

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2004.02.25	(73) Titular(es): VACCIBODY AS
(30) Prioridade(s): 2003.02.25 US 450134 P 2004.02.25 US 786907	GAUSTADALLEEN 21 N-0349 OSLO NO
(43) Data de publicação do pedido: 2005.11.30	(72) Inventor(es):
(45) Data e BPI da concessão: 2014.12.03 042/2015	(74) Mandatário: MARIA TERESA DELGADO AVENIDA DA LIBERDADE, Nº 69, 3º D 1250-140 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPO MODIFICADO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM NOVO TIPO DE MOLÉCULAS SEMELHANTES A ANTICORPOS RECOMBINANTES HUMANOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DE, ISTO É, MIELOMA MÚLTIPLO. ESTAS MOLÉCULAS, DESIGNADAS VACICORPOS, LIGAM-SE A APC (CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTIGÉNIO) E SÃO CAPAZES DE DESPOLETAR TANTO UMA RESPOSTA IMUNE DAS CÉLULAS T COMO DAS CÉLULAS B. ALÉM DISSO, VACICORPOS LIGAM-SE DE FORMA DIVALENTE ÀS APC PARA PROMOVER UMA INICIAÇÃO MAIS EFICIENTE DE UMA RESPOSTA IMUNE. ASSIM, UM OBJETIVO PRINCIPAL DA PRESENTE INVENÇÃO É INDUZIR UMA FORTE RESPOSTA IMUNE PARA TORNAR OS ADJUVANTES REDUNDANTES. OS VACICORPOS COMPREENDEM UM DÍMERO DE UMA UNIDADE MONOMÉRICA QUE CONSISTE NUMA UNIDADE DIRIGIDA COM ESPECIFICIDADE PARA UMA MOLÉCULA DE SUPERFÍCIE EM APC, LIGADA ATRAVÉS DE UMA REGIÃO CHARNEIRA E DE UM DOMÍNIO CY3 A UMA UNIDADE ANTIGÉNICA NA EXTREMIDADE COOH-TERMINAL; SENDO ESTA ÚLTIMA DE ORIGEM, POR EXEMPLO, DE UM LINFOMA DE CÉLULAS B OU MIELOMA (FIGURA I), APESAR DE SER POSSÍVEL QUALQUER ORIGEM DEVIDO AO SISTEMA DE CLONAGEM DE CASSETE NO VETOR DE EXPRESSÃO. A DITA MOLÉCULA É CAPAZ DE INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA MIELOMA MÚLTIPLO, MAS A EXTENSÃO A UMA ESTRATÉGIA DE VACINAÇÃO GERAL PARA QUALQUER POLIPEPTÍDEO DEVERÁ SER EXEQUÍVEL. A PRESENTE INVENÇÃO TAMBÉM SE REFERE A UMA SEQUÊNCIA DE ADN QUE CODIFICA ESTA MOLÉCULA BASEADA EM ANTICORPO RECOMBINANTE, AOS VETORES DE EXPRESSÃO QUE COMPREENDEM ESTAS SEQUÊNCIAS DE ADN, LINHAS CELULARES QUE COMPREENDEM OS DITOS VETORES DE EXPRESSÃO, AO TRATAMENTO DE MAMÍFEROS PREFERENCIALMENTE POR IMUNIZAÇÃO ATRAVÉS DE ADN DE VACICORPO, ARN DE VACICORPO OU PROTEÍNA DE VACICORPO E, FINALMENTE, A PRODUTOS FARMACÊUTICOS E A UM KIT QUE COMPREENDE AS DITAS MOLÉCULAS.

RESUMO**"ANTICORPO MODIFICADO"**

A presente invenção refere-se a um novo tipo de moléculas semelhantes a anticorpos recombinantes humanos úteis no tratamento de, isto é, mieloma múltiplo. Estas moléculas, designadas Vacicorpos, ligam-se a APC (células apresentadoras de antígeno) e são capazes de despoletar tanto uma resposta imune das células T como das células B. Além disso, Vacicorpos ligam-se de forma divalente às APC para promover uma iniciação mais eficiente de uma resposta imune. Assim, um objetivo principal da presente invenção é induzir uma forte resposta imune para tornar os adjuvantes redundantes. Os vacicorpos compreendem um dímero de uma unidade monomérica que consiste numa unidade dirigida com especificidade para uma molécula de superfície em APC, ligada através de uma região charneira e de um domínio Cy3 a uma unidade antigénica na extremidade COOH-terminal; sendo esta última de origem, por exemplo, de um linfoma de células B ou mieloma (Figura I), apesar de ser possível qualquer origem devido ao sistema de clonagem de cassete no vetor de expressão. A dita molécula é capaz de induzir uma resposta imune contra mieloma múltiplo, mas a extensão a uma estratégia de vacinação geral para qualquer polipeptídeo deverá ser exequível. A presente invenção também se refere a uma sequência de ADN que codifica esta molécula baseada em anticorpo recombinante, aos vetores de expressão que compreendem estas sequências de ADN, linhas celulares que compreendem os ditos vetores de expressão, ao tratamento de mamíferos preferencialmente por imunização através de ADN de vacicorpo, ARN de vacicorpo ou proteína de vacicorpo e, finalmente, a produtos farmacêuticos e a um kit que compreende as ditas moléculas.

DESCRIÇÃO**"ANTICORPO MODIFICADO"**

REFERÊNCIA

O presente pedido reivindica prioridade em relação ao pedido provisório U.S. N.º 60/450134, submetido a 25 de fevereiro de 2003.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à utilização terapêutica de ácidos nucleicos que codificam moléculas baseadas em anticorpo humano recombinante chamadas vacicorpos, que são capazes de despoletar uma resposta imune tanto das células T como das células B. Mais particularmente, os Vacicorpos codificados induzem por eles próprios respostas imunes fortes para as quais não são necessariamente precisos adjuvantes. A presente invenção também permite um método de tratar, por exemplo, mieloma múltiplo através das ditas vacinas de ácidos nucleicos que codificam os ditos Vacicorpos.

ANTECEDENTE DA INVENÇÃO

O mieloma múltiplo (MM) é um cancro da medula óssea no qual um único clone de célula do plasma se tornou maligno e produz imunoglobulina monoclonal (Ig). Pacientes com MM têm um prognóstico muito fraco. Apesar de poderem ser conseguidas elevadas taxas de resposta e sobrevivência aumentada utilizando elevadas doses de quimioterapia seguida de enxerto de células estaminais autólogas ou alogeneicas, na maioria dos pacientes observa-se reincidência e poucos, se alguns, são curados.

As células do mieloma produzem Ig monoclonal que é única para cada tumor e, por isso, para cada paciente individual. Ig é composta de duas cadeias pesadas idênticas (H) e duas cadeias leves idênticas (L). As cadeias L e H têm regiões variáveis (V) altamente diversificadas, V_L e V_H . V_L e V_H juntas formam o Fv (fragmento variável) que contém determinantes antigénicos

únicos chamados idiotopos (Id). Os idiotopos coletivamente constituem o idiotipo do Fv (da Ig *in casu*). A indução de uma resposta imune contra o idiotipo, a chamada vacinação Id é uma estratégia promissora no tratamento de linfomas das células B e MM (Bendandi, Gocke et al. 1999) (Tao e Levy 1993) (Huang, Wu et al. 2004) (Hakim, Levy et al. 1996) (King, Spellerberg et al. 1998) (Biragyn, Tani et al. 1999; Biragyn, Ruffini et al. 2002), e ambos anticorpos anti-idiotípicos (Sirisinha e Eisen 1971; Hough, Eady et al. 1976) e células T específicas de Id (Lauritzsen, Weiss et al. 1994) podem ser importantes. Contudo, Id é um auto-Ag fraco no seu contexto original (como parte de Ig). Portanto, para fins de vacinação, é importante potenciar a imunogenicidade de Id.

Células auxiliares T (células T CD4+) reconhecem os seus antígenos (Ag) depois deste ter sido processado através de engolfamento de proteínas estranhas por APC, quebra proteolítica em fragmentos peptídicos que são carregados em moléculas da classe II do MHC e transportadas para a superfície de APC onde o complexo péptido-MHC é apresentado aos recetores das células T (TCRs) das células T CD4+. As células T CD4+ ativadas estimulam células T citotóxicas (células T CD8+) e células B com a especificidade por Ag correspondente, iniciando uma resposta ampla contra o Ag original. Um problema grande respeitante à vacinação Id de pacientes com MM é que as células T CD4+ específicas de Id nestes pacientes, conforme extrapolado de experiências em ratinhos [18], provavelmente são tolerantes aos determinantes da região V de Id na proteína de mieloma altamente abundante. Os pacientes com MM que foram sujeitos a transplante de células estaminais autólogas (ASCT) podem estar numa fase vantajosa para a vacinação Id pelas duas razões seguintes: 1) alívio da tolerância das células T à proteína de mieloma Id e 2) desenvolvimento de novas células T que podem responder a vacinação Id.

Direcionar epítomos das células T para moléculas de superfície em APC com Troycorpos (Lunde, Munthe et al. 1999),

que estão equipados com um epítopo de células T incorporado num loop num domínio constante da Ig resulta em estimulação aumentada das células T por um fator de 100-100000 (Lunde, Rasmussen et al. 2001). Contudo, os Troycorpos não incluem o Ag na sua conformação nativa, tal como Fv, e estão, por isso, restringidos à indução das respostas das células T. Portanto, para induzir uma resposta das células B anti-Id e anti-Id Abs, é necessário incluir o Fv completo do componente M do paciente. Quanto à indução de uma resposta das células T anti-Id, uma inclusão do Fv inteiro aumentará grandemente a possibilidade de incluir sequências de idiotopo que se ligam às moléculas HLA do paciente, que é um pré-requisito para a ativação de células T específicas de Id.

Foram desenvolvidas várias abordagens para tornar os idiotipos mais imunogénicos. A vacinação proteica com imunoglobulinas (Ig) Id+ completas fundidas com fator estimulante de colónia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (Tao e Levy 1993) ou ligando CD40 (Huang, Wu et al. 2004) potencia o nível de anticorpos anti-Id e resulta na proteção contra linfoma das células B em ratinhos. Contudo, scFv-GM-CSF foi eficaz apenas quando injetado como proteína e não como uma vacina de ADN (Hakim, Levy et al. 1996). Por outro lado, a vacinação de ADN que emprega scFv fusionado com IL-1 β não induziu imunidade tumoral (Hakim, Levy et al. 1996). Noutra abordagem, scFv foi geneticamente fusionado com fragmento C da toxina do tétano e administrado como uma vacina de ADN por injeção intramuscular (i.m.). Esta estratégia resultou em níveis aumentados de anticorpos anti-Id, respostas CD4+ específicas de Id e proteção contra mielomas e linfoma em ratinhos. O mecanismo da atividade do adjuvante do fragmento C do toxóide tetânico é desconhecido (King, Spellerberg et al. 1998). Numa abordagem semelhante, o scFv foi fusionado a quimiocinas como MCP3, IP10 mDF2 β (Biragyn, Tani et al. 1999; Biragyn, Ruffini et al. 2002) e foi utilizado tanto como uma vacina de ADN como como uma de proteína (Biragyn, Tani et al.

1999). Em vários destes estudos, epítomos de células T estranhos correspondentes a fragmento-C do TT ou sequências de fusão únicas poderiam ter contribuído para as respostas. Foram observadas respostas de anticorpo anti-Id e de proteção tumoral aumentadas. O mecanismo de ação do scFv-quimiocina é desconhecido. Uma possibilidade é que a fração da quimiocina direcione o Fv para recetores de quimiocina nas APC para entrega potenciada de scFv. Em alternativa, as quimiocinas atraem APC para o local de injeção. Contudo, tanto as estratégias de fusão com Fragmento C como com quimiocina dependem da ligação monovalente às suas moléculas alvo (King, Spellerberg et al. 1998; Biragyn, Tani et al. 1999). Isto é preocupante, porque se mostrou que a reticulação é importante para a estimulação ótima das células T, por exemplo, para Troycorpos (Lunde, Munthe et al. 1999).

Tendo em conta estas considerações, os inventores desenharam um novo tipo de moléculas tipo anticorpo recombinante chamadas Vacicorpos, uma molécula divalente que compreende uma charneira flexível, sem ligação FcR e que contém o Ag na sua conformação nativa, com o fim de induzir ambas respostas das células T e de Ab específico de Id fortes. Os vacicorpos são macromoléculas grandes e complexas, mas, surpreendentemente, as células foram capazes de produzir e exportar moléculas intactas.

"Vaccibodies: future vaccines for B cell lymphoma and myeloma?" por Brunsvik A et. al. é um poster publicado no dia 5 de fevereiro de 2003 em Banff. O poster revela um estudo imunológico sobre a imunogenicidade das moléculas derivadas de anticorpo designadas "vacicorpos" que transportam scFv (Id) da proteína de mieloma M315.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é baseada na construção de um novo tipo de moléculas tipo anticorpo recombinante humano úteis no tratamento de, isto é, mieloma múltiplo. Estas moléculas, chamadas Vacicorpos, ligam-se a APC e são capazes de despoletar

ambas respostas imunes das células T e das células B. Além disso, os vacicorpos ligam-se de forma divalente a APC para promover uma iniciação mais eficiente de uma resposta imune. Assim, um objetivo fundamental da presente invenção é induzir uma forte resposta imune para tornar os adjuvantes redundantes. Os vacicorpos compreendem um dímero de uma unidade monomérica que consiste numa unidade dirigida com especificidade por uma molécula de superfície em APC, ligada através de uma região charneira e de um Cy3 domínio a uma unidade antigénica na extremidade COOH-terminal; sendo esta última de, por exemplo, origem de linfoma das células B ou mieloma (Figura 1), apesar de ser possível qualquer origem devido ao sistema de clonagem de cassete no vetor de expressão. A dita molécula é capaz de induzir uma resposta imune contra mieloma múltiplo, mas deveria ser exequível a extensão a uma estratégia de vacinação geral para qualquer polipeptídeo. Também são reveladas uma sequência de ADN que codifica esta molécula baseada em anticorpo recombinante, vetores de expressão que compreendem estas sequências de ADN, linhas celulares que compreendem ditos vetores de expressão, tratamento de mamíferos preferencialmente por imunização através de ADN de vacicorpo, ARN de vacicorpo ou proteína de vacicorpo e finalmente produtos farmacêuticos e um kit que compreende as ditas moléculas.

No seu âmbito mais alargado, a presente invenção refere-se, assim, a um ácido nucleico na forma de um plasmídeo de ADN nú para utilização como um terapêutico, em que o ácido nucleico codifica uma unidade monomérica de uma molécula baseada em anticorpo recombinante dimérico que compreende duas de ditas unidades monoméricas ligadas através de um motivo de dimerização que consiste numa região charneira derivada de Ig e num domínio Cy3, compreendendo dito motivo de dimerização uma região charneira e um domínio Cy3 de cada unidade monomérica, em que cada região charneira contribui para a dimerização através de pontes dissulfido para a outra região charneira e cada domínio Cy3 contribui para a dimerização através de

interações hidrofóbicas com o outro domínio Cy3, e em que ditas unidades monoméricas cada consistem numa unidade dirigida com especificidade por uma molécula de superfície numa célula apresentadora de antígeno, ligada através de dita região charneira e dito domínio Cy3 a uma unidade antigénica no COOH-terminal, e em que ditas unidades monoméricas cada carecem de um domínio CH2.

Num aspeto semelhante, a presente invenção refere-se à utilização do ácido nucleico definido anteriormente para fabricar um medicamento para tratar cancro ou uma doença infecciosa.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1 A estrutura do vacicorpo. Os dois scFvs a branco dirigem o Vacicorpo a moléculas de superfície no APC. Podem ser substituídas por outras moléculas alvo, por exemplo, recetores de quimiocina. A charneira providencia flexibilidade da orientação relativa dos dois scFvs NH₂-terminal e pontes dissulfido ligam os monómeros. Os domínios C_H3 (cinzento claro) atuam como um espaçador entre os scFvs NH₂ e COOH terminal e participam na dimerização através de interações hidrofóbicas. Estes motivos de dimerização podem ser substituídos por outros domínios de dimerização ou multimerização. Os dois scFvs mostrados a cinzento escuro são a fração antigénica do Vacicorpo. Estes scFvs são derivados do componente M, albergando, assim, sequências idiotípicas (preto). O scFv antigénico pode ser substituído por qualquer polipeptídeo derivado de uma fonte antigénica, conferindo estratégias de vacina em direção a qualquer antígeno.

Figura 2 Princípio. O Vacicorpo é direcionado a moléculas de superfície em APC, o complexo é preparado por endocitose mediada por recetor, processado e péptidos Id são apresentados a células T CD4+ na classe II do MHC. Ao mesmo tempo, o Id pode estimular células B com um BCR anti-Id. Estas células B também servirão como APC para as células T CD4+. Assim, as

células T e B cooperarão para potenciar a resposta, conforme indicado. Consequentemente, desenvolver-se-ão células B anti-Id em células do plasma que produzem anticorpos anti-Id.

Figura 3 Os Vacicorpos específicos da classe II do MHC ligam esplenócitos CD19⁺ (branco). Os Vacicorpos específicos de NIP (controles negativos - cinzento), não se ligam aos esplenócitos. A ligação foi detetada com estreptavidina PE e 9A8bio que é um mAb de ratazana que liga o Fv antigénico de origem M315 (V λ 1/2).

Figura 4 Os Vacicorpos controlo específicos de NIP exibem ligação ao hapteno NIP. Sobrenadante de células transfetadas com genes que codificam vacicorpos específicos de NIP foi adicionado a placas ELISA revestidas com NIP-BSA. 9A8 bio (antiV λ 1/2) foi utilizado como o Ab secundário. Foram obtidos resultados semelhantes com um anti IdAb biotinilado (Ab2.1-4 bio).

Figura 5 Os Vacicorpos exibem ligação a DNP, portanto o scFv antigénico é dobrado corretamente. O M315 Ab, do qual o scFv antigénico é derivado, é específico para o hapteno DNP. Placas ELISA foram revestidas com DNP-BSA. Sobrenadantes de células transfetadas com genes que codificam vários Vacicorpos foram adicionados. A ligação foi detetada com 9A8 bio.

Figura 6 APC pulsado com quantidades tituladas de Vacicorpos específicos da classe II do MHC estimulou células T específicas de M315 polarizadas de ratinhos SCID transgénicos TCR >100-1000 vezes melhor do que os Vacicorpos controlo não dirigidos específicos de NIP. Não houve diferenças significativas entre os Vacicorpos com uma sequência longa antes da primeira ponte dissulfido na charneira (h1+h4) comparado com os Vacicorpos com uma sequência charneira curta acima da primeira ponte dissulfido (h4).

Figura 7 Os vacicorpos específicos da classe II do MHC induzem uma forte resposta anti-Id Ab na ausência de adjuvante.

Ratinhos BALB/c foram injetados com Vacicorpos, 20 µg e 200 µg, respectivamente. Foram recolhidas amostras de sangue em diferentes pontos de tempo para análise dos soros. São mostrados dados de soros recolhidos no dia 28, 14 dias após a segunda imunização dos vacicorpos. Os vacicorpos específicos da classe II do MHC induziram uma forte resposta anti-Id Ab. Os vacicorpos com a charneira mais longa (h1+h4) induziram a resposta anti-Id Ab mais forte atingindo 3-4 µg/ml nos soros.

Figura 8 Construção das duas variantes charneira-Cy3 derivadas de hIgG3 por PCR. Os moldes foram de pUC19 contendo regiões constantes hIgG3 modificadas foram o exão h4 foram ligados ao domínio CH3 (A) ou o exão h1 foram ligados ao exão h4 ligado ainda ao domínio CH3 (B) (Olafsen T et al, 1998). Os iniciadores inseriram locais das enzimas de restrição HindIII (5') e SfiI (3'). A charneira e domínio CH3 são ligados por um triplicado dos aminoácidos GlyGlyGlySerSer.

Figura 9 Construção dos segmentos charneira-Cy3 derivados de mIgG2b. A charneira e os genes CH3 foram amplificados a partir de um vetor pUC18 contendo a região constante de mIgG2b por PCR com dois iniciadores que codificam um local das enzimas de restrição HindIII (5') e SfiI (3'). Os dois fragmentos PCR foram unidos por PCR SOEing. Nesta reação, a charneira e o domínio C_h3 foram ligados por uma triplicação dos aminoácidos Gly-Gly-Gly-Ser-Ser.

Figura 10 Construção do scFv derivado da proteína de mieloma M315. O ADNc que funcionou como um molde nas reações de PCR foram derivados do ARNm extraído de células MOPC315.4. As regiões V foram unidas por PCR SOEing resultando num scFv. Nesta reação, as regiões V foram ligadas por um triplicado de GlyGlyGlyGlySer. Além disso, os fragmentos do gene que codifica o scFv completo foram flanqueados por locais das enzimas de restrição SfiI e SalI.

Figura 11 Junção dos segmentos charneira-Cy3 e o M315 scFv por PCR SOEing. Esta reação introduziu o local 5' SfiI da

região que codifica o scFv antigénico.

Figura 12 Subclonagem de charneira-Cy3-M315 scFv em pUC19. Três motivos de dimerização diferentes foram incluídos, derivados de mIgG2b ou IgG3. Em todos os casos, consistiram da charneira seguida de um triplicado de GlyGlyGlySerSer e CH3. Duas charneiras diferentes foram derivadas de hIgG3, uma consistindo de h1 ligado a h4 e uma consistindo de apenas h4.

Figura 13 Remoção de dois locais inconvenientes da enzima de restrição BamHI dentro do fragmento do gene que codifica o scFv antigénico por QuickChange PCR.

Figura 14 Introdução do codão de terminação, uma SfiI e um local da enzima de restrição BamHI a jusante da região codificante por QuickChange PCR.

Figura 15 Subclonagem na cassete C do vetor de expressão pLNOH₂ em HindIII-BamHI

Figura 16 Clonagem das regiões V específicas para NIP e MHCII. As regiões V foram amplificadas e unidas por PCR soeing resultando em scFvs. O ligante que liga as regiões V consiste de um triplicado de GlyGlyGlyGlySer. Os fragmentos do gene que codifica os scFvs completos são flanqueados por locais BsmI/MunI e BsiWI. Os ligantes e locais de restrição foram introduzidos nas reações de PCR.

Figura 17 Subclonagem no vetor de expressão pLNOH₂ em BsmI/MunI e BsiWI

Figura 18 A construção final do vacicorpo

Figura 19 Figura detalhada da construção do gene do vacicorpo. A unidade dirigida é inserida entre os locais da enzimas de restrição BsmI/MfeI e BsiWI (a cassete V do vetor pLNOH₂). O charneira-Cy3-Fv³¹⁵ é inserido entre os locais HindIII e BamHI na cassete C de pLNOH₂. A charneira e o domínio Cy3, bem como os dois scFv são ligados com ligantes (G₄S)₃ (caixas pretas). O Cy3 e o Fv³¹⁵ estão ligados através de um ligante GLSGL. O Fv³¹⁵ é inserido entre dois locais da enzima de restrição SfiI não idênticos. A unidade antigénica e motivo de dimerização podem ser de qualquer origem

apropriada. Além disso, podem ser empregues fragmentos funcionais de Cy3 ou uma sequência que é substancialmente homóloga à sequência de Cy3 ou fragmentos de Cy3.

Figura 20 Vacicorpos são segregados como moléculas funcionais. Dois vacicorpos distintos foram testados, um transportando o Fv^{NIP} específico de hapteno como unidade dirigida, enquanto o outro transportava o Fv^{I-E} específico da classe II do MHC como unidade dirigida. Ambos transportavam o scFv de M315 (Fv³¹⁵) como unidade antigénica. a) 10% SDS-PAGE de Vacicorpos rotulados metabolicamente imunoprecipitados a partir de sobrenadantes de cultura de transfetantes com ou sem redução de ligações dissulfido por mercaptoetanol (ME). b) a especificidade por DNP dos vacicorpos foi medida por ELISA. Os sobrenadantes de células NSO transfetadas com vacicorpos foram adicionados a placas de ELISA revestidas com DNP-BSA. Os dados são ilustrados como média de triplicados e as barras de erro indicam erro-padrão da média. c) a especificidade por NIP foi medida por ELISA. Placas de ELISA foram revestidas com NIP-BSA. Vacicorpos em ambos b) e c) foram detetados por 9A8-bio (α V λ 1/2) ou Ab2.1-4 (específico para Id de Fv³¹⁵) Fv³¹⁵ transporta V λ 2 e Fv^{NIP} transporta V λ 1 e ambos ligarão 9A8 mAb. Apenas Fv315 ligará Ab2.1-4 mAb. Fv^{I-E} transporta V κ não se ligará a nenhum dos mAbs.

Figura 21 Produção de vacicorpos por injeção intramucular de plasmídeos de ADN nus seguida de eletroporação *in vivo*. Amostras de soro foram recolhidas no dia 14. Plasmídeos de vacicorpo foram injetados em ratinhos BALB/c I-E^d positivos, que foram subsequentemente eletroporados. a) Nível de vacicorpos nos soros foi medido por ELISA, com DNP-BSA e 9A8bio, conforme descrito previamente. b) As mesmas amostras de soros do dia 14 foram analisadas para anticorpos anti-Id por ELISA. As placas de microtítulo foram revestidas com M315 e 187-bio (Ab κ anti-ratinho) foi utilizado para deteção. c) Comparação de níveis de vacicorpo detetáveis e anticorpos anti-Id. A quantidade de vacicorpos detetáveis nos soros é

mostrada no eixo dos y e o nível de α Id-Abs é mostrado no eixo dos x.

Figura 22 Evitação do tumor. Ratinhos BALB/c foram imunizados uma vez com plasmídeos nus que codificam vacicorpos específicos da classe II do MHC ($Fv^{1-E} Fv^{315}$), vacicorpos específicos de NIP não alvos ($Fv^{NIP} Fv^{315}$) ou 0,9% NaCl por imunização i.m. nos dois músculos quadríceps (25 μ g/músculo) seguida de eletroporação *in vivo*. Foram desafiados com $1,6 \times 10^5$ MOPC315.4 células de mieloma s.c. e a toma do tumor do primeiro dia foi registada. Um tumor de >3 mm foi classificado como toma de tumor positiva.

Figura 23 Indução de imunidade protetora contra o plasmacitoma MOPC315.4. Ratinhos BALB/c foram imunizados uma vez com plasmídeo nus que codificam vacicorpos específicos da classe II do MHC ($Fv^{1-E} Fv^{315}$), vacicorpos específicos de NIP não alvos ($Fv^{NIP} Fv^{315}$) ou 0,9% NaCl por imunização i.m. nos dois músculos quadríceps (25 μ g/músculo) seguida de eletroporação *in vivo*. Foram desafiados com $1,6 \times 10^5$ MOPC315.4 células de mieloma s.c. e as suas sobrevivências foram comparadas.

Figura 24 Nível de proteína de mieloma M315 nos soros de ratinhos no a) dia 18 e b) dia 24 após desafio com MOPC315.4 em ratinhos BALB/c vacinados i.m. com plasmídeos vacicorpo seguido de eletroporação *in vivo*. M315 em amostras de soros foram medidos por ELISA revestida com anti-Id-mAb (Ab2.1-4) e detetados por anti-IgA mAb biotinilados (8D2).

Figura 25 Vacicorpos de quimiocina são segregados como moléculas funcionais. MIP-1 α Fv^{315} tem proteína inflamatória de macrófago de ratinho 1 α como a unidade dirigida e scFv de M315 (Fv^{315}) como a unidade antigénica. A funcionalidade de MIP- 1 α no formato de vacicorpo foi medida em ELISA. Os sobrenadantes das células 293E transfetadas com vacicorpos foram adicionados a placas de ELISA revestidas com MIP-1 α mAb anti-ratinho (R&D Systems) e detetados por 9A8-bio (α V λ 1/2).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção é baseada na construção de moléculas baseadas em anticorpo humano recombinante, chamadas Vacicorpos, que compreendem dímeros de uma unidade monomérica que consiste num variável de fragmento de cadeia única (scFv) de imunoglobulinas (Ig) com especificidade para moléculas de superfície em células apresentadoras de Ag (APC), ligado através de uma região charneira e um domínio Cy3 a um scFv na extremidade COOH-terminal, sendo esta última derivada de uma proteína de mieloma (Figura 1), apesar de ser possível qualquer origem devido ao sistema de clonagem da cassete do vetor de expressão. A região charneira e os domínios Cy3 (domínio C carboxiterminal da Ig) contribuem para a dimerização do vacicorpo através de pontes dissulfido na charneira e de fortes interações hidrofóbicas entre os dois domínios Cy3. Assim, o produto dimérico incluirá dois scFvs preferencialmente idênticos com especificidade de ligação pelas mesmas moléculas de superfície no APC (Figura 2), permitindo a ligação bivalente. A ligação bivalente (isto é, reticulação) é importante para despoletar a ativação da célula alvo e iniciar, assim, uma resposta imune. Além disso, ligação bivalente providencia força de ligação aumentada devido aos efeitos de avidéz e aumenta a probabilidade de endocitose mediada por recetor no APC e subsequente degradação dentro do APC. Além disso, a ligação bivalente pode providenciar sinalização intracelular mediada por recetor importante ao APC. Os scFvs com uma função de direção são derivados ou de anticorpos monoclonais que expressam hibridomas das células B (mAbs) que se ligam a moléculas de superfície no APC ou podem ser derivados a partir de qualquer fonte, por exemplo, bibliotecas de exibição de fago. A utilização de scFvs de hibridomas das células B como a fração alvo abre para uma gama ampla de alvos possíveis devido à grande coleção de hibridomas das células B que produzem mAbs que ligam diferentes moléculas de superfície no APC. Além disso, é possível escolher a natureza do sinal dado

à célula alvo empregando mAbs agonísticos ou antagonísticos. Um maior conhecimento das interações Ab-Ag permitirão a melhoria da afinidade de ligação de tais mAbs aos seus Ag por substituições de aminoácidos nos locais de ligação. Isto pode ser realizado por mutagênese sítio-dirigida convencional. Para fins de vacinação, uma abordagem apelativa é dirigir os vacicorpos a moléculas de superfície expressas exclusivamente nos subconjuntos de células dendríticas (DC) que são capazes de iniciar uma resposta imune forte, específica em direção à própria Id dos pacientes. Exemplos de tais moléculas de superfície alvo no APC são HLA, por exemplo HLA-DP, CD14, CD40, recetores do tipo Toll, por exemplo, recetor do tipo Toll 2 ou recetores de quimiocina. O vacicorpo pode ser dirigido para tais moléculas de superfície através de unidades dirigidas que compreendem, por exemplo, regiões de ligação de anticorpo com especificidade por, por exemplo, HLA, HLA-DP, CD14, CD40 ou recetor do tipo Toll; ligandos, por exemplo, ligando CD40 solúvel; ligandos naturais como quimiocinas, por exemplo, RANTES ou MIP-1a; ou antígenos bacterianos como, por exemplo, flagelina ou uma parte da mesma. Porque a unidade dirigida é inserida na cassete V do vetor de expressão pLNOH₂ (Norderhaug, Olafsen et al. 1997), é facilmente trocada com outras unidades (Figura 17).

Os motivos de dimerização cruciais nos vacicorpos construídos nos exemplos a seguir incluem regiões charneiras e um domínio de imunoglobulina (por exemplo, domínio C γ 3), por exemplo, domínio C carboxiterminal (domínio C H 3) ou uma sequência que é substancialmente homóloga a dito domínio C. A charneira é derivada de Ig e contribui para a dimerização através da formação de uma ligação(ões) covalente intercadeia, por exemplo, ponte(s) dissulfido. Além disso, funciona como um espaçador flexível entre os domínios permitindo os dois scFvs com tarefas alvo para ligar simultaneamente a duas moléculas alvo expressas com distâncias variáveis (Figura 2). Os domínios de imunoglobulina contribuem para a homodimerização através de

interações não covalentes, por exemplo, interações hidrofóbicas. Numa modalidade preferida, o domínio C_H3 é derivado de IgG. Estes motivos de dimerização podem ser trocados com outras frações de multimerização (por exemplo, a partir de outros isotipos/subclasses de Ig).

O scFv C-terminal derivado de Ig monoclonal produzido por células de mieloma ou linfoma, também designadas o componente M mieloma/linfoma, pode ser trocado geneticamente com outros scFvs ou outro antígeno, porque o vetor foi construído com um local de restrição Sfi I (Figura 8). Portanto, o scFv derivado da proteína de mieloma modelo utilizado no presente exemplo é facilmente trocado com scFv do componente M de qualquer paciente com linfoma das células B ou mieloma múltiplo. Assim, este vetor permitirá uma construção rápida de vacinas específicas de pacientes individuais. A estrutura dimérica do vacicorpo não só suporta reticulação, mas deveria também permitir carregamento duplo do Fv do paciente para o APC por molécula de vacicorpo comparado com um único scFv combinado com uma única fração alvo. Além disso, existe num único vacicorpo duplicação de determinantes idiotípicos serológicos, que podem ser importantes para a resposta anti-Id das células B. Os vacicorpos carecem de um domínio C_H2 e assim todos os locais de ligação a FcR e deveriam, portanto, ser preparados exclusivamente através das suas moléculas alvo, tais como classe II do MHC no exemplo utilizado e não por quaisquer FcRs, assegurando que uma grande proporção da vacina chegará às células alvo pretendidas. Isto é em contraste com vacinas que exercem o seu efeito através da ligação com um FcR numa célula alvo (Ravetch e Bolland 2001).

Os vacicorpos podem ser estendidos para um tratamento médico geral através da indução de uma resposta imune contra qualquer polipeptídeo de qualquer origem. É possível substituir o scFv idiotípico com outras sequências antigénicas de comprimento suficiente para permitir a dobragem adequada dos polipeptídeos. Esta sequência pode ser derivada de outras

proteínas cancerígenas ou agentes infecciosos. Exemplos de tais sequências cancerígenas são telomerase, mais especificamente hTERT. Os agentes infecciosos podem ser de origem bacteriana, por exemplo, antígenos de tuberculose, ou de origem viral, mais especificamente sequências derivadas de HIV como, por exemplo, sequências derivadas de gp120. A inserção de tais sequências num formato vacicorpo também podem conduzir à ativação de ambos os braços da resposta imune, semelhante aos vacicorpos que são descritos aqui que compreendem o scFv idiотípico. Imunização através de proteína de vacicorpo, ADN de vacicorpo ou ARN de vacicorpo, as últimas duas executadas, por exemplo, por injeção intramuscular seguida de eletroporação (Ver Exemplos) são todos métodos exequíveis.

Os scFvs na extremidade NH₂-terminal dos vacicorpos dirigem os vacicorpos ao APC através da ligação a moléculas de superfície (Figura 2) e no exemplo mostrado eles ligam-se à classe II do MHC. A classe II do MHC é expressa em todo o APC profissional, pelo que os vacicorpos descritos aqui são capazes de dirigir células B, DC e macrófagos. A direção de complexos Ag-Ab convencionais à classe II do MHC induz a ativação de células T CD4+ específicas (Snider e Segal 1987; Casten e Pierce 1988). A direção de Troycorpos à classe II do MHC foi previamente mostrada potenciar a apresentação do Ag e a ativação das células T *in vitro* bem como *in vivo* (Lunde, Western et al. 2002). Na região antigénica da molécula, os vacicorpos dos exemplos contêm o scFv da proteína de mieloma M315 derivada do plasmacitoma BALB/c MOPC315.4. A cadeia leve $\lambda 2^{315}$ de M315 alberga três mutações somáticas definidas no loop CDR3 e funciona como um epítipo modelo das células T idiотípicas num sistema bem definido (Bogen, Malissen et al. 1986; Bogen e Lambris 1989).

Os vacicorpos foram montados geneticamente e o ADN transfetado em células NSO, células 293E e células Cos-7. Os transfectantes produzem e segregam as moléculas de vacicorpo recombinantes. Os scFvs alvo numa extremidade dos vacicorpos

exibem ligação à classe II do MHC (Figura 3). O scFv antigénico na outra extremidade do vacicorpo liga DNP (di-nitro-fenilo, a especificidade de M315) (Figura 5). Assim, tanto os scFv alvo como antigénicos retêm o mesmo padrão de dobragem que no seu contexto original. Temos evidências de que os vacicorpos têm a capacidade de induzir respostas das células T fortes através da sua ligação ao APC e apresentação de péptidos Id em moléculas de classe II a células T CD4+ específicas de Id *in vitro* (Figura 6). Além disso, uma vez que têm Fv intacto do componente M, eles despoletam anticorpos anti-Id em quantidades significativas *in vivo* quando injetados em ratinhos BALB/c sem adjuvantes (Figura 7).

Para determinar se pacientes com MM tratados com ASCT conseguem remissão com uma concentração baixa de proteína de mieloma no soro, deveria ser realizada ELISA para cada proteína de mieloma do paciente, porque os ensaios de rotina (eletroforese em gel de agarose, combinado com imunofixação) têm apenas uma sensibilidade de cerca de 0,2-1 mg/ml, o que é muito insensível. Os dados cinéticos dos níveis da proteína de mieloma no soro indicarão se e quando a vacinação Id pode ser melhor realizada após o ASCT para evitar o problema da tolerância das células T de emigrantes tímicos recentemente educados. Para conseguir isto, os ratinhos foram imunizados com ADN que codifica vacicorpos específicos do paciente por eletroporação *in vivo* de células musculares. Os soros de ratinhos imunizados são absorvidos em Ig-Sefarose anti humana para remover anticorpos retro-reativos e daí em diante eluídos para obter anticorpos específicos de Id altamente purificados. ELISAs em sandwich específicas para cada mieloma do paciente são realizadas como se segue: O anti-Id Ab purificado de ratinhos é revestido em poços. O soro do paciente *in casu* é adicionado. A proteína de mieloma que se liga a anticorpos anti-Id será detetada pela utilização de Ab específico para IgG ou IgA humana. A sensibilidade de tais ELISAs em sandwich é normalmente $< 1 \text{ ng/ml}$, que é $> 10^6$ vezes mais sensível do que

os ensaios de rotina. Além disso, para monitorizar o desenvolvimento de novas células T, o perfil das células T no sangue será monitorizado por citometria de fluxo com mAbs específicos de V β , em combinação com outros marcadores.

A presente invenção providencia um produto farmacêutico que compreende as sequências de ADN/ARN recombinantes descritas anteriormente ou vetores de expressão, de acordo com a invenção. Onde apropriado, este produto farmacêutico compreende adicionalmente um veículo farmaceuticamente compatível. Veículos adequados e a formulação de tais produtos farmacêuticos são conhecidos de uma pessoa habilitada na arte. Veículos adequados são, por exemplo, soluções de sal comuns tamponadas com fosfato, água, emulsões, por exemplo, emulsões óleo/água, agentes humidificantes, soluções estéreis, etc. Os produtos farmacêuticos podem ser administrados oralmente ou por via parentérica. Os métodos da administração parentérica compreendem a administração tópica, intra-arterial, intramuscular, subcutânea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal ou intranasal. A dose adequada é determinada pelo médico assistente e depende de diferentes fatores, por exemplo da idade, do sexo e peso do paciente, do tipo de administração, etc. Além disso, a presente invenção providencia uma composição de vacina contra cancro ou doenças infecciosas que compreende uma quantidade imunologicamente eficaz do ácido nucleico que codifica a molécula da invenção ou degenera variantes da mesma, em que dita composição é capaz de despoletar ambas respostas imunes das células T e células B.

Também é descrito um método de preparar a molécula recombinante que compreende transfetar o vetor que compreende os ácidos nucleicos descritos aqui numa população de células; cultivar a população de células; recolher a proteína recombinante expressa da população de células; e purificar a proteína expressa.

As sequências nucleotídicas descritas anteriormente podem ser preferencialmente inseridas num vetor adequado para terapêutica génica, por exemplo, sob o controlo de um promotor específico e introduzidas nas células. Para o fim da terapêutica génica, as sequências de ADN/ARN para utilização da invenção também podem ser transportadas para as células alvo na forma de dispersões coloidais. Elas compreendem, por exemplo, lipossomas ou lipoplexos.

Numa modalidade preferida da presente invenção, construção de ADN nú de vacicorpo é utilizada num método onde é injetada por via intramuscular em ratinhos, ao que o local de injeção é sujeito a eletroporação *in vivo*. Esta vacinação de ADN resultou na produção de proteína de vacicorpo que conferiu imunidade protetora salva-vidas a uma maioria dos ratinhos. Mais especificamente, o exemplo 4 demonstra que após uma única injeção de plasmídeo de vacicorpo nos quadríceps e eletroporação, a proteína do vacicorpo $F_v^{NIP} F_v^{315}$ foi detetada em quantidades significativas no soro, ao passo que não foi detetado $F_v^{I-E} F_v^{315}$ (Figura 21a). Além disso, o exemplo 5 mostra a presença de anticorpos anti-Id no soro após injeção de ADN de vacicorpo por via intramuscular e eletroporação. Em conjunto, os resultados demonstram um efeito formidável de dirigir a células positivas da classe II do MHC (I-E^d) para desenvolvimento de uma forte resposta humoral. Além disso, o exemplo 6 mostra que a proteção contra mieloma pode ser conseguida por vacina de ADN i.m. seguida de eletroporação e que a proteção requer dirigir scFv derivado de tumor a APC. O exemplo 7 demonstra que as quimiocinas são funcionais como unidades dirigidas no formato vacicorpo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ratinhos

BALB/cABom foram de Bomholtgaard (Ry, Dinamarca). Os ratinhos transgénicos TCR específicos de $\lambda 2^{315}$ num fundo BALB/c (Bogen, Gleditsch et al. 1992) foram criados nas nossas instalações animais.

Linhas celulares

O hibridoma 14-4-4S (Ozato, Mayer et al. 1980) e células NSO foram compradas da Coleção de Culturas Tipo Americana (ATCC, Manassas, VA). As células 293E, uma variante da linha celular 293 que expressa a proteína EBNA1 do vírus Epstein-Barr.

Construção de vacicorpos

O gene para a charneira hIgG3 e domínio C_H3 foi clonado do vetor pUC19 contendo charneira geneticamente combinada com genes C_γ3 da subclasse hIgG3 (Olafsen, Rasmussen et al. 1998). Foram feitas duas variantes do comprimento da charneira nos vacicorpos humanizados; uma com apenas o exão h4 ligado ao domínio C_H3 (sh) e uma com ambos exões h1 e h4 ligados ao domínio C_H3 (lh) (Figura 8). Os iniciadores incluíram locais de enzima de restrição (sublinhado): 5'h4: tag caa gct tgg cca gcg cag gga g; 3'CH3: cag gcc acc gag gcc ttt acc cgg aga cag gga. O exão h1 foram introduzidos diretamente a montante do exão h4 por QuickChange PCR utilizando estes iniciadores Qh1a: ctccaatcttctctctgca **gag ctc aaa acc cca ctt ggt gac aca act cac aca** gag ccc aaa tct tgt gac ac e Qh1b: gt gtc aca aga ttt ggg ctc **tgt gtg agt tgt gtc acc aag tgg ggt ttt gag ctc** tgcagagagaagattgggag.

Os vacicorpos murinos têm uma charneira e domínio C_H3 completos da subclasse mIgG2b apanhados por PCR a partir de um vetor pUC18 que contém os genes C_γ2b (Figura 9). Os iniciadores incluíram locais de enzima de restrição (sublinhado) ou ligantes (negrito) com as sequências complementares (itálico): 5'charneira: tagcaagctt ca gag ccc agc ggg ccc; 3'hinge: **5'tcc acc tcc gct gct tcc** acc gcc tgg gca ttt gtg aca ctc ctt g; 5'C_H3: **gga agc agc gga ggt gga** agt gga ggg cta gtc aga gct cca ca; 3'C_H3: cag gcc acc gag gcc acc cgg aga ccg gga gat g. A charneira e o domínio C_H3 foram depois unidos por PCR SOEing.

Os genes da região V antigénica foram clonados a partir do plasmacitoma MOPC315.4 (Eisen, Simms et al. 1968). As regiões V foram obtidas extraíndo ARNm da linha celular MOPC315.4 com

pérolas Dyna (Dyna) magnéticas revestidas com oligo (dT). ADNc de primeira cadeia foram depois feitos e utilizados como molde para amplificação por PCR dos genes da região V utilizando iniciadores específicos que emparelham as extremidades exatas das sequências da região V de M315. Os iniciadores incluíram locais de enzima de restrição (sublinhado) ou ligantes (negrito) com as sequências complementares (itálico). As sequências iniciadoras foram: 5'V_H: ggc ctc ggt ggc ctg gat gta cag ctt cag gag tca; 3'V_H: **gcc aga gcc acc tcc gcc_aga tcc gcc tcc acc** tga gga gac tgt gag agt ggt; 5'V_L: **ggc gga ggt ggc tCt ggc_ggt ggc gga tcc** cag gct gtt gtg act cag gaa; 3'V_L: gacg tcgac tag gac agt gac ctt ggt tcc. Os genes V_H e V_L foram depois unidos por PCR soeíng a um formato scFv (Figura 10).

As sequências complementares nas etiquetas 3' da região codificante Cy3 coding e 5' da região codificante M315 V_H permitiu o scFv de M315 ser combinado com os três genes charneira-C_H3 diferentes por PCR SOEíng (Figura 11). Os produtos desta reação foram depois digeridos com HindIII e SalI e subclonados num vetor pUC19 (Figura 12). Dois locais de enzima de restrição BamHI dentro das regiões V de M315 foram removidos por QuickChange PCR (Figura 13) utilizando iniciadores: BamHI V_L1: at gcc aac tgg ata caa gaa aaa cc; BamHI V_L2: gg ttt ttc ttg tat cca gtt ggc at, BamHI V_H1: tgg aac tgg ata cgg cag ttt cc e BamHI V_H2: gg aaa ctg ccg tat cca gtt cca. Uma QuickChange PCR seguinte utilizando iniciadores: 3'V_L terminaçãol: gtc act gtc cta tga ggcctgcagggcc ggatcc gtcgactctag e 3'V_L terminaçãol2: cta gag tcc ac ggatcc ggcctgcagggcc tca tag gac agt gac, foram depois realizados para introduzir um codão de terminação (negrito), uma SfiI e um local de enzima de restrição BamHI (sublinhado) a jusante da região codificante (Figura 14).

A construção final é depois digerida com HindIII e BamHI e subclonada no vetor de expressão pLNOH₂ (Figura 15) (Norderhaug, Olafsen et al. 1997).

Os genes da região V que providenciam especificidade pela classe II do MHC foram previamente clonados a partir do

hibridoma 14-4-4S (Lunde, Western et al. 2002), que produz um Ab específico para a cadeia E α (determinante Ia.7) da molécula da classe II do MHC I-E (Ozato, Mayer et al. 1980). Iniciadores específicos que emparelham com as extremidades exatas das sequências da região V com etiquetas desenhadas para incluir locais de enzimas de restrição (sublinhado) ou sequências ligantes (negrito) com as sequências complementares (itálico). As sequências iniciadoras foram: 5'V_L: gac att caattg *aca* cag tct tct cct gct tcc; 3'V_L: **gcc aga gcc acc tcc gcc** *aga* tcc gcc tcc acc ttt gat ttc cag ctt ggt gcc; 5'V_H: **ggc gga ggt ggc tct ggc** ggt ggc gga tcg cag gtc cag ctg cag cag t; 3'V_H: ga cgtacg actcacc tga gga gac ggt gac tga gg. Os genes da região V que conferem especificidade pelo hapteno NIP (Neuberger 1983) foram desenhados com as sequências etiqueta semelhantes exceto para o iniciador 5'V_L: 5'V_L: ggtg tgcattcc cag gct gtt gtg act cag gaa; 3'V_L: **gcc aga gcc acc tcc gcc** *aga* **tcc gcc tcc** acc tag gac agt cag ttt ggt acc t; 5'V_H: **ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg** cag gtc caa ctg cag cag cc; 3'V_H: ga cgtacg a ctc acc tga gga gac tgt gag agt ggt. Ambas V_L e V_H foram depois unidas por PCR SOEing (Figura 16) e subclonadas na cassete V do vetor pLNOH₂ contendo os genes de charneira-CH3-scFvM315 (Figuras 17 e 18). Da mesma forma, outros genes V que conferem uma especificidade desejada são isolados de hibridomas ou de fago selecionado de bibliotecas de exibição de fago. Eles são depois amplificados por PCR utilizando iniciadores desenhados da mesma forma que anteriormente e subclonados após PCR SOEing na cassete alvo (Figuras 17 e 18). Genes V_H e VK rearranjados que conferem especificidade por HLA-DP foram amplificados por PCR a partir de ADNc do hibridoma 22C1, que produz um anticorpo com especificidade pan HLA-DP. Os genes V foram reamplificados com novos iniciadores contendo locais para clonagem direta nos vetores de expressão pLNOK e pLNOH₂ (Norderhaug e Olafsen, 1997); 5'-V_L, ggtgt- gcattccgacattgtgctcacc; 3'-V_L, cgtacgttctactcacgtttttatttccagct; 5'-V_H, gtgcattccgaggtgcagctgcaggagtct; 3'-V_H, cgtacgact-

cacctgaggagaccgtagc. Além disso, scFV foi gerado por PCR SOEing utilizando os seguintes iniciadores:

5'V_L, g gtg tgcatc cga cat tgt gct cac c

3'V_L: ***gcc aga gcc acc tcc gcc aga tcc gcc tcc acc gtt*** tta ttt
cca gct

5'V_H: ***ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg*** gag gtg cag ctg
cag gag tct

3'V_H, cgtacg act cac ctg agg aga ccg tag c

Em 3'VL e 5'VH as sequências a negrito+itálico são complementares e antiparalelos, hibridizando assim para gerar o fragmento do gene que codifica a região ligante.

Regiões V anti CD14 são clonadas a partir do hibridoma 3C10 de ratinho (ATCC).

Os genes de quimiocina foram clonados a partir de tioglicolato estimularam macrófagos peritoneais. 4 ml 2% tioglicolato foram injetados i.p. em ratinhos Balb/c. 3 dias mais tarde foram recolhidos macrófagos peritoneais e foi extraído ARNm com pérolas Dyna magnéticas revestidas com oligo (dT). ADNc de primeira cadeia foi feito e utilizado como molde para amplificação por PCR de genes de quimiocina (RANTES e MIP-1 α) utilizando iniciadores específicos: 5'MIP-1 α : ggtg tgcatc cgc gcc ata tgg agc tga cac, 3'MIP-1 α : ga cgtacg act cac ctg cat tca gtt cca ggt cag tg 5'RANTES: ggtg tgcatc c gcc tca cca tat ggc tcg g 3'RANTES: ga cgtacg a ctc acc tga cat ctc caa ata gtt gat gta ttc. Os genes das diferentes unidades dirigidas foram depois digeridos com MunI e BsiWI ou BsmI e BsiWI, respetivamente e subclonados na cassette V do vetor pLNOH₂ contendo os genes de charneira-CH3-scFvM315 (Figuras 17 e 18). Ligando CD40 é clonado a partir de células T que são ativadas com LPS durante 4 horas antes do ARNm ser extraído para preparação de ADNc. O ADNc é utilizado como molde numa reação de PCR com iniciadores específicos para a sequência ligando CD40. Além disso, esta sequência é reamplificada com iniciadores desenhados para facilitar a subclonagem na cassette alvo, conforme descrito anteriormente.

Produção e purificação de vacicorpos

O vetor pLNOH₂ que transporta os genes de vacicorpo foi transfetado em células NS0 por eletroporação e os sobrenadantes de colônias únicas resistentes a 800 µg/ml G418 foram analisados para segregação de vacicorpo após 2-3 semanas, utilizando ELISA. DNP-BSA foi utilizado como revestimento e Vλ1/2 de ratazana-anti ratinho biotinilado (9A8-bio) foi utilizado para detecção. Os vacicorpos específicos de NIP foram adicionalmente classificados numa ELISA utilizando NIP-BSA como revestimento. As células selecionadas por produção elevada de vacicorpo foram crescidas em garrafas redondas (VWR) e afinidade purificada do sobrenadante utilizando uma coluna feita por DNP-lisina (Sigma) acoplada com Sefarose de fluxo rápido. Os vacicorpos foram eluídos com 0,05M DNP-glicina (Sigma) e o fluxo contínuo foi corrido numa coluna de resina Cl⁻ Dowex 1x8 de troca de iões (Sigma). Os vacicorpos eluídos foram dializados contra PBS/0,05%NaN₃ e PBS estéril antes da concentração do vacicorpo serem calculadas a partir dos valores de absorvância a 280nm.

Ab e citometria de fluxo

Ab e reagentes utilizados para citometria de fluxo foram 9A8 biotina, FGK.45 biotina, estreptavidina PerCP, anti-CD19 PE e anti-mIgG2a PE (BD Pharmingen). Células de baço de BALB/c foram coradas duplamente com anti-CD19 PE e vacicorpos. Os vacicorpos ligados foram detetados por 9A8-bio e estreptavidina PerCP. Vinte mil células foram corridas em FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA) e analisadas utilizando o programa WinMDI.

Rotulagem metabólica e imunoprecipitação

2x10⁶ células foram rotuladas durante 6h a 37°C em RPMI carecendo de metionina, cisteína (BioWhittaker) contendo 100mCi ³⁵[S]-metionina, cisteína (Amersham). O SN foi colhido e imunoprecipitado com Vλ1/2 de ratazana anti-ratinho (9A8) numa roda ON a 4°C. 10 µl de pérolas Dyna revestidas com IgG de ovelha anti-ratazana (Dynal AS, Oslo, Noruega) foram

incubados com o precipitado durante 1h numa roda e as pérolas Dyna foram recolhidas com uma prateleira concentradora de partículas magnéticas Dynal (Dynal MPC). As pérolas foram lavadas três vezes em PBS gelado com 1%NP40 e ressuspensas em 10 µl 1x tampão amostra. As proteínas foram eluídas a partir das pérolas incubando as amostras a 95°C durante 3 minutos. Os vacicorpos foram corridos num gel 10% SDS-PAGE, com um gel empilhado 5%, a 40mA durante 1h, utilizando um aparelho de eletroforese em gel BIO RAD miniprotean II. Os géis foram subsequentemente fixos em 30% metanol e 10% ácido acético durante 30 minutos antes de 30 min de incubação com Amplify (Amersham), antes de secagem e exposição a película BIOMAX-MR (Eastman Kodak Company, Utah, EUA).

Ensaio de proliferação de células T

Esplenócitos BALB/c irradiados (2000rad) (5×10^5 células/weN) foram utilizados como uma fonte de APC. Quantidades tituladas de diferentes vacicorpos específicos da classe II do MHC e específicos de NIP foram adicionados aos esplenócitos. Um péptido sintético 91-107 $\lambda 2^{315}$ foi utilizado como um controlo positivo. Os ensaios foram montados em culturas de 150 µl em poços de microtítulo de fundo raso com 96 poços e incubados durante 4 h a 37°C (Lunde, Western et al. 2002). As culturas foram depois lavadas três vezes antes da adição de 200 µl de células Th2 específicas de $\lambda 2^{315}$ polarizadas (2×10^4) derivadas de ratinhos SCID transgénicos TCR. Após 48h, as culturas foram pulsadas durante 16-24h com 1 µCi $^3\text{[H]}$ dThd. As culturas foram colhidas e incorporaram $^3\text{[H]}$ dThd foi medido utilizando um contador de cintilação TopCount NXT (Packard, Meriden, CT).

Experiências in vivo

Ratinhos BALB/c foram injetados por via subcutânea (s.c) com 200 µg ou 20 µg de proteínas de vacicorpo purificadas em PBS no dia 0, 14 e 28. Foram colhidas amostras de sangue no dia 14 e 28 antes da revacinação e depois no dia 35, 42 e 49, antes d serem sacrificados de acordo com o procedimento de ponto final

humano.

Medição de respostas de anticorpo

Abs anti-idiotípico contra M315 foram medidos por ELISA. Os poços foram revestidos com 2 µg/ml M315. Ab anti-Id nos soros foram detetados por um Ab Vκ anti-ratinho biotinilado (187.1 bio), IgG1 bio anti-ratinho ou IgG2a bio anti-ratinho (ambos de BD Pharmingen). Ab2.1-4 (um mAb anti-Id que liga λ2³¹⁵) foi utilizado como padrão.

Vacinação

Vacinação proteica: Ratinhos BALB/c foram injetados por via subcutânea (s.c) na região do flanco direito com 20 µg ou 200 µg de vacicorpos específicos da classe II ou de NIP purificados ($F_v^{I-E} F_v^{315}$, $F_v^{NIP} F_v^{315}$) em PBS o dia 0 e 14. PBS foi injetado como controlo negativo. Foram colhidas amostras de sangue da veia da perna em diferentes pontos de tempo após a última imunização. Anticorpos anti-idiotípicos com especificidade com especificidade para F_v^{315} foram medidos por ELISA. Os poços foram revestidos com 2 µg/ml M315. Ab anti-Id nos soros foram detetados por um mAb κ anti-ratinho biotinilado (187.1 bio). Ab2.1-4 (um mAb anti-Id que liga F_v^{315} (Kristoffersen, Hannestad et al. 1987) foi utilizado como padrão.

Vacinação de ADN e eletroporação

Ratinhos Balb/c com cinco a dez semanas de idade foram comprados de Bomholtgaard (Ry, Dinamarca). Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal com 9 g Pentobarbital/ratinhos e as pernas foram depiladas. Foi aplicado gel conductor na pele e 50 µl de ADN do vetor diluídos em 0,9% NaCl, foi injetado nos quadríceps. Após injeção, foi realizada eletroporação aplicando elétrodos em forma de barra à pele próximo do local da injeção e sujeitando o local a um potencial elétrico compreendendo 10 combóios de 1000 pulsos cada, com um comprimento de pulso a duas vezes 200 Sec (200Sec positivos e 200 Sec negativos) com 600 s de intervalo entre cada pulso e com um limite de corrente de 50 mA (cerca de 150-174

V/cm) (Tollefsen, Tjelle et al. 2002).

Foram colhidas amostras de sangue da veia da perna em diferentes pontos temporais e foi realizada punção cardíaca no dia em que foram sacrificados. Foram analisadas amostras do soro para a presença de vacícorpos dobrados corretamente. A ELISA foi realizada com DNP-BSA como revestimento e 9A8-bio como Ab detectado, conforme descrito anteriormente. Além disso, foram analisadas amostras de soro para Abs anti-Id por ELISA, conforme descrito anteriormente.

Desafio tumoral

Vacícorpos proteicos-MOPC315.4: Ratinhos BALB/c (6-10 semanas de idade) foram injetados s.c. com 160 µg de vacícorpos específicos de classe II ou NIP em PBS na região do flanco direito no dia 0 e 14. No dia 28, $1,6 \times 10^5$ células MOPC315.4 foram injetadas s.c. no flanco direito. Os ratinhos foram inspecionados duas vezes por semana. O desenvolvimento do tamanho do tumor foi monitorizado por palpação e utilização de um paquímetro. Um tumor de 3 mm em diâmetro foi classificado como toma de tumor. Os ratinhos foram mortos quando o tamanho do tumor atingiu 20 mm sem sinal de necrose tumoral.

Vacícorpos de ADN-MOPC315.4: vacinação de ADN foi realizada no dia 0, conforme descrito anteriormente. No dia 14, $1,6 \times 10^5$ células MOPC315.4 foram injetadas s.c. na região do flanco direito. O desenvolvimento do tamanho do tumor foi monitorizado por palpação e pela utilização de um paquímetro. Os ratinhos foram sacrificados quando o tamanho do tumor atingiu 20 mm. Foram colhidas amostras de sangue em diferentes pontos temporais da veia da perna. Os níveis de proteína de mieloma M315 nos soros foram quantificados numa ELISA em sandwich com Ab2.1-4 como revestimento por mAb anti-Ca biotinilado (8D2) como Ab de detecção. O tamanho do tumor, toma do tumor, curvas de sobrevivência e análises estatísticas foram calculadas utilizando o programa Graph Pad Prism 3.0 (San Diego, CA).

EXEMPLOS

A título de exemplo, as seguintes experiências demonstram que os vacicorpos se ligam a APC e são capazes de despoletar ambas respostas imunes das células T e das células B. Além disso, as seguintes experiências mostram que os vacicorpos induzem uma forte resposta imune tornando os adjuvantes redundantes. As experiências demonstram que dita molécula é capaz de induzir uma resposta imune contra mieloma múltiplo e, além disso, a exequibilidade do tratamento de mamíferos por imunização através de ADN de vacicorpo ou proteína de vacicorpo. As experiências também demonstram que outra abordagem apelativa é dirigir os vacicorpos a moléculas de superfície expressas exclusivamente em subconjuntos de células dendríticas (DC), como, por exemplo, os recetores de quimiocina. Pretende-se que os exemplos seguintes sejam para ilustrar como fazer e utilizar a invenção. Não se pretende que limitem o âmbito da invenção de qualquer maneira ou em qualquer grau.

Exemplo 1

Vacicorpos são produzidos e segregados como moléculas dimerizadas funcionais e é ele próprio ligado pelo anticorpo anti-V λ 1/2 (9A8) (Bogen 1989) e o anticorpo anti-idiotípico Ab2.1-4 (Lauritzsen, Weiss et al. 1994).

O mAb M315 liga o hapteno di-nitro-fenilo (DNP) (Eisen, Simms et al. 1968). Portanto, para verificar que os vacicorpos foram produzidos, secretados e dobrados corretamente como moléculas funcionais, as unidades antigénicas dos vacicorpos foram testadas em ELISA pela sua capacidade de ligarem DNP, 9A8 e Ab2.1-4 mAbs. A Figura 20b mostra que ambos vacicorpos específicos de NIP e específicos de MHCII, que ambos têm scFv³¹⁵, ligam DNP, 9A8 e Ab2.1-4. Isto foi o caso com todos os vacicorpos contendo scFv³¹⁵, ambos os com unidade de dimerização longa humana, unidade de dimerização curta humana e unidade de dimerização murina (Figura 5). De seguida, testámos as unidades dirigidas dos vacicorpos. Verificou-se que estas estavam

corretas; primeiro, os vacícorpos específicos de NIP ligaram NIP-BSA na ELISA (Figura 4 e Figura 20c), ao passo que os vacícorpos específicos de MHCII não (Figura 20c). Em segundo lugar, os vacícorpos específicos de MHCII ligaram a células B esplênicas BALB/c que expressam I-E (H-2^d) conforme detectado por citometria de fluxo, ao passo que os vacícorpos específicos de NIP não (Figura 3). Para verificar a homodimerização correta, os vacícorpos foram rotulados metabolicamente por crescimento de células transfectadas em meio contendo ³⁵S-metionina, vacícorpos foram imunoprecipitados a partir do sobrenadante utilizando anticorpos específicos e analisados por SDS-PAGE. Como seria de esperar da consideração teórica da Figura 2, ambos transfectomas $F_v^{NIP} F_v^{315}$ e $F_v^{I-E} F_v^{315}$ segregaram vacícorpos diméricos de ~ 130 kDa. Após redução das ligações dissulfido, os vacícorpos são degradados em cadeias monoméricas de ~ 65 kDa (Figura 20a).

Exemplo 2

Vacícorpos específicos da classe II do MHC potenciam a estimulação específica de $\lambda 2^{315}$ das células T CD4+.

Vacícorpos específicos de classe II e específicos de NIP não dirigidos foram mistuados com células apresentadoras de antígenos (APC) e comparados pela sua capacidade de induzir a ativação específica das células T. Esplenócitos de BALB/c irradiados foram utilizados como APC. A estirpe BALB/c tem o haplótipo H-2^d, assim eles expressam moléculas I-E^d necessárias para dirigir os vacícorpos específicos de classe II do MHC e a apresentação do epítipo $\lambda 2^{315}$ a células T CD4+ específicas.

Os APC foram pulsados com os diferentes vacícorpos durante 4h e subsequentemente lavados. A lavagem foi realizada para reduzir a possibilidade de que os vacícorpos específicos de I-E^d no meio de cultura pudessem diminuir a estimulação das células T bloqueando as moléculas I-E^d (Lunde, Western et al. 2002). Células Th2 polarizadas de ratinhos transgênicos para um TCR restrito por I-E^d específico de $\lambda 2^{315}$ (Lauritzsen, Weiss et al. 1993) foram adicionadas como células T responsivas. A curva da

dose resposta na Figura 6 mostra que o epítopo $\lambda 2^{315}$ foi apresentado 100-1000 vezes mais eficientemente às células Th2 transgênicas TCR quando foram transportadas nos vacícorpos específicos da classe II do MHC dirigidos a APC (ambos os com unidades de dimerização curta e longa humanas) comparado com os vacícorpos específicos de NIP não alvo. Dever-se-ia notar que os vacícorpos não incluem um local de ligação ao Fc γ R; assim, os vacícorpos específicos de NIP não deveriam ser capazes de entrar nas células através de endocitose mediada por recetor.

Exemplo 3

Nível de anticorpos anti-idiotípicos nos soros de ratinhos que receberam vacícorpos como proteínas em solução salina s.c. na ausência de adjuvante.

No protocolo de vacinação proteica, ratinhos BALB/c foram imunizados duas vezes, espaçadas duas semanas com 20 ou 200 μ g Vacícorpos específicos de MHCII ou vacícorpos específicos de NIP em PBS. De notar que não foi empregue qualquer adjuvante. Os soros dos ratinhos imunizados colhidos em vários pontos temporais após a segunda vacinação foram depois analisados em relação a anticorpos anti-idiotípicos que se ligam a M315 na ELISA. Os vacícorpos específicos de MHCII despoletaram respostas de anticorpo anti-idiotípicas significativamente mais elevadas depois de 14 dias após a segunda imunização do que os vacícorpos específicos de NIP. Vacícorpos com uma unidade de dimerização longa humana induziram as melhores respostas de Ab anti-idiotípicas (Figura 7). Logo, dirigir os vacícorpos potenciou respostas imunes anti-Id, contudo, por esta via de imunização os vacícorpos não alvo também induziram algumas respostas.

Exemplo 4

Vacícorpos proteicos detetados no soro após injeção de ADN por via intramuscular e eletroporação in vivo.

Foi descrito recentemente que o músculo esquelético pode produzir anticorpos após injeção de genes de Ig e eletroporação

(Tjelle 2004). Investigámos, assim, se vacicorpos funcionais foram produzidos por injeção de plasmídeo i.m. e eletroporação. Uma vez que os vacicorpos $F_v^{I-E} F_v^{315}$ são específicos para moléculas I-E^d presentes em BALB/c (H-2^d), estes vacicorpos deveriam ser rapidamente absorvidos pelas células positivas I-E^d em BALB/c. Em contraste, os vacicorpos $F_v^{NIP} F_v^{315}$ não alvo não deveriam ser absorvidos. De facto, 14 dias após uma única injeção de 50 µg de plasmídeo de vacicorpo nos quadríceps e eletroporação, a proteína de vacicorpo $F_v^{NIP} F_v^{315}$ foi detetada em quantidades significativas no soro, ao passo que não houve $F_v^{I-E} F_v^{315}$ detetável (Figura 21a).

Exemplo 5

Anticorpos anti-Id o soro após injeção de ADN de vacicorpo por via intramuscular e eletroporação.

A análise das amostras de soro do mesmo dia 14 para anticorpos anti-idiotípicos demonstrou que os ratinhos injetados i.m. /eletroporados com o ADN do vacicorpo $F_v^{I-E} F_v^{315}$ alvo de classe II do MHC tinha desenvolvido anticorpos que ligaram o Fv idiotípico do tumor MOPC315.4 (Figura 21b). Este resultado contrastou com a falta de qualquer resposta de anticorpo anti-idiotípico em ratinhos injetados com o ADN do vacicorpo $F_v^{NIP} F_v^{315}$ não alvo (Figura 21b). Em conjunto com os resultados descritos no exemplo 4, os resultados demonstram um efeito formidável de dirigir a células positivas da classe II do MHC (I-E^d) para desenvolvimento de uma forte resposta humoral. Os ratinhos controlo injetados i.m. com 0,9% NaCl seguido de eletroporação não tiveram nem vacicorpos nem Abs anti-idiotípicos nos soros do dia 14 (Figuras 21a-c).

Exemplo 6

Indução de imunidade protetora contra o mieloma MOPC315.4: injeção/eletroporação de ADN de vacicorpo.

Vacinação intramuscular com plasmídeos de vacicorpo $F_v^{I-E} F_v^{315}$ alvo da classe II do MHC e subsequente eletroporação induziram forte proteção contra um desafio com células de mieloma MOPC315.4, $p < 0,001$, comparado com ratinhos controlo

injetados com 0,9% NaCl e eletroporados (Figura 23). Por oposição, a imunização por plasmídeo de vacicorpo $F_v^{NIP} F_v^{315}$ não dirigida foi ineficaz comparada com o grupo controle de solução salina, $p= 0,2739$ (Figura 23). O aparecimento de tumor foi retardado em ratinhos vacinados com $F_v^{I-E} F_v^{315}$ comparados com $F_v^{NIP} F_v^{315}$ (Figura 22). Um dos ratinhos vacinados $F_v^{I-E} F_v^{315}$ desenvolveu um tumor com máximo 6 mm (dia 20) de diâmetro que regrediu e tornou-se completamente indetetável a partir do dia 28 (dados não mostrados). A presença de proteína de mieloma M315 nos soros confirmou as medições do tamanho do tumor (Figura 24). Estes resultados mostram que a proteção contra o mieloma MOPC315.4 pode ser conseguida por vacina de ADN i.m. seguida de eletroporação e que a proteção requer dirigir o scFv derivado de tumor para as células positivas da classe II do MHC (I-E^d).

Exemplo 7

Quimiocinas são funcionais como unidades dirigidas no formato Vacicorpo

Foi montado um vetor que transporta o gene que codifica um vacicorpo conforme mostrado na Figura 18, mas especificamente com MIP-1 α na unidade dirigida, charneira humana longa na unidade de dimerização e scFv M315 na unidade antigénica. O sobrenadante das células transfetadas com esta construção foi recolhido e testado em ELISA para a presença de vacicorpos que se ligam a um mAb MIP-1 α anti-ratinho e 9A8 bio. Os resultados mostraram que tais vacicorpos com especificidade desejada foram produzidos e, além disso, que se ligaram a mAb anti-MIP-1 α , ao passo que os vacicorpos específicos de NIP não (Figura 25).

Exemplo 8

A quimiocina RANTES é funcional como unidade dirigida no formato Vacicorpo

Da mesma forma, foi produzido um vetor com um gene que codifica vacicorpos como aqueles descritos no exemplo 7, com a exceção de que a unidade dirigida foi a quimiocina RANTES de ratinho. O sobrenadante das células transfetadas com esta

construção foi recolhido e testado em ELISA para a presença de vacicorpos. A experiência mostrou que esta variante de vacicorpo foi expressa e exportada como uma molécula funcional.

Exemplo 9*Flagelina como unidade dirigida no formato Vacicorpo*

Da mesma forma, foi produzido um vetor com um gene que codifica vacicorpos como aqueles descritos no exemplo 7, com a exceção de que a unidade dirigida foi flagelina. O sobrenadante das células transfetadas com esta construção será recolhido e testado em ELISA para a presença de vacicorpos.

Exemplo 10*Ligando CD40 solúvel como unidade dirigida no formato Vacicorpo*

Da mesma forma, foi produzido um vetor com um gene que codifica vacicorpos como aqueles descritos no exemplo 7, com a exceção de que a unidade dirigida foi ligando CD40 solúvel de ratinho. O sobrenadante das células transfetadas com esta construção será recolhido e testado em ELISA para a presença de vacicorpos.

Exemplo 11*Anti-Recetor do tipo Toll 2 como unidade dirigida no formato Vacicorpo*

Da mesma forma, foi produzido um vetor com um gene que codifica vacicorpos como aqueles descritos no exemplo 7, com a exceção de que a unidade dirigida foi um scFv com especificidade para recetor do tipo toll 2 de ratinho. O sobrenadante das células transfetadas com esta construção será recolhido e testado em ELISA para a presença de vacicorpos.

Exemplo 12*Anti-CD14 é funcional como unidades dirigidas no formato vacicorpo*

Da mesma forma, foi produzido um vetor com um gene que codifica vacicorpos como aqueles descritos no exemplo 7, com a exceção de que a unidade dirigida foi um scFv com especificidade para CD 14 humana. O sobrenadante das células transfetadas com esta construção será recolhido e testado em

ELISA para a presença de vacicorpos. Os resultados mostraram que esta variante de vacicorpo foi expressa e exportada como uma molécula funcional.

Exemplo 13

Anti-HLA-DP é funcional como unidades dirigidas no formato Vacicorpo

Da mesma forma, foi produzido um vetor com um gene que codifica vacicorpos como aqueles descritos no exemplo 7, com a exceção de que a unidade dirigida foi um scFv com especificidade para HLA-DP. O sobrenadante das células transfetadas com esta construção foi recolhido e testado em ELISA para a presença de vacicorpos. Os resultados mostraram que esta variante de vacicorpo foi expressa e exportada como uma molécula funcional.

Exemplo 14

Antígeno de tuberculose na cassete antigénica do Vacicorpo.

Um ácido nucleico que codifica um antígeno de tuberculose (antígeno de gado) será inserido na unidade antigénica da construção do vacicorpo.

Exemplo 15

Antígeno de telomerase na cassete antigénica do Vacicorpo

hTERT, uma região antigénica da ribonucleoproteína telomerase, será inserida na unidade antigénica da construção do Vacicorpo.

Exemplo 16

HIV Gp120 antigénico na cassete antigénica do Vacicorpo

Um ácido nucleico que codifica uma molécula derivada de gp120 será inserida na unidade antigénica da construção do Vacicorpo.

Exemplo 17

Vacicorpos com scFv específico de paciente de origem de mieloma na cassete antigénica.

É recolhido aspirado de medula óssea de pacientes que sofrem de mieloma múltiplo. As células mononucleares (MNC) são separadas utilizando uma solução de gradiente de densidade de

Ficoll-Isopaque (Lymphoprep™ de Axis-Shield PoC AS). O ARN total é isolado (Reagente TRIzol® de Invitrogen™ Life Technologies) de MNC e ADNc é feito de ARNm (kit de síntese de ADNc de primeira cadeia de Amersham Biosciences (não iniciador bifuncional I-d(T) 18)). Este ADNc é utilizado como molde na PCR com iniciadores que amplificam os genes V da cadeia pesada ou leve da Ig do mieloma múltiplo. Os iniciadores sense são específicos de família e localizados nas regiões líder (VH1-7, VK1-6 e VL1-10) e os iniciadores anti-sense estão localizados na primeira parte das regiões C (um iniciador cada para IgG, IgA, kapa e lambda). Os produtos da PCR são ligados num vetor (pGEM®-T Easy Vector de Promega) e transformados em *E.coli*. Amostras de ADN isoladas de colónias individuais são sequenciadas. Obter a mesma sequência de três colónias diferentes originárias de três PCRs diferentes confirma que as regiões V da Ig de mieloma foram isoladas. PCR SOEing é realizada e a reamplificação é feita com iniciadores incluindo etiquetas com locais para SfiI, conforme descrito na Figura 19. Para um paciente tais iniciadores tinham a sequência:

5 'TAVH 5 ' ACGTAGGCCTCGGTGGCCTGCAGATCACCTTGAAGGAGTCT

3'TAVK 5' IgatccggccctgcaggcctcaItttgatctccagcttgggtccc

O vetor resultante é transitoriamente transfetado em células 293E. Os sobrenadantes são testados em ELISA para a presença de tais vacícorpos. Também são injetados nos ratinhos BALB/c. A presença de anticorpos anti-Idiotípicos é medida em ELISAs contra o soro dos ratinhos e o soro dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- Bendandi, M., C. D. Gocke, et al. (1999). "Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma." *Nat Med* 5(10): 1171-7.
- Biragyn, A., P. A. Ruffini, et al. (2002). "Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2." *Science* 298(5595): 1025-9.
- Biragyn, A., K. Tani, et al. (1999). "Genetic fusion of

- chemokines to a self tumor antigen induces protective, T-cell dependent antitumor immunity." *Nat Biotechnol* 17(3): 253-8.
- Bogen, B. (1989). "Monoclonal antibodies specific for variable and constant domains of murine lambda chains." *Scand J Immunol* 29(3): 273-9.
- Bogen, B., Peripheral T cell tolerance as a tumor escape mechanism: deletion of CD4+ T cells specific for a monoclonal immunoglobulin idiotype secreted by a plasmacytoma. *Eur J Immunol*. 1996 Nov;26(11):2671-9.
- Bogen, B., L. Gleditsch, et al. (1992). "Weak positive selection of transgenic T cell receptor-bearing thymocytes: importance of major histocompatibility complex class II, T cell receptor and CD4 surface molecule densities." *Eur J Immunol* 22(3): 703-9.
- Bogen, B. e J. D. Lambris (1989). "Minimum length of an idiotypic peptide and a model for its binding to a major histocompatibility complex class II molecule." *Embo J* 8(7): 1947-52.
- Bogen, B., B. Malissen, et al. (1986). "Idiotope-specific T cell clones that recognize syngeneic immunoglobulin fragments in the context of class II molecules." *Eur J Immunol* 16(11): 1373-8.
- Casten, L. A. e S. K. Pierce (1988). "Receptor-mediated B cell antigen processing. Increased antigenicity of a globular protein covalently coupled to antibodies specific for B cell surface structures." *J Immunol* 140(2): 404-10.
- Eisen, H. N., E. S. Simms, et al. (1968). "Mouse mieloma proteins with antihapten antibody acitivity. The protein produced by plasma cell tumor MOPC-315." *Biochemistry* 7(11): 4126-34.
- Hakim, I., S. Levy, et al. (1996). "A nine-amino acid peptide from IL-1beta augments antitumor immune responses induced by protein and DNA vaccines." *J Immunol* 157(12): 5503-11.
- Hough, D. W., R. P. Eady, et al. (1976). "Anti-idiotypic sera raised against superficie immunoglobulin of human neoplastic lymphocytes." *J Exp Med* 144(4): 960-9.

- Huang, H. I., P. Y. Wu, et al. (2004). "Improved immunogenicity of a self tumor antigen by covalent linkage to CD40 ligand." *Int J Cancer* 108(5): 696-703.
- King, C. A., M. B. Spellerberg, et al. (1998). "DNA vaccines with single-chain Fv fused to fragment C of tetanus toxin induce protective immunity against linfoma and mieloma." *Nat Med* 4(11): 1281-6.
- Kristoffersen, G., K. Hannestad, et al. (1987). "Two M315 idiotopes defined by isologous monoclonal antibodies: one depends on germline and the other on mutated murine lambda 2 light chain sequences." *Scand J Immunol* 26(5): 535-46.
- Lauritzsen, G. F., S. Weiss, et al. (1993). "Anti-tumour activity of idiotypic-specific, MHC-restricted Th1 and Th2 clones in vitro and in vivo." *Scand J Immunol* 37(1): 77-85.
- Lauritzsen, G. F., S. Weiss, et al. (1994). "Naive idiotypic-specific CD4+ T cells and immunosurveillance of B-cell tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(12): 5700-4.
- Lunde, E., L. A. Munthe, et al. (1999). "Antibodies engineered with IgD especificidade efficiently deliver integrated T-cell epitopes for antigen presentation by B cells." *Nat Biotechnol* 17(7): 670-5.
- Lunde, E., I. B. Rasmussen, et al. (2001). "'Troy-bodies': antibodies as vector proteins for T cell epitopes." *Biomol Eng* 18(3): 109-16.
- Lunde, E., K. H. Western, et al. (2002). "Efficient delivery of T cell epitopes to APC by use of MHC class II-specific Troybodies." *J Immunol* 168(5): 2154-62.
- Neuberger, M. S. (1983). "Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells." *Embo J* 2(8): 1373-8.
- Norderhaug, L., T. Olafsen, et al. (1997). "Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells." *J Immunol Methods* 204(1): 77-87.
- Olafsen, T., I. B. Rasmussen, et al. (1998). "IgM secretory

- tailpiece drives multimerisation of bivalent scFv fragments in eukaryotic cells." *Immunotechnology* 4(2): 141-53.
- Ozato, K., N. Mayer, et al. (1980). "Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies to mouse H-2 and Ia antigens." *J Immunol* 124(2): 533-40.
- Ravetch, J. V. e S. Bolland (2001). "IgG Fc receptors." *Annu Rev Immunol* 19: 275-90.
- Sirishinha, S. e H. N. Eisen (1971). "Autoimmune-like antibodies to the ligand-binding sites of myeloma proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(12): 3130-5.
- Snider, D. P. e D. M. Segal (1987). "Targeted antigen presentation using crosslinked antibody heteroaggregates." *J Immunol* 139(5): 1609-16.
- Tao, M. H. e R. Levy (1993). "Idiotypic/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma." *Nature* 362(6422): 755-8.
- Tjelle, T., Corthay, A., Lunde, E., Sandlie, I., Michaelsen, TE., Mathiesen, I and Bogen, B. (2004). "Monoclonal antibodies produced by muscle after plasmid injection and electroporation." *J Mol Ther*.
- Tollefsen, S., T. Tjelle, et al. (2002). "Improved cellular and humoral immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* antigens after intramuscular DNA immunisation combined with muscle electroporation." *Vaccine* 20(27-28): 3370-8.

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 60450134 B [0001]

Documentos não relacionados com patentes citados na descrição

- **BENDANDI, M.; C. D. GOCKE et al.** Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma. *Nat Med*, 1999, vol. 5 (10), 1171-7 [0067]
- **BIRAGYN, A.; P. A. RUFFINI et al.** Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science*, 2002, vol. 298 (5595), 1025-9 [0067]
- **BIRAGYN, A.; K. TANI et al.** Genetic fusion of chemokines to a self tumor antigen induces protective, T-cell dependent antitumor immunity. *Nat Biotechnol*, 1999, vol. 17 (3), 253-8 [0067]
- **BOGEN, B.** Monoclonal antibodies specific for variable and constant domains of murine lambda chains. *Scand J Immunol*, 1989, vol. 29 (3), 273-9 [0067]
- **BOGEN, B.; PERIPHERAL T.** cell tolerance as a tumor escape mechanism: deletion of CD4+ T cells specific for a monoclonal immunoglobulin idiotype secreted by a plasmacytoma. *Eur J Immunol.*, November 1996, vol. 26 (11), 2671-9 [0067]
- **BOGEN, B.; L. GLEDITSCH et al.** Weak positive selection of transgenic T cell receptor-bearing thymocytes: importance of major histocompatibility complex class II, T cell receptor and CD4 surface molecule densities. *Eur J Immunol*,

1992, vol. 22 (3), 703-9 [0067]

- **BOGEN, B.; J. D. LAMBRIS.** Minimum length of an idiotypic peptide and a model for its binding to a major histocompatibility complex class II molecule. *Embo J*, 1989, vol. 8 (7), 1947-52 [0067]
- **BOGEN, B.; B. MALISSEN et al.** Idiotope-specific T cell clones that recognize syngeneic immunoglobulin fragments in the context of class II molecules.
- *Eur J Immunol*, 1986, vol. 16 (11), 1373-8 [0067]
- **CASTEN, L. A.; S. K. PIERCE.** Receptor-mediated B cell antigen processing. Increased antigenicity of a globular protein covalently coupled to antibodies specific for B cell surface structures. *J Immunol*, 1988, vol. 140 (2), 404-10 [0067]
- **EISEN, H. N.; E. S. SIMMS et al.** Mouse mieloma proteins with antihapten antibody acitivity. The protein produced by plasma cell tumor MOPC-315. *Biochemistry*, 1968, vol. 7 (11), 4126-34 [0067]
- **HAKIM, I.; S. LEVY et al.** A nine-amino acid peptide from IL-1beta augments antitumor immune responses induced by protein and DNA vaccines. *J Immunol*, 1996, vol. 157 (12), 5503-11 [0067]
- **HOUGH, D. W.; R. P. EADY et al.** Anti-idiotypic sera raised against surface immunoglobulin of human neoplastic lymphocytes. *J Exp Med*, 1976, vol. 144 (4), 960-9 [0067]
- **HUANG, H. I.; P. Y. WU et al.** Improved immunogenicity of a self tumor antigen by covalent linkage to CD40 ligand. *Int J Cancer*, 2004, vol. 108 (5), 696-703 [0067]
- **KING, C. A.; M. B. SPELLERBERG et al.** DNA vaccines with single-chain Fv fused to fragment C of tetanus toxin induce protective immunity against lymphoma and myeloma. *Nat Med*, 1998, vol. 4 (11), 1281-6 [0067]
- **KRISTOFFERSEN, G.; K. HANNESTAD et al.** Two M315 idiotopes defined by isologous monoclonal antibodies: one depends on germline and the other on mutated murine lambda 2 light chain

- sequences. *Scand J Immunol*, 1987, vol. 26 (5), 535-46 [0067]
- **LAURITZSEN, G. F.; S. WEISS et al.** Anti-tumour activity of idiotype-specific, MHC-restricted Th1 and Th2 clones in vitro and in vivo. *Scand J Immunol*, 1993, vol. 37 (1), 77-85 [0067]
 - **LAURITZSEN, G. F.; S. WEISS et al.** Naive idiotype- specific CD4+ T cells and immunosurveillance of B-cell tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, vol. 91 (12), 5700-4 [0067]
 - **LUNDE, E.; L. A. MUNTHE et al.** Antibodies engineered with IgD specificity efficiently deliver integrated T-cell epitopes for antigen presentation by B cells. *Nat Biotechnol*, 1999, vol. 17 (7), 670-5 [0067]
 - **LUNDE, E.; I. B. RASMUSSEN et al.** Troy-bodies': antibodies as vector proteins for T cell epitopes. *Biomol Eng*, 2001, vol. 18 (3), 109-16 [0067]
 - **LUNDE, E.; K. H. WESTERN et al.** Efficient delivery of T cell epitopes to APC by use of MHC class II-specific Troybodies. *J Immunol*, 2002, vol. 168 (5), 2154-62 [0067]
 - **NEUBERGER, M. S.** Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells. *Embo J*, 1983, vol. 2 (8), 1373-8 [0067]
 - **NORDERHAUG, L.; T. OLAFSEN et al.** Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells. *J Immunol Methods*, 1997, vol. 204 (1), 77-87 [0067]
 - **OLAFSEN, T.; I. B. RASMUSSEN et al.** IgM secretory tailpiece drives multimerisation of bivalent scFv fragments in eukaryotic cells. *Immunotechnology*, 1998, vol. 4 (2), 141-53 [0067]
 - **OZATO, K.; N. MAYER et al.** Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies to mouse H-2 and Ia antigens. *J Immunol*, 1980, vol. 124 (2), 533-40 [0067]
 - **RAVETCH, J. V.; S. BOLLAND.** IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol*, 2001, vol. 19, 275-90 [0067]
 - **SIRISINHA, S.; H. N. EISEN.** Autoimmune-like antibodies to

the ligand-binding sites of myeloma proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971, vol. 68 (12), 3130-5 [0067]

- **SNIDER, D. P.; D. M. SEGAL.** Targeted antigen presentation using crosslinked antibody heteroaggregates. *J Immunol*, 1987, vol. 139 (5), 1609-16 [0067]
- **TAO, M. H.; R. LEVY.** Idiotypic/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma. *Nature*, 1993, vol. 362 (6422), 755-8 [0067]
- **TJELLE, T.; CORTHAY, A.; LUNDE, E.; SANDLIE, I. ; MICHAELSEN, TE. ; MATHIESEN, I; BOGEN, B.** Monoclonal antibodies produced by muscle after plasmid injection and electroporation. *J Mol Ther*, 2004 [0067]
- **TOLLEFSEN, S.; T. TJELLE et al.** Improved cellular and humoral immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* antigens after intramuscular DNA immunisation combined with muscle electroporation. *Vaccine*, 2002, vol. 20 (27-28), 3370-8 [0067]

REIVINDICAÇÕES

1. Um ácido nucleico na forma de um plasmídeo de ADN nu para utilização como um agente terapêutico, em que o ácido nucleico codifica uma unidade monomérica de uma molécula baseada em anticorpo recombinante dimérico que compreende duas das ditas unidades monoméricas ligadas através de um motivo de dimerização que consiste numa região charneira derivada de Ig e um domínio Cy3, compreendendo o dito motivo de dimerização uma região charneira e um domínio Cy3 de cada unidade monomérica, em que cada região charneira contribui para a dimerização através de pontes dissulfureto para a outra região charneira e cada domínio Cy3 contribui para a dimerização através de interações hidrofóbicas com o outro domínio Cy3, e em que cada das ditas unidades monoméricas consiste de uma unidade dirigida com especificidade para uma molécula de superfície numa célula apresentadora de antígeno, ligada através da dita região charneira e do dito domínio Cy3 a uma unidade antigénica no COOH-terminal, e em que cada das ditas unidades monoméricas carecem de um domínio CH2.

2. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 1, em que a dita unidade dirigida é um variável de fragmento de cadeia única de Ig (scFv).

3. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 2, em que o dito scFv é anti-HLA, anti-CD14 ou anti-recetor do tipo toll.

4. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 3, em que o dito anti-HLA é anti-HLA-DP.

5. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 3, em que o dito anti-recetor do tipo toll é o anti-recetor do tipo toll 2.

6. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 1, em que a dita unidade dirigida é um ligando.
7. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 6, em que o dito ligando é ligando CD40 solúvel ou uma quimiocina.
8. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 6, em que o dito ligando é uma quimiocina.
9. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 7 ou 8, em que a dita quimiocina é RANTES ou MIP-1 α .
10. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 7 ou 8, em que a dita quimiocina é MIP-1 α .
11. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 1, em que a dita unidade dirigida é um antígeno bacteriano.
12. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 11, em que o antígeno bacteriano é uma flagelina.
13. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 1, em que a unidade dirigida tem a capacidade de ter como alvo HLA-DP, CD14, CD40, recetores do tipo toll ou recetores de quimiocina.
14. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 13, em que a unidade dirigida tem a capacidade de ter como alvo HLA-DP.
15. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 1, em que a unidade dirigida tem a capacidade de ter como alvo recetores de quimiocina.
16. O ácido nucleico para a utilização de qualquer uma das

reivindicações anteriores, em que a unidade antigénica é um scFv antigénico.

17. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 16, em que o scFv antigénico é derivado de uma Ig monoclonal produzida por mieloma ou linfoma.

18. O ácido nucleico para a utilização de qualquer uma das reivindicações 1-15, em que a(s) unidade(s) antigénica(s) é/são derivada(s) de uma proteína cancerígena, tal como uma telomerase, ou de uma parte funcional da mesma.

19. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 18, em que a dita proteína cancerígena é hTERT.

20. O ácido nucleico para a utilização de qualquer uma das reivindicações 1-15, em que a unidade(s) antigénica(s) é/são derivada(s) de uma bactéria.

21. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 20, em que a(s) unidade(s) antigénica(s) derivada(s) de bactéria é/são antígeno de tuberculose.

22. O ácido nucleico para a utilização de qualquer uma das reivindicações 1-15 em que a(s) unidade(s) antigénica(s) é/são derivada(s) de um vírus.

23. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 22, em que a(s) unidade(s) antigénica(s) derivada(s) de um vírus é/são derivada(s) de VIH.

24. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 23, em que a(s) unidade(s) antigénica(s) derivada(s) de HIV é/são derivada(s) de gp120.

25. O ácido nucleico para a utilização da reivindicação 1, em que a região charneira compreende ambos os exões h1 e h4 de hIgG3.

26. O ácido nucleico para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a utilização está num método para tratar cancro ou uma doença infecciosa.

27. O ácido nucleico para uma utilização de acordo com a reivindicação 26, que é administrado via dispersão coloidal ou injeção intramuscular seguido de eletroporação.

28. O ácido nucleico para uma utilização de acordo com a reivindicação 27, em que a dispersão coloidal é um lipossoma ou lipoplex.

29. O ácido nucleico para uma utilização de acordo com a reivindicação 27, em que o medicamento é administrado via injeção intramuscular seguido de eletroporação.

30. O ácido nucleico para uma utilização de acordo com a reivindicação 26, em que o cancro é mieloma múltiplo ou linfoma num mamífero.

31. O ácido nucleico para uma utilização de acordo com a reivindicação 26, em que a doença infecciosa é infeção por VIH ou tuberculose.

32. Utilização do ácido nucleico definida em qualquer uma das reivindicações 1-25 para fabricar um medicamento para tratar cancro ou uma doença infecciosa.

33. Utilização da reivindicação 32, em que o medicamento é administrado via dispersão coloidal ou injeção intramuscular seguido de eletroporação.

34. Utilização da reivindicação 33, em que a dispersão coloidal é um lipossoma ou lipoplex.

35. Utilização da reivindicação 33, em que o medicamento é administrado via injeção intramuscular seguido de eletroporação.

36. Utilização da reivindicação 32, em que o cancro é mieloma múltiplo ou linfoma num mamífero.

37. Utilização da reivindicação 32, em que a doença infecciosa é infeção por VIH ou tuberculose.

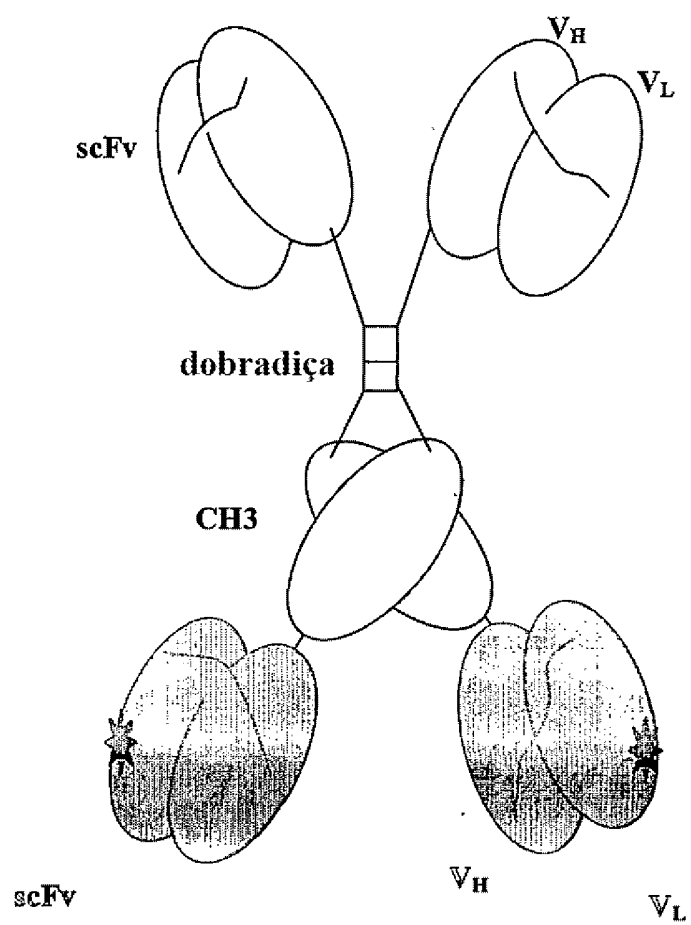


Fig. 1 A estrutura do vacicorpo.

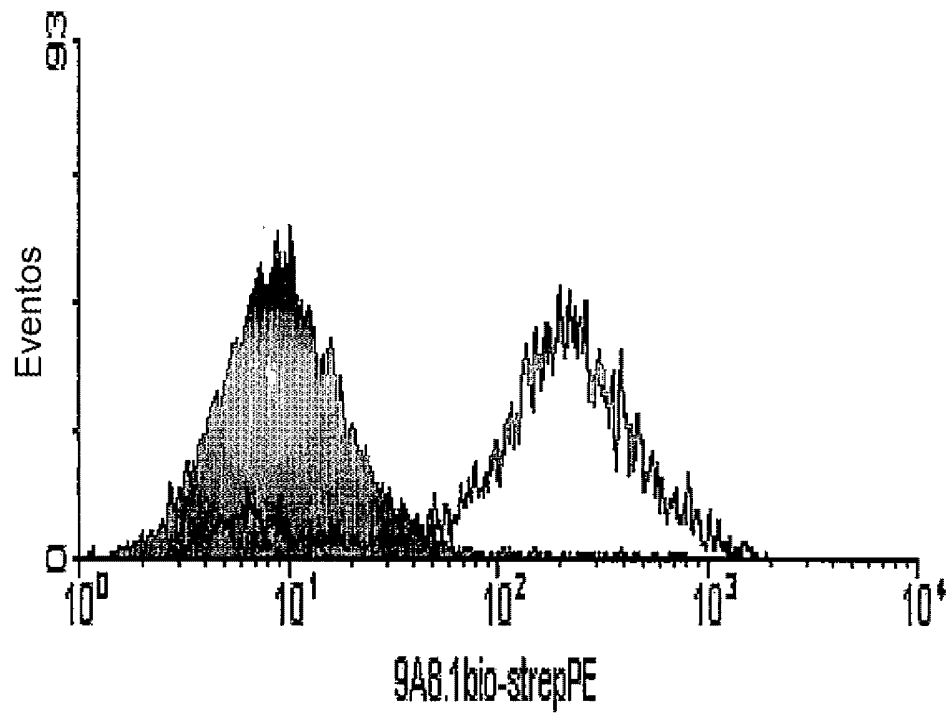


Fig. 3 Citometria de fluxo de esplenócitos

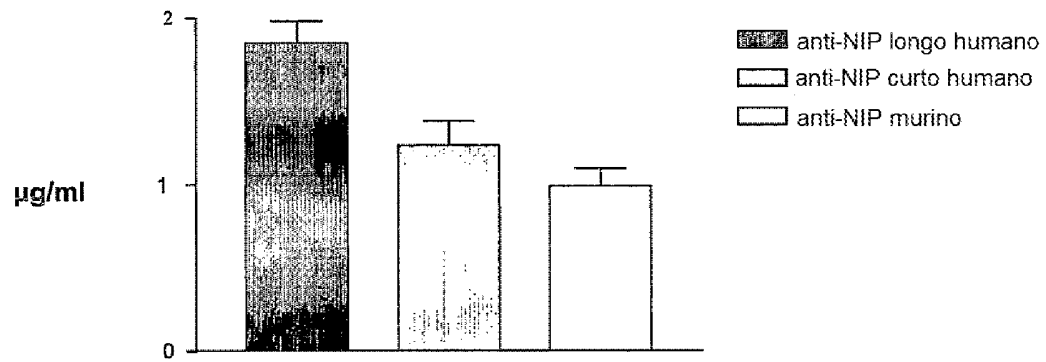


Fig. 4 Os vacicorpos controlo específicos de NIP exibem ligação com o hapteno NIP .

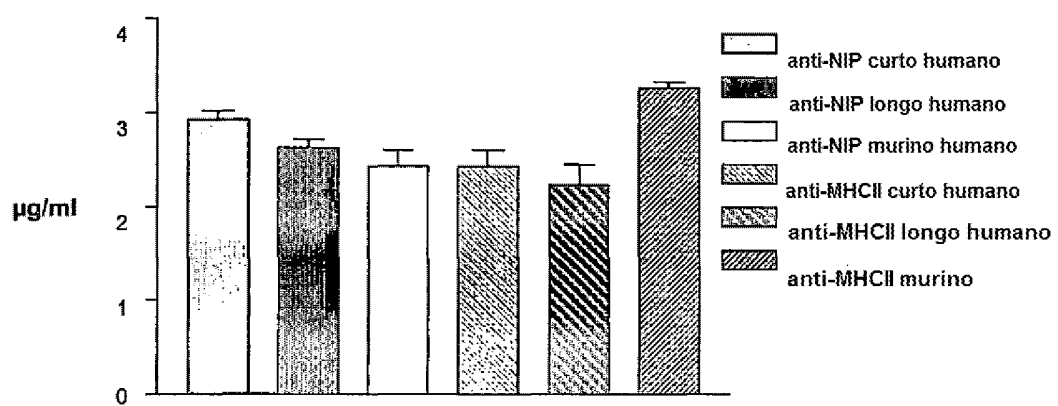
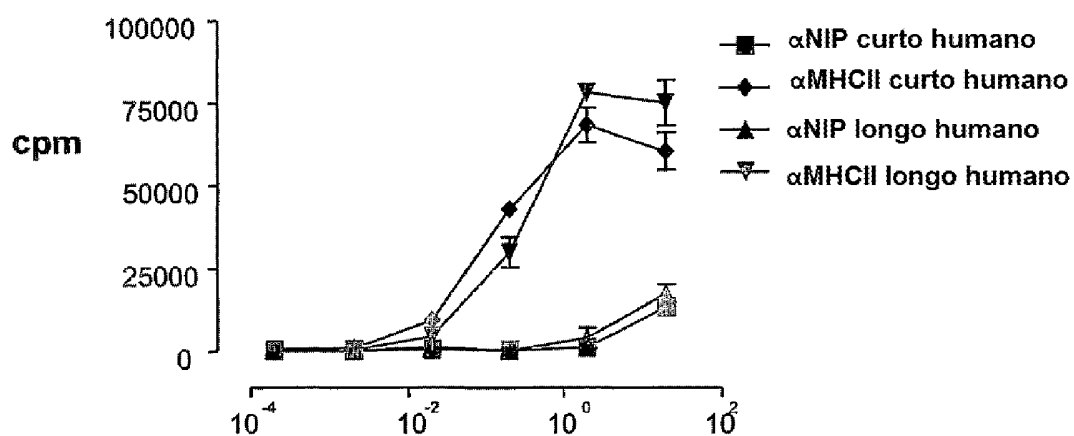


Fig. 5 Os vacicorpos exibem ligação ao DNP, logo o scFv antigénico é dobrado corretamente.



**Fig. 6 APC pulsadas com quantidades tituladas de vacicorpos
específicos
da classe II do MHC**

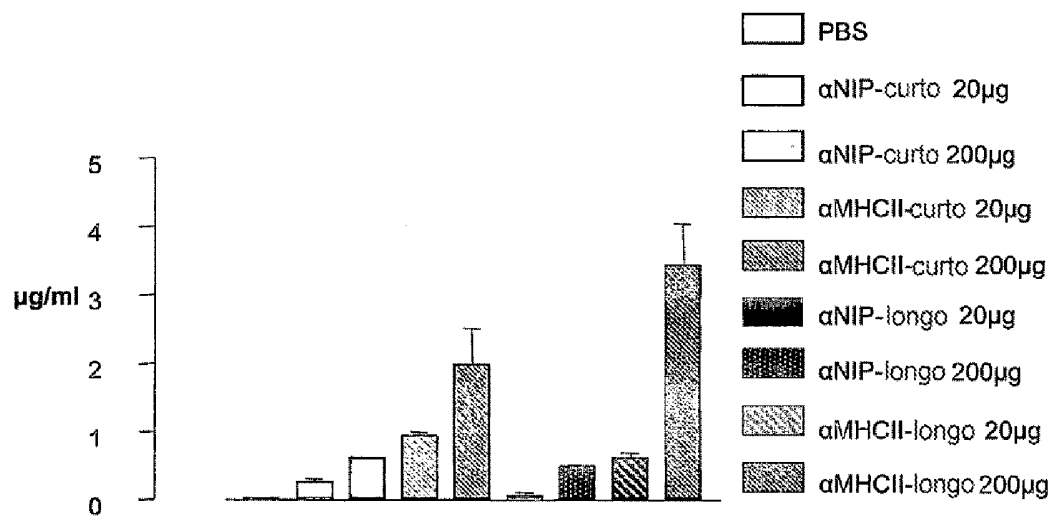
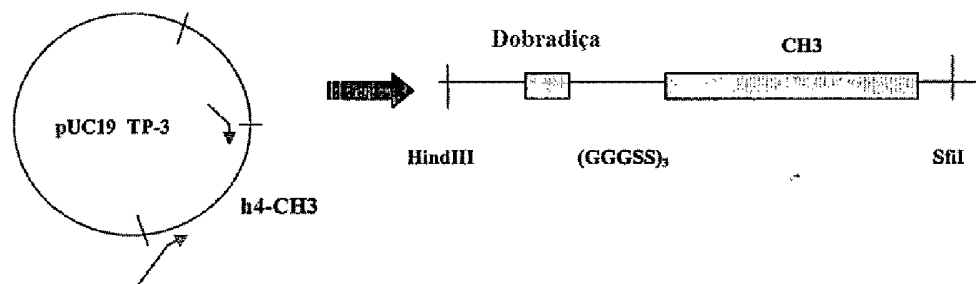


Fig. 7 Os vacicorpos específicos da classe II do MHC induzem uma forte resposta anti-Id Ab na ausência de adjuvantes .

A Dobradiça curta



B Dobradiça longa

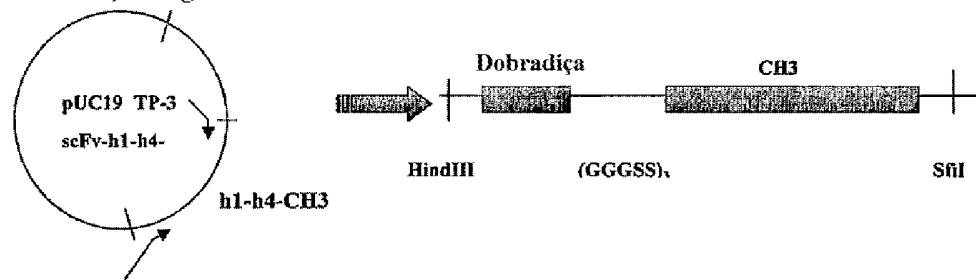


Fig. 8 Construção das duas variantes charneira-Cy3 de origem hIgG3 por PCR.

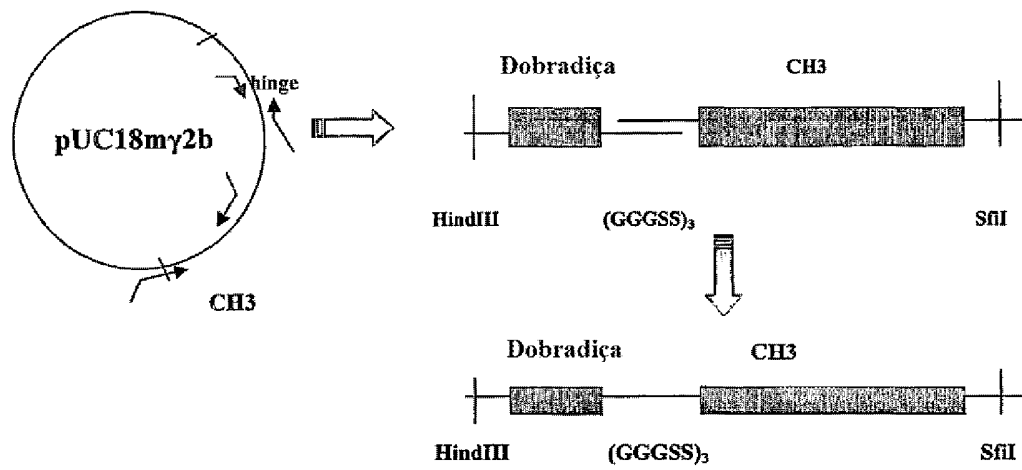


Fig. 9 Construção dos segmentos charneira - Cy3 derivados de mIgG2b.

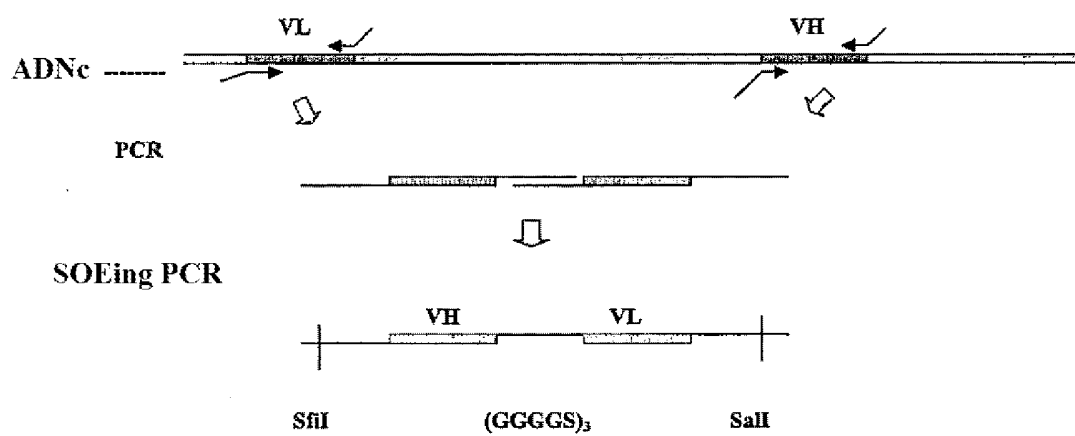


Fig. 10 Construção do scFv derivado da proteína de mieloma M315.

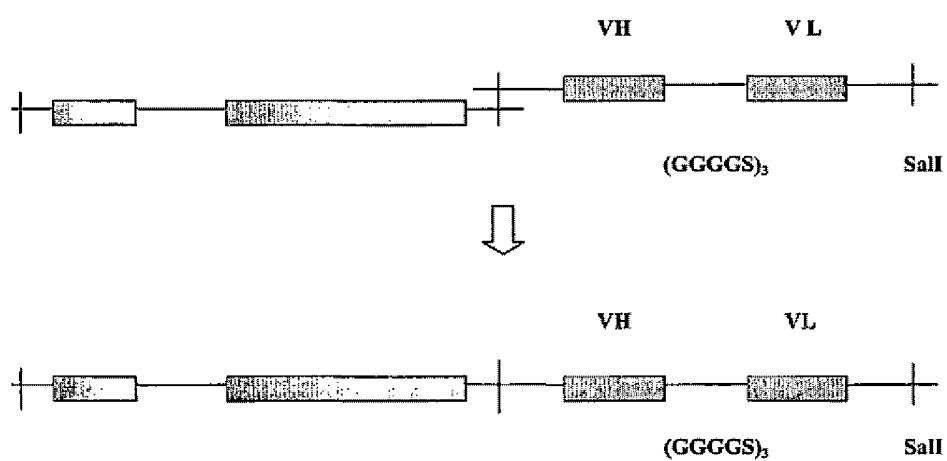


Fig. 11 Junção dos segmentos charneira-Cy3 e do M315 scFv por SOEing PCR.

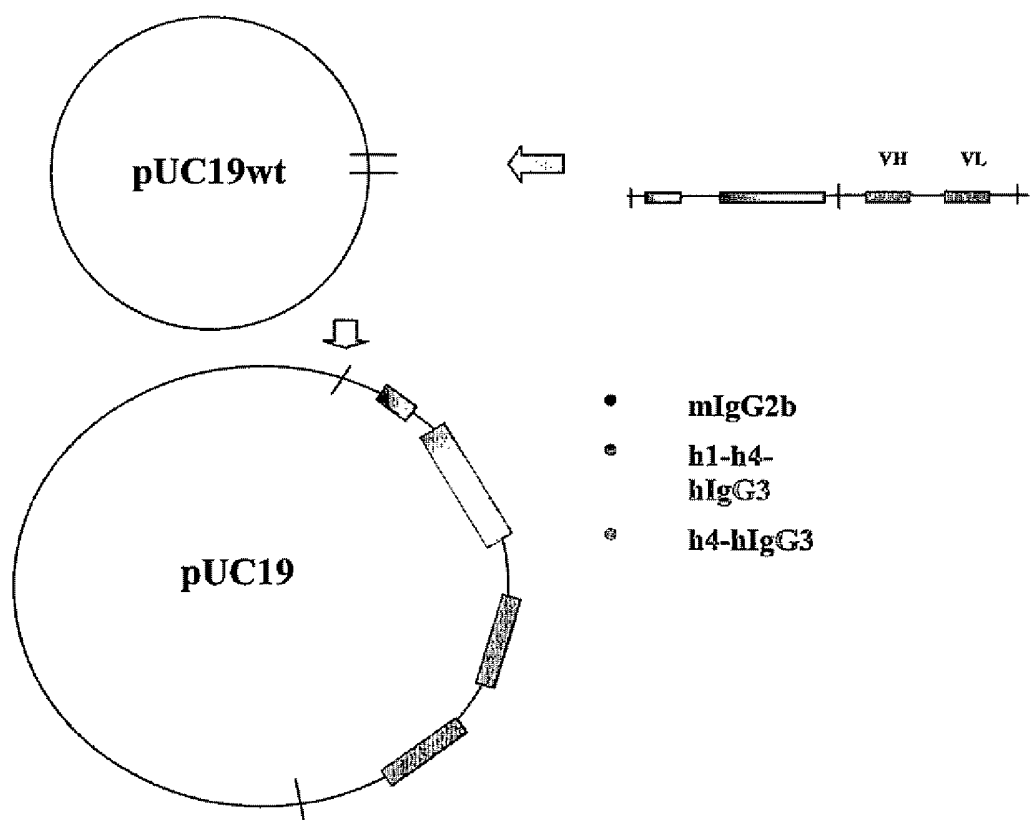


Fig. 12 Subclonagem de charneira - Cy3-M315 scFv em pUC19.

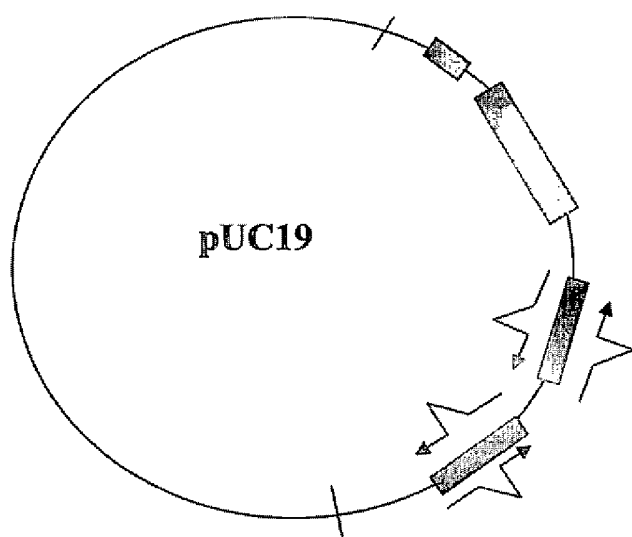


Fig. 13 Remoção de dois locais inconvenientes da enzima de restrição BamHI por QuickChange PCR.

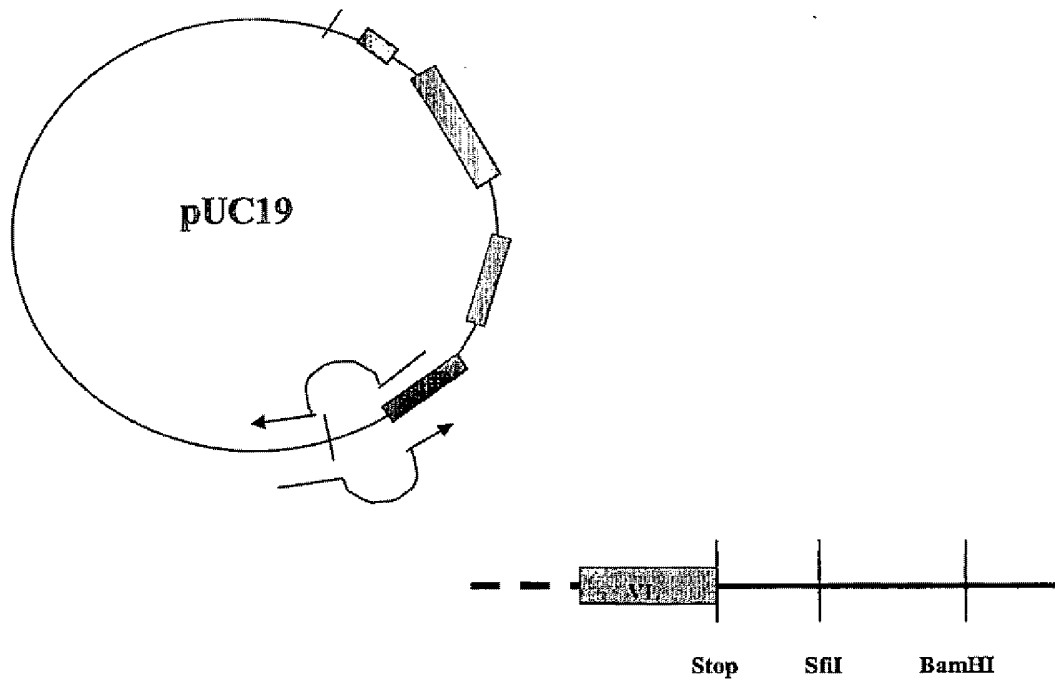


Fig. 14 Introdução de codão de terminação, uma SfiI e um local da enzima de restrição BamHI a jusante da região codificante por QuickChange PCR.

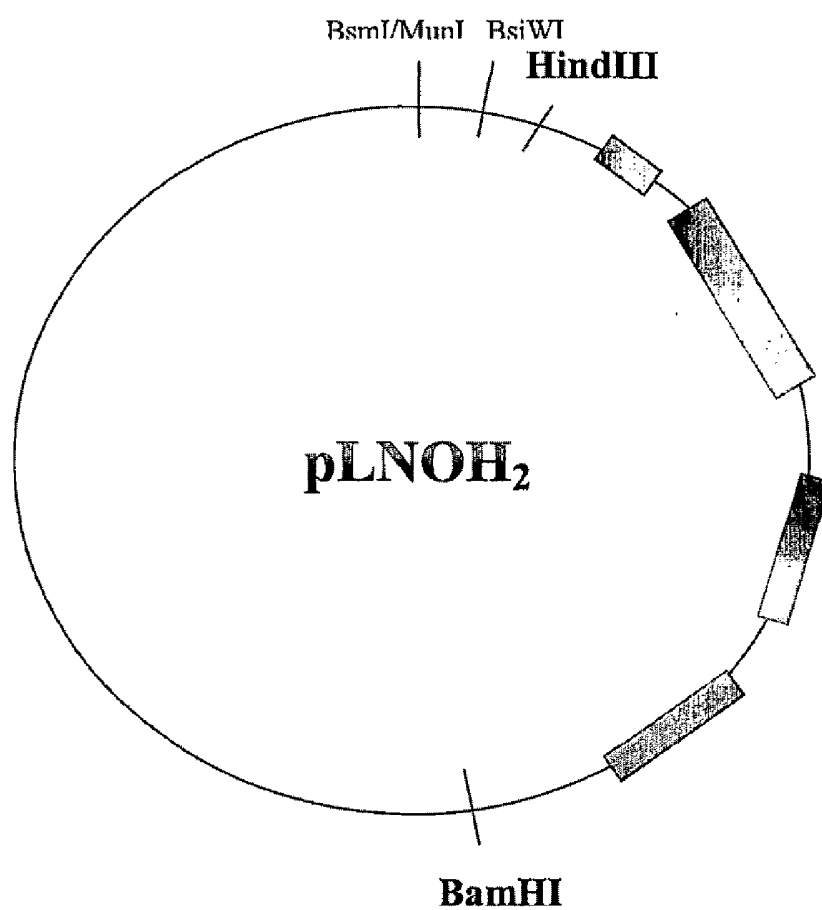


Fig. 15 Subclonagem na cassette C do vetor de expressão pLNOH₂ em HindII-BamHI.

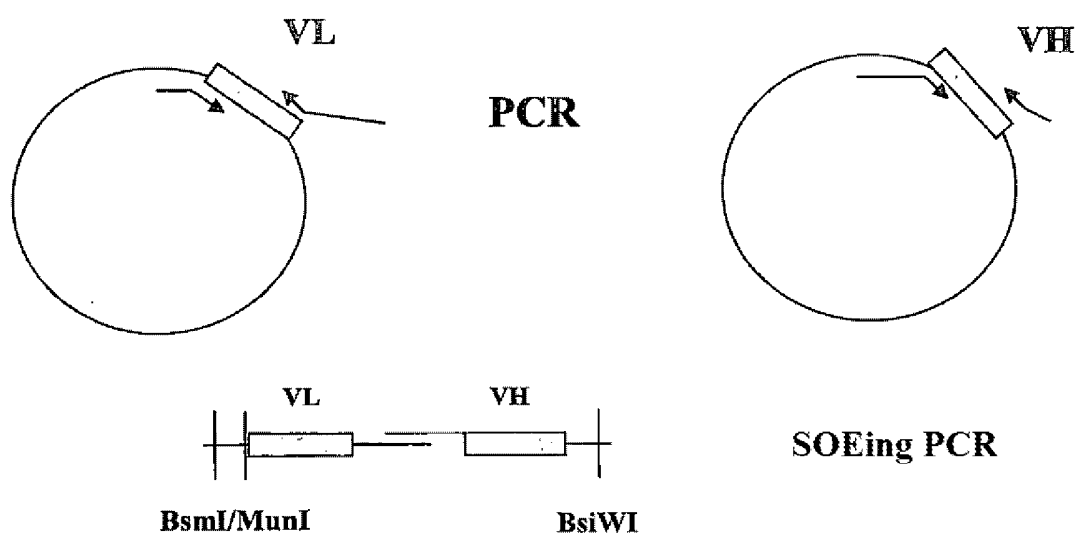


Fig. 16 Clonagem das regiões V específicas para NIP e MHCII e montagem num formato scFv por SOEing PCR.

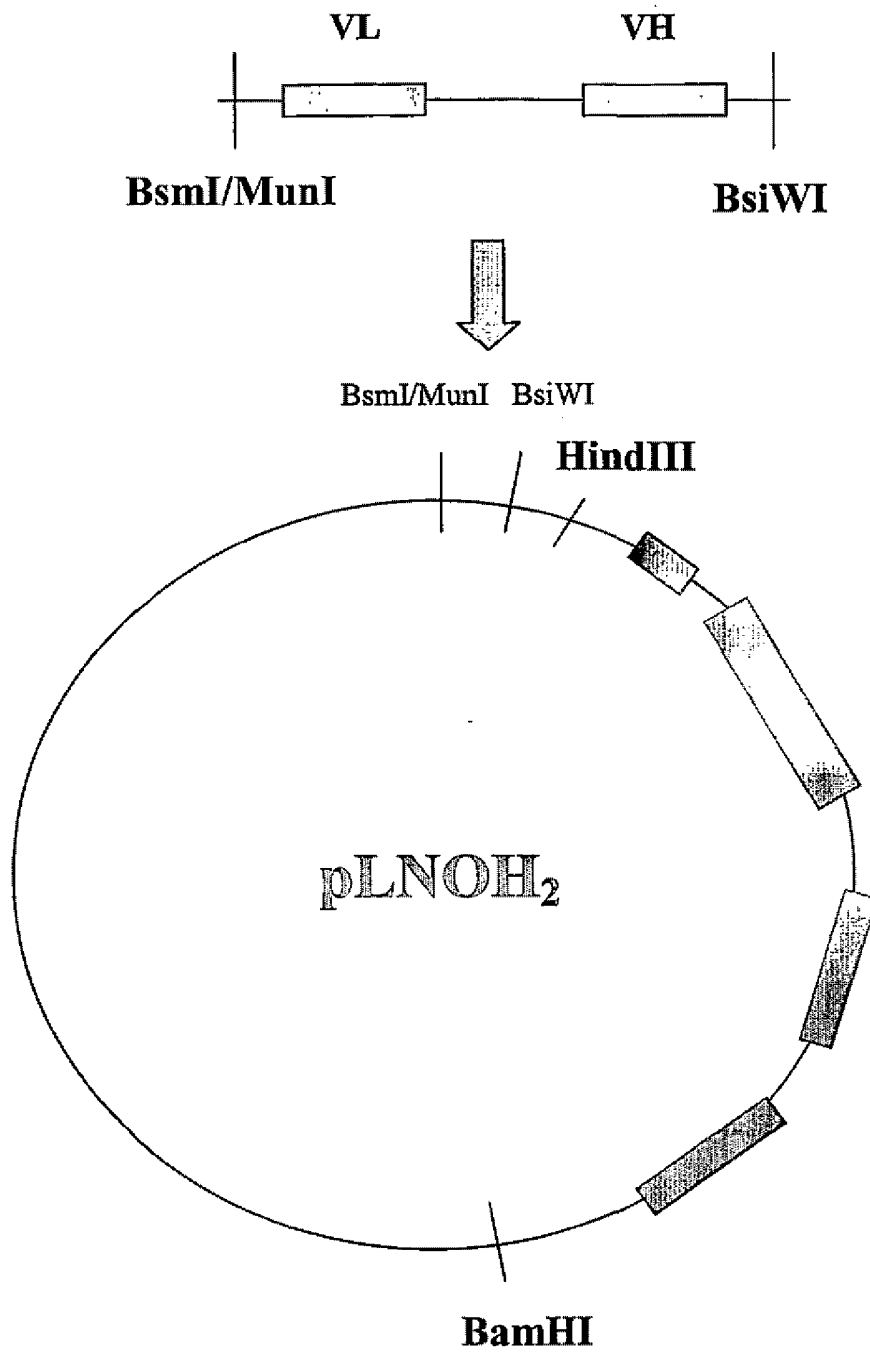


Fig. 17 Subclonagem no vetor de expressão pLNOH₂ em BsmI/MunI e BsiWI

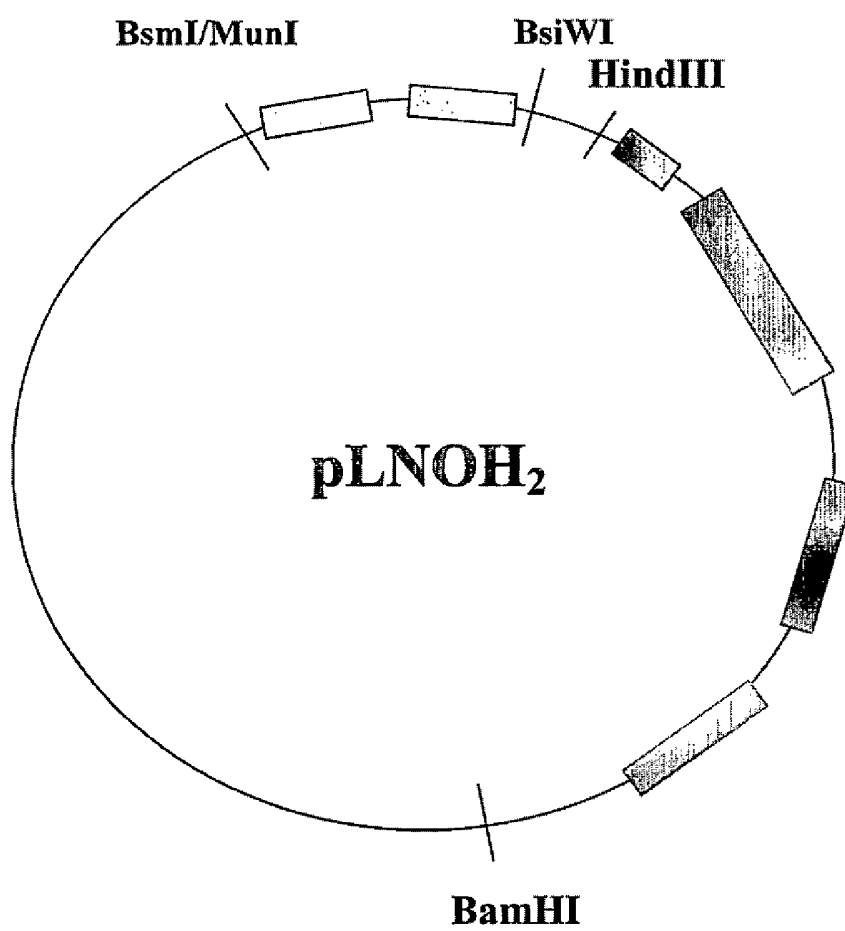


Fig. 18 A construção final do vacicorpo.

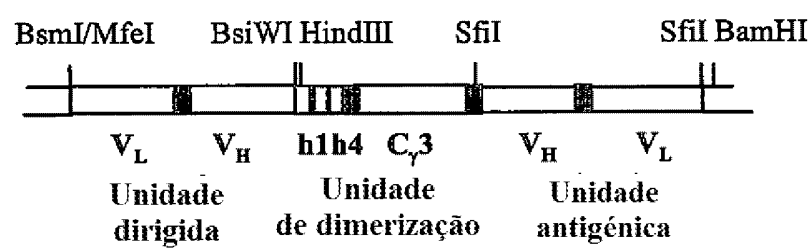


Fig. 19 A construção do gene do vacicorpo.

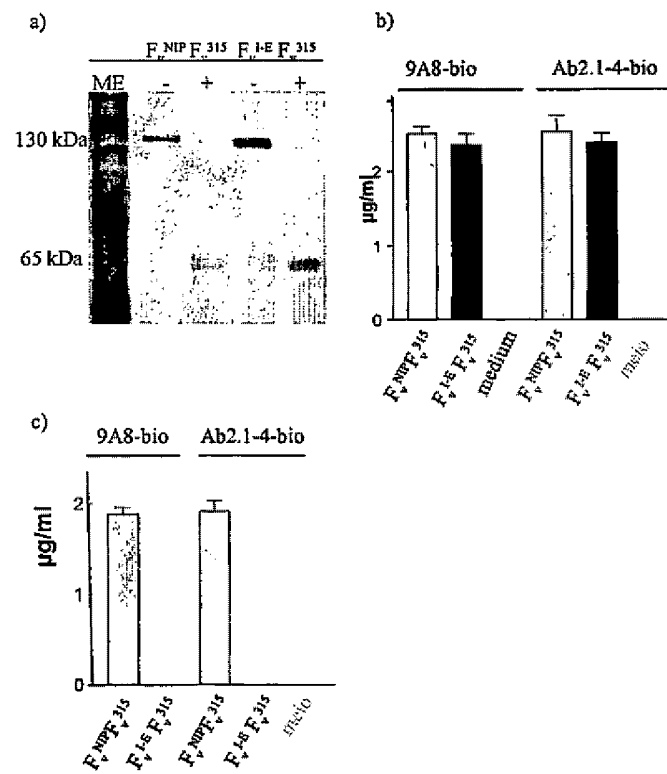


Fig. 20 Vacicorpos são secretados como moléculas funcionais.

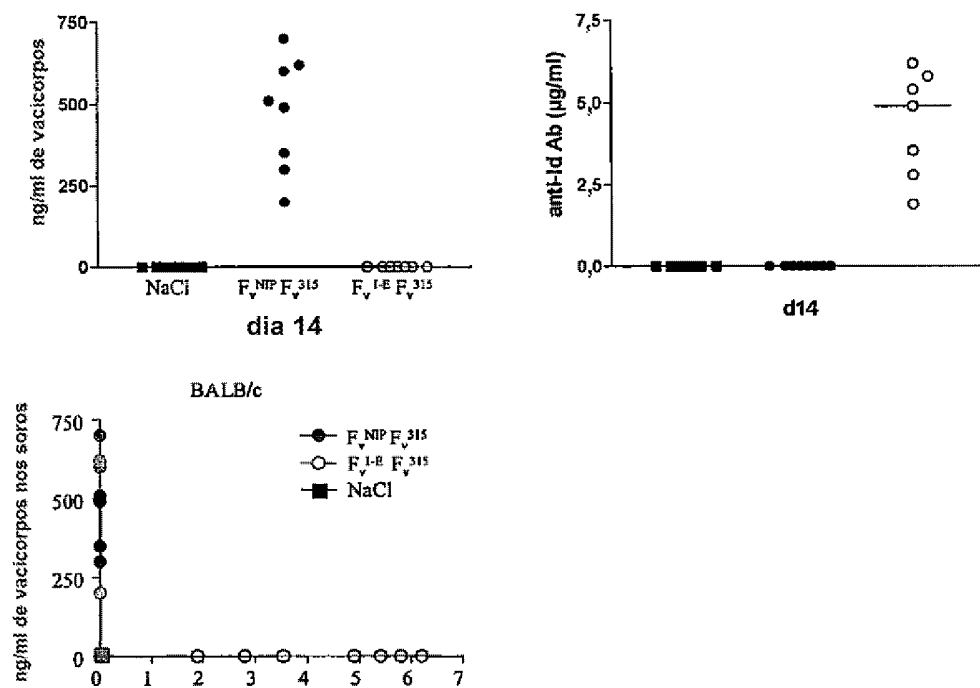


Fig. 21 Produção de vacicorpos por injeção intramuscular de plasmídeos de ADN nus seguida de eletroporação *in vivo*

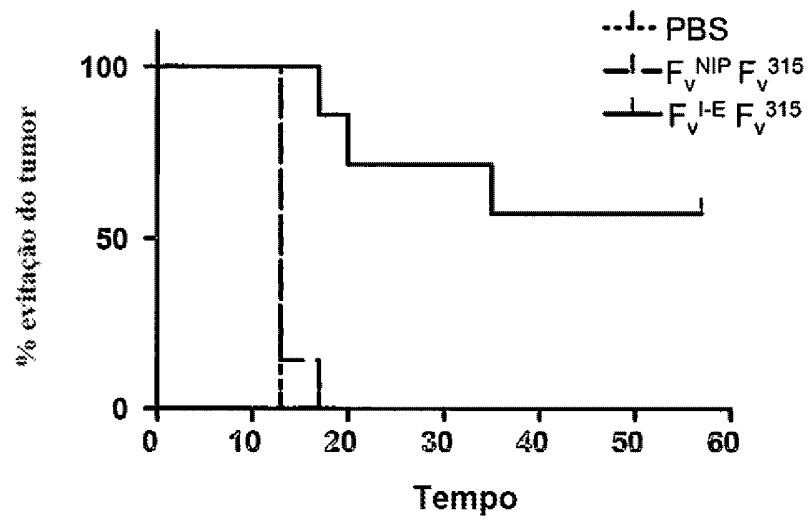


Fig. 22 Evitação do tumor

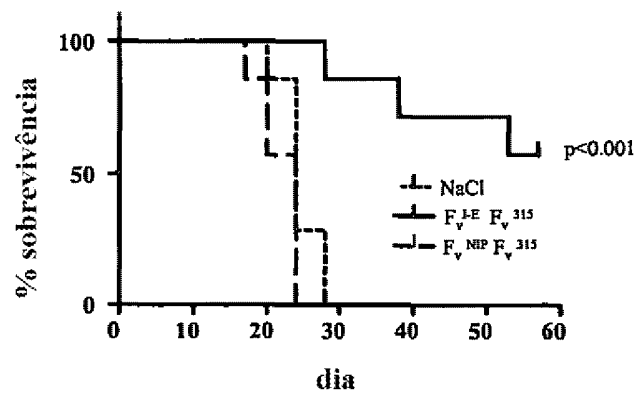


Fig. 23 Indução de imunidade protetora contra o plasmacitoma MOPC315.4

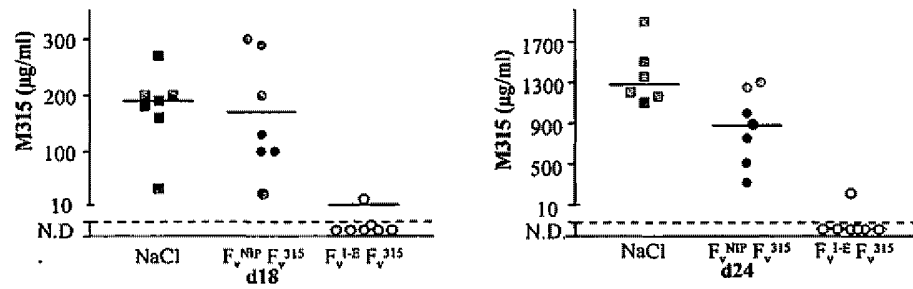


Fig. 24 Nível de proteína do mieloma M315 nos soros de ratinhos no a) dia 18 e b) dia 24 após o desafio com MOPC315.4

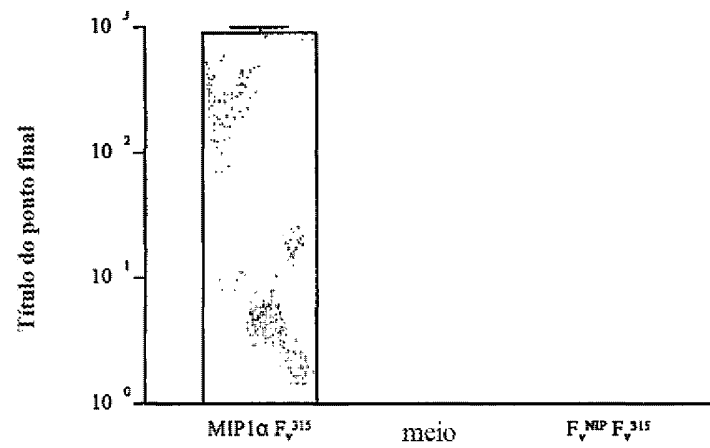


Fig. 25 Vacicorpos de quimiocina são secretados como moléculas funcionais