(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 316 380**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/002 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **00954739 .9**
(96) Fecha de presentación : **18.08.2000**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1204421**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **15.05.2002**

(54) Título: **Complejos de un péptido y de una proteína de estrés como vacunas contra patógenos intracelulares.**

(30) Prioridad: **19.08.1999 GB 9919733**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

(73) Titular/es: **Immunobiology Limited**
Babraham Bioincubators, Babraham
Cambridge CB2 4AT, GB

(72) Inventor/es:
Colaco, Camilo, Anthony, Leo, Selwyn

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Complejos de un péptido y de una proteína de estrés como vacunas contra patógenos intracelulares.

La presente invención se refiere a una vacuna y a un método para producir una vacuna. Más específicamente, se refiere a métodos para producir vacunas de complejos de proteína de choque/fragmento peptídico antigénico de células infectadas por patógenos intracelulares y las composiciones obtenidas de este modo.

Antecedentes de la invención

Un componente importante de cualquier respuesta inmune humana es la presentación de antígenos a células T por células presentadoras de antígenos (APC), tales como macrófagos, células B o células dendríticas. Los fragmentos peptídicos de antígenos extraños se presentan sobre la superficie del macrófago en combinación con moléculas de complejo principal de histocompatibilidad (MHC), en asociación con moléculas auxiliares, tales como moléculas CD4 y CD8. Tales fragmentos peptídicos antigénicos presentados de este modo se reconocen por el receptor de células T de células T. La interacción de los fragmentos peptídicos antigénicos con el receptor de células T da como resultado proliferación de células T específicas de antígeno y secreción de linfocinas por las células T. La naturaleza del fragmento peptídico antigénico presentado por las APC es crítica para establecer la inmunidad.

Las proteínas de choque térmico (HSP) forman una familia de proteínas altamente conservadas que están ampliamente distribuidas a lo largo de los reinos vegetal y animal. Basándose en sus pesos moleculares, las HSP se agrupan en seis familias diferentes: pequeña (hsp 20-30 kDa); hsp40; hsp60; hsp70; hsp90; y hsp100. Aunque las HSP se identificaron originalmente en células sometidas a estrés térmico, se ha observado que están asociadas a muchas otras formas de estrés, tales como infecciones, y se conocen, por tanto, más comúnmente como proteínas de estrés (SP). Por conveniencia, las iniciales SP se usarán en este documento para indicar en general todas las formas de proteínas de estrés producidas de cualquier modo y la iniciales HSP se usarán para indicar las proteínas que se hayan producido por estrés térmico.

Los miembros de la familia hsp90 de mamífero incluyen hsp90 citosólica (hsp83) y los compañeros de retículo endoplásmico hsp90 (hsp83), hsp87, Grp94 (Erp99) y gp97, véase, por ejemplo, Gething *et al*. (1992) Nature 355: 33-45. Los miembros de la familia hsp70 incluyen hsp70 citosólica (p73) y hsp70 (p72), el compañero de retículo endoplásmico BiP (Grp78) y el compañero mitocondrial hsp70 (Grp75). Los miembros de la familia hsp60 de mamífero solamente se han identificado en la mitocondria.

Las SP son ubicuas dentro de las células. Uno de los papeles de las SP es acompañar a los péptidos de un compartimento celular al otro y presentar los péptidos a las moléculas de MHC para la presentación en la superficie celular al sistema inmune. En el caso de células enfermas, las SP también acompañan a péptidos víricos o asociados a tumor a la superficie celular, véase Li y Sirivastave (1994) Behring Inst. Mitt, 94: 37-47 y Suzue *et al*. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13146-51. La función de acompañante se consigue por la formación de complejos entre las SP y los fragmentos peptídicos antigénicos y entre las SP y los fragmentos peptídicos víricos o asociados a tumor en una reacción dependiente de ATP. Las SP se unen o combinan con un amplio espectro de fragmentos peptídicos de un modo dependiente de ATP. Parece que los péptidos en tales complejos son una mezcla aleatoria de fragmentos peptídicos. Las mezclas y las naturalezas exactas de los fragmentos peptídicos no se han determinado. Del mismo modo, se ha observado la formación de complejos de SP con diversos fragmentos peptídicos en tejidos normales y no es un fenómeno específico de tumor, véase Srivastava (1994) Experimentia 50: 1054-60.

En un contexto terapéutico, se ha propuesto usar HSP de mamífero como vacunas. Los documentos WO 97/10000 y WO 97/10001 describen que una mezcla de HSP aisladas de células cancerosas o células infectadas víricamente son capaces de suscitar inmunidad protectora o linfocitos T citotóxicos para el antígeno tumoral o vírico afín. Sin embargo, por el contrario, las HSP aisladas de células normales son incapaces de suscitar tal inmunidad. Actualmente se piensa que las HSP no son inmunogénicas en sí, pero son capaces de suscitar inmunidad debido a su asociación con fragmentos peptídicos antigénicos específicos de tumor o virus que se generan durante el procesamiento de antígenos. Específicamente, los fragmentos peptídicos asociados a las HSP son inmunogénicos y se presentan a las células T. Las HSP separadas de fragmentos peptídicos asociados pierden su capacidad inmunógena, véase Udono, H. y Srivastava, P. K., Journal of Experimental Medicine, 178, páginas 1391 y siguientes, 1993. Hasta la fecha, la naturaleza de estos fragmentos peptídicos no se ha determinado.

Actualmente se considera que la capacidad inmunógena de SP no se produce por la SP en sí, sino por el complejo de fragmentos peptídicos asociados a la SP. Esta conclusión se basa en varias características de los complejos. No existen diferencias en la estructura de las SP obtenidas de células normales y tumorales. Determinados complejos de las SP con fragmentos peptídicos pierden su capacidad inmunógena después del tratamiento con ATP, Udono *et al*. (1993) J. Exp. Med. 178: 1391-96. Tal pérdida de capacidad inmunógena se debe a la disociación del complejo en sus componentes SP y de péptido. La capacidad inmunógena de preparaciones de SP depende de la presencia de células fagocitarias, tales como macrófagos y otras APC. Actualmente se piensa que las SP se captan por macrófagos y que los fragmentos peptídicos asociados a las SP se presentan después por las moléculas de clase I del MHC del macrófago. De este modo se inicia una respuesta de células T.

El uso de complejos de HSP de mamífero/fragmento peptídico antigénico como vacunas contra patógenos intracelulares se ha descrito en el documento WO 95/24923. Las HSP aisladas de células infectadas por virus se ha sugerido como una fuente de péptidos antigénicos, que se podrían presentar después a células T. Esto necesita la producción y purificación de HSP de tales células. La estimulación de células por choque térmico produce un aumento general en el nivel de proteínas de choque térmico.

El documento WO 98/34641 describe el tratamiento de enfermedades infecciosas mediante inyección de complejos de proteína o proteínas de choque térmico unidas no covalentemente a moléculas antigénicas.

En Heikema *et al*. (1997) se infectaron células con virus Semliki Forest recombinante que expresa la nucleoproteína del virus de la gripe. Se han usado complejos de proteína de choque térmico aislados de estas células para la inmunización.

Ni en el documento WO98/34641 ni en Heikema *et al*. (1997) se obtuvieron los complejos después de tratamiento térmico o con TNF.

Sin embargo, no se ha sugerido que se puedan tratar células por choque térmico u otros estreses, para aumentar los niveles intracelulares de las HSP. Esto se debe probablemente a que, aunque sería deseable estimular la producción de solamente un subconjunto de HSP, que son específicamente inmunogénicas, actualmente no hay modo de estimular específicamente células para producir un subconjunto de este tipo de HSP con capacidad inmunógena aumentada.

Sumario de la invención

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método *in vitro* para producir una composición de vacuna que comprende un componente activo de determinante inmunogénico, caracterizado por que comprende las etapas de:

a) someter células infectadas por un patógeno bacteriano, protozoario o parasitario intracelular a estrés con calor o factor de necrosis tumoral; y

b) extraer complejos de SP/fragmento peptídico antigénico de las células estresadas; y

c) usar los productos extraídos como el determinante inmunogénico en la preparación de la composición de vacuna.

Es sorprendente que el tratamiento de células infectadas por un patógeno intracelular con calor o factor de necrosis tumoral produce SP que son más inmunogénicas que las SP obtenidas de células no inducidas o células que se han estresado con otros estímulos. Un aspecto notable de la inmunidad suscitada por estas SP inducidas es la memoria a largo plazo en comparación a la inducida por la inmunización por otros subconjuntos de SP. Las mejores respuestas de memoria para patógenos bacterianos se observan con proteínas de estrés inducidas por calor y para patógenos protozoarios y parasitarios con factor de necrosis tumoral.

En este documento se usa el término vacuna para indicar cualquier composición que contenga un determinante inmunogénico que estimule el sistema inmune de tal forma que pueda responder mejor a infecciones posteriores. Se entenderá que una vacuna contiene habitualmente un determinante inmunogénico y un adyuvante, que mejora de forma no específica la respuesta a ese determinante.

Preferiblemente, el determinante inmunogénico para la presente invención se suministra en combinación con un adyuvante. Para los especialistas en la técnica estarán claros fácilmente adyuvantes adecuados, tales como el adyuvante completo de Freund, el adyuvante incompleto de Freund, Quil A, Detox, IS-COM o escualeno. Sin embargo, se entenderá que la vacuna de la presente invención también puede ser eficaz sin ningún adyuvante. Una vacuna de este tipo se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, tal como por vía oral o mediante inyección.

Las expresiones proteínas de estrés y proteína de choque térmico, como se usan en este documento, incluyen las proteínas que comprenden las familias GroEL, GroES y DnaK y DnaJ de HSP bacterianas y familias relacionadas en otros patógenos extracelulares. Estas familias se denominan en base al tamaño de los péptidos que codifican. Las familias están altamente conservadas entre especies. Además, muchas bacterias también expresan homólogos de proteínas eucariotas. Preferiblemente, la vacuna contiene una pluralidad de complejos de SP/fragmento peptídico antigénico obtenidos del patógeno estresado. Se prefiere particularmente el uso de las familias de proteínas GroEL, GroES, DnaK y DnaJ como determinantes inmunogénicos en la presente invención, prefiriéndose más DnaJ y GroEL. Preferiblemente, los complejos de SP tienen más del 25% de homología y/o el 20% de identidad a nivel aminoacídico con las familias de proteína HSP inducida por calor.

La presente invención requiere que el tratamiento de estrés que se usa sea capaz de estimular la presencia de SP dentro de las células infectadas. Se prefiere que para células infectadas por patógenos protozoarios y parasitarios, la inducción de estrés sea por factor de necrosis tumoral y, particularmente, factor de necrosis tumoral α (TNF-α). Para células infectadas por patógenos bacterianos, se prefiere que la inducción de estrés sea por tratamiento térmico de las células infectadas a una temperatura 5-10ºC por encima de la temperatura normal de desarrollo de la célula no

infectada. Sin quedar limitado por la teoría, se considera que el tratamiento de las células infectadas por patógeno intracelular funciona para inducir específicamente las HSP más capaces de interactuar con péptidos antigénicos del patógeno o para inducir las HSP que se fagocitan más fácilmente por APC o ambos.

Las condiciones óptimas para inducir las SP se pueden determinar fácilmente por ensayo y error simple y se puede evaluar el efecto de un cambio de estímulos usando técnicas convencionales, tales como ensayo *in vivo* en animales o mediante otras técnicas, por ejemplo, las descritas en "Current Protocols in Immunology", Wiley lnterscience, 1997.

Cuando las células se estresan mediante tratamiento con TNF, el TNF se usa de forma adecuada a 0,5-1000 unidades internacionales (u.i.)/ml de medio, preferiblemente aproximadamente 1-500 u.i./ml. Específicamente, para TNF-α se prefiere que las células se traten con 10-500 u.i./ml y después se cultiven durante 10-16 horas. Alternativamente, las células se pueden cultivar en monocapas de soporte productoras de citoquinas o inducidas para producir TNF endógeno. Además, el tiempo de incubación de células con el estímulo de estrés también es variable. Se prefiere usar un tiempo de exposición de 10-16 horas, pero este tiempo se puede disminuir a 2-4 horas en algunos casos y todavía ser eficaz.

Los medios para ensayar niveles óptimos de calor o TNF y el período de incubación están fácilmente disponibles para el especialista en la técnica. Sin embargo, se entenderá que el tratamiento exacto no es crucial para la invención, ya que el tratamiento estimula la producción de los productos inmunogénicos deseados, de forma notable, los complejos de SP/fragmento peptídico antigénico, dentro de las células tratadas. De forma similar, las demás condiciones de tratamiento, tales como la longitud de exposición y el medio de incubación celular no son características esenciales de la presente invención y se pueden variar dependiendo de la naturaleza exacta de la población celular que se usa. El especialista en la técnica entenderá fácilmente medios para variar y optimizar estos parámetros.

Preferiblemente, el TNF se aísla del mismo organismo que la célula que se tiene que tratar. El tratamiento de células con TNF del mismo organismo proporciona estimulación óptima de la síntesis de los complejos de SP. Sin embargo, el uso de TNF de otras especies o individuos también puede ser útil en la regulación positiva del nivel de SP en células, para proporcionar complejos de SP adecuados para el uso en la presente invención.

Se puede usar cualquier célula o línea celular adecuada infectada por patógeno en la presente invención para proporcionar una fuente de complejos de SP. Las células infectadas se obtienen mediante infección de una línea celular apropiada con el patógeno deseado *in vitro* o mediante el aislamiento de células infectadas por el patógeno *in vivo*. Las células infectadas de este modo se pueden someter después a estrés adecuado *in vitro* para producir complejos de SP inmunogénicos adecuados para la vacunación contra ese patógeno. Esto incluye células recombinantes que expresan antígenos heterólogos del patógeno intracelular deseado. Esto también incluye todos los tipos de células recombinantes transfectadas usadas para producir vacunas recombinantes, tales como líneas celulares de mamífero transfectadas con vectores recombinantes mediante métodos convencionales en la técnica tales como electroporación, fusión de liposomas y fosfato cálcico. Además, la invención también incluye la formación de los complejos de SP deseados a partir de células eucariotas que expresan antígenos de patógeno intracelular heterólogos que responden a tratamiento por calor o TNF. Aunque los fragmentos antigénicos son predominantemente proteínas y péptidos, también pueden incluir carbohidratos, ácido nucleico y restos lipídicos que se unen a SP.

Se entenderá que las células que se tienen que infectar por patógenos intracelulares para el presente uso pueden haberse modificado para permitir que las mismas sinteticen de forma constitutiva las SP inducidas normalmente por los estímulos de estrés extracelulares apropiados, de hecho, tratamiento con calor o TNF, mediante modificación de su estructura genética usando cualquier técnica de ADN recombinante adecuada, por ejemplo, las descritas en "Current Protocols in Molecular Biology", Wiley Interscience, 1997.

La extracción y purificación de materiales proteicos inducidos por el material celular por el estrés aplicado, de hecho, los complejos de SP/fragmento peptídico antigénico del material celular remanente se pueden conseguir usando cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, el material tratado con estrés se puede alterar por homogeneización o fragmentación por ultrasonidos, seguido de centrifugación para obtener una preparación de SP sin procesar en el sobrenadante. Las preparaciones de SP endógenas sin procesar se pueden usar directamente como la vacuna de la invención. Opcionalmente, las preparaciones de SP se pueden purificar adicionalmente mediante el uso de columnas de unión de ADP o mediante otros métodos adecuados disponibles de forma fácil para el especialista en la técnica, véase, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 97/10000 y WO 97/10001.

Se entenderá que se pueden aislar complejos inmunogénicos específicos de SP/fragmento peptídico antigénico de la mezcla de complejos producida por el estrés del material celular para producir una vacuna que sea específica de patógeno. Sin embargo, esto habitualmente no se requerirá y la mezcla de complejos se puede usar para inducir inmunización de amplio espectro. Si se desea, los fragmentos peptídicos antigénicos específicos se pueden recuperar del complejo, por ejemplo, mediante tratamiento con ATP usando técnicas convencionales.

El complejo de SP/fragmento peptídico antigénico de la vacuna de la presente invención se puede suministrar en combinación con un adyuvante y en un vehículo acuoso. Los adyuvantes adecuados son fácilmente evidentes para el especialista en la técnica, tales como adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, Quil A, Detox, ISCOM o escualeno. Sin embargo, las composiciones de vacuna de la presente invención también pueden ser eficaces sin ningún adyuvante.

La invención también proporciona un uso de una vacuna de la invención opcionalmente en combinación con un adyuvante, en la preparación de un medicamento para suscitar una respuesta inmune en un animal. El animal típicamente es un ser humano. Sin embargo, la invención también se puede aplicar a otros mamíferos, tales como caballos, vacas, cabras, ovejas o cerdos y a aves, en particular, aves de corral tales como pollos o pavos.

Las composiciones de vacuna de la presente invención se pueden administrar mediante cualquier medio adecuado, tal como por vía oral, mediante inhalación, por vía transdérmica o mediante inyección y en cualquier medio de soporte adecuado. Sin embargo, se prefiere administrar la vacuna como una composición acuosa mediante inyección usando cualquier técnica adecuada con aguja o sin aguja.

Las vacunas de la invención pueden contener cualquier concentración adecuada del complejo de SP/fragmento peptídico antigénico. Se prefiere que el complejo de SP se administre en el intervalo de 10-600 μg, preferiblemente 10-100 μg, mucho más preferiblemente 25 μg por kg de peso corporal del animal que se está tratando. Se entenderá que la vacuna de la invención se puede aplicar como un tratamiento inicial seguido de uno o más tratamientos posteriores con la misma velocidad de dosificación o una diferente con un intervalo de 1 a 26 semanas entre cada tratamiento para proporcionar inmunización prolongada contra el patógeno.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar pero no para limitar la invención. Las Figuras 1 a 3 son perfiles de electroforesis capilar de zona (CZE) de los complejos de SP obtenidos por diversos métodos de estrés. La Figura 1 es el perfil de CZE de péptidos/polipéptidos aislados de SP constitutivas aisladas de macrófagos peritoneales de ratón infectado por *M. tuberculosis*; la Figura 2 es el perfil de CZE de péptidos/polipéptidos aislados de SP inducidas por calor aisladas de macrófagos peritoneales de ratón infectado por *M. tuberculosis*; y la Figura 3 es el perfil de CZE de péptidos/polipéptidos aislados de SP inducidas por TNF aisladas de macrófagos peritoneales de ratón infectado por *M. tuberculosis*.

Ejemplo 1

Preparación de SP inducidas por calor

Se lavaron células infectadas por *M. bovis* en un medio sin suero, tal como RPMI (Sigma), después se sometieron a choque térmico a 45ºC durante 0,5 h o a 42ºC durante 5 h y se cultivaron durante una noche. Después, las células se lavaron en medio sin suero, seguido de un lavado en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después, las células se resuspendieron en tampón de homogeneización. El tampón de homogeneización puede ser un tampón hipotónico, tal como fosfato 10 mM pH 7,4 con $MgCl_2$ 2 mM, después de lo cual se rompen las células usando un homogeneizador celular (por ejemplo, un homogeneizador Dounce o Potter, combinador Ultraturrax o Waring). Alternativamente, el tampón de homogeneización puede contener detergente, tal como PBS con Tween al 0,5%, estando la concentración del detergente entre 0,1-1% y siendo adecuada para solubilizar la membrana celular. Después, el lisado celular se trata por centrifugación, típicamente 3-5000 g durante 5 minutos para retirar los núcleos y los restos celulares, seguido de una etapa de centrifugación a alta velocidad, típicamente 100.000 g durante 15-30 minutos. El sobrenadante obtenido de este modo se procesa para producir un complejo de SP/fragmento peptídico antigénico adecuado para el uso en una vacuna. Esto se puede realizar simplemente por precipitación con sulfato de amonio que usa un intervalo de sulfato de amonio del 20-70%. Específicamente se añade sulfato de amonio al 20% (p/p) a 4ºC, se desecha el precipitado, seguido de la adición de más sulfato de amonio para llevar la concentración al 70% p/p. El precipitado de proteína se recupera por centrifugación y después se dializa en un tampón fisiológico apropiado, inyectable, tal como solución salina, para eliminar el sulfato de amonio antes del uso. Se entenderá que los complejos de SP aislados de este modo no se purifican hasta homogeneidad, pero, sin embargo, son adecuados para el uso como un componente de vacuna.

Si se requiere una preparación de complejo de SP más purificada, los complejos se pueden purificar del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad sobre matrices que llevan difosfato de adenosina, tales como ADP-agarosa o ADP-sepharose. Estos métodos se describen en el documento WO 97/10000, el documento WO 97/10001 y el documento WO 97/10002.

Los complejos de SP se pueden usar a cualquier concentración adecuada para proporcionar el determinante inmunogénico en la composición de vacuna. Se prefiere que la cantidad de complejo de SP inducido que se administra esté en el intervalo de 10-600 μg, preferiblemente 10-100 μg, mucho más preferiblemente 25 μg por kg de peso corporal del animal.

Para determinar la capacidad inmunógena de los complejos de SP se pueden usar ensayos de proliferación de células T. Los ensayos adecuados incluyen la reacción de linfocitos mixtos (MLR), ensayados por captación de timidina tritiada y ensayos de citotoxicidad para determinar la liberación de ^{51}Cr de células diana, véase "Current Protocols in Immunology", Wiley lnterscience, 1997. Alternativamente, se puede examinar la producción de anticuerpos usando inmunoensayos convencionales o ensayos de lisis de placa o evaluar por protección intrauterina de un feto, véase "Current Protocols in Immunology".

Ejemplo 2

Preparación de SP inducidas por TNF

Se incubaron líneas celulares infectadas con el patógeno palúdico *Plasmodium* en un medio sin suero, tal como RPMI (Sigma), y se incubaron con TNF-α durante una noche. Típicamente se infectaron hepatocitos de hígado de rata preparados por tratamiento con colagenasa de tejido hepático de rata con *Plasmodium berghei* mediante incubación de células hepáticas de rata con 3 veces el número de células de parásito durante 5 h a 35ºC. Después, las células se incubaron durante una noche a 37ºC con o sin TNF-α. Después se lavaron células inducidas por TNF y de control en medios sin suero seguido de un lavado en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Después, las células se re-suspenden en tampón de homogeneización y se rompen usando un homogeneizador celular mediante ciclos de congelación-descongelación o por lisis con detergente. Después, el lisado celular se trata por centrifugación, típicamente 3-5000 g durante 5 minutos, para retirar los núcleos y los restos celulares, seguido de una etapa de centrifugación a alta velocidad, típicamente 100.000 g durante 15-30 minutos. El sobrenadante obtenido de este modo que se procesa para producir un complejo de SP adecuado para el uso en una vacuna como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3

Inmunización con SP inducidas; inmunidad en destinatario de vacuna

Se prepararon SP como se ha descrito anteriormente y se vacunaron ratones y conejos con 1-10 microgramos del extracto que contiene proteína de estrés en solución salina tamponada con fosfato y se reforzaron con dosificaciones de vacuna idénticas un mes después de la inyección primaria. Se ensayó la inducción de inmunidad frente al patógeno por análisis de transferencia de Western usando proteínas totales de *Plasmodium* o *M. bovis*. Se obtuvieron de forma rutinaria los títulos de anticuerpos de 1:1-10.000 y en los ratones inmunizados también se podría detectar la actividad de células T citotóxicas dirigida contra células infectadas por patógeno. La exposición de los conejos a *Plasmodium* fijado o *M. bovis* en períodos de 6, 12 y 18 meses después de las inmunizaciones iniciales dio como resultado la producción de buenas respuestas de anticuerpos indicando títulos de 1:1-10.000 buenas repuestas de memoria en los animales inmunizados.

Ejemplo 4

Comparación de péptidos asociados en complejos de SP constitutivos e inducidos y su uso como vacunas

Se infectaron macrófagos peritoneales de ratón aislados por lavado de cavidad peritoneal con *M. tuberculosis* (3 x 10^6 células incubadas con 10^7 células bacterianas durante 6 h a 35ºC). Los cultivos celulares infectados se cultivaron durante una noche en presencia o ausencia de 1 μg/ml de TNF-α a 37ºC, para el aislamiento de SP constitutivas o inducidas por TNF o se sometieron a choque térmico por incubación a 42ºC durante 2 h para el aislamiento de SP inducidas por calor (HSP). Las células tratadas se sedimentaron por centrifugación a 3000 g durante 5 minutos y se resuspendieron en solución de lisis de Tween al 1% en Tris-HCl 100 mM, pH 8. El lisado celular se centrifugó a 5000 g durante 5 minutos para eliminar los núcleos y restos celulares, seguido de una etapa de centrifugación a alta velocidad a 100.000 g durante 15-30 minutos. Se prepararon las SP y HSP a partir de los lisados aclarados por precipitación con sulfato de amonio como se ha descrito en el anterior Ejemplo 1.

Los péptidos asociados se eluyeron de las HSP y SP purificadas resuspendiendo los complejos precipitados en ácido acético al 10% e hirviendo durante 15 minutos para disociar los complejos. Las HSP y SP desnaturalizadas se sedimentaron en una Airfuge (ultracentrífuga) de Beckman durante 30 minutos en un espacio frío y los sobrenadantes que contenían péptido se recuperaron por secado por congelación y se analizaron por electroforesis capilar de zona usando un sistema de CZE de Beckman. Los perfiles de CZE de los péptidos eluídos de las SP de *M. tuberculosis* constitutivas e inducidas por TNF y las HSP eran significativamente diferentes entre sí como se muestra en las Figuras 1-3, indicando que los tres tipos de SP llevaban familias diferentes de péptidos asociados. La inmunización de conejos con los tres tipos de SP mostró títulos de anticuerpos similares en animales inmunizados con las SP constitutivas e inducidas por TNF en comparación con títulos de anticuerpos significativamente mayores (10-50x) en animales inmunizados con SP bacterianas inducidas por calor. La inmunización con mezclas de los péptidos eluídos y las SP o HSP desnaturalizadas de las que se aislaron dio malas respuestas de anticuerpos indicando que la inmunidad inducida requiere complejos de SP-péptidos asociados nativos, intactos.

Ejemplo 5

Comparación de SP constitutivas e inducidas como vacunas

Se prepararon hepatocitos de hígado de rata forzando los hígados de rata PVG digeridos con colagenasa a través de un tamiz de malla fina y lavando las células aisladas por centrifugación por medio de cultivo tisular DMEM. Las células lavadas se resuspendieron con una densidad celular de $7x10^6$ células/ml y se infectaron con *Plasmodium berghei* mediante co-cultivo a 37ºC durante 4 h. Se usaron células infectadas para preparar lisados para el ensayo de título de anticuerpos o se cultivaron durante una noche en presencia o ausencia de 1 μg/ml de TNF-α a 37ºC para

el aislamiento de SP constitutivas o inducidas por TNF. Las células se sedimentaron por centrifugación a 3000 g durante 5 minutos y se resuspendieron en solución de lisis de Tween al 1% en Tris-HCl 100 mM, pH 8. El lisado celular se centrifugó a 5000 g durante 5 minutos para retirar los núcleos y restos celulares, seguido de una etapa de centrifugación a alta velocidad a 100.000 g durante 15-30 minutos. Después, se usó el lisado aclarado para ensayos de títulos de anticuerpos o para aislar SP para la inmunización. Se prepararon SP constitutivas e inducidas por TNF a partir de los lisados aclarados mediante precipitación con sulfato de amonio como se ha descrito en el anterior Ejemplo 1.

Se inmunizaron conejos con las SP aisladas a partir de bacterias constitutivas o inducidas con TNF e inducidas por calor resuspendidas en solución salina tamponada con fosfato sin ningún adyuvante añadido en ninguna de las vacunaciones primaria o de refuerzo. Los títulos de anticuerpos en los animales inmunizados se ensayaron por diluciones seriadas de factor 10 usando un ensayo de transferencia puntual en lisados celulares totales preparados a partir de hepatocitos infectados recientemente como en el anterior análisis descrito. Los animales vacunados con SP inducidas por TNF mostraron un título de anticuerpos de 10 a 100 veces superior al de los inmunizados con SP constitutivas.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para producir una vacuna que contiene un determinante inmunogénico, **caracterizado** porque comprende las etapas de:

a) someter células infectadas por un patógeno intracelular bacteriano, protozoario o parasitario a estrés con calor o factor de necrosis tumoral; y

b) extraer complejos de proteína de choque endógena/fragmento peptídico antigénico de las células estresadas; y

c) usar los productos extraídos como el determinante inmunogénico en la preparación de la composición de vacuna.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el ingrediente activo del determinante inmunogénico consiste predominantemente en uno o más complejos de proteína de choque/fragmento peptídico antigénico.

3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque las células se infectan por patógenos bacterianos y el estrés aplicado es calor.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado** porque el estrés térmico se consigue calentando de 5 a 8º por encima de la temperatura normal de cultivo de las células.

5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque las células se infectan por patógenos parasitarios y el estrés se induce por factor de necrosis tumoral.

6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque las células se han modificado para inducir síntesis de proteínas de estrés.

7. Una composición de vacuna que contiene un determinante inmunogénico, **caracterizada** porque el determinante inmunogénico se produce mediante un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada** porque la composición también contiene un adyuvante para el determinante inmunogénico.

9. Una composición de vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizada** porque la composición es una composición acuosa.

10. Uso de una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en la preparación de un medicamento para suscitar una respuesta inmune en un animal.

11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado** porque la composición de vacuna es para la administración mediante inyección.

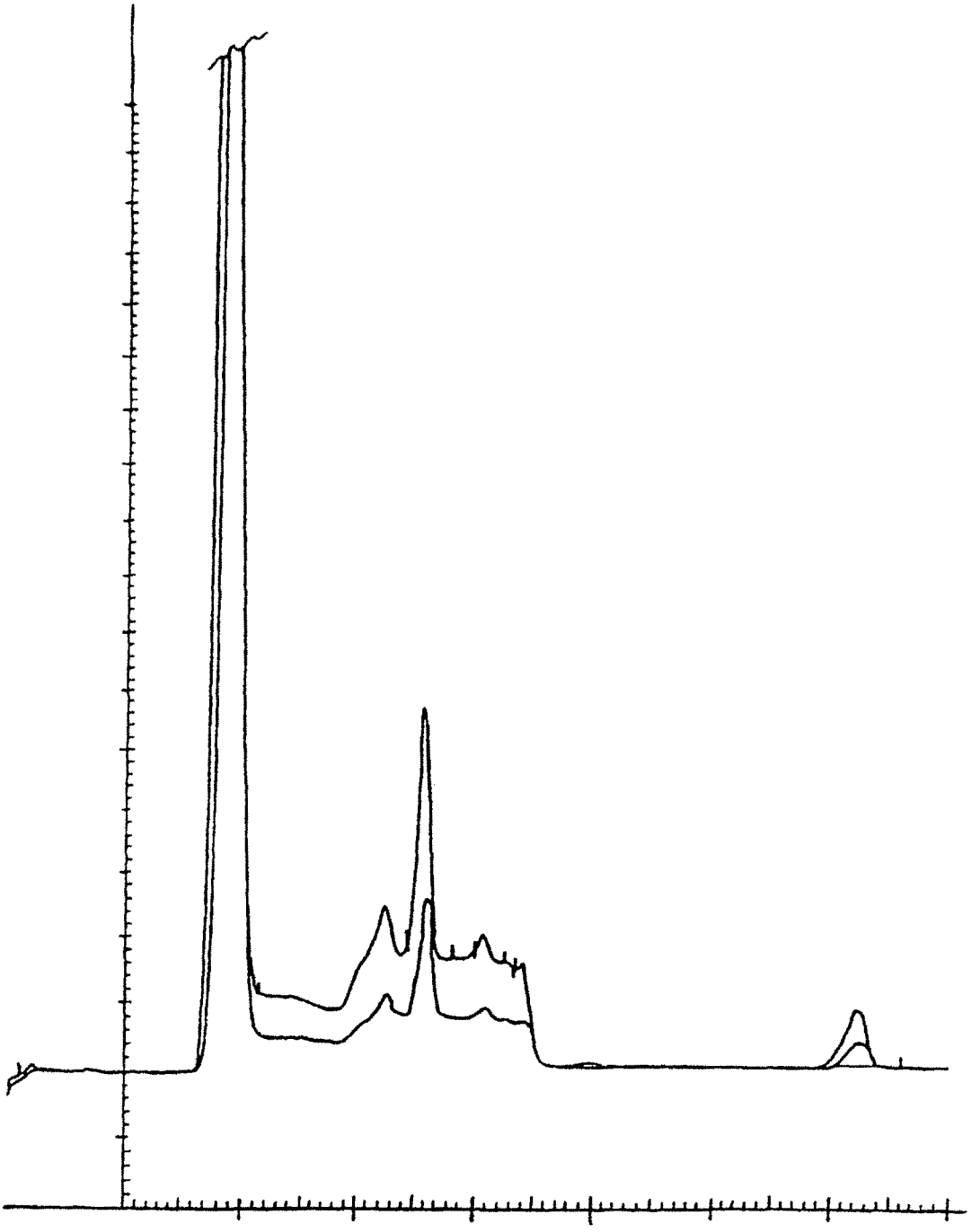


Fig. 1

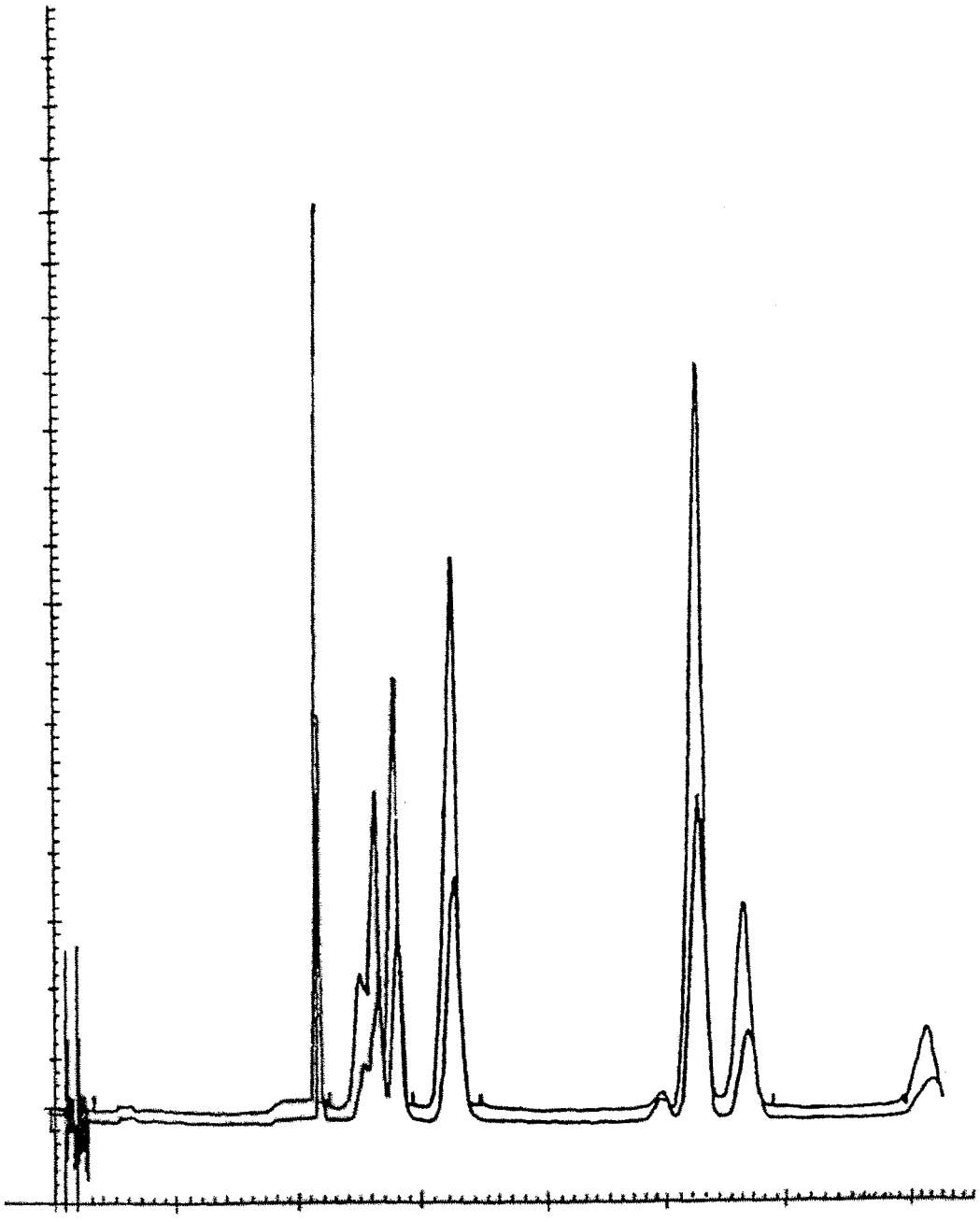


Fig. 2

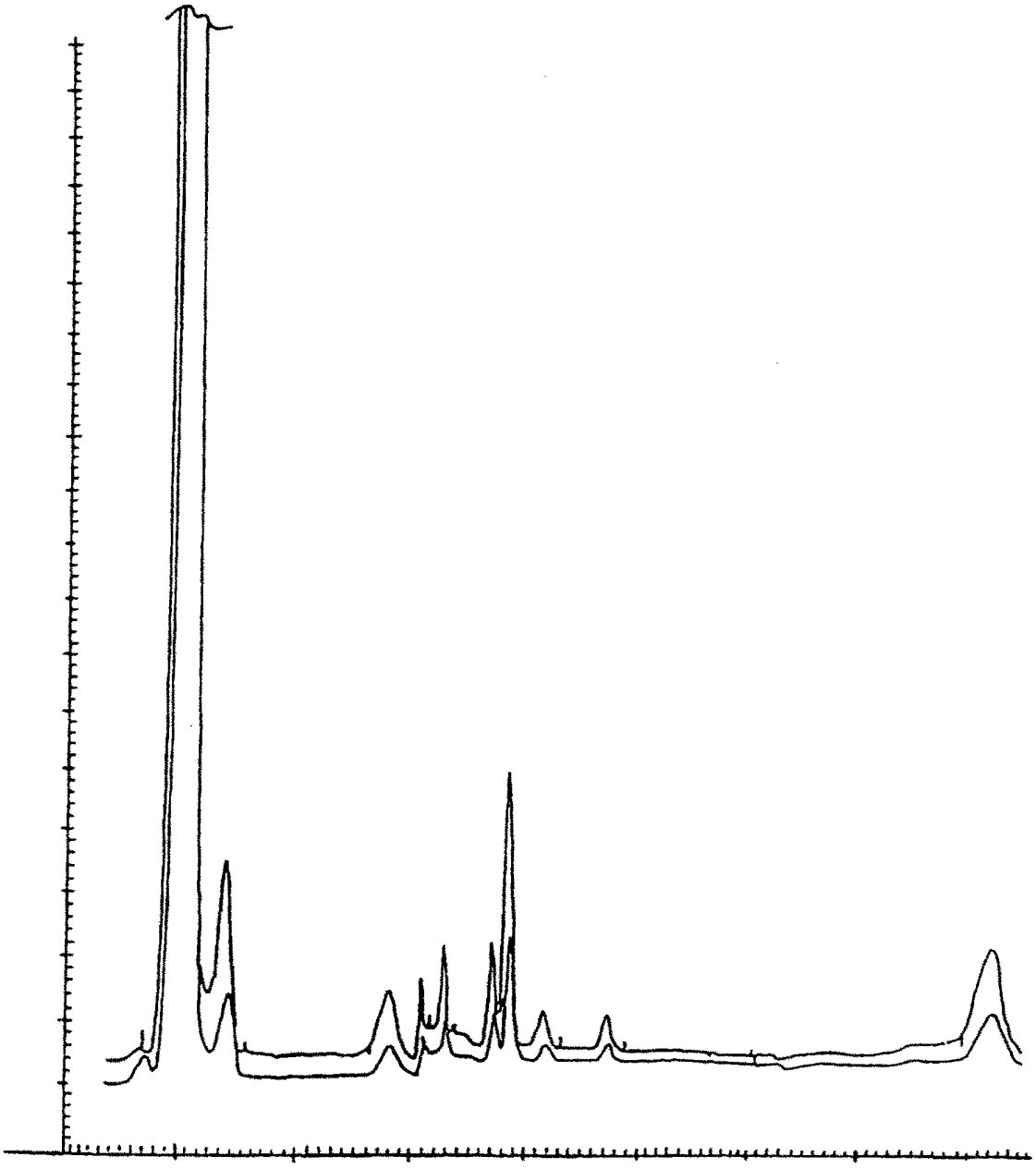


Fig. 3