



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 340 270**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/07** (2006.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

**A61K 35/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03792414 .9**

96 Fecha de presentación : **22.08.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1537204**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2005**

54

Título: **Granzima B dependiente de péptidos Hsp70/Hsp70 como inductora de apoptosis en células tumorales.**

30

Prioridad: **23.08.2002 EP 02018284**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.06.2010**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.06.2010**

73

Titular/es: **Gabriele Multhoff**  
**Kirchenstrasse 17c**  
**81675 München, DE**

72

Inventor/es: **Multhoff, Gabriele**

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 340 270 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).

## ES 2 340 270 T3

### DESCRIPCIÓN

Granzima B dependiente de péptidos Hsp70/Hsp70 como inductora de apoptosis en células tumorales.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para inducir o aumentar la expresión de la granzima B en células citotóxicas naturales o natural killer (NK). Además, la presente invención se refiere a la granzima B para su utilización en el tratamiento de tumores, donde las células tumorales expresan Hsp 70 en su superficie celular.

10 Se ha encontrado que los niveles citoplásmicos elevados de la proteína de choque térmico 70 (Hsp70) protegen las células tumorales contra la muerte celular programada (Nylandsted *et. al.* (2000) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 926, 122). La Hsp70 es la forma inducible de estrés más importante de la familia de proteínas de choque térmico (HSP), que se encuentra principalmente localizada en el citosol. Los resultados acumulados durante los últimos años han demostrado que las HSPs unidas a la membrana plasmática y localizada extracelular son altamente inmunogénicas y exponen a las células a un ataque inmune (Schild *et. al.* (1999) *Current Opinion in Immunology* 11, 109). Tras la captación mediada por receptor (Arnold-Schild *et. al.* (1999) *J. Immunol.* 162, 3757) y de nuevo la presentación por células presentadoras de antígeno (APC), los péptidos acompañantes de HSP provocan la destrucción de las células, respuesta de las células CD8<sup>+</sup> T (Suto *et. al.* (1995) *Science* 269, 1585). Se han identificado varios receptores, que incluyen CD91 y receptores tipo Toll 2 y 4 (TLR2/4), que median la interacción de complejos peptídicos HSP90 (gp96), HSP70 (Hsp70, Hsc70) y HSP60 con APCs (Basu *et. al.* (2001) *Immunity* 14, 303; Binder *et. al.* (2000) *Nat. Immunol.* 1, 151; Sondermann *et. al.* (2000) *Biol. Chem.* 381, 1165.; Ohashi *et. al.* (2000) *J. Immunol.* 164, 558). Se ha descrito "el efecto acompañante" independiente de péptido por los miembros del grupo HSP70. La unión de HSP70 exógeno a monocitos vía TLR2/4 en un patrón dependiente de CD14 induce la agrupación de receptores y la secreción de citoquinas proinflamatorias vía transducción de la señal MyD88/IRAK/NFκ-B (Pfeiffer *et. al.* (2001) *Eur. J. Immunol.* 31, 3153; Asea *et. al.* (2000) *Nature Medicine*, 6, 435; Asea *et. al.* (2000) *Cell Stress & Chaperones*, 5, 425; Asea *et. al.* (2002) *J Biol Chem.* 277 (17), 15028).

30 Se ha encontrado que las células (NK) natural killer interactúan específicamente con un epítipo localizado C-terminal de Hsp70 (Botzler *et. al.* (1998) *Cell Stress & Chaperones*, 3, 6), que se presenta en la membrana celular de las células tumorales (Multhoff *et. al.* (1995) *Int. J. Cancer*, 61, 272; Multhoff *et. al.* (1997) *J. Immunol.* 158, 4341). La cantidad de Hsp70 unida a la membrana en las células tumorales se correlaciona positivamente con la intensidad de lisis mediada por las células NK: Se ha encontrado que el estrés físico (calor) así como químico (fármacos citostáticos) aumentan la expresión en la superficie celular de Hsp70 en células tumorales y, por lo tanto, representan las mejores dianas para las células NK (Multhoff (1997) *Int. J. Hyperthermia* 13, 39; Botzler *et. al.* (1999) *Exp. Hematol.* 27, 470; Rabinovich *et. al.* (2000) *J. Immunol.* 165, 2390; Feng *et. al.* (2001) *Blood* 97, 3505). La incubación de células NK purificadas con proteína Hsp70 recombinante aumenta su actividad citolítica contra las células tumorales positivas a la membrana de Hsp70 (Multhoff *et. al.* (1999) *Exp. Hematology* 27, 1627). Se consigue el mismo efecto mediante un péptido de 14 aminoácidos, terminado TKD (TKDNNLLGRFELSG, aa450-463), derivado de la C-terminal del dominio Hsp70. Esta región corresponde al dominio Hsp70 expuesta a un medio extracelular de células tumorales viables (Multhoff *et. al.* (2001) *Cell Stress & Chaperones* 6, 337). Concomitante con un aumento de la actividad citolítica, tras el contacto con la Hsp70 o con Hsp70-péptido TDK, la expresión de la superficie celular de la forma activa del receptor de lectina CD94 tipo-C se ha mejorado en las células NK. Los análisis de bloqueo que utilizan un anticuerpo inhibidor específico de CD94 revelaron una participación de CD94 en la interacción de las células NK con las células tumorales positivas a la membrana de Hsp70 (Multhoff *et. al.* (1999) *Exp. Hematología* 27,1627). Estos datos indican que, aparte de péptidos líder que presentan HLA-E de alelos HLA clásicos (Lanier *et. al.* (1998) *Inmunidad* 8.693; Braud *et. al.* (1998) *Naturaleza* 391, 795), el terminal localizado Hsp70-secuencia de péptido TKD podría considerarse un ligando potencial para un aún complejo receptor CD94 activador indefinido. A pesar de que las observaciones anteriores indican que las funciones de Hsp70-péptido como un estructura de reconocimiento diana selectiva al tumor para las células NK positivas CD94 (Multhoff *et. al.* (1997) *J. Immunol.* 158,4341), el mecanismo por el cual las células NK lisan las células diana tumorales positivas Hsp70 queda todavía por dilucidar. Además, es preferible estimular específicamente la actividad lítica de las células NK hacia células tumorales de la manera más específica que hasta ahora sea posible. Todos estos objetivos científicos sirven como medios para encontrar un enfoque más eficaz y más específico en el tratamiento de enfermedades y, en particular, en el tratamiento de tumores.

55 Se han hecho informes de la expresión en superficie de proteínas de choque térmico que incluyen la Hsp70 para encontrar también después infección vírica o en respuesta al estrés. En particular, se encontró Hsp70 en membrana en células limfoides infectadas por HIV (Di Cesare *et al.* (1992), *Immunology* 76, 341) y en líneas celulares de conejos infectados por HTLV I (Chouchane *et al.* (1994), *J. Infect. Dis.* 169, 253). De forma parecida, es concebible que las células infectadas por bacterias o afectadas por inflamación expresen Hsp70 en sus superficies celulares. En consecuencia, la actividad lítica de las células NK o granzima B puede estar dirigida hacia células infectadas por virus o bacterias así como hacia células afectadas por inflamación.

65 El estado de la técnica también incluye las siguientes divulgaciones: WO 99/49881: Efectos antitumorales de células NK en células tumorales que expresan en la superficie celular Hsp70 (ejemplos 2 y 3), WO 01/80880: se hace referencia a las páginas 7 y 8 para la producción de granzima B por células NK activadas.

Por tanto, el problema técnico que plantea la presente invención es proporcionar medios y procedimientos para el tratamiento específico de enfermedades y, en particular, de tumores, infecciones víricas y bacterianas y enfermedades inflamatorias.

## ES 2 340 270 T3

La solución a dicho problema técnico se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un procedimiento *ex vivo* de inducción o mejora de la expresión de la granzima B en células (NK) natural killer que comprende poner en contacto células NK con

- (a) proteína Hsp70;
- (b) un fragmento (C-terminal) de (a) que comprende la secuencia de aminoácidos TKDNNLLGRFELSG;
- (c) un (poli)péptido que comprende la secuencia de aminoácidos TKDNNLLGRFELSG; o
- (d) una combinación de (a), (b) y/o (c).

La granzima B es una proteasa serina bien conocida en el estado de la técnica y se ha descrito que está implicada en el proceso de la apoptosis/muerte celular programada (Berke (1995) Cell, 81(1), 9-12; Froelich *et. al.* (1998) Immunology Today, 19(1), 30-26); Metkar S *et al.* Apoptosis mediada por gránulos de células citotóxicas: las perforinas liberan complejos de serglicina de granzima B en la células diana sin información de poro de la membrana plasmática, Inmunidad 16 (2002), 417-428.

Esta encima promueve la fragmentación del ADN por desdoblamiento de procaspasas en sus formas activadas y, por lo tanto, induce la muerte celular programada a través de la ruta inhibida Bcl-2. La granzima B empieza a inducir el proceso de apoptosis después de la presencia en el citosol de una célula diana.

El término "células NK" ("células natural killer") comprende linfocitos granulares grandes que expresan CD45 en la superficie y que muestran actividad para matar sin estimulación previa. Están especialmente caracterizadas por el hecho de que no expresan CD3 o receptor de células T  $\alpha/\beta$ - o  $\gamma/\delta$  y pueden estimularse por la interleucina-2.

Las células NK estimuladas por el procedimiento de la presente invención además se caracterizan por las siguientes propiedades:

- tienen adherencia plástica transitoria después de la adición de IL-2 en cantidades de 10 a 10.000 unidades, por ejemplo de 100 IU, donde IL-2 puede adquirirse de la firma Chiron;
- la adherencia tiene efecto 3-18 horas después de la adición de IL-2 en las recién aisladas PBL (linfocitos de sangre periférica empobrecidos por monocitos);
- las células NK muestran un expresión CD16dim (valor medio de la fluorescencia débil);
- las células NK expresan CD56 y CD57 como marcador NK típico;
- las células NK expresan CD94 (receptor celular asesino de lecitina tipo C);
- las células NK secretan después de la activación con Hsp70 y citocinas IFN $\gamma$ ;
- las células NK puede estimularse por la adición de Hsp70, Fragmento de Hsp70 o Hsp70-péptido (proteína purificada) (crecimiento y actividad citotóxica);
- no son dependientes del tipo MHC del paciente.

De acuerdo con la invención, también pueden utilizarse otras poblaciones de células NK. Se conocen en el estado de la técnica otros procedimientos para la obtención de dichas poblaciones e incluyen el aislamiento utilizando bolas magnéticas y clasificación de células. En este caso, sin embargo, es un requisito previo que puedan activarse por Hsp70 o por los fragmentos citados más arriba o (poli)péptidos. De acuerdo con la invención, pueden utilizarse células NK aisladas. Además, es posible utilizar mezclas de células tales como células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que contiene células NK.

En una realización especialmente preferida del procedimiento *ex vivo* de la invención, se utilizan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o una fracción de esta que contiene las células NK como suspensiones celulares fisiológicas.

Utilizando procedimientos adecuados, las células NK pueden obtenerse de los pacientes a tratar o de un donante sano por extracción de sangre. Preferiblemente, se utilizan células mononucleares de cultivo o concentrados de linfocitos obtenidos por otros medios que contienen células NK.

Las células mononucleares de cultivo o concentrados de linfocitos se toman de los pacientes a través de las venas y, por ejemplo, se añade heparina para prevenir la coagulación de las células. Las células mononucleares de cultivo a las que se ha añadido la heparina se recogen en un recipiente estéril (generalmente, bolsas de plástico estéril) y

## ES 2 340 270 T3

después se centrifuga utilizando centrifugación de densidad Ficoll que da como resultado una acumulación de células sanguíneas (=PBMC, células mononucleares sanguíneas periféricas, por ejemplo, linfocitos, monocitos, granulocitos y así sucesivamente). El concentrado de linfocitos permanece estéril en bolsas de cultivo estéril.

5 Las células mononucleares de cultivo que contienen células mononucleares sanguíneas periféricas se utilizan en forma de una suspensión celular fisiológica, preferiblemente con adición de heparina. La heparina previene la agregación de las células.

10 En WO 99 49 881 se han descrito procedimientos para la estimulación de las células NK por incubación con proteínas Hsp70 de fragmentos C-terminal de éstas. Sorprendentemente, se ha encontrado que la expresión de la granzima B está inducida o mejorada en las células NK por el contacto de dichas células con la proteína Hsp70, un fragmento de la misma que comprende la secuencia de aminoácidos TKDNNLLGRFELSG, un (poli)péptido que comprende la secuencia de aminoácidos TKDNNLLGRFELSG, o una combinación de dichas proteínas/(poli)péptidos, preferiblemente, en combinación con IL-2. Preferiblemente, el fragmento referenciado arriba y en relación con 15 otras realizaciones (preferidas) de la invención es un fragmento (C-terminal) carboxi terminal de Hsp70.

De acuerdo con la invención, el término “proteína Hsp70” se refiere a las proteínas de choque térmico, las células eucariotas (HSP). La expresión de dichas HSPs puede inducirse por calor pero también por una serie de otros reactivos tales como, por ejemplo, análogos de aminoácidos, metales pesados, ionóforos o citotoxinas, en donde el factor de 20 aumento de la expresión por medio de la inducción es de por lo menos 5 en comparación con la expresión constitutiva. La secuencia completa de aminoácidos se ha publicado en Milner *et al.* (1990) *Inmunogenética* 32 (4), 242-251.

De acuerdo con la invención, el término “fragmento” de la proteína Hsp70 también comprende (poli)péptidos que muestran una secuencia de aminoácidos del margen de aminoácidos 384-641 de la Hsp70 humana. Todos los fragmentos C-terminal (carboxi-terminal) por lo menos comprende la secuencia de aminoácidos TKDNNLLGRFELSG. Los 25 procedimientos para el aislamiento de los correspondientes (poli)péptidos son conocidos en el estado de la técnica y especialmente descritos en el ejemplo 1 que sigue más adelante. Por tanto, el experto en la materia también es capaz de producir fragmentos a partir del fragmento mencionado más arriba 384-641 por técnicas recombinantes sin más preámbulos (se describen procedimientos estándares para ello en Sambrook *et al.* “La clonación molecular, un manual de laboratorio”, 2ª Edición 1989, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY) y ponerlos a prueba para las propiedades de 30 activación deseadas.

El término (poli)péptido se refiere a los péptidos así como polipéptidos (proteínas). De acuerdo con la práctica habitual, los péptidos comprenden hasta 30 aminoácidos, mientras que los polipéptidos consisten en más de 30 aminoácidos. Esta práctica también se emplea en la invención. Además, de acuerdo con la invención, los aminoácidos a 35 través de toda la descripción se referencian por un código de letras.

En una alternativa, los (poli)péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos TKDNNLLGRFELSG son (poli)péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos enumerada y, opcionalmente, comprenden otros aminoácidos N-terminalmente y C-terminalmente derivados de la Hsp70, unidos a las secuencias de aminoácidos seleccionadas que se forman de forma aleatoria o natural. Así, el procedimiento *ex vivo* según la presente invención se refiere a la estimulación de células NK mediante proteínas de fusión que comprenden la secuencia del péptido 14-mer Hsp70.

Una realización preferida de la invención se refiere a un procedimiento en el que la proteína Hsp70, el fragmento 45 (C-terminal) de la misma, los (poli)péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos TKDNNLLGRFELSG, o la combinación de los mismos se encuentra en un estado no complejo.

Las HSPs son conocidas en el estado de la técnica por formar complejos con un gran número de péptidos de diferentes sustratos (Tamura *et al.* (1997) *Ciencia*, 278,117-223). Sin embargo, sorprendentemente se ha encontrado 50 que las proteínas de choque térmico, los fragmentos (C-terminal) de las mismas o derivados procedentes de los mismos (véase más arriba) inducen actividades inmunológicas por medio de la activación de las células NK, incluso si no forman complejos con los péptidos.

Así, según los procedimientos descritos en WO9949881, el experto en la materia es capaz de estimular las células 55 NK mediante la proteína Hsp70 o (poli)péptido que comprende la secuencia de aminoácidos TKDNNLLGRFELSG en un estado no complejo.

Un procedimiento previsto incluiría la inyección de Hsp70, fragmento de Hsp70 o péptido de Hsp70 en pacientes para la estimulación *in vivo* de células NK y así producir granzima B.

60 En realizaciones de la invención, los procedimientos se llevan a cabo *ex vivo* o *in vitro*.

Este procedimiento comprende el aislamiento de las células NK o una población de células que comprende las células NK como se ha descrito aquí más arriba, en el que se mezcla una suspensión celular fisiológica que contiene 65 células NK con la proteína Hsp70, el fragmento C-terminal de la misma o un derivado del mismo o una proteína/(poli)péptido que comprende la secuencia de aminoácidos TKDNNLLGRFELSG y se incuban para inducir o mejorar la expresión de granzima B en células NK.

## ES 2 340 270 T3

La incubación puede llevarse a cabo, por ejemplo, en una incubadora a la temperatura fisiológica (37°C) en un agitador (agitación suave), el 5% de CO<sub>2</sub> +> 80% atmósfera humificada también en condiciones fisiológicas de retención que permiten la supervivencia de las células NK.

- 5 El procedimiento previsto incluiría una reinfusión de preferiblemente autoplastia y/o células NK alogénicas con expresión de granzima B inducida o mejorada en un mamífero.

Una vez que las células NK se han sometido a un tratamiento *in vitro* o *ex vivo* para inducir o mejorar la expresión de granzima B, se vuelven a infundir en un paciente. La re-infusión puede realizarse utilizando el equipo médico estándar. Por ejemplo, la reinfusión de las células NK o PBMC que contiene células NK puede ser I.v., i.p., s.c. o intratumoral.

El mamífero puede ser un humano.

- 15 En otra realización preferida del procedimiento *ex vivo* de la invención, dicho contacto de las células NK con la proteína Hsp70, el fragmento (C-terminal) de la misma o un derivado del mismo o una proteína/(poli)péptido que comprende la secuencia de aminoácidos TKDNNLLGRFELSG se realiza durante por lo menos 12 horas. De acuerdo con otra realización preferida, dicho contacto se realiza durante por lo menos 4 días.

20 La presente invención se refiere, en otra realización preferida a un procedimiento *ex vivo* en el que dichas células NK, antes de ponerse en contacto con, se obtienen a partir de células de médula ósea mediante incubación de dichas células de médula ósea con interleucina-15 (IL-15) y el factor de células madre (SCF) a concentraciones de 1 ng/ml - 1000 ng/ml por citoquina durante por lo menos 7 días y hasta 4 meses.

25 Esta realización preferida de la invención permite el aislamiento natural de células NK después de la estimulación de células de médula ósea con las llamadas citoquinas. Las células NK obtenidas muestran marcadores típicos de las células NK referenciados aquí más arriba. La concentración preferida de citocinas está en el intervalo de 100 ng/ml por citocina. Después de la estimulación con citoquinas y la diferenciación en las células NK que muestran CD94 y CD56 en su superficie, el contacto con estas células puede continuar con la proteína Hsp70 o el fragmento mencionado más arriba de (poli)péptidos o la combinación de los anteriores mencionados más arriba en la presente invención.

De acuerdo con la invención, cuando sea aplicable, las preparaciones farmacéuticas se definen como sustancias y preparaciones de sustancias que, cuando se utilizan en el cuerpo humano, son para curar, aliviar, prevenir o reconocer enfermedades, dolencias, defectos físicos o malestares patológicos.

35 Opcionalmente, dichas composiciones farmacéuticas comprenden además un portador, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

El experto en la materia conoce ejemplos de portadores aceptables farmacéuticamente adecuados (tolerables) que comprenden, por ejemplo, soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones oleaginosas/acuosas, soluciones estériles, y así sucesivamente. Las composiciones farmacéuticas (preparaciones farmacéuticas) que contiene dichos portadores pueden prepararse de acuerdo con los procedimientos habituales. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse a los individuos respectivos en una dosis apropiada. Las formas de administración son, por ejemplo, por vía intravenosa (i.v.), intraperitoneal (i.p.), intratumoral, subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.), tópica o intradérmica. La dosis depende de muchos factores, por ejemplo, del tamaño del paciente, sexo, peso, edad, así como el tipo de la composición especial administrada, la forma de administración y así sucesivamente. Las composiciones pueden administrarse de forma local o sistémica. En general, la administración se realiza por vía parenteral.

50 Las preparaciones para la administración parenteral incluyen suspensiones, emulsiones y soluciones estériles acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son el propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como el oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen el agua, soluciones acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina al 0,9% de NaCl, tampón fosfato, X-20 *in vivo*, y medios tamponados. Los vehículos parenteral incluyen una solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio o lactato de Ringer. Los vehículos de vía intravenosa incluyen reconstituyentes de líquidos y nutrientes, reconstituyentes de electrolitos (como los basados en la glucosa de Ringer) y similares. Los conservantes y otros aditivos también pueden estar presentes como, por ejemplo, los antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y los gases inertes, etc. Por otra parte, la composición farmacéutica de la invención puede comprender otros agentes como las interleucinas o los interferones en función del uso previsto de la composición farmacéutica.

60 La invención también se refiere a la utilización de granzima B en el tratamiento *in vivo* de tumores independiente de la perforina. Más preferiblemente, dichos tumores se seleccionan entre el grupo que consiste en el estómago, gástrico, colorrectal, páncreas, mama, pulmón, ginecológico, cáncer de cabeza y cuello, dermatológico (por ejemplo, el melanoma), tumores neuronales, leucemia y linfoma.

65 Los tumores a tratar expresan Hsp70 en la superficie celular. En el estado de la técnica son conocidos los procedimientos para la detección de la expresión en superficie de Hsp70 y comprenden métodos histológicos, citometría de flujo, etc.

## ES 2 340 270 T3

5 En contraposición con los indicios del estado de la técnica, de acuerdo con la presente invención podría demostrarse que la granzima B es eficaz en el tratamiento de tumores independiente de la ruta perforina. Esto tiene importantes aplicaciones en la estrategia de tratamiento de tumores ya que la captación del compuesto farmacéuticamente activo ahora puede conducirse independiente de la ruta perforina. La granzima B puede administrarse por vía intratumoral, i.v., subcutánea.

En una realización preferida de la presente invención, la granzima B se utiliza como el único componente farmacéuticamente activo en dicha composición farmacéutica.

10 Una vez más, esta realización preferida de la invención tiene importantes implicaciones en el diseño de los componentes necesarios de la composición farmacéutica a utilizar en el tratamiento de cánceres. Es importante destacar que no existe la necesidad de incluir otros principios farmacéuticos activos en la composición farmacéutica con el fin de tratar de forma eficaz los tumores y/o reducir el tamaño de los tumores o de tratar infecciones virales o bacterianas o enfermedades inflamatorias.

15 Se prevee un procedimiento para el tratamiento de tumores, infecciones víricas o bacterianas o enfermedades inflamatorias que comprende las etapas de:

- 20 (a) poner en contacto células NK con células tumorales que tienen Hsp70 en su superficie o células afectadas por dicha infección o inflamación y que tienen Hsp70 en su superficie;
- (b) permitir que la granzima B entre en dichas células a través de los canales iónicos formados por dicha Hsp70 en la superficie de las células tumorales; y
- 25 (c) permitir que dichas células lleguen a la apoptosis como resultado de la actividad enzimática de la granzima B.

30 Como alternativa, la granzima puede aplicarse directamente en lugar de expresarse por estimulación de las células NK. En consecuencia, la presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de tumores, infecciones virales o bacterianas o enfermedades inflamatorias que comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto células tumorales que tienen Hsp70 en su superficie o células afectadas por dicha infección o inflamación y que tienen Hsp70 en su superficie con la granzima B;
- 35 (b) permitir que la granzima B entre en dichas células a través de los canales iónicos formados por dicha Hsp70 en la superficie de las células tumorales; y
- (c) permitir que dichas células lleguen a la apoptosis como resultado de la actividad enzimática de la granzima B.

40 A partir del estudio de las enseñanzas incluidas más arriba en la invención, el experto en la materia puede deducir los intervalos de células tumorales o células afectadas por dicha infección o inflamación y las concentraciones de granzima B, así como los intervalos de tiempo de contacto de la granzima B y las células tumorales o células afectadas por dicha infección o inflamación.

45 En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, la granzima B se administra en una concentración final de 1  $\mu\text{g/ml}$  a 500  $\mu\text{g/ml}$ .

50 En otra realización preferida del procedimiento de la invención, la granzima B se administra a una concentración final de 1 ng/ml a 10 ng/ml. Es todavía más preferible que la granzima B se administre a una concentración final de aproximadamente 6 ng/ml. En este sentido, es importante destacar que son más preferibles las formas de administración que la introducción de estas concentraciones de granzima B directamente en las células tumorales o células afectadas por dicha infección o inflamación.

55 En otra realización preferida de la presente invención, la granzima B se introduce/empaqueta en un liposoma.

Es bien conocida en el estado de la técnica la encapsulación de compuestos farmacéuticos activos en liposomas.

Las figuras muestran:

60 La figura 1 muestra la identificación de granzima B por interacción por contacto de la proteína Hsp70 y el péptido TKD de Hsp70.

65 Figura 1A: La proteína Hsp70 (Hsp70), albúmina sérica bovina (BSA) y el péptido (TKD) de Hsp70 se incubaron en columnas con células lisadas de la línea celular YT con NK o la línea celular K562 sin NK. Las proteínas unidas se eluyeron de las columnas en 5 fracciones (F1-F5), separadas en SDS-PAGE (electroforesis del gel de poliacrilamida del sulfato dodecil de sodio). Después de la tinción de plata, los eluidos de células YT procedentes de columnas Hsp70 y TKD, revelaron una banda de proteína dominante de 32 kDa en las fracciones dos

## ES 2 340 270 T3

(F2) y tres (F3). La banda de proteína dominante de 32 kDa se detectó en eluidos YT derivados de las columnas de BSA y en eluidos K562 derivados de las columnas de TKD. La posición de la banda de 32 kDa se indica con una flecha.

5        Figura 1B: Los péptidos trípticos de la banda de 32 kDa tintados de azul de Coomassie de la fracción 3 (F3), derivados de la columna de TKD, corresponden a la granzima B humana. La probabilidad de identificación fue del 100% y el puntaje-Z estimado fue de 1,89 correspondiente a > 95% de confianza.

10        Figura 1C: Análisis correspondiente de Western-Blot de YT y eluidos de células K562 (F3) después de la incubación en columnas con la proteína Hsp70 (Hsp70) y péptido de Hsp70 (TKD). La mancha fue autoradiografiada y se visualizó la localización de la granzima B por inmunotinción con el anticuerpo monoclonal 2C5 (AcM 2C5) específico para granzima B. Los eluidos de células YT (izquierda), pero no de células K562 (derecha), revelaron una banda de proteína de la granzima B de 32 kDa.

15        Figura 1D: Citometría de flujo intracelular de células YT (izquierda) y células K562 (derecha) permeabilizadas utilizando el anticuerpo monoclonal específico HC2-PE de granzima B conjugada con ficoeritrina (PE) (línea continua), en comparación con un anticuerpo de control negativo emparejado a un isotipo (línea discontinua). Sólo las células YT, pero no las células K562, contenían granzima B citoplásmica.

20        La figura 2 muestra la unión específica de superficie celular y la aceptación de granzima B (GRB) por células tumorales positivas a la membrana de Hsp70.

25        Figura 2A: Unión comparativa de granzima B (2 µg/ml) a la superficie celular de células tumorales CX+/Cx- y Colo+/Colo- a 4°C, y la absorción en el citosol tras un cambio de temperatura 37°C durante 30 minutos, utilizando el anticuerpo monoclonal específico HC2-PE1a de granzima B conjugada a ficoeritrina (PE). La primera fila, de microscopía de luz, segunda fila, inmunofluorescencia de células sin granzima B (control); tercera fila, inmunofluorescencia de las células después de la adición de granzima B, tal como se específica (grB). Se ilustra la microscopía de fluorescencia representativa de tres resultados idénticos; aumento 40x.

30        Figura 2B: Citometría de flujo intracelular de células tumorales Colo+/Colo- (n = 4) y CX+/CX- (n=2) permeabilizadas utilizando el anticuerpo monoclonal específico HC2-PE para granzima B antes (línea discontinua) y después (línea continua) de la incubación de las células tumorales con 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml de granzima B a 37°C durante 30 min. Sólo las células CX+ y Colo+, pero no CX- y Colo- mostraron un cambio de dosis-dependiente del pico de granzima B a la derecha, indicando la captación de granzima B expresada de forma extracelular.

40        La figura 3 muestra un experimento en el que la apoptosis es inducida selectivamente por granzima aislada B (grB) en células tumorales positivas a la membrana de Hsp70.

45        Figura 3A: Porcentaje de células CX+/Colo+ (izquierda) y CX-/Colo- (derecha) teñidas con anexina V-FITC positivas y yoduro de propidio (PI) negativas, ya sea sin tratar (barras en negro) o después de la incubación, ya sea con camptotecina (4 µg/ml; barras de color gris claro) o con granzima B (6 ng/ml; barras gris oscuro) durante 4 h, 12 h y 24 h. Los datos representan la media de desviación estándar de tres a cuatro experimentos independientes; la marca\* se refiere a valores significativamente diferentes del control (p<0,05).

50        Figura 3B: Análisis correspondiente de citometría de flujo de células CX+ y CX- teñidas positivamente con anexina V-FITC y negativamente con yoduro de propidio (PI), ya sea sin tratar (control), o después de la incubación con granzima B (grB) durante 24 h. El porcentaje de células teñidas positivamente con anexina V-FITC se da en porcentaje en la esquina inferior derecha de cada gráfica.

55        Figura 3C: Análisis por microscopía de luz de agrupaciones (clusters) de células tumorales CX+/CX- y Colo+/Colo- de crecimiento adherentes, ya sea sin tratar (control) o después del tratamiento con camptotecina (CAM, 4 µg/ml) o granzima B (grB, 10 ng/ml), durante 24 h. La barra en la escala indica 100 µm.

60        Figura 3D: Al mismo tiempo, se tiñeron las células CX+/CX- y Colo+/Colo- ya bien sea sin tratar (control), o bien tratadas con camptotecina (CAM) o con granzima B (grB) (24 h) con DAPI. Se observó una fragmentación del ADN nuclear considerable en todas las sublíneas tumorales seguidas de la incubación con camptotecina (panel central). Después de la incubación con granzima B sólo las células CX+ y Colo+ mostraron fragmentación del ADN nuclear (panel inferior, izquierda). No se observaron signos de apoptosis en las células CX- y Colo- seguidas de la incubación con granzima B (panel inferior, derecha). La barra en la escala indica 10 µm.

65        La Figura 4 muestra un experimento en el que se demuestra la muerte de las células tumorales positivas a la membrana de Hsp70. La apoptosis mediada por células NK positivas de granzima B está bloqueada por los AcM específicos de Hsp70.

Figura 4A: Microscopía de luz (ampliación 20x) de las colonias de células CX- negativas a la membrana de Hsp70 y CX+ positivas a la membrana de Hsp70, o bien sin tratar (control) o después de una incubación de 12

## ES 2 340 270 T3

h con células NK (+NK) estimuladas por Hsp70-péptido TKD. La relación efector a célula diana (E:D) fue de 20:1. La barra de escala representa 200  $\mu\text{m}$ , el compartimento en la esquina inferior derecha de cada gráfica muestra una colonia de células representativas, 2,5x aumentos.

5 Figura 4B: Se cuantificó la muerte celular de células tumorales diana CX+/Colo+ (izquierda) y CX-/Colo- (Panel derecho) mediante células NK nativas (NK d0) y estimuladas con Hsp70-péptido TKD (NK d3) en ensayos de liberación  $^{51}\text{Cr}$ . Los niveles de granzima B intracelular en células NK nativas (NK d0) respecto a las células NK estimuladas con TKD (NK d3) fueron 1,4 veces mayores; En concordancia, la lisis de células CX+ fue 1,5 veces mayor, y la de las células Colo+ de 2,0 veces a diferentes relaciones de efector diana. La lisis de las células tumorales CX- y Colo- no se vio afectada. Además, el aumento de la actividad citolítica de las células NK estimuladas por TKD (NK d3 AcM Hsp70) contra las células CX+ y Colo+ fue completamente inhibida por la caída de los anticuerpos específicos de Hsp70 hasta el nivel de la lisis de las células tumorales negativas a la membrana de Hsp70 (inhibición de 1,7 veces, línea de puntos). La citotoxicidad se determinó a las relaciones E:D que van desde 2:1 a 20:1; la liberación espontánea de cada célula diana fue inferior al 10%. Los datos representan la media de la desviación estándar de tres experimentos independientes.

### Ejemplos

20 Los siguientes ejemplos ilustran la invención. Estos ejemplos no deben interpretarse de manera limitativa: los ejemplos se incluyen sólo a título ilustrativo.

#### Ejemplo 1

25 *Materiales y Métodos*

##### *Células*

30 Se cultivó la línea celular YT con NK en intervalos de densidades de células que van de 0,1-0,5 x 10<sup>6</sup> células/ml en medio RPMI-1640 (Life Technologies, Eggenstein, Alemania) que contenían un 10% suero fetal bovino inactivado por calor (FCS, Life Technologies, Eggenstein, Alemania) complementado con 6 mM de L-glutamina y antibióticos (100 UI/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  estreptomycin, Life Technologies). Las células NK con adherencia plástica transitoria se derivaron de células mononucleares de cultivo de voluntarios humanos sanos. Las células sanguíneas mononucleares periféricas separadas por Ficoll (PBMC) fueron cultivadas en rIL-2 (100 UI/ml, Quirón, Frankfur, Alemania) durante 12 h. Después de la selección de adherencia de los linfocitos de sangre periférica empobrecidos de monocitos de acuerdo con un método modificado de Vujanovic (Vujanovic *et al.* (1993) de la célula. Immunol. 151,133), las células fueron cultivadas en un medio RPMI-1640 complementado con Hsp70-péptido TKD (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 3 días.

40 Las sublíneas de tumores humanos CX+/CX- y Colo+/Colo- se obtuvieron por clasificación de células de las líneas celulares de carcinoma de colon CX-2 (Hsp70 positivo: 60%) y páncreas Colo357 (Hsp70 positivo: 70%) utilizando el anticuerpo monoclonal específico Hsp70 C92F3B1, de acuerdo con un protocolo previamente descrito (Multhoff *et al.* (1997) J. Immunol. 158,4341). En consecuencia, CX+ y CX- son autólogas, al igual que Colo+ y Colo-. Las sublíneas de carcinoma CX+ (Hsp70 positivo: 80%) y Colo+ (Hsp70 positivo: 85%) de expresión altamente estable de Hsp70 difieren significativamente de las células de carcinoma de CX-(Hsp70 positivo: 25%) y Colo- (Hsp70 positivo: 35%) de expresión poco estable de Hsp70.

50 Se cultivaron sublíneas de carcinoma CX+/Colo+ y CX-/Colo-, que difieren en cuanto a su expresión en la membrana de la Hsp70, pero muestran idéntica expresión MHC de clase I, y la línea de células NK no leucémicas K562 en un medio de RPMI-1640 complementado con 5% de FCS, 6 mM de L-glutamina y antibióticos. Se utilizaron para granzima B las células tumorales de crecimiento exponencial (día 1 tras el paso de células), el tratamiento de la camptotecina y como objetivos en ensayos de citotoxicidad.

55 Todas las líneas celulares se examinaron periódicamente para detectar contaminación por micoplasma mediante un inmunoensayo enzimático para detectar *M. arginini*, *M. hyorhinitis*, *A. laidlawii* y *M. orale* (Roche, Mannheim, Alemania). Sólo se utilizaron las líneas de células libres de micoplasma.

##### *Cromatografía de afinidad e inmunoprecipitación*

60 Se incubó albúmina sérica bovina (BSA, 1 mg/ml, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), 1 mg/ml liofilizado, proteína Hsp70 recombinante humana (Stressgen, Columbia Británica, Canadá) o 2 mg/ml Hsp70-péptido TKD (TKDNNLLGRFELSG, aa<sub>450-463</sub>, Bachem, Bubendorf, Suiza) con perlas de AminoLink agarosa equilibradas (Pierce, Rockford, EE.UU.) en 2 ml durante 6 horas, junto con el reductor NaCNBH<sub>3</sub>. La capacidad de fijación de la BSA, la proteína Hsp70 y Hsp70-péptido TKD fue superior al 95%. Tras la eliminación del material no acoplado mediante el lavado con tampón Tris y enfriado de los grupos no-reactivos, las células de lisis se aplicaron a las columnas de BSA, proteína Hsp70 y Hsp70-péptido TKD conjugado durante 1 h.

## ES 2 340 270 T3

Tras el lavado con 10 volúmenes de columna de 20 mM de tampón Tris, se eluyeron las proteínas unidas con cloruro sódico 3M en 20 mM de tampón Tris, en 5 fracciones. Cada fracción se sometió a un 10% SDS-PAGE y se secó en membranas de PVDF.

### 5 *Preparación de la membrana*

La purificación de la membrana se realizó mediante homogeneización Dounce de  $50 \times 10^6$  células en hipotónica, tampón libre de EDTA que contenía inhibidor de proteasa PMSF seguido de la centrifugación secuencial a 1.000 g durante 5 min y a 100.000 g, a 4°C, durante 60 min. El pellet que contenía las membranas se resuspendió en 2 ml de NaCl 0,3M en 50 mM de tampón Tris, 0,5% NP40, pH 7,6.

### *Análisis de Western blot*

Tras el bloqueo en leche desnatada (0,1%) y la incubación con el anticuerpo monoclonal dirigido contra la granzima B 2C5 (IgG2a, Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania), a 4°C, durante 5 h, los Western blots se lavaron y se incubaron con un anti-IgG HRP Ab secundario (Dianova, Hamburgo, Alemania), durante 1 h. Las proteínas se detectaron utilizando el equipo ECL (Amersham Bioscience) durante 5 segundos.

### *Identificación de proteínas por huella peptídica*

La banda de proteína precipitada de 32 kDa de Hsp70 y Hsp70-péptido TKD se cortó de los geles teñidos con Azul de Coomassie, se digirió con tripsina y desnaturalizó utilizando la fase reversa (*ZIP-Tip*) (Millipore, Eschborn, Alemania). Las muestras se incorporaron en ácido 4-hidroxi- $\alpha$ -ciano-cinámico y se determinaron las masas de los péptidos con un Perseptive Voyager DePro MALDI-TOF (Matriz Asistida por láser de Desorción/Ionización - Detector de iones) espectrómetro de masas en el modo reflexivo. Se elaboró una lista de picos con el software de m/z (Proteometrics) y se utilizó para la selección de los picos; la huella peptídica de masa resultante se utilizó para buscar en la base de datos de proteína NCBI no redundantes utilizando el equipo de búsqueda en profundidad (Proteometrics). La granzima B se identificó con el 100% de probabilidad y confianza > 95%.

### 30 *Citometría de flujo*

Las células ( $0,5 \times 10^6$ ) se fijaron en paraformaldehído (1% PFA en PBS) durante 10 min, y se permeabilizaron en PBS con BSA (0,5%),  $\text{NaN}_3$  (0,1%) y saponinos (0,1%). Luego, se incubaron las células permeabilizadas, ya sea con el anticuerpo monoclonal conjugado de la granzima B-ficoeritrina HC2-PE (IgG1; Holzes Diagnostika, Colonia, Alemania), con un anticuerpo de control IgG1 en concordancia con un isotipo, a 4°C durante 1 h, en la oscuridad. Las células una vez lavadas se analizaron en un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania).

### *Tratamiento*

Las soluciones madre de camptotecina (4 mg/ml, Sigma, Munich, Alemania) se diluyeron en DMSO y se almacenaron a 4°C en la oscuridad. Se prepararon soluciones de granzima B directamente (6 ng/ml, Hölzel, Colonia, Alemania) antes de su uso. Se incubaron las células en crecimiento exponencial ( $0,5-1,5 \times 10^6$ /ml), ya sea con camptotecina a una concentración final de 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  o con granzima B activa purificada enzimáticamente (10 ng/ml, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Shi *et. al.* (2000) *Métodos de Enzimología* 322, 125) durante 10 min y 30 min, ya sea a 4°C o a 37°C. Después de lavar en un medio RPMI-1640 se determinó la fijación y captación en las células tumorales permeabilizadas y no permeabilizadas mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia en un microscopio Axioscop 25 (Zeiss, Jena, Alemania) equipado con un objetivo de 40x y filtros estándares. Las imágenes fueron tratadas por el sombreado de corrección multiplicativa utilizando el software Axiovision (Vison Zeiss, Jena, Alemania). La granzima B se visualizó en rojo utilizando el anticuerpo HC2-PE. La muerte por apoptosis celular se determinó después de la incubación de las células tumorales con 6 ng/ml de granzima B durante 4 h, 12 h y 24 h a 37°C y lavado en medio RPMI-1640 a partir de diferentes ensayos de apoptosis, tal y como se describe a continuación.

### *Ensayos de apoptosis*

Tinción con annexin V-FITC: Brevemente, las células se lavaron dos veces en tampón Hepes que contenía 5 mM de  $\text{CaCl}_2$  y se incubaron con anexina V-FITC (Roche) durante 10 min a temperatura ambiente. Las células teñidas positivamente con Annexin V-FITC se midieron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). Tinción DAPI: Se incubaron las células fijadas en metanol/acetona ( $0,1 \times 10^6$  células/100  $\mu\text{l}$ ) con 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) en PBS/glicerol (3:1), durante 15 minutos en la oscuridad. Después del lavado en PBS, las células se montaron en un medio de montaje fluorescente (Dako, Glostrup, Dinamarca) y, a continuación, se analizaron por fluorescencia utilizando un microscopio de exploración Axioscop 2 modelo Zeiss (Zeiss Jena, Alemania) equipado con un objetivo de 40x y filtros estándares. La apoptosis se visualizó con tinción DAPI de 50 túneles, cada uno. Las imágenes fueron tratadas por el sombreado de corrección multiplicativos utilizando el software AxioVision (Zeiss Vision Jena, Alemania).

Liberación de citocromo c: La liberación del citocromo c se determinó utilizando un inmunoensayo cuantitativo (DCDCO, R&D Systems, Wiesbaden, Alemania). En pocas palabras, se lavaron las células ( $1,5 \times 10^6$ /ml) CX+ y CX- tratadas con granzima B (6 ng/ml) o camptotecina (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) sin tratar, en PBS y se trataron con solución tampón de

## ES 2 340 270 T3

lisis durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras centrifugación a 1.000 g durante 15 min se retiraron los sobrenadantes y se utilizaron 200  $\mu$ l de una dilución al 1:100, 1:250 y 1:500 para un ensayo ELISA. Después de la incubación en una solución de sustrato en la oscuridad durante 3 0 minutos se detuvo la reacción. La densidad óptica de cada pocillo se determinó en un lector ELISA a 450 nm. La cantidad de citocromo c se determinó de acuerdo con una curva de calibración.

### *Granzima B ELISPOT*

La liberación de granzima B se comparó en células NK (NK d0) no estimuladas y en células NK estimuladas por TKD (NK d3) después de un período de co-incubación de 4 h con líneas de células tumorales CX+/CX- y Colo+/Colo-, a diferentes proporciones de efector/células diana (E:D) en el intervalo de 20:1 a 2:1. Se utilizó el kit ELISPOT (# 552572, BD, Heidelberg, Alemania) para la detección de la granzima B. En pocas palabras, se recubrieron placas de ELISPOT de 96-pocillos (MAIPN45, Millipore) durante toda la noche 4°C con anticuerpos de captura, bloqueadas con medio de cultivo RPMI-1640 que contenía 10% FCS y se incubaron con células tumorales y efectoras durante 4 horas a 37°C, tal como se ha especificado anteriormente. Después de lavar en agua desionizada y tampones de lavado A y B, se añadió anticuerpo de granzima B \*anti biotinilado (2  $\mu$ g/ml) durante 2 h. Después de otros dos etapas de lavado la granzima B se visualizó por adición de la recién preparada avidina-peroxidasa de rábano (2 h) y la solución de sustrato (período de incubación 25 min). Las manchas se contaron automáticamente utilizando un analizador de ImmunoSpot Serie I.

### *Ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr y ensayo de inhibición*

Se midió la citotoxicidad mediada por células NK utilizando un ensayo de radioisótopos <sup>51</sup>Cr de 12 h. Como las células diana, se utilizaron las sublíneas de carcinoma de colon CX+ y CX-. Para los estudios de bloqueación se utilizó el anticuerpo monoclonal C92F3B1 y un anticuerpo de control emparejado con isotipo (IgG1) a una concentración final de 5  $\mu$ g/1 x 10<sup>6</sup> células. Después de la incubación de células diana CX+ y CX- con los anticuerpos durante 30 min a 4°C, las células se marcaron con <sup>51</sup>Cr y se realizó el ensayo de citotoxicidad según lo descrito por MacDonald *et. al.* (1974) *J. Exp. Med.* 140,718). El porcentaje de lisis específico se calculó como:

$$[(\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})] \times 100.$$

### Ejemplo 2

#### *Interacción de la granzima B en la proteína de choque térmico de larga duración 70 (Hsp70) y en Hsp70-péptido TKD*

Las proteínas se identificaron mediante cromatografía de afinidad en la proteína Hsp70 humana inmovilizada (1 mg) o un péptido de 14 aminoácidos, se marcó TKD (TKDNNLLGRFELSG, aa<sub>450-463</sub>, 2 mg), que contenía el epítipo extracelular de la Hsp70 que se encontró mediaba la interacción con las células NK. Este péptido se identificó previamente como el epítipo (Reineke *et. al.* (1996) *Immunobiol.* 196, 96) de un anticuerpo específico contra Hsp70 (Welch y Suhan (1986) *J. Cell. Biol.* 103,2035), que detecta específicamente la Hsp70 unida a la membrana en las células tumorales viables (Multhoff *et. al.* (1995) *Int. J. Cáncer* de 61.272; Multhoff *et. al.* (1995) *Sangre* 86,1374). Un lisado de células NK de la línea celular YT (Drexler *et. al.* (2000) *Leucemia* 14.777) se fraccionó en columnas de péptido TKD o Hsp70 inmovilizadas. El material unido a las columnas se eluyó con cloruro sódico 3M en cinco fracciones. Como controles, se administraron lisados de células YT a portadores o columnas BSA-conjugado. Por otra parte, fue fraccionado un lisado de una línea de células no-NK (K562) en columnas de afinidad TKD-conjugado. Las fracciones eluidas se separaron por SDS-PAGE (10%) y se visualizaron por tinción de plata. Una banda de proteína dominante de peso molecular aparente de 32 kDa se observó en las fracciones dos (F2) y tres (F3) de los eluidos de células YT derivados de la columna de proteína Hsp70 (Hsp70) y Hsp70-péptido (TKD) (Figura 1A, YT). Esta banda no se observó en columnas de eluidos de sefaroza no conjugada (datos no mostrados) o columnas BSA-conjugado ni en el material eluido de las columnas de afinidad TKD cargadas con lisados de células K562 (Figura 1A). Idénticos resultados se obtuvieron con columnas de la proteína Hsp70 (datos no mostrados). Paralelamente, se separaron los eluidos de Hsp70-péptido TKD y proteína Hsp70 derivados de la fracción 3 (F3) por SDS-PAGE y se tiñeron con Azul de Coomassie. Se cortó la banda de proteína de 32 kDa derivada de F3 de la columna Hsp70-péptido y se digirió la tripsina (Figura 1B). Los péptidos resultantes se analizaron por huella péptídica de masas MALDI-TOF. La secuencia de péptidos tripticos mostraron 100% de homología con la granzima B con un valor-Z estimado de 1,89 lo que indicaba una probabilidad superior al 95% para la granzima B (Figura 1B). La identidad de la banda de proteína de 32 kDa como granzima B se confirmó mediante el análisis Western blot utilizando el anticuerpo 2C5 específico para la granzima B (IgG2a): los eluidos de células YT obtenidos a partir de las columnas de proteína Hsp70 (Hsp70) y Hsp70-péptido (TKD), ambas revelaron una banda de proteína de granzima B dominante de 32 kDa (Figura 1C). No se detectó la granzima B en la fracción eluida de las columnas de Hsp70 o de afinidad TKD cargadas con lisados de células K562 (Figura 1C). La citometría de flujo utilizando un anticuerpo de granzima B conjugada-ficoeritrina (PE) (IgG1) de nuevo la granzima B mostró tinción positiva para la granzima B citoplasmática de las células YT, pero no para las células K562 (Figura 1D). Estas observaciones corroboran los resultados anteriores. En resumen, estos datos indican que la granzima B es una proteína potencial de la Hsp70. La granzima B es probable que interactúe con la región C-terminal de la Hsp70 denominada TKD.

## Ejemplo 3

*Unión específica e internalización de la granzima B en células tumorales positivas a la membrana de Hsp70*

5 Los resultados anteriores plantean la pregunta de si la Hsp70 unida a membrana podría permitir la unión específica y la entrada de granzima B en el citosol. Por lo tanto, la granzima B purificada libre de perforina se co-incubó con sublíneas de células tumorales CX+/CX- y Colo+/Colo- que muestran expresión en la membrana Hsp70 diferencial. Se muestra un análisis de microscopía de luz de células CX+ y Colo+ sin tratar (control) a 4°C respecto a 37°C en la fila superior de cada panel (Figura 2A). El microscopio de inmunofluorescencia correspondiente de las células a 10 4°C y a 37°C se ilustra a continuación (Control). Inicialmente, ninguna de las células mostró tinción de la granzima B, ni en la superficie celular, ni en el citoplasma. Sin embargo, después de un período de incubación de 15 min de las células con granzima B purificada (grB) a 4°C, una fluorescencia en forma de anillo, que indica una coloración típica de la superficie de la célula se detectó en las sublíneas tumorales CX+ y Colo+ positivas a la membrana Hsp70 (Figura 2A, izquierda). Un cambio de temperatura de 4°C a 37°C durante el período de incubación de 30 minutos dió 15 como resultado la captación de granzima B, tal y como se determinó por un patrón de tinción citoplasmático en las sublíneas tumorales CX+ y Colo+ (Figura 2A, el panel de la derecha). Por el contrario, los homólogos CX- y Colón- negativos a la membrana Hsp70, no mostraron unión en la superficie celular de la granzima B a 4°C, ni en la captación a 37°C (datos no mostrados). El análisis de citometría de flujo de células permeabilizadas reveló un cambio leve del pico de la granzima B a la derecha de forma selectiva a CX+ y Colo+ positiva a la membrana Hsp70, pero no en las sublíneas tumorales CX- y Colo-, si las células fueron co- incubadas con 1 µg/ml de granzima B durante 30 min a 20 37°C (Figura 2B, gráfico superior). Se detectó un aumento de la dosis-dependiente en la captación de granzima B, en la membrana de las células tumorales positivas-Hsp70 (CX+/Colo+) después de co-incubación con 2 µg/ml y 4 µg/ml de granzima B (Figura 2B, bajar el gráfico). Sin embargo, incluso a la concentración más elevada de 4 µg/ml, la granzima B se internalizó mucho más fuerte por la membrana de las células tumorales positivas-Hsp70 en comparación con la de las células tumorales negativas-Hsp70 (CX-/Colo-). Los canales de iones potenciales formados por Hsp70 pueden desempeñar un papel en el mecanismo de captación selectiva de la granzima B en las células tumorales positivas a la membrana de Hsp70. De hecho, se observó una ruta de conductancia del ion particular después de la incorporación de las vesículas derivadas de fosfolípidos purificados de las sublíneas tumorales positivas a la membrana de Hsp70 (CX+). Esto no se vió en las vesículas obtenidas a partir de las células tumorales negativas a la membrana de Hsp70 (CX-) (datos no mostrados). En base a estos resultados se podría especular acerca de una actividad del canal iónico que 30 facilita la captación de la granzima B, de forma selectiva en las células tumorales positivas a la membrana de Hsp70.

## Ejemplo 4

35 *In vitro* tal que la granzima B induce apoptosis selectivamente en las células tumorales positivas a la membrana de Hsp70

40 Los resultados anteriores plantean la pregunta de si la granzima B purificada puede inducir la apoptosis de las células tumorales que presentan Hsp70 en su superficie celular. Las células de carcinoma de colon positivas (CX+/Colo+) y negativas (CX-/Colo-) en la membrana Hsp70 que muestran idéntica expresión MHC clase I (Multhoff *et al.* (1997) *J. Immunol.* 158,4341) se incubaron durante 4 h, 12 h y 24 h con granzima B activa aislada enzimáticamente (6 ng/ml) (Shi *et al.* (2000) *Métodos de Enzimología* 322.125). Como control positivo para la apoptosis todos los tipos de células se incubaron con camptotecina inhibidor de la topoisomerasa a una concentración de 4 µg/ml. La apoptosis se 45 determinó mediante tinción Annexin V-FITC medida por FACS(FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania), tinción DAPI y liberación de citocromo c mitocondrial. La apoptosis no se detectó en las células CX+ y CX- incubadas con camptotecina (CAM) o granzima B (grB) durante 4 h de incubación (Figura 3A). Las células CX+ y Colo+, así como CX- y Colo- incubadas con camptotecina experimentaron la apoptosis después de un período de 12 h y 24 h de incubación con la camptotecina. Al parecer, las sublíneas de carcinoma de colon CX+/CX- están mejor protegidas hacia una muerte celular mediada por camptotecina en comparación con las sublíneas de carcinoma de 50 páncreas Colo+/Colo-.

Como se muestra en la Figura 3A, después de 12 h la cantidad de células CX+ positivamente teñidas con anexina V-FITC aumentó de 16,6% a 28,0% (1,7 veces) y después de 24 h de 18% a 39% (2,1 veces). En las células CX- la cantidad de células positivamente teñidas con anexina V-FITC aumentó de forma similar a partir de 12,1% a 19,8% 55 (1,6 veces) después de 12 h, y de 11,9% a 25,1% (2,1 veces) a las 24 h. Por el contrario, la apoptosis se observó de manera selectiva en células CX+ positivas en la membrana Hsp70 incubadas con granzima B durante 12 h y 24 h, con un aumento del 16,6% al 20,9% (1,3 veces) y del 18% al 30,2% (1,8 veces), respectivamente. Del mismo modo, se observó un aumento de 1,3 veces y de 2,4 veces en la cantidad de células Colo+ teñidas positivamente con anexina V-FITC después de 12 h y 24 h, respectivamente. En las células CX- y Colo- ni a las 12 h ni a las 24 h 60 de tratamiento con granzima B se induce apoptosis. En la Figura 3B se ilustra un patrón comparativo de tinción con Annexin V-FITC de células CX+ y CX- tratadas con granzima B durante 24 h. En comparación con las células control sin tratamiento (18%), la cantidad de células CX+ teñidas negativamente con yoduro de propidio (PI) y positivamente con anexina V-FITC aumentó 1,7 veces (30%) después del tratamiento con granzima B. Sin embargo, la cantidad de células apoptóticas CX- permaneció inalterada antes y después del tratamiento idéntico con la granzima B. Además de las células CX+, la granzima B induce apoptosis también en la línea celular leucémica K562 positiva en la membrana de Hsp70 (datos no mostrados). La cantidad de células K562 teñidas positivamente con anexina V-FITC pasó de 8,7% a 16% (1,8 veces).

## ES 2 340 270 T3

Con el fin de excluir la apoptosis iniciada por anoikes (matriz celular) se llevó a cabo un análisis de microscopía de luz de las células tumorales CX-/Colo- y CX+/Colo+ no tratadas (control), con camptotecina (CAM) y granzima B (gbB). Como se muestra en la Figura 3C, 24 h después del tratamiento con granzima B, ni las líneas de células tumorales negativas ni positivas a la membrana de Hsp70 presentaba ningún signo de pérdida de adherencia plástica. En cuanto a estos resultados se descarta la posibilidad de que anoikes podría ser un posible mecanismo para la inducción de la muerte celular apoptótica en las sublíneas tumorales positivas a la membrana Hsp70. Es importante señalar que todos los ensayos de apoptosis se determinaron en la población de células adherentes después de una tripsinización de corto tiempo (<1 min).

De acuerdo con los resultados de patrón de tinción con anexina V-FITC, todos los tipos celulares, CX+/CX-, Colo+/Colo- mostraron fragmentación del núcleo, un signo típico de apoptosis en una fase posterior, según lo detectado por tinción con DAPI del ADN nuclear después del tratamiento con camptotecina (4 µg/ml) durante 24 h (Figura 3D, cam). Sin embargo, la fragmentación del ADN sólo se detectó en las células tumorales CX+ y Colo+ positivas a la membrana de Hsp70 después de 24 h de tratamiento con granzima B (6 ng/ml), mientras que no se observó fragmentación del ADN en las células CX- y Colo- negativas a la membrana de Hsp70 (Figura 3D, grB).

Como ensayo adicional de la muerte celular por apoptosis, se midió la liberación de citocromo c después de la incubación de células CX+ y CX- con granzima B durante 24 h. Como se resume en la tabla I, después de la incubación con granzima B (6 ng/ml) durante 24 h, la concentración de citocromo c se elevó de 0,382 mg/ml a 0,690 mg/ml (1,8 veces) en las células CX+. Sin embargo, no se observó aumento de citocromo c en las células CX- después del tratamiento con granzima B (0,452 mg/ml en comparación con 0,425 mg/ml). Por el contrario, una incubación con camptotecina (4 µg/ml) durante 24 h, dió como resultado un aumento comparable de 1,5 veces en las concentraciones de citocromo c en ambos tipos celulares. Estos resultados indican que la granzima B aislada induce la muerte celular por apoptosis selectivamente en las células tumorales que presentan Hsp70 en su superficie celular. Se propone que el desencadenante de la apoptosis por granzima B está mediada a través del epítipo TKD extracelular expuesto a Hsp70.

TABLA I

*Determinación de células tumorales CX+ y CX- en citocromo c humano sin tratar (control), o después de la incubación con camptotecina (4 µg/ml) o con granzima B (6 ng/ml) durante 24 h. Los datos representan la media de 4 experimentos independientes SE; la marca\* indica valores significativamente diferentes del control (p <0,05)*

|                |                | Citocromo c (mg/ml) |                   |  |
|----------------|----------------|---------------------|-------------------|--|
| <b>células</b> |                | Veces aumento       |                   |  |
|                | <u>control</u> | <u>camptotecina</u> | <u>granzima B</u> |  |
| CX+            | 0,382±0,02     | 0,555±0,04*         | 0,690±0,08*       |  |
|                | <b>1,0</b>     | <b>1,5</b>          | <b>1,8</b>        |  |
| CX-            | 0,452±0,02     | 0,672±0,02*         | 0,425±0,075       |  |
|                | <b>1,0</b>     | <b>1,5</b>          | <b>0,9</b>        |  |

### Ejemplo 5

*La estimulación de células NK con Hsp70-péptido TKD induce la producción de granzima B y aumenta la muerte de las células diana tumorales positivas a la membrana de Hsp70*

El papel fisiológico de los resultados fue probado en ensayos funcionales utilizando células NK humanas estimuladas por Hsp70 y nativas. Previamente, se demostró que la incubación de las células NK con proteína Hsp70 a concentraciones de 10 a 50 µg/ml o a concentraciones de equivalentes de Hsp70-péptido (0,2-2,0 µg/ml) dió como resultado un aumento de la actividad citolítica de las células NK contra las células tumorales diana positivas a la membrana de Hsp70. Al mismo tiempo, se reguló la expresión de la activación del receptor CD94 tipo C activador de células NK (Multhoff *et. al.* (1999) Exp. Hematología 27,1627; Bruto *et. al.* (2002) suministrado). Aunque la Hsp70 actúa como una estructura de reconocimiento selectivo del tumor para las células NK, según lo determinado por los estudios de bloqueo de anticuerpo (Multhoff *et. al.* (1997) J. Immunol. 158,4341; Multhoff *et. al.* (1995) Sangre 86,1374), el mecanismo citotóxico mediado por NK sigue sin estar claro. Para dilucidar el posible mecanismo, las células NK se incubaron con Hsp70-péptido TKD (2 µg/ml) durante 3 días. Se observó una expresión de la granzima B intracelular significativamente superior, según lo determinado en 3 experimentos independientes. Por el contrario, la expresión

## ES 2 340 270 T3

de la granzima B no fue mayor en células T positivas a CD3 tratadas con Hsp70-péptido TKD. En la Figura 4A se ilustran los análisis de microscopía de luz de células NK activadas con Hsp70-péptido co-incubadas con células CX-negativas a la membrana de Hsp70 y + CX+ positivas a la membrana Hsp70. Las células tumorales CX- negativas a la membrana de Hsp70 y CX+ positivas a la membrana de Hsp70 ( $0,1 \times 10^6$  células/ml) fueron cultivadas por duplicado en 24 placas de pocillos durante 2 días. La tasa de proliferación de células de ambas líneas tumorales fue comparable, según lo determinado por el recuento de células idénticas ( $0,3 \times 10^6$  células/ml). Las células tumorales CX+ y CX- en el panel superior se cultivaron en la ausencia de células NK; las células tumorales en el panel inferior se co-cultivaron durante 12 h con las células NK que se habían estimulado con Hsp70-péptido TKD ( $2 \mu\text{g/ml}$ , 3 días). Casi el 100% de las colonias de células CX+ se encontró en clústers con las células NK y pareció reducirse la viabilidad de las células tumorales CX+. En contraste, las células tumorales CX- y las células NK no se encontraron en los clústers; las células tumorales CX- negativas a la membrana de Hsp70 no atrajeron las células NK. La viabilidad celular de las células tumorales CX- tras el contacto con las células NK parece estar menos afectada en comparación con el de la de las células tumorales CX+. Los insertos en la esquina inferior derecha de cada gráfico ilustra un aumento de 2,5x veces de una colonia de células representativas.

La muerte celular de células tumorales, recién aisladas, CX+/CX- y Colo+/Colo- tras el contacto con las células NK (NK d3) estimuladas con Hsp70-péptido TKD o sin estimular (NK d0) se cuantificó en un ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  de 12 h (Figura 4B). En consonancia con lo observado en microscopía de luz (Figura 4A), la actividad citolítica de células NK estimuladas con TKD (NK d3) frente a células diana CX+ (izquierda) fue significativamente mayor en comparación con las células diana CX- (derecha). Junto con el aumento de niveles de granzima B tras la estimulación con Hsp70-péptido TKD durante 3 días, la respuesta citolítica contra las células CX+ y Colo+ positivas a la membrana de Hsp70, pero no contra las células CX- y Colo- negativas a la membrana de Hsp70 fue significativamente elevada, 1,5 veces (CX+) y 2,0 veces (Colo+) a relaciones E:D de 2:1 a 20:1. Puesto que las células tumorales CX+ CX- sólo difieren en cuanto a su expresión en la membrana Hsp70, pero muestran idéntico patrón de expresión MHC clase I, el efecto inhibitorio mediado por los receptores inhibidores de células asesinas (KIR) podría excluirse. El aumento de la actividad citolítica contra las células tumorales CX+ positivas a la membrana de Hsp70 (izquierda), pero no contra las células tumorales CX-negativas a la membrana de Hsp70 (derecha) puede ser completamente inhibido por la preincubación de las células diana con el anticuerpo monoclonal específico de Hsp70 del que se conoce detecta Hsp70-péptido TKD unido a la membrana en las células tumorales viables (Multhoff *et al.* (1995) *Int. J. Cáncer* de 61.272).

Por el contrario, la lisis de las células tumorales negativas a la membrana de Hsp70 no se vio afectada después de la incubación con el anticuerpo Hsp70. Técnicamente, no es posible cuantificar la cantidad absoluta de granzima B que se transfiere de las células NK a las células tumorales por contacto célula a célula. Sin embargo, los valores relativos de liberación de granzima B pueden determinarse por el análisis ELISPOT. Por lo tanto, una comparación de la respuesta citolítica de las recién aisladas, células NK (NK d3) estimuladas con TKD y sin estimular (NK d0) contra las células tumorales CX+/CX- y Colo+/Colo- se realizó concomitantemente con la definición de la liberación de granzima B. Independientemente de la línea celular tumoral y de la relación de E:células diana (D), la co-incubación de células tumorales con células NK sin estimular (NK d0), siempre conlleva una baja liberación de granzima B; el número de manchas fue siempre inferior a 20. Después de un período de estimulación de 3 días con TKD (NK d3) seguido de un tiempo de 4 h de coincubación con células tumorales, se reguló significativamente la liberación de granzima B. A una relación de E:D de 5:1, el número de manchas de granzima B, según lo determinado en tres experimentos independientes, fue como sigue: CX+  $260 \pm 20$ , CX-  $165 \pm 6$ ; Colo+  $137 \pm 55$ ; Colo-  $66 \pm 8$ . Al mismo tiempo, las células diana tumorales (CX+/Colo+) positivas a la membrana de Hsp70 se sometieron a lisis significativamente mejor en comparación con sus homólogas negativas (CX-/Colo-). Estos datos sugieren fuertemente que la lisis de las células tumorales positivas a la membrana de Hsp70 por células NK activadas por TKD está asociada con la liberación de granzima B.

Se planteó la hipótesis de que la interacción de granzima B con el péptido TKD enlazado a la membrana Hsp70 es clave para su captación en las células tumorales y para la inducción de apoptosis. Cuando las células NK se eliminan mediante lavado con PBS y las células tumorales se tiñen con DAPI. Las células CX+ positivas a la membrana Hsp70 mostraron una fragmentación del ADN, mientras que las células CX- negativas a la membrana Hsp70 no siguieron la co-incubación con las células NK. Se obtuvieron idénticos resultados cuando se tiñó con Annexina V-FITC (datos no mostrados). Estas observaciones sugieren fuertemente que las células NK activadas con TKD matan las células CX+ positivas a la membrana de Hsp70 por inducción de apoptosis, que también tiene niveles elevados de granzima B.

### Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

### Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9949881 A [0005] [0017] [0024]
- WO 0180880 A [0005]

## Documentos de la patente no citados en la descripción

- **Nylandsted.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2000, vol. 926, 122 [0002]
- 5 • **Schild.** *Current Opinión in Immunology*, 1999, vol. 11, 109 [0002]
- **Arnold-Schild.** *J. Immunol.*, 1999, vol. 162, 3757 [0002]
- **Suto.** *Science*, 1995, vol. 269, 1585 [0002]
- 10 • **Basu.** *Immunity*, 2001, vol. 14, 303 [0002]
- **Binder.** *Nat. Immunol.*, 2000, vol. 1, 151 [0002]
- 15 • **Sondermann.** *Biol. Chem.*, 2000, vol. 381, 1165 [0002]
- **Ohashi.** *J. Immunol.*, 2000, vol. 164, 558 [0002]
- **Pfeiffer.** *Eur. J. Immunol.*, 2001, vol. 31, 3153 [0002]
- 20 • **Asea.** *Nature Medicine*, 2000, vol. 6, 435 [0002]
- **Asea.** *Cell Stress & Chaperones*, 2000, vol. 5, 425 [0002]
- 25 • **Asea.** *J Biol Chem.*, 2002, vol. 277 (17), 15028 [0002]
- **Botzler.** *Cell Stress & Chaperones*, 1998, vol. 3, 6 [0003]
- **Multhoff.** *Int. J. Cancer*, 1995, vol. 61, 272 [0003][0069] [0077]
- 30 • **Multhoff.** *J. Immunol.*, 1997, vol. 158, 4341 [0003][0071] [0076]
- **Multhoff.** *Int. J. Hyperthermia*, 1997, vol. 13, 39 [0003]
- 35 • **Botzler.** *Exp. Hematol.*, 1999, vol. 27, 470 [0003]
- **Rabinovich.** *J. Immunol.*, 2000, vol. 165, 2390 [0003]
- **Feng.** *Blood*, 2001, vol. 97, 3505 [0003]
- 40 • **Multhoff.** *Exp. Hematology*, 1999, vol. 27, 1627 [0003] [0076]
- **Multhoff.** *Cell Stress & Chaperones*, 2001, vol. 6,337 [0003]
- 45 • **Lanier.** *Immunity*, 1998, vol. 8, 693 [0003]
- **Braud.** *Nature*, 1998, vol. 391, 795 [0003]
- **Di Cesare et al.** *Immunology*, 1992, vol. 76, 341 [0004]
- 50 • **Chouchane et al.** *J. Infect. Dis.*, 1994, vol. 169, 253 [0004]
- **Berke.** *Cell*, 1995, vol. 81 (1), 9-12 [0009]
- 55 • **Froelich.** *Immunology Today*, 1998, vol. 19 (1),30-26 [0009]
- **Metkar S et al.** Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore information. *Immunity*, 2002, vol. 16, 417-428 [0009]
- 60 • **Milner et al.** *Immunogenetics*, 1990, vol. 32 (4), 242-251 [0018]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning, A Laboratory Manual. CSH Press*, 1989 [0019]
- **Tamura.** *Science*, 1997, vol. 278, 117-223 [0023]
- 65 • **Vujanovic.** *Cell. Immunol.*, 1993, vol. 151, 133 [0053]
- **Multhoff et al.** *J Immunol.*, 1997, vol. 158, 4341 [0054]

## ES 2 340 270 T3

• **Shi.** *Methods in Enzymology*, 2000, vol. 322, 125 [0064] [0071]

• **MacDonald.** *J. Exp. Med.*, 1974, vol. 140, 718 [0068]

5 • **Reineke.** *Immunobiol.*, 1996, vol. 196, 96 [0069]

• **Welch; Suhan.** *J. Cell. Biol.*, 1986, vol. 103, 2035 [0069]

10 • **Multhoff.** *Blood*, 1995, vol. 86, 1374 [0069] [0076]

• **Drexler.** *Leukemia*, 2000, vol. 14, 777 [0069]

15

20

25

30

35

40

45

50

55

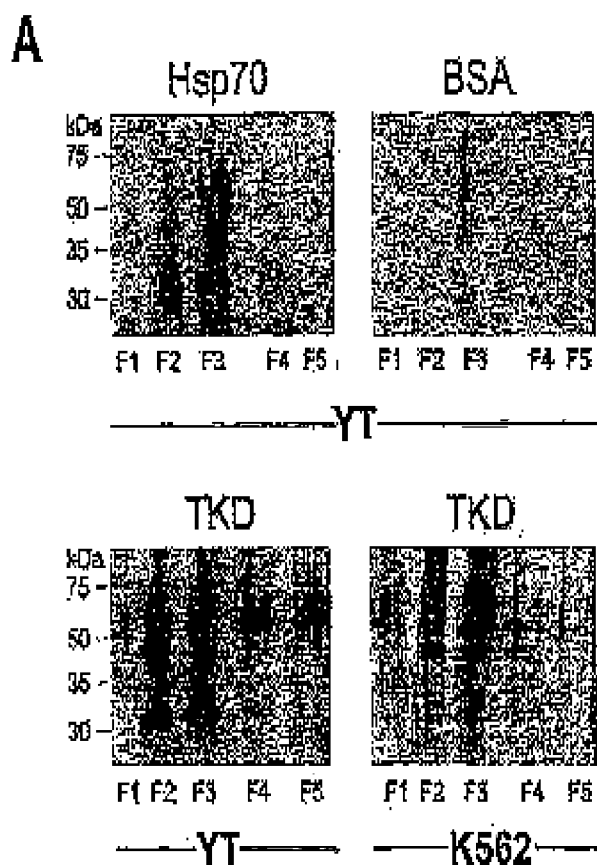
60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento *ex vivo* de inducción o mejora de la expresión de la granzima B en células natural killer (NK) que comprende poner en contacto células NK con
- (a) proteína Hsp70;
  - (b) un fragmento (C-terminal) de (a) que comprende la secuencia de aminoácidos TKDNNLLGRFELSG;
  - 10 (c) un (poli)péptido que comprende la secuencia de aminoácidos TKDNNLLGRFELSG; o
  - (d) una combinación de (a), (b) y/o (c).
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la proteína Hsp70, el fragmento (C-terminal) de la misma, el (poli)péptido que comprende la secuencia de aminoácidos TKDNNLLGRFELSG o una combinación de estos está en un estado no complejoado.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además proporcionar células NK con expresión de granzima B mejorada o inducida útil para la reinfusión en un mamífero.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, donde las células NK son células NK autólogas y/o alélicas.
5. Procedimiento según la reivindicación 3 ó 4, donde dicho mamífero es un humano.
- 25 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho contacto se realiza durante por lo menos 12 h.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, donde dicho contacto se realiza por lo menos durante 4 días.
- 30 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dichas células NK antes de ponerse en contacto con, se obtienen a partir de células de médula ósea mediante la incubación de dichas células de médula ósea con interleucina-15 (IL-15) y el factor de células madre (SCF) a concentraciones de 1 ng/ml - 1000 ng/ml por citoquina durante por lo menos 7 días y hasta 4 meses.
- 35 9. Granzima B para utilizar en el tratamiento *in vivo* de tumores independiente de la ruta perforina donde dichos tumores expresan Hsp70 en la superficie celular.
10. Granzima B según la reivindicación 9, que se utiliza como único compuesto farmacéuticamente aceptable.
- 40 11. Granzima B según la reivindicación 9 ó 10, que está diseñada para administrarse a una concentración final de 1  $\mu\text{g/ml}$  a 500  $\mu\text{g/ml}$ , preferiblemente de 1  $\mu\text{g/ml}$  a 10  $\text{ng/ml}$  y más preferiblemente a una concentración final de aproximadamente 6  $\text{ng/ml}$ .
- 45 12. Granzima B según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que se empaqueta en liposomas.
13. Granzima B según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, donde dichos tumores se seleccionan entre el grupo que consiste en estómago, gástrico, colorrectal, páncreas, mama, pulmón, ginecológico, cáncer de cabeza y cuello, dermatológico (por ejemplo, el melanoma), tumores neuronales, leucemia y linfoma.
- 50
- 55
- 60
- 65

# FIG 1



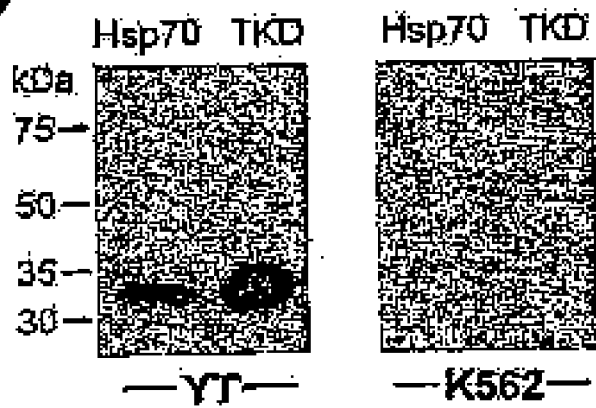
**B** Identific. Granzima B humana por análisis MALDI-TOF

| Tinte    | Mr obs. | Mr esp. | Pép. inic. | Pép. Final | Secuencia |
|----------|---------|---------|------------|------------|-----------|
| Comassie |         |         |            |            |           |

|     |          |          |     |     |             |
|-----|----------|----------|-----|-----|-------------|
| kDa |          |          |     |     |             |
| 75  | 877.384  | 877.386  | 146 | 151 | MTVQEDR     |
|     | 883.389  | 883.391  | 146 | 151 | MTVQEDR     |
| 50  | 1048.572 | 1048.568 | 192 | 201 | VAGIMSYGR   |
| 35  | 1055.549 | 1077.568 | 138 | 144 | HSHTLQIEVAV |
| 30  | 1288.702 | 1288.703 | 73  | 83  | RPIHPAYNPK  |
|     | 1442.722 | 1442.746 | 61  | 72  | EQEPTQDFPK  |

# FIG 1

## C



## D

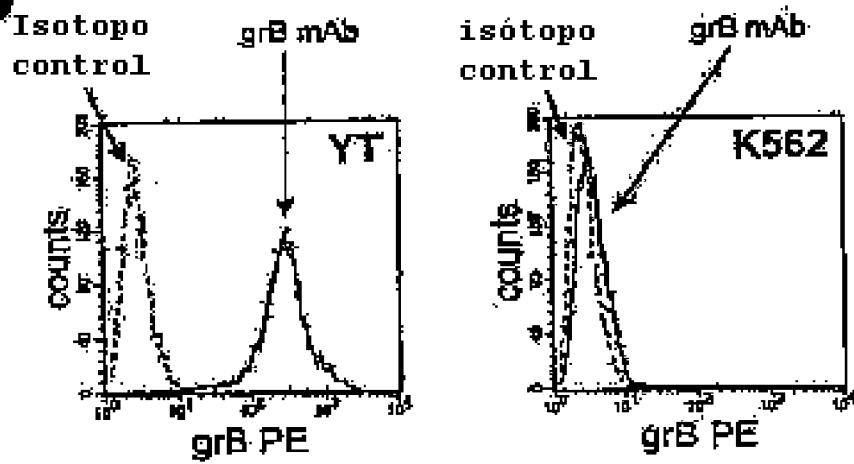


FIG 2

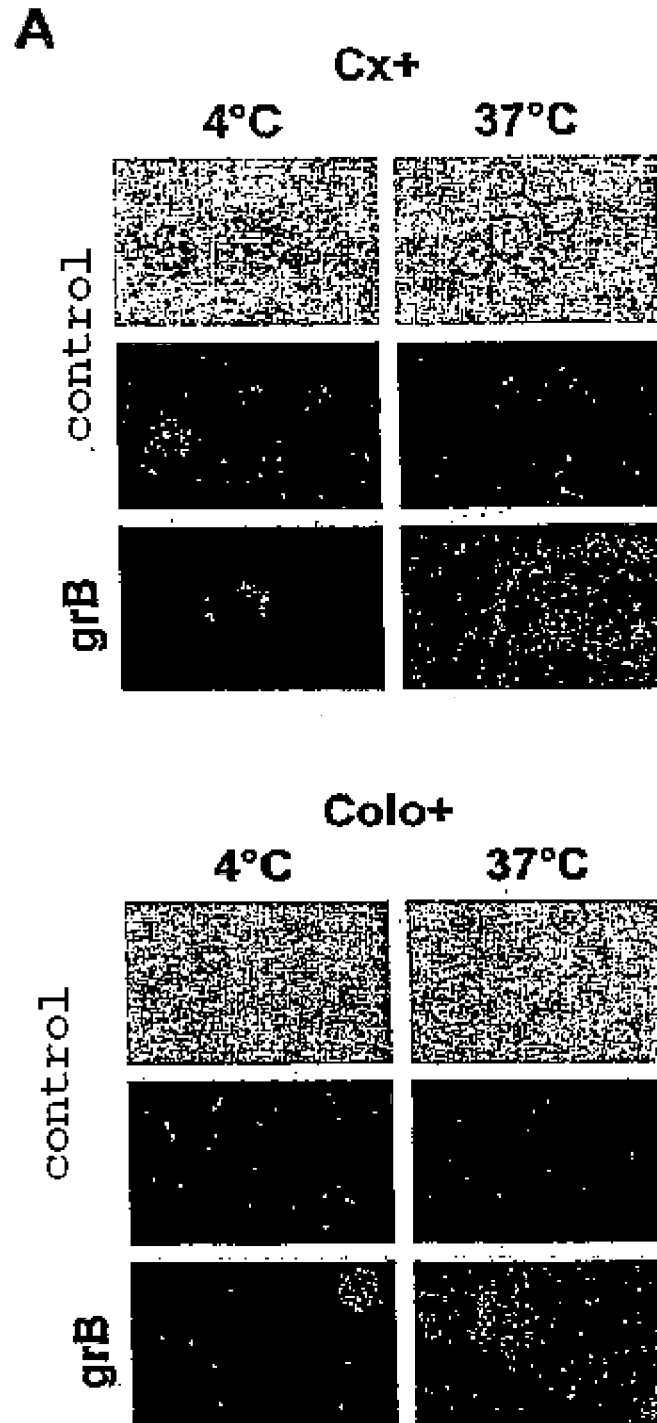


FIG 2

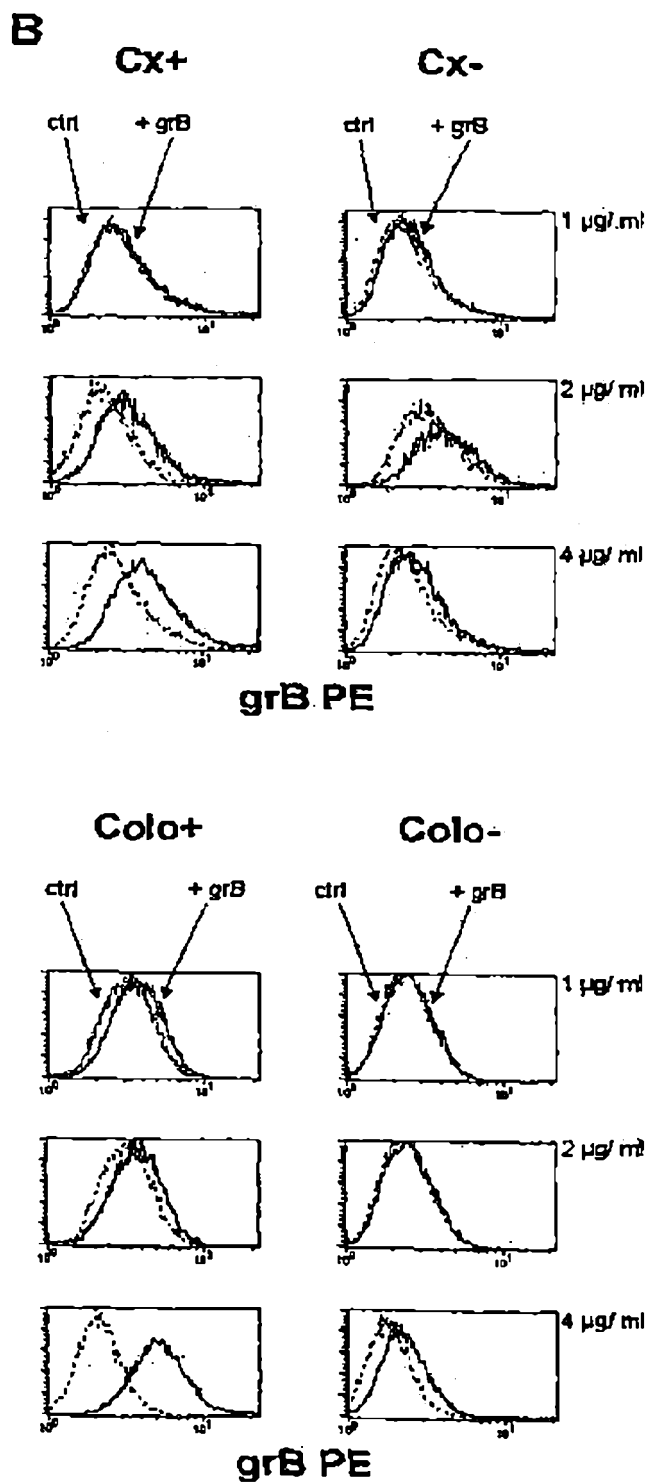


FIG 3

A

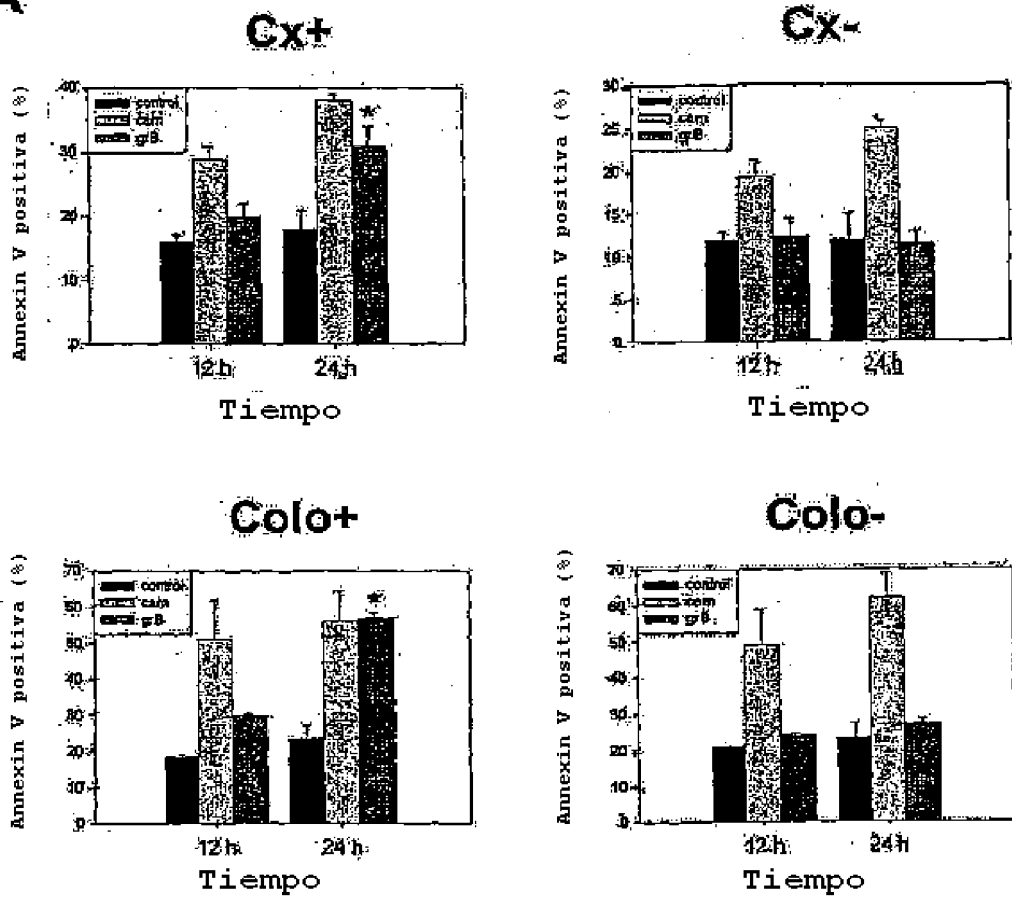


FIG 3B

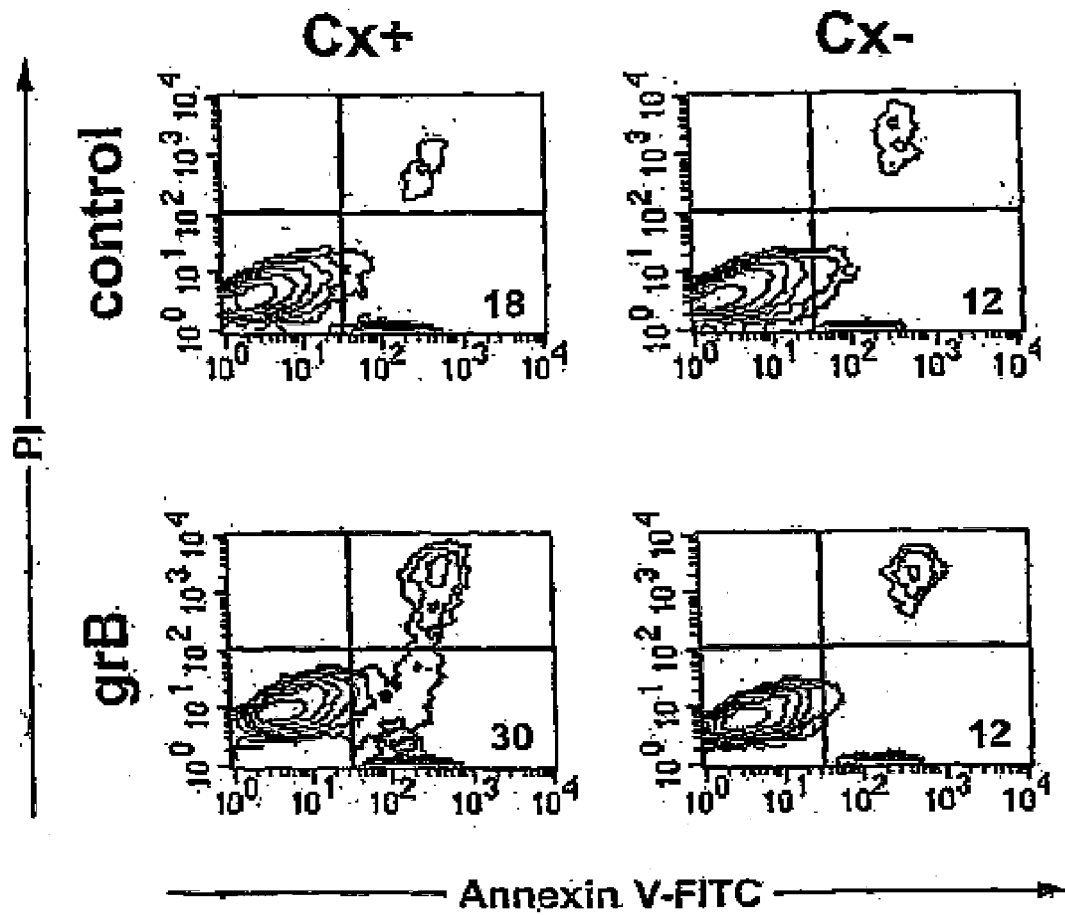


FIG 3

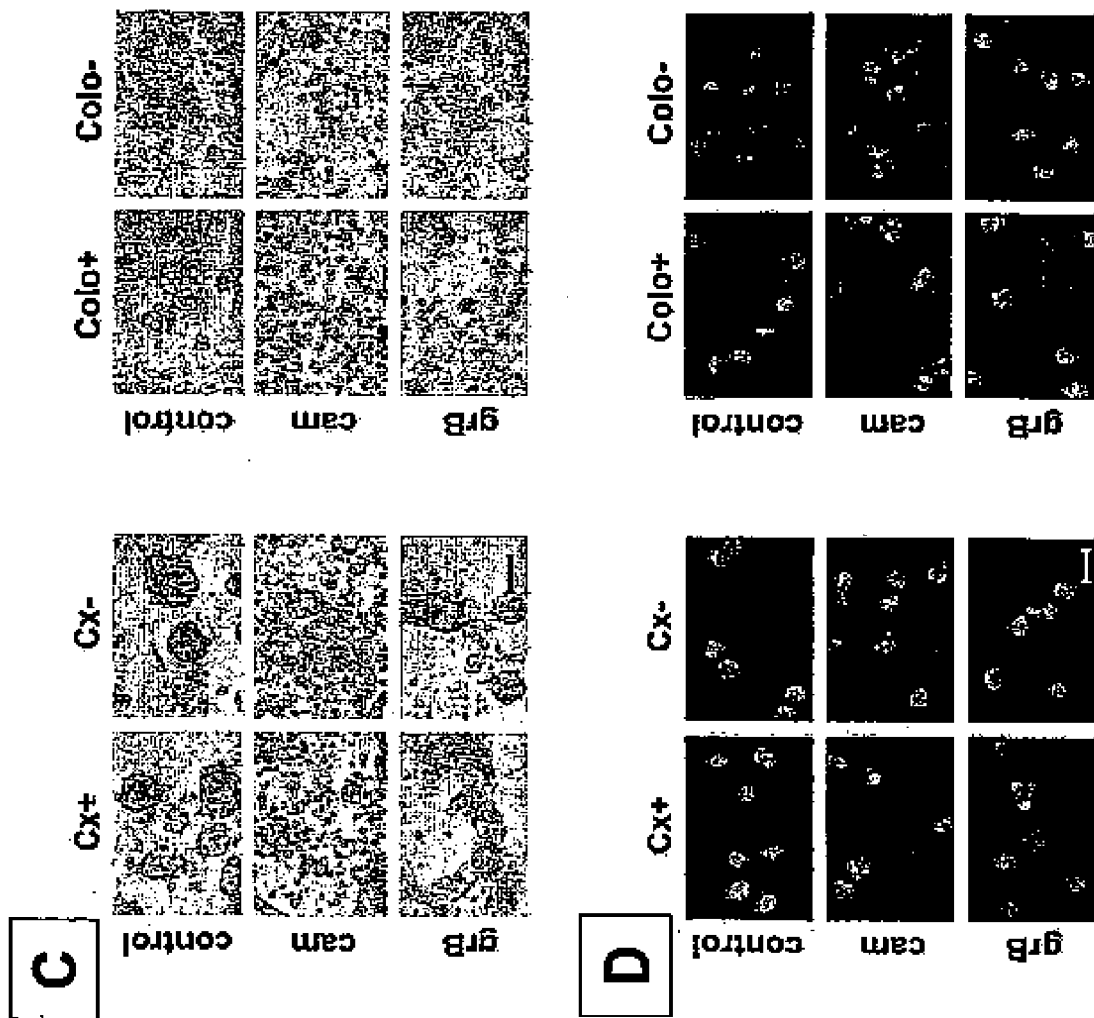


FIG 4A

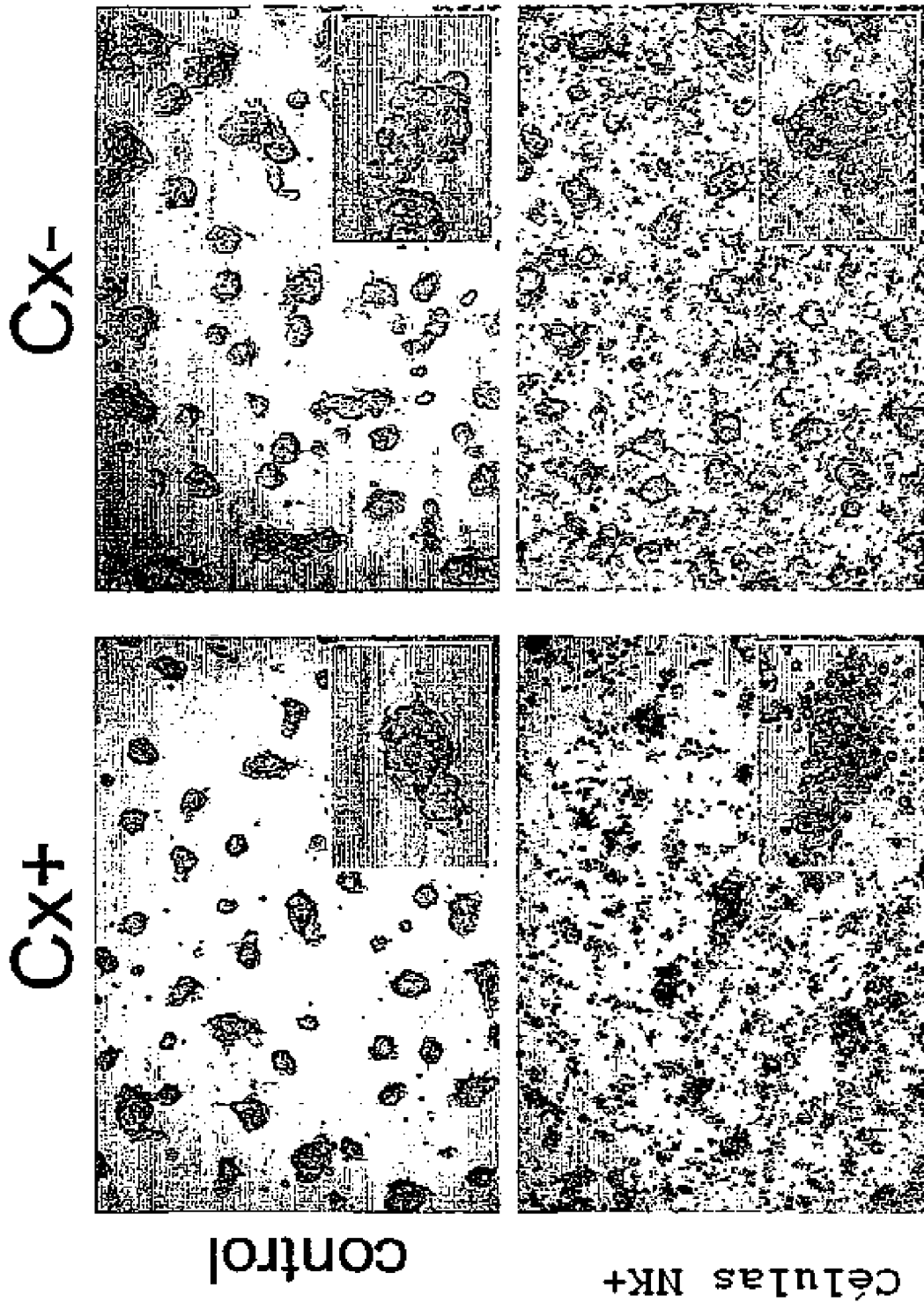


FIG 4B

