



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 307 323**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/11** (2006.01)

**C07K 14/25** (2006.01)

**C07K 14/245** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**A61K 38/04** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98939705 .4**

86 Fecha de presentación : **17.07.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1017715**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2000**

54

Título: **Polipéptido quimérico que comprende el fragmento B de la toxina Shiga y unos péptidos de interés terapéutico.**

30

Prioridad: **18.07.1997 FR 97 09185**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2008**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2008**

73

Titular/es: **Institut Curie  
26, rue d'Ulm  
75248 Paris Cédex 05, FR  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE**

72

Inventor/es: **Goud, Bruno y  
Johannes, Ludger**

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 307 323 T3

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).

## DESCRIPCIÓN

Polipéptido quimérico que comprende el fragmento B de la toxina Shiga y unos péptidos de interés terapéutico.

5 La invención tiene por objeto unos medios y sus usos para el transporte intracelular de las proteínas o de los polipéptidos, así como la presentación membranaria de ciertos epítomos.

10 El transporte retrógrado se puede definir como el recorrido de las moléculas de la membrana celular hacia el retículo endoplásmico (RE), pasando, llegado el caso, por el aparato de Golgi. Este mecanismo se ha demostrado para ciertas clases de proteínas del retículo endoplásmico portadoras del tetrapéptido KDEL en su extremo carboxi-terminal (o HDEL en la levadura). Tanto unas evidencias bioquímicas como morfológicas indican que estas proteínas dejan el retículo endoplásmico, alcanzan el aparato de Golgi en el que sufren unas modificaciones en su cadena carbohidrato y después se redirigen hacia el retículo endoplásmico. El tetrapéptido KDEL es una señal de retención que permite 15 entrapar el péptido o la proteína a la que está atado en el retículo endoplásmico, efectuándose este entrapamiento mediante la interacción con una proteína receptora de este motivo KDEL descrito por Lewis M.J. *et al.* en Nature, 348 (6297): 162: 3, 8 de noviembre de 1990.

Otras evidencias sobre la existencia de un transporte retrógrado intracelular se desprenden del estudio de ciertas toxinas bacterianas que entran en el citosol de las células eucariotas después de pasar al retículo endoplásmico (Pelham 20 *et al.* (1992) Trends cell. Biol., 2: 183-185). Un ejemplo particularmente estudiado es el de la toxina de Shiga de *Shigella dysenteriae*, así como las toxinas de tipo Shiga de *E. coli*. Estas toxinas están compuestas por dos cadenas polipeptídicas, una (el fragmento A) es el fragmento tóxico y tiene una actividad deadenilasa que inhibe la síntesis proteica mediante la acción sobre el ARN ribosomal 28S, mientras que la otra sub-unidad (fragmento B) permite el enlace de la toxina sobre su diana (O'Brien *et al.* (1992), Curr. Top. Microbiol. Immunol. 180: 65-94). Unos estudios en microscopía electrónica han demostrado que la toxina de Shiga se puede detectar en el RE de las células A 431, 25 Vero, de las células Daudi en particular (Sandvig *et al.*, 1992 y 1994; KHINE, 1994). Además, el tratamiento de las células con un metabólico fúngico que provoca la pérdida de la estructura del aparato de Golgi (brefeldina A) protege las células contra la toxina de Shiga, sugiriendo así que atraviesan el aparato de Golgi antes de alcanzar el RE. Kim *et al.* (1996) han confirmado por último que el fragmento B de la toxina está localizado en el aparato de Golgi.

30 El estado de los conocimientos sobre el transporte retrógrado, y en particular el transporte del fragmento B de la toxina Shiga en el RE, se indica en las siguientes referencias: Sandvig *et al.* (1992) Nature 358: 510-512; Sandvig *et al.* (1994) J. Cell. Biol 126: 53-64; Kim *et al.*, (1996) J. Cell. Biol 134:1387-1399.

35 El transporte intracelular se define como el conjunto de los intercambios entre los diferentes compartimentos celulares.

Los autores de la presente solicitud han observado que el fragmento B estaba encaminado no sólo hacia el RE, sino también al núcleo de células de las líneas hematopoyéticas, en particular las células dendríticas y los macrófagos.

40 Los autores han demostrado que estas células, incubadas en presencia de dos micro-molares del fragmento B-gly-KDEL tal como se describe a continuación, durante tres horas y después fijadas, presentaban una reactividad con unos anticuerpos específicos contra la toxina en el núcleo e incluso en el nucleolo de estas células (resultados no publicados), lo cual indica realmente la existencia de un transporte intracelular de dicho fragmento.

45 La presente invención es el resultado de las observaciones sobre el transporte intracelular del fragmento B de la toxina de Shiga (el Fragmento B), y usa sus propiedades de encaminamiento para construir una secuencia polipeptídica quimérica que contiene:

- 50 - un péptido o polipéptido de interés terapéutico unido a este fragmento o cualquier equivalente funcional de éste,
- o bien una secuencia polinucleotídica que contiene una secuencia de la que se busca la expresión. El enlace entre el fragmento B y la secuencia polinucleotídica se realiza mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia, y en particular la descrita por Alliquant B. *et al.* en Journal of Cell Biology, 1288 (5): 55 919-27, (1995).

Además de la unión covalente de las moléculas de ADN o de otras moléculas al fragmento B, se puede realizar una unión mediante una interacción no covalente fuerte. Para ello, a título de ejemplo, el ADN<sub>c</sub> del fragmento B se fusiona con el de la estreptavidina o con cualquier otro derivado de la avidina, según los procedimientos descritos (Johannes 60 *et al.* (1987) J. Biol. Chem., 272: 19554-19561).

La proteína resultante de la fusión (B-estreptavidina) se puede someter a una reacción con el ADN biotinilado obtenido mediante PCR usando unos cebadores biotinilados, o con cualquier otra sustancia biotinilada. El complejo 65 resultante se une a las células dianas y debería ser transportado como el fragmento B intracelular.

Según otro procedimiento de unión, se recurre a una etapa de biotinilación específica del sitio del fragmento B. Para ello, el ADN<sub>c</sub> del fragmento B se fusiona con el ADN<sub>c</sub> que codifica para el sitio de reconocimiento de la enzima BirA

## ES 2 307 323 T3

(Boer *et al.* (1995) *J. Bacterial*, 177: 2572-2575; Saou *et al.* (1996) *Gene*, 169: 59-64). Después de la biotinylación *in vitro*, el fragmento B se enlaza a otras moléculas biotinylladas (tales como unos ADN<sub>c</sub>, véase anteriormente) por medio de la estreptavidina o cualquier otro derivado tetravalente de la avidina.

5 Mediante la expresión “equivalente funcional” se entiende cualquier secuencia derivada del Fragmento B por mutación, supresión o adición, y que presenta las mismas propiedades de encaminamiento que el Fragmento B.

De manera amplia, un equivalente funcional puede estar constituido por cualquier fragmento que presenta las propiedades de transporte retrógrado e incluso de transporte intracelular hasta el núcleo, como las descritas para el Fragmento B. A título de ejemplo, se puede citar el Fragmento B de la verotoxina descrito en Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 84 (13):4364-8; julio de 1987, o el Fragmento B de la ricina descrito por Lamb F.I. *et al* en European Journal of Biochemistry, 148 (2): 265-70, (1995). Después de la descripción de las propiedades particulares de transporte de estos fragmentos, el experto en la materia sabrá elegir el fragmento que sea el mejor candidato como vector de encaminamiento de cualquier secuencia en cualquier compartimento celular.

Así, la presente solicitud se refiere al uso del fragmento B de la toxina de Shiga, o cualquier otra sub-unidad de toxinas bacterianas que tendría unas actividades comparables, y en particular unas propiedades de encaminamiento análogas a las del fragmento B, incluyendo unos polipéptidos que imitan el fragmento B de la toxina de Shiga. Estos polipéptidos, y de manera general, sus equivalentes funcionales se pueden identificar mediante unos procedimientos de cribado (Screening methods) que tienen en común el principio de la detección de la interacción entre unas secuencias peptídicas aleatorias (random) y el receptor Gb<sub>3</sub>, o unos análogos solubles de este receptor. A título de ejemplo, se pueden emplear el uso de bancos de fagos (phage-library) que expresan unas secuencias peptídicas aleatorias para la selección sobre columnas de afinidad que comprenden Gb<sub>3</sub> o después de la hibridación con análogos solubles y radioactivos del Gb<sub>3</sub>. El glucolípido Gb<sub>3</sub> se ha identificado como el receptor celular de la toxina de Shiga (Lingwood (1993), *Adv. Lipid Res.*, 25: 189-211). Gb<sub>3</sub> se expresa mediante las células sensibles a la toxina y la internalización de la toxina sería permitida a través de una interacción con Gb<sub>3</sub>. Los inventores de la presente solicitud han demostrado que en unas células HeLa en las que la expresión del receptor Gb<sub>3</sub> ha sido inhibida (figura 1), el fragmento B internalizado no es transportado en el aparato de Golgi sino que se acumula a nivel de las estructuras vesiculares en el citoplasma, principalmente representadas mediante los lisosomas. En las células de control, el fragmento B es transportado a nivel del aparato de Golgi (figura 1B).

Esta hipótesis, según la cual en ausencia del receptor Gb<sub>3</sub> el fragmento B ya no es transportado hacia el sistema de biosíntesis o de secreción, se confirma mediante unos experimentos bioquímicos (figura 2).

Los inventores han demostrado que en presencia del inhibidor de síntesis del receptor Gb<sub>3</sub>, PPNP (+PPNP), hasta 50% del fragmento B internalizado se degrada en forma de material TCA soluble, lo que se corresponde con una actividad de transporte hacia un compartimento de degradación posterior tal como un compartimento endosomal o lisosomal. Cuando la síntesis del receptor Gb<sub>3</sub> no es inhibida (-PPNP), una proporción mucho más baja de fragmento B internalizado se vuelve TCA soluble. Por lo tanto, se puede concluir que la presencia del receptor Gb<sub>3</sub> es necesaria para el direccionamiento del fragmento B a unos compartimentos específicos, lo que justifica el hecho de que el aspecto preponderante de la actividad del fragmento B sería su enlace con el receptor Gb<sub>3</sub>.

La presente invención tiene por objeto unas secuencias polipeptídicas quiméricas, comprendiendo dichas secuencias al menos: el fragmento B de la toxina de Shiga o un equivalente funcional de éste a la que está enlazado en el extremo carboxi-terminal uno o varios polipéptidos X, que responden a la fórmula siguiente:

B-X,

50 en la que:

- B representa el fragmento B de una toxina como la de Shiga, cuya secuencia se describe en N. G. Seidah *et al.*, (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 13928-31, y en Strockbine *et al.* (1988) *J. Bact.* 170: 1116-22, o un equivalente funcional de ésta, o de verotoxina o de ricina (referencia anterior)
- X representa uno o varios polipéptidos cuya longitud total tiene como límite la de la compatibilidad con un transporte retrógrado o intracelular.

60 La presente invención se refiere asimismo a unas moléculas quiméricas de estructura

B-X'

65 en la que B tiene el mismo significado que anteriormente, y X' representa una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia peptídica X de la que se busca la expresión, en particular un epítipo de antígeno.

## ES 2 307 323 T3

Las moléculas quiméricas de la invención pueden comprender además:

- a) unos sitios de modificación, tales como un sitio de N-glucosilación constituido por aproximadamente 20 aminoácidos, unos sitios de fosforilación o cualquier secuencia necesaria para una eventual maduración de la molécula.
- b) una señal de retención de tipo del tetrapéptido KDEL(Lys-Asp-Glu-Leu) que, cuando se enlaza con el extremo carboxi-terminal de las proteínas residentes del RE, conlleva una retención después de la maduración de las proteínas mediante el paso en el aparato de Golgi. En el documento de M.J. Lewis *et al.*, (1992) Cell, 68: 353-64 se propone una síntesis de la función de la señal de retención desempeñada en la maduración proteica.

De manera más general, las secuencia polipeptídicas quiméricas podrán comprender:

- cualquier secuencia necesaria para la maduración de la proteína en un sistema celular adaptado;
- cualquier secuencia necesaria para el reconocimiento de un tipo celular determinado por la molécula quimérica, que permite así una selectividad de acción y de penetración en el citoplasma de la célula.

El punto en común a todas las secuencias de estructura B-X o B-X' quiméricas es que contienen el fragmento B, o un equivalente funcional de éste.

Las moléculas quiméricas de la invención permiten un encaminamiento de las secuencias X o del producto de expresión de X' en el RE. Cuando X está enlazado al Fragmento B, el transporte retrógrado pasa asimismo por el aparato de Golgi y probablemente por los endosomas. Además, en ciertas condiciones, las moléculas de la invención pueden sufrir una maduración que conduce a una presentación membranaria de ciertos epítomos contenidos en la secuencia polipeptídica quimérica.

Mediante el término "maduración" se entiende cualquier proceso que, a partir de un polipéptido determinado, conduce a la emergencia de péptidos que, a su vez, se podrán presentar en un compartimento celular incluyendo el citoplasma. La maduración se puede efectuar mediante la escisión enzimática en el retículo endoplásmico, o bien mediante el transporte en el citoplasma en el que el polipéptido sufre una escisión, y después, los péptidos así obtenidos se transportan nuevamente en el retículo endoplásmico.

Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH cl I) pueden cargarse con las moléculas polipeptídicas de interés X o X' después de dicha escisión y ser presentadas sobre las membranas celulares.

Cuando la molécula quimérica de la invención consiste en un enlace de un fragmento B o de su equivalente con una molécula polinucleotídica o un vector de expresión que comprende una secuencia de la que se busca la expresión, el polipéptido así sintetizado, después de la transcripción en el núcleo y tras la traducción en el citoplasma, podrá sufrir las mismas etapas de escisión, maduración y transporte intracelular que las que se han descrito anteriormente para una secuencia quimérica polipeptídica.

Unas moléculas polipeptídicas quiméricas según la invención pueden constituir un principio activo en una composición terapéutica para la inmunoterapia mediante un mecanismo parecido a los procesos biológicos que se refieren a la presentación antigénica apropiada para el desarrollo de la reacción inmune. El fragmento X representa entonces uno o varios epítomos de los que se busca la presentación membranaria en la superficie de las células. El tamaño del fragmento X está limitado únicamente por la capacidad de tránsito intracelular de las moléculas quiméricas consideradas.

Este enfoque se puede prever tanto para una inmunoterapia anti-infecciosa o anti-cancerígena como para constituir un señuelo antigénico en ciertas enfermedades autoinmunes.

Cualquier tipo de antígeno presentado por unos CMH cl I es un buen candidato para seleccionar unos epítomos simples o quiméricos que pertenecen a las construcciones de la invención. A título de ejemplo, se citarán:

a) *Epítomos humanos derivados de proteínas de células de melanoma:*

- BAGE que procede de la Tirosinasa (Boel, P. *et al.* (1995), Immunity 2, 167-75);
- GAGE que procede de la gp75 (Van den Eynde, B. *et al.* (1995), J. Exp. Med. 182, 689-98);
- Tirosinasa (Brichard V. *et al.* (1993), J. Exp. Med. 178, 489-95)
- p15 que procede de la Melan A/MART-1 (Coulie P.G. *et al.* (1994), J. Exp. Med. 180, 35-42; Kawakami Y. *et al.* (1994), J. Exp. Med. 180, 347-52);
- MAGE-1 y -3 que proceden de la  $\beta$ -catenina (De Plaen E. *et al.* (1994), Immunogenetics 40, 369-9; Traversari C. *et al.* (1992), J. Exp. Med. 176, 1453-7).

## ES 2 307 323 T3

b) *Epítomos humanos derivados de proteínas de virus implicados en el desarrollo del cáncer:*

- Péptidos derivados de las proteínas E6 y E7 del HPV 16 (Feltkamp M.C. *et al.* (1993), Eur. J. Immunol. 23, 2242-9; Davis H.L. *et al.* (1995), Hum Gene Ther 6, 1447-56);
- Péptidos derivados de la proteína Hbs del HBV (Rehermann B. *et al.* (1995), J. Exp. Med. 181, 1047-58);
- Péptidos derivados de las proteínas del EBV (Murray R.J. *et al.* (1992), J. Exp. Med. 176, 157-68);
- Péptido derivado del citomegalovirus.

c) *Epítomos humanos derivados de oncogenes:*

- p21 ras (Peace D.J. (1993), J. Immunother 14, 110-4; Ciernik, I.F. *et al.* (1995) Hybridoma 14, 139-42);
- p53 (Gnjatic S. (1995), Eur. J. Immunol. 25, 1638-42)

d) *Epítomos que presentan un interés para las enfermedades autoinmunes:*

Estos epítomos se pueden seleccionar de entre los descritos por Chiez R.M. *et al.* (1994) en Immunol. Today 15,155-60.

e) *Epítomos que presentan un interés en el contexto de las enfermedades infecciosas:*

A título de ejemplo de dichos epítomos, se pueden citar los descritos por Furukawa K. *et al.* (1994) en J. Clin. Invest. 94, 1830-9.

En las construcciones de la invención, X o el producto de expresión de X' puede asimismo representar una secuencia polipeptídica que permite la restauración de una función del transporte intracelular perturbada por cualquier motivo que sea. A título de ejemplo, una molécula biológica se puede entrapar en el RE debido a una modificación por mutación, delección o adición de una secuencia, que tiene por efecto bloquear la maduración o el tránsito de esta molécula. Es el caso, por ejemplo, del mutante CFTR ( $\Delta F508$ ) cuya unión a una molécula protectora, tal como la calnexina, se modifica de tal manera que se impide o se retrasa su precipitación, impidiendo así el tránsito intracelular. Esta mutación es la causa de la mucoviscidosis. La introducción en el retículo endoplásmico de una réplica no mutada podría permitir desplazar las cadenas N-glucosiladas de la glucoproteína CFTR ( $\Delta F508$ ) del sitio de interacción con la calnexina, teniendo por efecto permitir nuevamente el transporte de la proteína hasta la membrana plásmica, y un funcionamiento normal de las células epiteliales del pulmón.

La invención se refiere asimismo a unas construcciones de ácidos nucleicos, y en particular de ADN o de ADNc que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifican para la proteína quimérica cuya estructura y sus diferentes variantes se han definido anteriormente. Más particularmente, la invención se refiere a unos vectores de expresión o plásmidos portadores de las construcciones anteriores y susceptibles de expresarlas en unos cultivos bacterianos. A título de ejemplo, el vector de expresión puede ser el plásmido pSU108 descrito en G. F. Su *et al.*, (1992) Infect. Immun., 60: 3345-59.

Más particularmente, la invención se refiere a unas construcciones que comprenden:

- la secuencia que codifica para el fragmento B,
- una secuencia que codifica para uno o varios polipéptidos de los que se busca la expresión. Puede tratarse de epítomos de los que se buscan la expresión membranaria en la superficie de las células; puede tratarse asimismo de polipéptidos que permiten la retención de las proteínas en el aparato de Golgi; por último, puede tratarse de polipéptidos que permiten restaurar un funcionamiento perturbado del transporte intracelular.

La construcción podrá comprender además cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido cuya presencia permite un transporte intracelular correcto en las células destinadas a ser tratadas por las moléculas de la invención. En particular, podrá tratarse:

- de una secuencia que codifica para una señal de N-glucosilación,
- de una secuencia que codifica para la señal de retención KDEL.

La construcción polinucleotídica de la invención está bajo el control de un promotor, preferentemente un promotor fuerte que permite un índice de expresión correcto en las bacterias en las que se ha transfectado.

## ES 2 307 323 T3

La invención tiene asimismo por objeto unas bacterias transfectadas que comprenden estas construcciones, y susceptibles de producir las proteínas o polipéptidos quiméricos de la invención.

5 Las células hospedantes tratadas mediante las moléculas de la invención pertenecen asimismo a la invención; pueden ser cualquier tipo de células y en particular:

- las que se pueden tratar *ex vivo*, como las células del sistema inmunitario activas en la activación de la inmunidad celular, tales como las células dendríticas, los macrófagos o los linfocitos B;
- 10 - las que se pueden tratar *in situ*, como las células epiteliales que se pueden usar en la restauración de funciones alteradas o bien por una deficiencia genética, o bien por una perturbación metabólica;
- unas células cancerosas.

15 De manera general, las moléculas quiméricas de la invención permiten enfocar un nuevo procedimiento terapéutico que se libra de los problemas relacionados con los vectores víricos o retrovíricos habitualmente usados para integrar y hacer que se expresen unas moléculas exógenas en unas células animales. El procedimiento terapéutico, tal como se desprende de las moléculas de la invención, consiste en tratar directamente las células de un paciente, o bien *ex vivo* o bien mediante la aplicación directa de tipo estereotáxico de las secuencias polipeptídicas quiméricas, o por último  
20 mediante los procedimientos habituales de tratamiento mucosal, tal como los aerosoles.

La invención se refiere al uso de los polipéptidos quiméricos o de las secuencias polinucleotídicas que codifican para los polipéptidos de la invención, en la fabricación de composiciones terapéuticas, en la que se expresan unos polipéptidos particulares a nivel de las membranas de las células dianas. Estos polipéptidos son, de manera ventajosa,  
25 unos epítomos contra los cuales se busca el desarrollo de una reacción inmunológica que se presentan entonces en la superficie de las células del sistema inmunitario, en particular de las células dendríticas, de los macrófagos o de los linfocitos B. El fragmento B de la toxina de Shiga actúa como un vector de epítomo que permite programar unas células presentadoras de antígenos.

30 La presente invención se refiere a un procedimiento de inmunoterapia, que consiste en aumentar la inmunidad celular como consecuencia de la presencia de un antígeno indeseable en un organismo, consistiendo dicho procedimiento en que se expresen unos epítomos particulares mediante las células claves de la inmunidad celular, tales como las células dendríticas y los macrófagos. El procedimiento de tratamiento según la invención prevé iniciar la inmunidad de mediación celular y humoral cargando las moléculas del CMH cl I o cl II con los epítomos de interés, después de la  
35 restricción en las células dianas. Esto conduce a una activación de las células T citotóxicas en contra del antígeno del que se busca la eliminación.

Los epítomos presentados gracias a las construcciones de la invención proceden de antígenos víricos, parasitarios, bacterianos, o de cualquier célula, organito, o micro-organismo que se busca eliminar, tal como pueden ser unas células cancerosas o infectadas. Los epítomos pueden ser asimismo unos señuelos que permiten que las moléculas “propias”, reconocidas como unos antígenos extraños en unas enfermedades autoinmunes, sean sustituidas por los epítomos de la invención, conllevando así una desaceleración o a la disminución de la reacción inmunitaria.

45 Unos ejemplos de estos epítomos se citan anteriormente con motivo de la descripción de las secuencias polipeptídicas quiméricas.

La invención se refiere asimismo al uso de las moléculas quiméricas de la invención en la preparación de composiciones terapéuticas, en el que los polipéptidos particulares que se desea expresar permiten la restauración del tránsito intracelular de una proteína cuya estructura alterada conduce a su entrapamiento en el RE y a una deficiencia de  
50 expresión. Es el caso de las proteínas de expresión membranaria que sufren una maduración intracelular, incluyendo unas glucosilaciones, sulfataciones, plegados (folding), etc.

Un ejemplo particular es el del mutante CFTR ( $\Delta F508$ ) cuyo enlace a una molécula protectora como la calnexina se modifica como consecuencia de una modificación de la proteína; lo que conduce a un entrapamiento de la molécula, causa de la mucoviscidosis, y que se traduce por una insuficiencia general de las secreciones exocrinas, en particular  
55 a nivel del páncreas y de los pulmones.

La presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento terapéutico de enfermedades cuyo origen es un defecto de secreción de proteínas; el procedimiento consiste en administrar directamente los polipéptidos quiméricos o  
60 en administrar en las células de los pacientes la información genética en forma de plásmidos portadores de secuencias exógenas que codifican para un péptido o polipéptido que permitirá la restauración de la función celular deficiente.

Esta restauración puede ser el resultado o bien de la suplementación de la función deficiente mediante el polipéptido X, o bien de una competición entre la proteína mutada y el polipéptido sintetizado a partir de la secuencia exógena para  
65 la unión con una molécula o un receptor específico de la maquinaria celular. Un ejemplo particular es el tratamiento del mutante citado anteriormente, causa de la mucoviscidosis, mediante la administración de un vector portador de una secuencia que codifica para el sitio de unión de la proteína CFTR con su molécula protectora, o mediante la administración directa del polipéptido quimérico.

## ES 2 307 323 T3

Las construcciones de la invención ponen a disposición de la comunidad de la salud humana o animal un nuevo medio terapéutico para tratar las enfermedades que tienen por causa una deficiencia del tránsito intracelular, o para aumentar o inducir una presentación membranaria de una molécula, de un polipéptido o de un epítipo de interés.

- 5 Otras propiedades de la invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de los ejemplos y de las figuras siguientes.

### Leyenda de las figuras

- 10 Figura 1A): Células HeLa en las que se ha inhibido la expresión del receptor Gb<sub>3</sub>. El fragmento B internalizado no es transportado hacia el aparato de Golgi sino que se acumula en las estructuras vesiculares.

Figura 1B): Células HeLa de control en las que el fragmento B es transportado hacia el aparato de Golgi.

- 15 Figura 2: Ensayo bioquímico que muestra el defecto de transporte del fragmento B.

- Figura 3: Presentación CMH clase limitada de proteínas de fusión Shiga B-Mage 1 a unas células monocitarias de la sangre periférica (CMSP o PBMC): función desempeñada por la secuencia KDEL. Las CMSP ( $5 \times 10^4$ ) han sido primadas durante una noche con el péptido Mage 1 ( $1 \mu\text{M}$ ), o Mart 1 ( $1 \mu\text{M}$ ), o las proteínas de fusión Shiga B-Mage 1 ( $1 \mu\text{M}$ ) con una secuencia de reciclaje hacia el retículo endoplásmico activa (B-Mage 1-Glyc-KDEL) o inactiva (B-Mage 1-Glyc-KDELGL). Después del lavado, se han incubado  $2 \times 10^4$  células T citotóxicas específicas para el epítipo Mage 1 (clon 82/30) con las células CMSP primadas durante 24 horas. Después, se han recogido los sobrenadantes y se han ensayado para la producción de interferón  $\gamma$ .
- 20

- 25 Figura 4: Presentación CMH clase I limitada de la proteína de fusión Shiga B-Mage 1 mediante diferentes tipos de células presentadoras de antígenos. Se han primado unas células linfoblastoides B (E), unas células dendríticas (+), o unas células T ( $\square$ ) clonales con la proteína de fusión soluble Shiga B-Mage 1 como en la figura 3. La presentación de péptidos Mage 1 se ha ensayado con la línea 82/30 CTL.

- Figura 5: Análisis de la especificidad de la presentación CMH clase I limitada de la proteína de fusión Shiga B-Mage 1 mediante unas líneas de células linfoblastoides B. Las células de la línea B linfoblastoide BM21 (HLA-A1) o BV1 (HLA-A2) se han primado durante la noche con el medio solo, o bien con los péptidos sintéticos Mage 1 o Mart 1 ( $1 \mu\text{M}$ ), o bien con la proteína de fusión Shiga B-Mage 1 ( $1 \mu\text{M}$ ), o bien con la proteína de fusión Antp-Mage 1, o con el fragmento B de la toxina de Shiga salvaje. Después del lavado, se han incubado las células específicas de Mage 1 CTL 82/30 (A) o de Mart 1 CTL LB373 (B) durante 24 horas con unas células B-EBV primadas. Después, se han recogido los sobrenadantes y se han ensayado para la producción de interferón  $\gamma$ .
- 30
- 35

### I- Construcción de un polinucleótido quimérico recombinante, y producción del polipéptido correspondiente

- 40 I - 1) Construcción del plásmido

El epítipo X elegido es el epítipo MAGE, presente en las células cancerosas de pacientes que padecen melanoma. El plásmido usado es el plásmido pSU108 descrito en Su *et al.*, 1992, Infect. Immun. 60: 33-45, 3359.

- 45 Los cebadores PCR usados son los siguientes:

5'-ACTAGCTCTGAAAAGGATGAACTTTGAGAATTCTGACTCAGAATAGCTC-3'

5'-CTTTTCAGAGCTAGTAGAATTAGGATGATAGCGGCCGCTACGAAAATAACTTCGC-3'

50

Estos cebadores se usan con unos cebadores específicos del vector ShigaAtpE (5')

5'-CACTACTACGTTTTAAC-3'

55

5'-CGGCGCAACTATCGG-3'

con el fin de producir unos fragmentos que han sido clonados a nivel de los sitios de restricción SphI y SalI del plásmido SU108.

- 60 Se han ligado unos fragmentos adaptadores que contienen el sitio de glucosilación y la secuencia KDEL, compuesto por los oligonucleótidos 1: ((5' fosforilado; 5'-GGCCGCCATCCTAATTCTACTTCT-3') y sulfato 2 (5'-CTCAGAA GTAGAATTAGGATGGC-3') o sulfato 3 (5'-GAGTCTGAAAAAGATGAACTTTGATGAG-3') durante la noche a 16°C.

- 65 Los fragmentos resultantes se han clonado en los sitios de restricción de pSU108 NotI y EcoRI y que contienen el ADNc que codifica para B-Glyc-KDEL.

## ES 2 307 323 T3

### I - 2) Purificación de las proteínas

La purificación de los fragmentos recombinantes se realiza asimismo según la técnica descrita en Su *et al.*, 1991, citada anteriormente. Brevemente, unas células de *E. coli* que contienen unos plásmidos de expresión recombinantes obtenidos a partir de pSU108 se cultivan toda la noche a 30°C. Después, el cultivo se diluye 5 veces en LB suplementado con 50 mg/ml de ampicilina a 50°C. Después de incubar durante 4 horas a 42°C, las células se lavan generosamente en 10 mM de Tris/HCl, pH8, se incuban durante 10 minutos en 10 mM de Tris/HCl, pH8; 25% de sacarosa, 1 mM de EDTA, y por último se resuspenden rápidamente en una mezcla de agua-helado que contiene 1 mM de PMSF y una mezcla de inhibidor de proteasa (leupeptina, quimostatina, pepstatina, antipaina y aprotinina). La última etapa conduce a la ruptura del periplasma. Después de la clarificación, el sobrenadante se carga sobre una columna QFF (Pharmacia) y se eluye mediante un gradiente lineal de NaCl en 20 mM de Tris/HCl, pH 7,5. Según la construcción, el fragmento B se eluye entre 120 mM y 400 mM. Las fracciones que contienen el fragmento B se dializan después contra 20 mM de Tris/HCl, pH 7,5, y se recargan sobre una columna monoQ (Pharmacia) y se eluyen de la misma manera que anteriormente. Las proteínas resultantes, estimadas con un grado de pureza del 95% mediante del de electroforesis en poliacrilamida-SDS, se almacenan después a -80°C hasta su uso.

### I - 3) Inducción de una respuesta CTL *in vitro*

Se cultivan unas células dendríticas (CD) según unos protocolos preestablecidos (Romani *et al.*, 1994). Brevemente, se resuspenden unas PBMC en el medio de Iscove y se incuban durante 2 horas a 37°C en unas cajas de 6 pocillos. Se retiran las células que no se han adherido y se incuban las células restantes a 37°C en presencia de GM-CSF (800 U/ml) y de IL-4 (500 U/ml). Después de 5 días de cultivo, se añaden IL-1 $\alpha$  e IFN- $\gamma$  respectivamente a una concentración de 50 U/ml y 150 U/ml, y se continúa la incubación a 30°C durante 24 horas. Después, se resuspenden las células dendríticas en el medio de Iscove en presencia de concentraciones crecientes de fragmento B enlazado con el epítipo MAGE y en presencia de la  $\beta$ 2-microglobulina humana a 3  $\mu$ g/ml, con el fin de mejorar la capacidad de las células para la presentación de los epítopos membranaarios. Esta mezcla se incuba a 30°C durante 4 horas. Se irradian unas CD que han internalizado el fragmento B enlazado con este epítipo a 5000 rad, reunidas mediante centrifugación, resuspendidas, y mezcladas con unos linfocitos CD8<sup>+</sup> (preparadas a partir de las PBMC). Después, estas CD pulsadas con un antígeno y los CD8<sup>+</sup> se conservan en co-cultivo en presencia de IL-7 al 5 ng/ml.

Después de 10 días, los linfocitos CD8<sup>+</sup> respondedores se reestiman mediante unas CD irradiadas recientemente preparadas, que han sido incubadas a su vez en presencia de unas concentraciones crecientes de fragmento B enlazado con este mismo epítipo. El co-cultivo de CD y de linfocitos CD8<sup>+</sup> respondedores se continúa en presencia de IL-2 y de IL-7 a 10 U/ml y 5 ng/ml, respectivamente. Este protocolo de re-estimulación se repite 3 veces.

Para medir la inducción de una respuesta de CTL, los linfocitos CD8<sup>+</sup> respondedores pre-estimulados como se ha descrito anteriormente se incuban en presencia de células cancerosas o de células infectadas por un virus. Estas células que expresan el epítipo elegido han sido marcadas con Na<sub>2</sub> <sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> y después se han puesto en contacto con los CD8<sup>+</sup> respondedores durante 5 horas (Bakker *et al.*, 1994). La radioactividad liberada en el medio se determina a continuación, permitiendo cuantificar la actividad citotóxica de los linfocitos CD8<sup>+</sup> contestadores pre-estimulados.

### Resultados

### II - Presentación del antígeno MAGE I mediante unas células Pena-EBV y dendríticas pulsadas por un fragmento B de la toxina Shiga portadora de este antígeno

#### II - 1) Estudio morfológico del transporte intracelular de un fragmento B portador del epítipo MAGE-I

Se ha demostrado que era posible fusionar una secuencia peptídica en el extremo carboxi-terminal del fragmento B de la toxina Shiga conservando al mismo tiempo el encaminamiento intracelular de esta proteína hacia el retículo endoplásmico (RE). Esta demostración se ha efectuado construyendo unos polipéptidos quiméricos que comprenden el fragmento B, el sitio de N-glucosilación y la señal de retención KDEL. A título de control, se ha usado la señal de retención KDELGL, que es la versión inactiva del péptido KDEL, Misendock y Rothman, 1995, J. Cell. Biol., 129: 309-319. Mediante unos estudios morfológicos y bioquímicos, se ha demostrado que el fragmento B modificado es transportado de la membrana plasmática a través de unos endosomas y el aparato de Golgi hacia el retículo endoplásmico. Este transporte se inhibe mediante el BFA (Brefeldina A metabolito fúngico) y disminuido por el nocodazol (agente despolimerizante de los microtúbulos).

Estos experimentos muestran claramente que se conserva el encaminamiento intracelular de la proteína de fusión hacia el retículo endoplásmico. Para evaluar el potencial del fragmento B como vector de epítipo para la vacunación anti-tumoral *in vitro*, se ha añadido el epítipo MAGE-I al fragmento B-Glyc-KDEL en las condiciones experimentales descritas anteriormente. La nueva proteína se ha denominado B-MAGE-Glyc-KDEL. La proteína B-MAGE-Glyc-KDEL se ha enlazado al fluoróforo DTAF con el fin de poder seguir su transporte intracelular mediante microscopía confocal. Después de su internalización, esta proteína es detectable a nivel del aparato de Golgi así como a nivel del RE de las células HeLa, de las células Pena-EBV (línea de linfocitos B inmortalizados con la ayuda del virus de Epstein-Barr). Estos resultados confirman las observaciones originales que se refieren al transporte intracelular de un fragmento B modificado en su extremo carboxi-terminal (descrito anteriormente) y permiten afirmar que ciertas células presentadoras de la línea hematopoyéticas son capaces de internalizar el fragmento B y de transportar la proteína hasta el RE.

## ES 2 307 323 T3

Ahora, se especificarán estos estudios midiendo la N-glucosilación de la proteína B-MAGE-Glyc-KDEL. La N-glucosilación es una modificación que se realiza específicamente a nivel del RE, y se ha demostrado anteriormente que un fragmento B portador de un sitio de reconocimiento para la N-glucosilación está realmente glucosilado si es transportado hasta el RE.

5

### II - 2) Estudio de la presentación del antígeno MAGE-1 mediante unas células Pena-EBV y dendríticas pulsadas por la proteína B-MAGE-Glyc-KDEL

10 Con el fin de evaluar la capacidad del fragmento para actuar como vector de epítipo, se ha usado un clon de linfocitos T citotóxicos (CTL 82/30) que reconoce específicamente el epítipo MAGE-1 asociado al CMH de clase I de células presentadoras del haplotipo HLA-A1. Estos CTL se conservan en presencia de células Pena-EBV o dendríticas pulsadas con la proteína B-MAGE-Glyc-KDEL. Si el epítipo MAGE-1 está presentado por unas células presentadoras, los CTL se activarán y segregarán el interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) que se dosifica a continuación.

15

La cantidad de IFN $\gamma$  segregada es proporcional a la amplitud de la estimulación de los CTL por unas células presentadoras.

20 Unas células presentadoras (Pena-EBV y dendríticas), 20.000 células por micropocillo de fondo redondo) o bien se han fijado 1 hora con PBS-paraformaldehído al 4% o no. Después, se han lavado 2 veces con OptiMEM antes de ser incubadas durante 15 horas con unas diluciones de la proteína B-MAGE-Glyc-KDEL. La proteína se ha ensayado con 4 diluciones, empezando con una concentración de 10  $\mu$ M final, y diluyendo de 5 en 5 en un medio OptiMEM (medio sin suero). Después de 15 horas, se han lavado las placas 2 veces mediante centrifugación a baja velocidad. Se han añadido los CTL (CTL 82/30) en una cantidad de 5.000 CTL por pocillo en 100  $\mu$ l de medio de cultivo (ID-HS-AAG + 25 U/ml de IL2). Como control positivo, se han conservado unos CTL 82/30 en presencia de la línea G43 (línea de linfocitos B transfectados mediante un plásmido de expresión de MAGE-1). Después de 24 horas de incubación, se han recogido los sobrenadantes para dosificar la cantidad de IFN $\gamma$  producido.

25

Los resultados obtenidos se representan en la Tabla I.

30

TABLA I

Tipo de células		Concentración de B-MAGE-Glyc-KDEL			
		10 $\mu$ M	2 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,08 $\mu$ M
Dendríticas	fijadas	446 $\pm$ 293	821 $\pm$ 64	661 $\pm$ 18	312 $\pm$ 181
	no fijadas	155 $\pm$ 404	1315 $\pm$ 91	1231 $\pm$ 150	1174 $\pm$ 478
Pena-EBV	fijadas	70 $\pm$ 47	68 $\pm$ 48	23 $\pm$ 32	4 $\pm$ 5
	no fijadas	1966 $\pm$ 415	1960 $\pm$ 206	1544 $\pm$ 42	853 $\pm$ 116

35

40

45 Los resultados se representan por unidad de IFN $\gamma$  producido en cada condición (media  $\pm$  desviación estándar; n = 3).

Se observa que las células dendríticas y las células Pena-EBV pulsadas con la proteína B-MAGE-Glyc-KDEL son efectivamente reconocidas por los CTL, incluso con bajas concentraciones de la proteína. Por el contrario, las células dendríticas y las células Pena-EBV, fijadas previamente, no son reconocidas. Por lo tanto, parece ser que se ha producido endocitosis y processing de la proteína B-MAGE-Glyc-KDEL. Estos resultados alentadores se consolidarán ahora mediante unos experimentos de vacunación *in vitro*.

50

### 55 III - Ensayo de actividad anti-tumoral y/o antivírica *in vivo* en el ratón

Las células dendríticas de ratón se preparan y se marcan con un antígeno derivado de las proteínas P21 RAS, P53 o EP2/NER para ensayar la actividad anti-tumoral, o de HBV, EBV o HPV para ensayar la actividad antivírica. Esta preparación de células dendríticas se efectúa según el protocolo presentado en el apartado 1-4) anterior.

60

Estas células dendríticas se introducen después en el ratón.

El efecto antivírico o anti-tumoral se observa mediante el tratamiento posterior de estos ratones así injertados con unas células tumorales o unos virus que expresan este antígeno.

65

*Conclusión*

Las secuencias polipeptídicas o las secuencias polinucleotídicas de la invención pueden constituir así de forma ventajosa un principio activo de una composición farmacéutica destinada a tratar ciertos cánceres o ciertas infecciones víricas o bacterianas, a partir del momento en el que un epítipo particular de dicho virus o de dicha célula cancerosa se habrá integrado en la secuencia nucleotídica recombinante, conduciendo a una síntesis de un polipéptido quimérico susceptible de ser restringido por el CMH clase 1 y ser expresado en la superficie membranaria de las células del sistema inmunitario.

IV - *Restauración del transporte intracelular de la proteína mutada CFTR ( $\Delta F508$ ) con la ayuda del fragmento B de la toxina de Shiga*

La proteína CFTR (cystis fibrosis transmembrane regulator) es un canal cloro de la membrana plásmica. En la gran mayoría de los pacientes que padecen mucoviscidosis, el gen CFTR porta unas mutaciones. La mutación ( $\Delta F508$ ), la más frecuentemente observada, afecta el encaminamiento intracelular de la proteína CFTR. En efecto, la proteína mutada CFTR ( $\Delta F508$ ), que es funcional en lo referente a su actividad canal iónico, queda bloqueada a nivel del retículo endoplásmico, en lugar de ser transportada hasta la membrana plásmica. Se ha introducido en el retículo endoplásmico con la ayuda del fragmento B la toxina de Shiga, un dominio de la proteína CFTR conocido por ser el dominio de interacción con la proteína calnexina ("protectora" del RE). Este dominio se fusionará en el extremo carboxi-terminal del fragmento B. Se ha ensayado que esta proteína quimérica permite desplazar las cadenas N-glicosiladas de la glucoproteína CFTR ( $\Delta F508$ ) del sitio de interacción con la calnexina, lo cual tiene por efecto que la proteína CFTR ( $\Delta F508$ ) ya no está retenida en el retículo endoplásmico y puede estar transportada hasta la membrana plásmica y funcionar entonces normalmente.

En un primer tiempo, se ha construido una proteína quimérica compuesta por el fragmento B y por el dominio de interacción derivado de la proteína CFTR. Se ha añadido una señal de reciclaje (el péptido KDEL) en el extremo carboxi-terminal de esta proteína a fin de aumentar su retención en el retículo endoplásmico. En primer lugar, se ha verificado que la nueva proteína era también transportada en el retículo endoplásmico de las células dianas. Se ha estudiado la movilización de CFTR ( $\Delta F508$ ) en unas células de una línea estable de células LLCPK1 transfectadas por el ADNc de CFTR ( $\Delta F508$ ). Esta línea se ha establecido por M.A. Costa de Beauregard y M.D. Louvard (Instituto Curie, Paris, CNRS UMR 144). La proteína CFTR ( $\Delta F508$ ) que se expresa en estas células se ha dotado además de un epítipo tag. Por lo tanto, es posible detectar mediante inmunofluorescencia la llegada de la proteína CFTR ( $\Delta F508$ ) en el seno de la membrana plásmica. En ausencia de tratamiento, la membrana plásmica de las células LLCPK1 de la línea está desprovista de marcación específica de CFTR ( $\Delta F508$ ) en el seno de la membrana plásmica. Si los resultados de estos experimentos pilotos son prometedores, se hará el esfuerzo de desarrollar este enfoque en una óptica de terapia de la mucoviscidosis.

*Conclusión*

El experimento descrito anteriormente muestra que el polipéptido sintético en el que X está constituido por el dominio de interacción entre la proteína CFTR y la calnexina pueden constituir de forma ventajosa el principio activo de una composición terapéutica destinada a tratar la mucoviscidosis. En efecto, la competición entre el dominio de interacción mutado existente en el mutante y el fragmento del polipéptido sintético para la interacción con la calnexina puede permitir restaurar la secreción a nivel de los bronquios de la proteína mutada.

*Ensayo de presentación antigénico*

Se han incubado las células presentadoras de antígeno (CMSP, células B-EBV, células T, células dendríticas) en unas microplacas de 96 pocillos a una densidad de  $10^5$  células por pocillo, y primadas (pulsed) a  $37^\circ\text{C}$  durante 4 horas o 15 horas con el antígeno disuelto en  $100\ \mu\text{l}$  de medio de Iscove. Al final de la incubación, el medio se retiró y se añadieron 20.000 células CTL en cada pocillo en  $100\ \mu\text{l}$  de medio de cultivo de los CTL que contiene 25 U/ml de IL2. Después de 24 horas, se han recogido  $50\ \mu\text{l}$  de sobrenadante, y se ha medido el interferón  $\gamma$  mediante el ensayo ELISA (Diaclone). En ciertos experimentos, se han fijado las células con 1% de paraformaldehído durante 10 minutos a temperatura ambiente y se han lavado extensivamente antes de la transferencia en unas microplacas.

REIVINDICACIONES

1. Secuencia quimérica que responde a la fórmula B-X o a la fórmula B-X', en la que B es el fragmento B de la toxina de Shiga, cualquier derivado del fragmento de Shiga mediante mutación, supresión o adición, que presenta las mismas propiedades de encaminamiento en una célula diana, que el fragmento de Shiga, X' es un polinucleótido que codifica para X, y X representa una o varias secuencias de interés terapéutico seleccionada(s) de entre los péptidos, polipéptidos, antígenos o epítomos de antígenos.
2. Secuencia según la reivindicación 1, **caracterizada** porque comprende además:
- un sitio de glucosilación, o
  - una señal de retención en el retículo endoplásmico, o
  - un sitio de sulfatación, o
  - una mezcla de éstos.
3. Secuencia según una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizada** porque X es uno o varios epítomos susceptibles de ser presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I.
4. Secuencia según la reivindicación 3, **caracterizada** porque X es un epítomo que procede de un polipéptido o de una proteína que se desea expresar en la superficie de las células del sistema inmunitario y en particular en el grupo constituido por proteínas de células cancerosas, de proteínas de virus, de oncogenes.
5. Secuencia según la reivindicación 4, **caracterizada** porque X es un epítomo MAGE específico de las células de melanoma.
6. Secuencia según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizada** porque X es un polipéptido susceptible de restaurar o de activar una función del transporte intracelular interactuando con unas proteínas de la maquinaria celular, en particular entrando en competición en el retículo endoplásmico con la forma mutada de una proteína implicada en el transporte intracelular, o suplementando una función deficiente en dicho transporte.
7. Secuencia según la reivindicación 6, **caracterizada** porque X es el dominio de interacción de la proteína CFTR con una molécula protectora, la calnexina.
8. Construcción de ácido nucleico, **caracterizada** porque codifica para la secuencia quimérica B-X según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Secuencia según una de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso como agente activo en la inmunoterapia por presentación antigénica de epítomos sobre unas células del sistema inmunitario.
10. Secuencia según la reivindicación 9, **caracterizada** porque las células son unas células dendríticas o unos macrófagos.
11. Secuencia según la reivindicación 9 ó 10, **caracterizada** porque los epítomos proceden de antígenos víricos, parasitarios o bacterianos, o se derivan de proteínas específicas de células cancerígenas, se derivan de oncogenes o se derivan de proteínas de virus cancerígenos.
12. Secuencia según una de las reivindicaciones 1 a 2, para su uso como principio activo para la restauración del tránsito intracelular de proteínas mutadas en su sitio de enlace a una molécula protectora.
13. Secuencia según la reivindicación 12, en la que la proteína mutada es la proteína CFTR responsable de la mucoviscidosis.
14. Composición con fines terapéuticos, **caracterizada** porque comprende como principio activo una secuencia según una de las reivindicaciones 1 a 7.
15. Composición según la reivindicación 14, **caracterizada** porque la secuencia es una secuencia polipeptídica según la reivindicación 1.
16. Uso de una secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la preparación de un medicamento que permite restaurar unas deficiencias del transporte intracelular.
17. Uso de una secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la preparación de un medicamento que permite estimular las defensas inmunitarias del organismo frente a infecciones víricas, parasitarias, bacterianas o de antígenos de células cancerosas.

## ES 2 307 323 T3

18. Uso de una secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la preparación de un medicamento que permite disminuir o suprimir unas reacciones inmunitarias en las enfermedades autoinmunes.

5

10

15

20

25

30

35

40

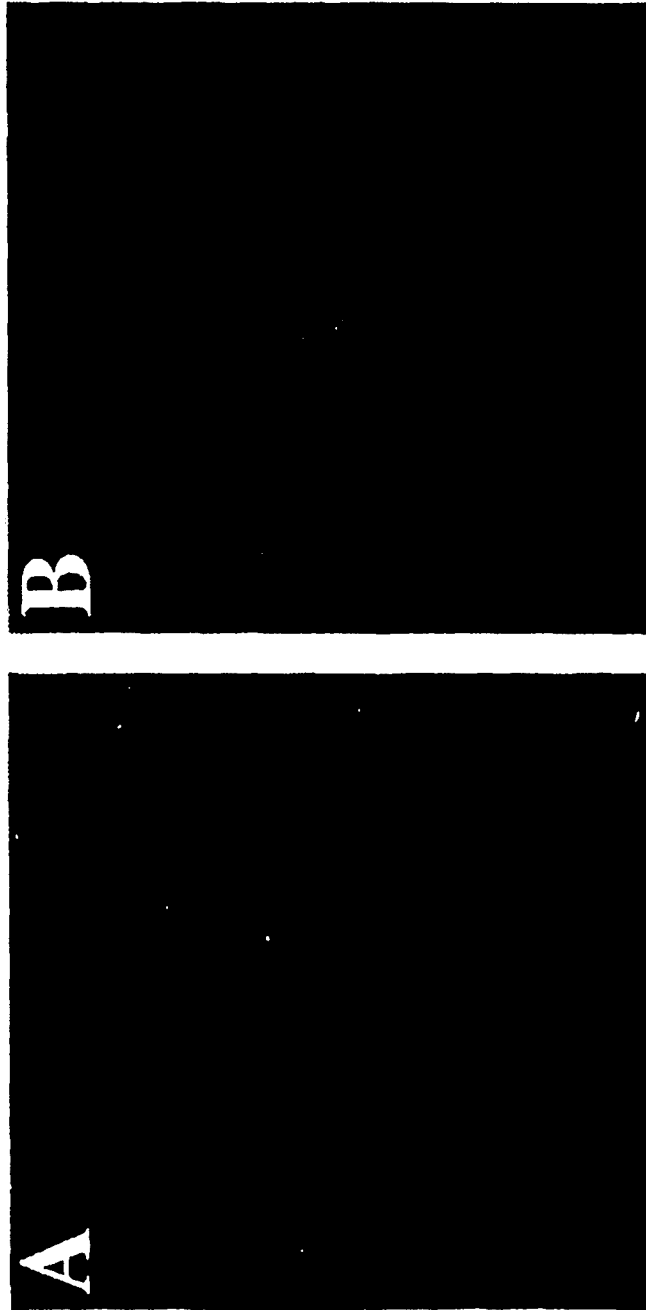
45

50

55

60

65



**Fig. 1 a)**

**Fig. 1 b)**

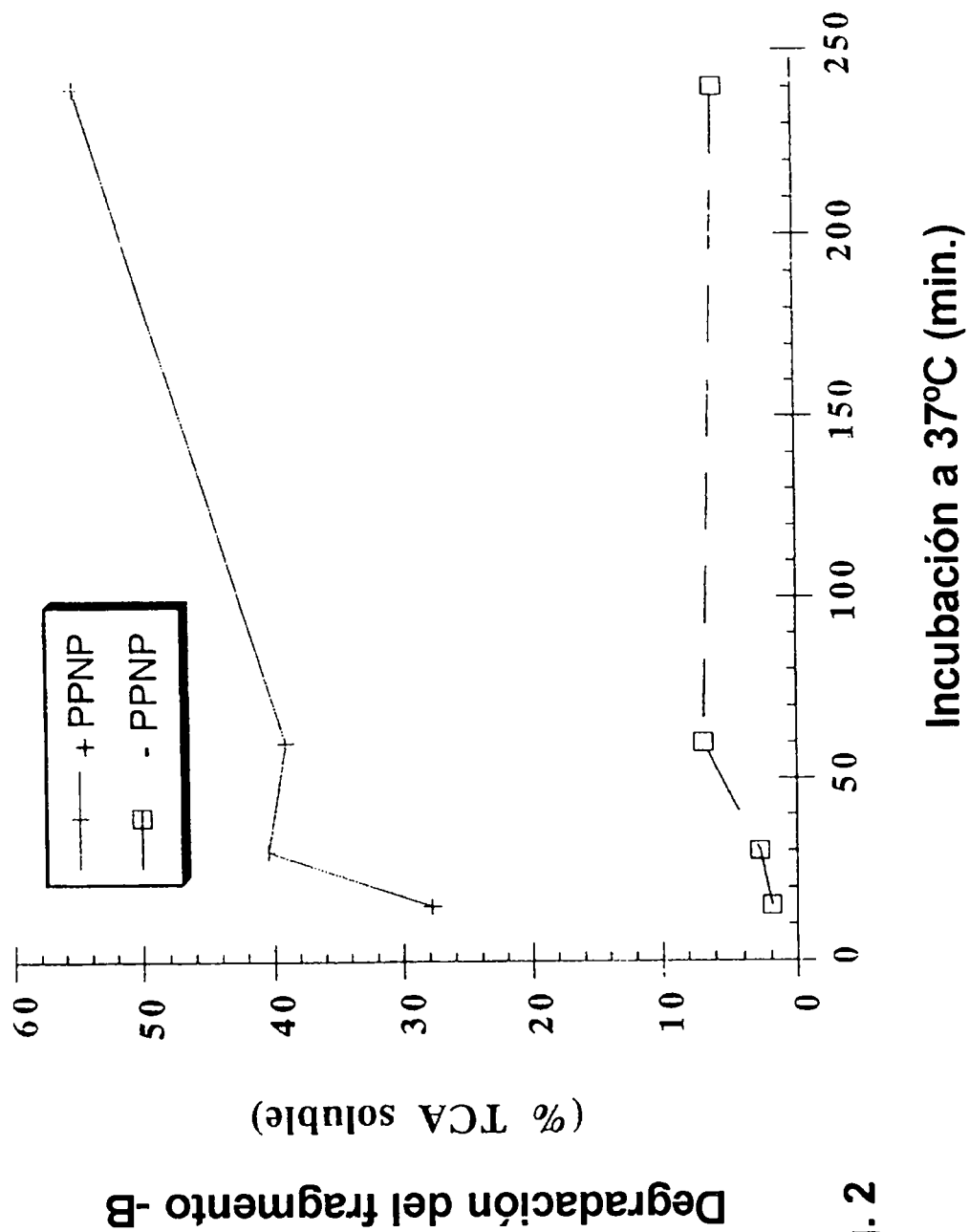
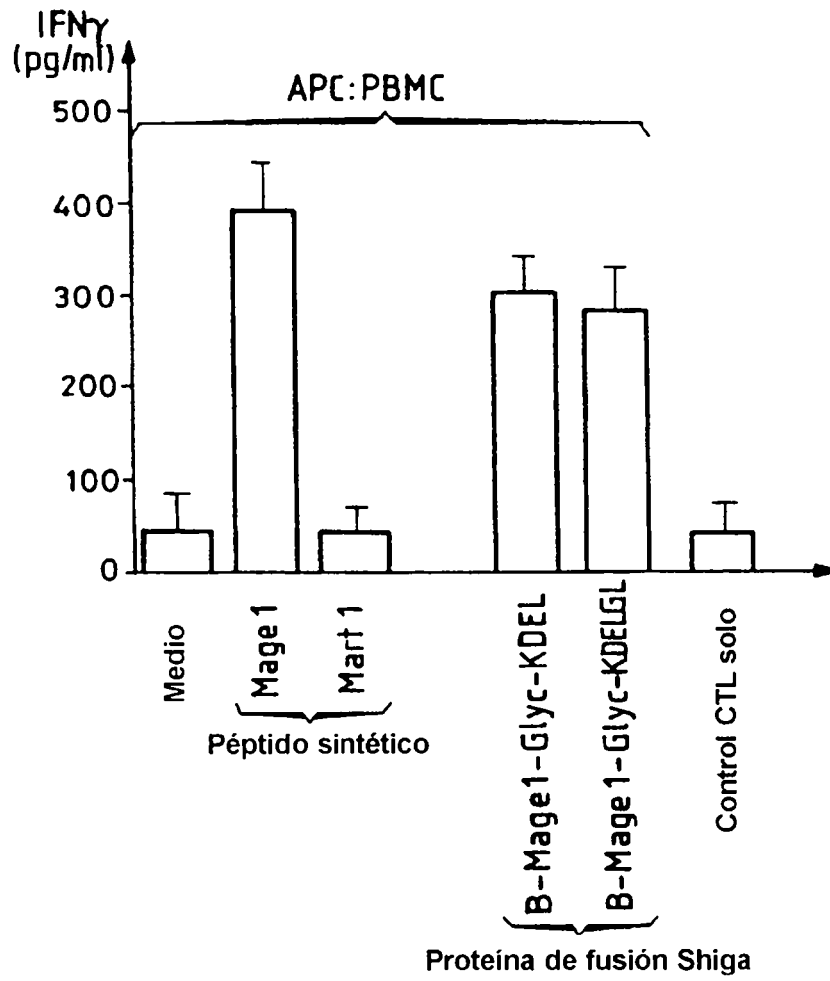
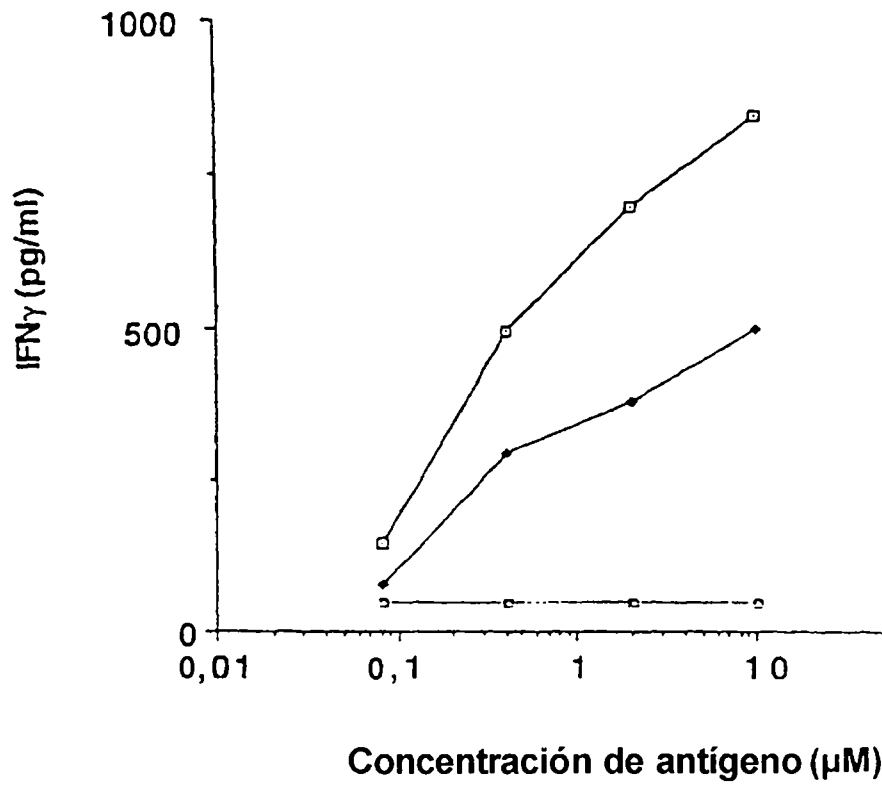


Fig. 2

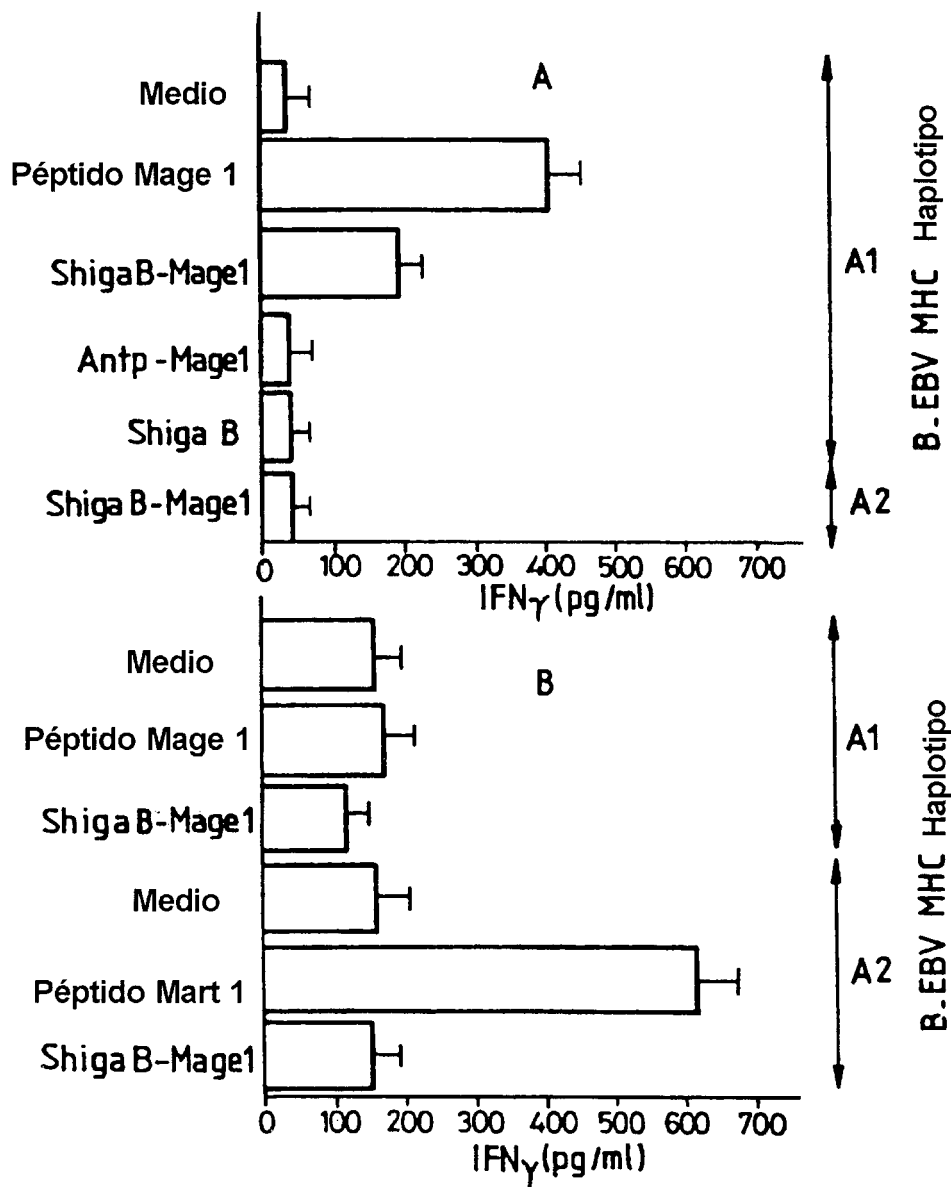
FIG\_3





**Fig. 4**

FIG\_5



# ES 2 307 323 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

	<110> INSTITUT CURIE CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE	
5	<120> POLIPÉPTIDO QUIMÉRICO QUE COMPRENDE EL FRAGMENTO B DE LA TOXINA SHIGA, Y UNOS PÉPTIDOS DE INTERÉS TERAPÉUTICO	
10	<130> 3509A/FL/SDU	
	<140> PCT/FR98/01573	
	<141> 17-07-1998	
15	<150> 9709185	
	<151> 18-07-1997	
20	<160> 7	
	<170> PatentIn Vers. 2.0	
25	<210> 1	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PCR	
35	<400> 1	
	actagctctg aaaaggatga actttgagaa ttctgactca gaatagctc	49
40	<210> 2	
	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PCR	
50	<400> 2	
	cttttcagag ctagtagaat taggatgata gcgggccgcta cgaaaaataa cttcgc	56
55	<210> 3	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador específico del vector ShigaAtpE	
65	<400> 3	
	cactactacg tttaac	17

## ES 2 307 323 T3

	<210> 4		
	<211> 15		
	<212> ADN		
5	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador específico del vector shigaAtpE		
10	<400> 4		
	<b>cggcgcaact atcgg</b>		<b>15</b>
15	<210> 5		
	<211> 24		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento adaptador que contiene el sitio de glucosilación		
25	<400> 5		
	<b>ggccgcatc ctaattctac ttct</b>		<b>24</b>
30	<210> 6		
	<211> 23		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento adaptador que contiene el sitio de glucosilación		
40	<400> 6		
	<b>ctcagaagta gaattaggat ggc</b>		<b>23</b>
45	<210> 7		
	<211> 28		
	<212> ADN		
50	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento adaptador que contiene el sitio de glucosilación		
55	<400> 7		
	<b>gagtctgaaa aagatgaact ttgatgag</b>		<b>28</b>
60			
65			