



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004108129/15, 20.08.2002

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.08.2002

(30) Конвенционный приоритет:
20.08.2001 US 60/313,629
06.12.2001 US 60/337,222

(43) Дата публикации заявки: 20.04.2005

(45) Опубликовано: 10.10.2008 Бюл. № 28

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 9710000 A1, 20.03.1997. WO 9950303
A1, 07.10.1999. US 5981706 A, 07.11.1999. US
6017540 A, 25.06.2000. US 5837251 A,
17.11.1998. US 6187312 B1, 13.02.2001. CHU CT
et al. «Receptor-mediated antigen delivery
into macrophages, Complexing antigen to alpha
2-macroglobulin enhances presentation to T
cells», J. Immunol. Jan 1; 150(1), p.48-58.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
22.03.2004

(86) Заявка РСТ:
US 02/26573 (20.08.2002)

(87) Публикация РСТ:
WO 03/015712 (27.02.2003)

Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):
СРИВАСТАВА Прамод К. (US)

(73) Патентообладатель(и):
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КОННЕКТИКУТ ХЕЛТ
СЕНТЕР (US)

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ, ВКЛЮЧАЮЩИХ ХИТШОКОВЫЕ БЕЛКИ ИЛИ
АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИН, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ И
ИНФЕКЦИОННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к способам и композициям для профилактики и лечения инфекционных заболеваний и злокачественных опухолей. Предложен способ получения комплексов, содержащих один или более хитшоковых белков, связанных в комплекс с антигенными пептидами, предусматривающий контактирование популяции антигенных пептидов с одним или более различных хитшоковых белков in

vitro в условиях, в которых указанные пептиды образуют комплекс с указанными хитшоковыми белками, где популяция антигенных пептидов содержит по меньшей мере 50 различных пептидов и получена способом, включающим расщепление белкового препарата одной или более протеиназами или расщепление белкового препарата при помощи одного или более неферментативных методов, где указанный белковый препарат происходит из антигенных

клеток или их клеточной фракции и включает по меньшей мере 50% различных белков или по меньшей мере 50 различных белков указанных антигенных клеток или клеточной фракции соответственно. Предложена композиция, содержащая иммуногенное количество комплексов, содержащих хитшоковые белки в комплексе с

антигенными пептидами. Предложен способ индуцирования иммунного ответа у субъекта против второй антигенной клетки. Предложен способ лечения или предупреждения злокачественной опухоли. Предложен способ лечения или предупреждения инфекционного заболевания. 5 н. и 60 з.п. ф-лы, 1 табл.

RU 2 3 3 5 2 9 5 C 2

RU 2 3 3 5 2 9 5 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004108129/15, 20.08.2002**(24) Effective date for property rights: **20.08.2002**

(30) Priority:
20.08.2001 US 60/313,629
06.12.2001 US 60/337,222

(43) Application published: **20.04.2005**(45) Date of publication: **10.10.2008 Bull. 28**(85) Commencement of national phase: **22.03.2004**

(86) PCT application:
US 02/26573 (20.08.2002)

(87) PCT publication:
WO 03/015712 (27.02.2003)

Mail address:
129010, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517

(72) Inventor(s):
SRIVASTAVA Pramod K. (US)

(73) Proprietor(s):
JuNIVERSITI OF KONNEKTIKUT KhELT SENTER
(US)

(54) **METHOD OF OBTAINING COMPOSITIONS INCLUDING HEAT SHOCK PROTEINS OR ALPHA-2-MACROGLOBULIN, SUITABLE FOR TREATMENT OF MALIGNANT TUMOUR AND INFECTIOUS DISEASE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions concerns methods and compositions for preventive maintenance and treatment of infectious diseases and malignant tumours. The method of obtaining the complexes containing of one or more heat shock proteins, bound in a complex with the antigenic peptides is offered, providing populations engagement of antigenic peptides from one or more various heat shock proteins in vitro in conditions, where the specified peptides form a complex with the specified heat shock proteins, where population of antigenic peptides contains at least 50 various peptides and is obtained by the way including splitting of an albuminous preparation by one or more proteinases or splitting of an albuminous preparation by means

of one or not more enzymatic methods where the specified albuminous preparation occurs from antigenic cells or their cellular fraction and includes at least 50 % of various proteins or at least 50 various proteins of the specified antigenic cells or cellular fraction accordingly. The composition containing immunogenic quantity of complexes, containing heat shock proteins in a complex with antigenic peptides is offered. The provocation method of the immune response at the person against the second antigenic cell is offered, the way of treatment or prevention of a malignant tumour is offered. The way of treatment or the infectious disease prevention is offered.

EFFECT: obtaining of compositions for prevention and treatment of infectious diseases and malignant tumours.

65 cl, 1 tbl

Настоящее изобретение заявляет приоритет предварительных патентных заявок Соединенных Штатов №60/313629, поданной 20 августа 2001 г., и №60/337222, поданной 6 декабря 2001 г., которые целиком включены в настоящий документ в качестве ссылок.

Настоящее изобретение было сделано при правительственной поддержке в форме гранта номер СА/А184479, присуждаемого Национальными институтами здравоохранения. Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

1. ВВЕДЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к способам и композициям для профилактики и лечения инфекционных заболеваний, а также первичных и метастатических неопластических заболеваний. В практике профилактики и лечения инфекционных заболеваний и злокачественной опухоли композиции, включающие цитозольные и полученные из мембран белки из антигенных клеток и/или продуктов их ферментативного расщепления, объединены с хитшоковыми белками (белками теплового шока) и/или альфа-2-макроглобулином для усиления иммунного ответа на опухоли и инфекционные агенты.

2. ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2.1. ХИТШОКОВЫЕ БЕЛКИ

Хитшоковые белки (HSP), называемые также белками теплового шока, были впервые идентифицированы как белки, синтезируемые клетками в ответ на тепловой шок. HSP классифицируют на пять семейств на основе молекулярной массы, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 и smHSP. Впоследствии было установлено, что многие члены данных семейств индуцируются в ответ на другие стрессогенные раздражители, включая недостаточность питания, метаболические нарушения, кислородные радикалы и инфекцию внутриклеточными патогенами (см. Welch, May 1993, Scientific American 56-64; Young, 1990, Annu. Rev. Immunol. 8:401-420; Craig, 1993, Science 260:1902-1903; Gething et al., 1992, Nature 355:33-45 и Lindquist et al., 1988, Annu. Rev. Genetics 22:631-677).

Исследования, посвященные клеточному ответу на тепловой шок и другие физиологические стрессы, показали, что HSP участвуют не только в клеточной защите от указанных неблагоприятных условий, но также и в необходимых биохимических и иммунологических процессах в клетках, не подвергающихся стрессу. HSP выполняют различные вспомогательные функции. Например, члены семейства HSP70, расположенные в цитоплазме, ядре, митохондриях или эндоплазматической сети клеток (Lindquist et al., 1988, Ann. Rev. Genetics 22:631-677), участвуют в презентации антигенов клеткам иммунной системы, а также участвуют в переносе, укладке и упорядоченном структурировании белков в нормальных клетках. HSP способны связываться с белками или пептидами в присутствии аденозинтрифосфата (АТФ) или кислой реакции среды (Udono and Srivastava, 1993, J. Exp. Med. 178:1391-1396).

Srivastava et al. показали иммунный ответ против сарком, индуцированных метилхолантеном, у инбредных мышей (1988, Immunol. Today 9:78-83). В данных исследованиях было установлено, что молекулы, ответственные за индивидуально различимую иммуногенность данных опухолей, представляли собой гликопротеины с молекулярной массой 96 кДа (gp96) и внутриклеточные белки с молекулярной массой от 84 до 86 кДа (Srivastava et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3407-3411; Ullrich et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3121-3125). Иммунизация мышей gp96 или p84/86, выделенными из конкретной опухоли, обеспечивала мышам иммунитет против указанной конкретной опухоли, но не против антигенно отличающихся опухолей.

Выделение и описание свойств генов, кодирующих gp96 и p84/86, выявило значительную гомологичность между ними и показало, что gp96 и p84/86 представляли собой взаимно дополняющие друг друга части одних и тех же хитшоковых белков в эндоплазматической сети и цитозоле, соответственно (Srivastava et al., 1988, Immunogenetics 28:205-207; Srivastava et al., 1991, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 167:109-123). Кроме того, было установлено, что HSP70 вызывает иммунитет против той опухоли, из которой он был выделен, но не против антигенно отличающихся опухолей. Однако HSP70, отделенный от пептидов, как было установлено, утрачивает свою иммуногенную активность (Udono and

Srivastava, J. Exp. Med. 178:1391-1396). Данные наблюдения предполагают, что хитшоковые белки сами по себе не являются иммуногенными, но образуют нековалентные комплексы с антигенными пептидами, и указанные комплексы могут вызывать специфичный иммунитет против антигенных пептидов (Srivastava, 1993, Adv. Cancer Res. 62:153-177; Udono et al., 1994, J. Immunol., 152:5398-5404; Suto et al., 1995, Science 269:1585-1588).

Нековалентные комплексы HSP и пептида, выделенные из злокачественных клеток, можно использовать для лечения и профилактики злокачественной опухоли, и они описаны в РСТ публикациях WO 96/10411, датированной 11 апреля 1996 г., и WO 97/10001, датированной 20 марта 1997 г. (патент США №5750119, выданный 12 мая 1998 г., и США №5837251, выданный 17 ноября 1998 г., соответственно, целиком включенные в настоящий документ в качестве ссылок). Выделение и очистка HSP-пептидных комплексов описаны, например, из клеток, инфицированных патогеном, и использовались для лечения и профилактики инфекции, вызванной патогеном, таким как вирусы и другие внутриклеточные патогены, включая бактерии, простейшие, грибы и паразиты (см., например, РСТ публикацию WO 95/24923, датированную 21 сентября 1995 г.). Иммуногенные комплексы шоковый белок-антиген можно также получить путем комплексообразования шокового белка и антигенных пептидов *in vitro*, и применение указанных комплексов для лечения и профилактики злокачественной опухоли и инфекционных заболеваний описано в РСТ публикации WO 97/10000, датированной 20 марта 1997 г. (патент США №6030618, выданный 29 февраля 2000 г.). Применение комплексов шоковый белок-антиген для сенсibilизации антиген-презентирующих клеток *in vitro* для применения в адоптивной иммунотерапии описано в РСТ публикации WO 97/10002, датированной 20 марта 1997 г. (см. также патент США №5985270, выданный 16 ноября 1999 г.).

2.2 АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИН

α -Макроглобулины являются членами белкового суперсемейства структурно родственных белков, которое также включает компоненты комплемента C3, C4 и C5. Человеческий белок плазмы альфа-2-макроглобулин (α 2M) представляет собой гомотетраммерный белок с молекулярной массой 720 кДа, известный, главным образом, как ингибитор протеиназ и как молекула-скевенджер протеиназ плазмы и воспалительной жидкости (см. обзор Chu and Pizzo, 1994, Lab. Invest. 71:792). α 2M синтезируется как предшественник, имеющий 1474 аминокислотных остатка. Первые 23 аминокислоты функционируют как сигнальная последовательность, которая расщепляется с образованием зрелого белка с 1451 аминокислотным остатком (Kan et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2282-2286).

α 2M беспорядочно связывается с белками и пептидами, имеющими нуклеофильные аминокислотные боковые цепи, ковалентными связями (Chu et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 737:291-307) и нацеливает их на клетки, которые экспрессируют рецептор α 2M (α 2MR) (Chu and Pizzo, 1993, Immunol. 150:48). Связывание α 2M с рецептором α 2M опосредуется карбоксиконцевой частью tt2M (Holtet et al., 1994, FEBS Lett. 344:242-246), и ключевые остатки были идентифицированы (Nielsen et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 12909-12912).

Общеизвестный своей ингибирующей в отношении протеиназ активностью α 2M связывается с различными протеиназами посредством многочисленных сайтов связывания (см., например, Hall et al., 1981, Biochem. Biophys. Res. Commun. 100(1):8-16). Взаимодействие протеиназ с α 2M обеспечивает сложную структурную перестройку, называемую трансформацией, которая является результатом расщепления в области "приманки" α 2M после того, как протеиназа "захватывается" тиоэфирами. Структурное изменение обнажает остатки, которые требуются для связывания рецептора, позволяя комплексу α 2M-протеиназа связываться с α 2MR. Метиламин может индуцировать сходные структурные изменения и расщепление, как те, которые индуцируются протеиназами.

Нерасщепленная форма $\alpha 2M$, которая не распознается рецептором, часто упоминается как "медленная" форма (s- $\alpha 2M$). Расщепленная форма $\alpha 2M$ упоминается как "быстрая" форма (f- $\alpha 2M$) (обзор Chu et al., 1994, Ann. N.Y. Acad. Sci. 737:291-307). Недавно было также показано, что $\alpha 2M$ может связываться с HSP, такими как gp96, hsp90, hsp70 и кальретикулином (Basu et al., 2001, Immunity 14(3):303-13).

Исследования показали, что, помимо функции ингибирования протеиназ, $\alpha 2M$, находясь в комплексе с антигенами, может усиливать на два порядка способность антигенов захватываться антиген-презентирующими клетками, такими как макрофаги, и презентироваться Т-клеточным гибридомом *in vitro* (Chu and Pizzo, 1994, Lab. Invest. 71:792), а также индуцировать пролиферацию Т-клеток (Osada et al., 1987, Biochem. Biophys. Res. Commun. 146:26-31). Дополнительные данные предполагают, что образование комплекса антигена с $\alpha 2M$ усиливает выработку антител необработанными клетками селезенки *in vitro* (Osada et al., 1988, Biochem. Biophys. Res. Commun. 150: 883), вызывает антительные ответы *in vivo* у подопытных кроликов (Chu et al., 1994, J. Immunol. 152:1538-1545) и мышей (Mitsuda et al., 1993, Biochem. Biophys. Res. Commun. 101:1326-1331). Также было показано, что комплексы $\alpha 2M$ -антигенный пептид индуцируют цитотоксический Т-клеточный ответ *in vivo* (Binder et al., 2001, J. Immunol. 166:4698-49720).

3. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩЕСТВА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам изготовления комплексов антигенных белков и пептидов с хитшоковым белком (HSP) или альфа-2-макроглобулином ($\alpha 2M$), которые являются пригодными для профилактики и лечения злокачественной опухоли и инфекционного заболевания.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу изготовления комплексов HSP и популяции антигенных белков антигенных клеток или вирусных частиц. Указанный способ включает образование комплекса популяции антигенных белков, полученных из антигенных клеток или вирусных частиц, с одним или более различных хитшоковых белков *in vitro*, в котором популяция включает по меньшей мере 50% различных белков или по меньшей мере 50 различных белков, которые имеются в антигенных клетках или вирусных частицах или имеются в клеточной фракции антигенных клеток. В другом варианте осуществления настоящего изобретения способ включает контактирование белкового препарата *in vitro* с одним или более различных хитшоковых белков в таких условиях, при которых белки в белковом препарате образуют комплекс с хитшоковыми белками.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к комплексам, включающим HSP и популяцию антигенных пептидов антигенных клеток или вирусных частиц, в которых популяция антигенных пептидов получена способом, включающим ферментативное расщепление белкового препарата антигенных клеток, их клеточной фракции или вирусных частиц протеиназой или множеством различных протеиназ в отдельности. Популяцию антигенных пептидов также можно получить способом, включающим воздействие на белковый препарат антигенных клеток, их клеточную фракцию или вирусные частицы АТФ, гидрохлоридом гуанидия и/или кислотными условиями, достаточными для элюирования антигенных пептидов из белковых комплексов, присутствующих в белковом препарате. Антигенные пептиды, полученные одним из указанных способов или обоими, образуют комплекс с одним или более различных HSP *in vitro*.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения комплексов $\alpha 2M$ и популяции антигенных белков антигенных клеток. Указанный способ включает образование комплекса популяции антигенных белков, полученных из антигенных клеток или вирусных частиц, с $\alpha 2M$ *in vitro*, в котором популяция включает по меньшей мере 50% различных белков или по меньшей мере 100 различных белков, которые имеются в антигенных клетках или вирусных частицах, или имеются в клеточной фракции антигенных клеток. В другом варианте осуществления настоящего изобретения

способ включает контактирование белкового препарата *in vitro* с $\alpha 2M$ в таких условиях, при которых белки в белковом препарате образуют комплекс с $\alpha 2M$.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к комплексам, включающим $\alpha 2M$ и популяцию антигенных пептидов антигенных клеток или вирусных частиц, в которых популяция антигенных пептидов получена способом, включающим ферментативное расщепление белкового препарата антигенных клеток, их клеточной фракции или вирусных частиц протеиназой или множеством различных протеиназ в отдельности. Популяцию антигенных пептидов также можно получить способом, включающим воздействие на белковый препарат антигенных клеток, их клеточную фракцию или вирусные частицы АТФ, гидрохлоридом гуанидия и/или кислотными условиями. Антигенные пептиды, полученные одним из указанных способов или обоими, комплексируют с $\alpha 2M$ *in vitro*.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения антигенные клетки могут представлять собой злокачественные клетки или клетки, инфицированные патогеном или инфекционным агентом, и, предпочтительно, человеческие клетки. Антигенные клетки могут также представлять собой клетки патогена или инфекционного агента или их варианты. Белковый препарат антигенных клеток может включать только цитозольные белки, только белки, полученные из мембраны, или и цитозольные и полученные из мембраны белки. Белковый препарат может быть необработанным, нефракционированным клеточным лизатом. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения белковый препарат можно изготовить лизированием антигенных клеток, удалением клеточного дебриса и небелковых материалов, и, необязательно, очисткой белков способами, известными специалистам. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения белковый препарат не подвергался никакому способу получения, который избирательно удаляет или сохраняет один или более конкретных белков из других белков в антигенных клетках.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения белковый препарат антигенных клеток, их клеточная фракция или вирусные частицы могут расщепляться различными протеиназами, такими как, без ограничения, трипсин, стафилококковая пептидаза I (известная также как протеиназа V8), химотрипсин, пепсин, катепсин G, термолизин, эластаза и папаин, в условиях, подходящих для ферментативной реакции. Степень расщепления можно отслеживать с помощью отбора образца и его анализа с помощью известных методик определения длины пептидов. Предпочтительно осуществлять стадию ферментативного расщепления в таких условиях, чтобы получающаяся популяция пептидов, которая включает антигенные пептиды, имела средний размер от приблизительно 7 аминокислотных остатков до приблизительно 20 аминокислотных остатков. Желательно также получать из белкового препарата различные популяции пептидов путем ферментативного расщепления аликвот белкового препарата различными протеиназами. Пептиды, полученные из различных аликвот, подвергнутых ферментативному расщеплению, перед образованием комплекса с HSP или $\alpha 2M$ можно объединять. Перед образованием комплекса популяции пептидов, которая включает антигенные пептиды, с HSP или $\alpha 2M$ желательно инактивировать или отделить протеиназу от популяции пептидов и, необязательно, очистить популяцию пептидов.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антигенные клетки, их клеточная фракция или вирусные частицы контактируют с аденозинтрифосфатом (АТФ), гидрохлоридом гуанидия и/или кислотными условиями, таким образом, что антигенные пептиды могут быть элюированы без необходимости первоначального выделения комплексов HSP. Антигенные пептиды, элюированные данным способом, включают пептиды, которые эндогенно связаны с HSP и молекулами MHC класса I и II.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения, в зависимости от способа, использованного для образования комплекса популяции антигенных пептидов с HSP или $\alpha 2M$, реакция может давать антигенные пептиды, образующие комплексы с HSP или $\alpha 2M$, как с помощью ковалентной связи, так и с помощью нековалентной связи.

Хитшоковые белки, которые предполагаются для образования комплекса, включают, без ограничения, HSP 60, HSP 70, HSP 90, grp96, кальретикулин, grp 78 (или BiP), протеин-дисульфид-изомеразу (PDI), HSP 110 и grp170. Обычно предпочтительными являются человеческие HSP и человеческий $\alpha 2M$. Комплексы HSP и антигенных пептидов можно

5 подвергать дополнительной очистке перед использованием в терапевтической или профилактической композиции. Указанные композиции могут дополнительно включать адъювант. Также созданы наборы, включающие HSP и/или $\alpha 2M$, антигенные клетки, белковые препараты и/или протеиназы.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения создан способ

10 индуцирования иммунного ответа у субъекта против первой антигенной клетки или вирусной частицы, включающий введение индивидууму композиции, включающей иммуногенное количество HSP и/или $\alpha 2M$, связанных в комплекс с популяцией антигенных белков/пептидов, которые были получены из второй антигенной клетки или вирусной частицы. Антигенные пептиды можно получить ферментативным расщеплением белкового

15 препарата антигенных клеток или вирусных частиц протеиназой или воздействием на белковый препарат АТФ, гидрохлоридом гуанидия и/или кислотными условиями. Первые и вторые антигенные клетки или вирусные частицы экспрессируют по меньшей мере одну общую антигенную детерминанту.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения создан способ лечения

20 или профилактики вида злокачественной опухоли или инфекционного заболевания, включающий введение субъекту, который нуждается в указанном лечении или профилактике, композиции, включающей количество, эффективное для указанного лечения или профилактики, HSP и/или $\alpha 2M$, связанного в комплекс с популяцией антигенных пептидов. Антигенные белки/пептиды получают из злокачественных клеток или клеток,

25 инфицированных патогеном, которые являются антигенно родственными злокачественным или инфекционным заболеваниям. Патоген или инфекционный агент, включая вирусные частицы, также можно использовать для получения антигенных пептидов. Антигенные пептиды можно получать ферментативным расщеплением белкового препарата антигенных клеток, их клеточной фракции или вирусных частиц АТФ, гидрохлоридом

30 гуанидия и/или кислотой, такой как трифторуксусная кислота.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения создан способ лечения или профилактики вида злокачественной опухоли или инфекционного заболевания, включающий введение субъекту, который нуждается в указанном лечении или

35 профилактике, антиген-презентирующих клеток, которые были сенсibilизированы комплексами HSP и/или $\alpha 2M$ с популяцией антигенных белков/пептидов. Помимо сенсibilизированных антиген-презентирующих клеток субъекту также можно вводить комплексы HSP и/или $\alpha 2M$ с популяцией антигенных пептидов.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения введение комплексов

40 можно повторять в том же участке и периодически, например с недельными интервалами. Композицию можно вводить многими путями, такими как внутрикожный или подкожный.

4. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам изготовления композиции, включающей хитшоковый белок (HSP) или альфа-2-макроглобулин ($\alpha 2M$), которые являются пригодными

45 для профилактики и лечения злокачественной опухоли и инфекционного заболевания. Способ по настоящему изобретению включает изготовление *in vitro* комплексов HSP или $\alpha 2M$ с антигенными белками и пептидами антигенных клеток. В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ включает изготовление белкового

50 препарата антигенных клеток, включающего популяцию антигенных белков, и образование комплекса *in vitro* популяции антигенных белков с HSP или $\alpha 2M$. В другом варианте осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает ферментативное расщепление белкового препарата антигенных клеток по меньшей мере одной протеиназой для получения популяции антигенных пептидов перед образованием комплекса *in vitro*

популяции антигенных пептидов с HSP или $\alpha 2M$. В настоящем изобретении используется полный антигенный потенциал антигенных клеток.

Терапевтические и профилактические способы по настоящему изобретению основаны на возбуждении иммунного ответа у субъекта, для которого желательно лечение или профилактика инфекционных заболеваний или злокачественной опухоли. Иммунный ответ направлен специфичным образом против антигенных детерминант злокачественных клеток, клеток, инфицированных инфекционным агентом, который вызывает инфекционное заболевание, или антигенных детерминант инфекционного агента. Введение индивидууму композиции, включающей HSP и/или $\alpha 2M$, связанных в комплекс с пептидами антигенной клетки, композиции, которая включает комплексы HSP и/или $\alpha 2M$ с антигенными пептидами, будет стимулировать иммунный ответ, такой как цитотоксический Т-клеточный ответ. Антигенные клетки могут представлять собой злокачественные клетки, или инфицированные клетки, или клетки, которые имеют общие антигенные детерминанты или демонстрируют сходную антигенность со злокачественными или инфицированными клетками. В результате иммунного ответа различные иммунные эффекторный механизмы индивидуума будут действовать на злокачественные или инфицированные клетки, что приводит к лечению или профилактике указанного заболевания.

Индивидуум или субъект, для которого желательно лечение или профилактика инфекционных заболеваний или злокачественной опухоли, представляет собой животное, предпочтительно млекопитающее, примата, не являющегося человеком, и наиболее предпочтительно человека. Термин "животное", используемый в настоящем документе, включает, без ограничения, сельскохозяйственных животных, домашних животных, таких как кошки, собаки, коровы, свиньи, овцы, лошади, куры и т.п.

Терапевтические схемы и фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно использовать в сочетании с дополнительными усилителями иммунного ответа или модификаторами биологического ответа, включая, без ограничения, цитокины IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, TNF или другой цитокин, который воздействует на иммунные клетки.

Композиции и способы по настоящему изобретению представляют собой улучшение по сравнению с другими композициями и способами, в которых используются натуральные комплексы HSP-антигенный пептид для лечения или профилактики злокачественной опухоли или инфекционного заболевания. В указанных других способах специфичный HSP и его комплексы с антигенными пептидами выделяют из злокачественной или инфицированной клетки и вводят пациенту для индуцирования иммунного ответа против злокачественных или инфицированных клеток *in vivo* (см., например, патенты США №№5750119 и 5961979). Натуральные комплексы выделяют способами, соответствующими желаемому типу HSP. Так, натуральные комплексы типа HSP и антигенных пептидов включают только те антигенные пептиды, которые локализуются в компартменте антигенных клеток совместно с этим типом HSP.

Определенные типы HSP обнаруживаются только в одном единственном клеточном компартменте, а некоторые антигенные пептиды обнаруживаются только в определенных компартментах антигенной клетки. Например, HSP90 и HSP70 обнаруживаются только в цитозоле. Таким образом, они будут образовывать комплекс только с антигенными пептидами, расположенными в цитозоле, но не с антигенными пептидами, расположенными где-либо еще, например, в эндоплазматической сети. Иными словами, только подгруппа антигенных пептидов антигенной клетки может связываться с каждым конкретным HSP. Таким образом, для стимуляции иммунного ответа на максимальное количество антигенных детерминант злокачественной или инфицированной клетки нужно будет выделять из злокачественной или инфицированной клетки каждый тип HSP и его пептидный комплекс с помощью соответствующего ему способа выделения, а затем вводить пациенту. Данный подход является трудоемким и может потребовать большие количества антигенных клеток, которые при некоторых обстоятельствах не доступны. Способ по настоящему изобретению решает данную проблему посредством получения пептидного профиля фактически всех антигенов антигенной клетки *in vitro*, а затем

образования комплекса пептидов с одним или более различных HSP и/или $\alpha 2M$, которые затем можно использовать для стимуляции иммунного ответа у пациента. Используя способы по настоящему изобретению можно даже получать комплексы антигенных пептидов и HSP, которые не локализируются вместе в одном и том же компартменте

5 антигенной клетки. Способы по настоящему изобретению дают возможность формировать комплексы определенного типа HSP с большинством или даже каждым из антигенных пептидов антигенной клетки. Соответственно, композициями, изготовленными способами по настоящему изобретению, можно индуцировать более эффективный иммунный ответ против антигенных клеток. Помимо этого, данный способ не требует сначала выделять

10 комплексы HSP и связанных пептидов, позволяя, таким образом, использовать очень малое количество исходного материала, получение которого часто ограничено.

Помимо этого, антигенный профиль злокачественных клеток, инфицированных клеток или патогенов может с течением времени изменяться, например, даже во время курса лечения. Многие патогены уклоняются от иммунной системы хозяина посредством мутации

15 и синтеза мутантных белков, которые не распознаются иммунными клетками и антителами. Известно, что злокачественные клетки становятся резистентными к определенным лекарственным средствам в результате мутаций с последующим синтезом мутантных белков, некоторые из которых могут не распознаваться иммунной системой. Преимуществом использования одного из вариантов осуществления настоящего

20 изобретения является то, что путем ферментативного расщепления цитозольных и/или полученных из мембраны белков из злокачественных клеток, инфицированных клеток или патогенов получен обширный ряд антигенных белков и, следовательно, большее разнообразие антигенных пептидов, образующих комплекс с HSP и/или $\alpha 2M$. В результате иммунный ответ направлен на большее количество антигенных детерминант на антигенных

25 клетках, делая, таким образом, более трудным для антигенной клетки, такой как злокачественная клетка или инфицированная клетка, избегать распознавания и воздействия со стороны иммунной системы.

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способы по настоящему изобретению получают комплексы $\alpha 2M$ -пептид, которые не встречаются в

30 естественных условиях. $\alpha 2M$ представляет собой внеклеточный белок, который, как известно, связывается с различными внеклеточными белками, в частности с протеиназами, инактивируя их, а затем перенося их внутрь клетки. $\alpha 2M$ обычно не имеет доступа и, следовательно, не образует комплекса с целым репертуаром антигенных пептидов антигенной клетки. Способы по настоящему изобретению позволяют $\alpha 2M$ образовывать

35 комплекс с гораздо более обширным рядом пептидов, которые являются цитозольными или полученными из мембраны или которые получают ферментативным расщеплением *in vitro* цитозольных или полученных из мембраны белков антигенных клеток.

В разделе 4.1 описаны источники антигенных клеток, из которых можно изготавливать

40 белковые препараты. В разделе 4.2 представлены способы изготовления различных типов белковых препаратов антигенных клеток и способы ферментативного расщепления белкового препарата. Разделы 4.3 и 4.4 описывают, соответственно, выделение или получение HSP или $\alpha 2$, которые используются для образования комплекса с антигенными пептидами. Образование комплекса HSP и антигенных пептидов *in vitro* описано в разделе

45 4.5. В разделе 4.6 описаны способы применения комплексов для профилактики и лечения злокачественной опухоли и инфекционных агентов и типы злокачественной опухоли и инфекционных заболеваний, которые лечат. Применение композиций, изготовленных способами по настоящему изобретению, в адаптивной иммунотерапии описано в разделе

50 4.7. В разделе 5 представлены экспериментальные данные, показывающие эффективность комплексов по настоящему изобретению с точки зрения защиты животного профилактически от роста злокачественных клеток.

4.1. ИСТОЧНИКИ АНТИГЕННЫХ КЛЕТОК

Антигенные клетки по настоящему изобретению включают антигенную детерминанту, на которую желательно получить иммунный ответ субъекта.

Для лечения или профилактики злокачественной опухоли или инфекционного заболевания способы по настоящему изобретению обеспечивают композиции HSP и $\alpha 2M$, связанные в комплекс с антигенными белками и пептидами; указанные антигенные белки/пептиды получены из злокачественных клеток, предпочтительно злокачественных опухолей человека, например фрагменты специфичных для опухоли антигенов и связанных с опухолью антигенов. Пептиды получают протеолитическим ферментативным расщеплением белков (например, цитозольных и/или полученных из мембраны белков) из злокачественных клеток или антигенных клеток, которые имеют общие антигенные детерминанты или демонстрируют сходную антигенность со злокачественными клетками.

Антигенные пептиды можно также получить воздействием на белки АТФ, гидрохлоридом гуанидия и/или кислотными условиями. Используемый в настоящем документе термин клетки или ткань "одного и того же типа злокачественной опухоли" относится к клеткам или тканям злокачественной опухоли одного и того же типа ткани или метастазам злокачественной опухоли одного и того же типа ткани.

Для лечения или профилактики инфекционных заболеваний способы по настоящему изобретению обеспечивают композиции HSP и $\alpha 2M$, связанные в комплекс с антигенными пептидами, полученными из клеток, инфицированных патогеном или инфекционным агентом, который вызывает инфекционное заболевание, или патогеном, который включает, без ограничения, вирус, бактерию, гриб, простейшее, паразит и т.п. Предпочтительно патоген представляет собой патоген, который инфицирует людей. Антигенные пептиды получают протеолитическим ферментативным расщеплением (например, цитозольных и/или полученных из мембраны) белков, полученных из инфицированных клеток, антигенных клеток, которые имеют общие антигенные детерминанты или демонстрируют сходную антигенность с инфицированными клетками или патогенами, включая вирусные частицы. Антигенные пептиды можно также получить воздействием на белки АТФ, гидрохлоридом гуанидия и/или кислотой. Антигенные пептиды можно также получить из антигенных клеток, которые демонстрируют антигенность агента (патогена), который вызывает инфекционное заболевание, или варианта указанного агента.

Поскольку в настоящих способах используются интактные злокачественные клетки, инфицированные клетки или другие антигенные клетки, при использовании настоящих способов нет необходимости выделять или изучать свойства или даже знать идентичность указанных антигенных пептидов. Источники антигенных клеток можно выбирать в зависимости от природы заболевания, с которым связаны антигены. В одном варианте осуществления настоящего изобретения любые ткани или клетки, выделенные из злокачественной опухоли, включая злокачественную опухоль, которая метастазировала в множество областей, можно использовать в качестве антигенной клетки по настоящему изобретению. Например, можно также использовать лейкозные клетки, циркулирующие в крови, лимфе или других жидкостях организма, можно использовать ткань солидных опухолей (например, первичную ткань из биоптата). Используемый в настоящем документе термин злокачественная клетка также включает в себя пренеопластическую клетку, которая представляет собой клетку в переходной форме от нормальной до неопластической формы. Переход от ненеопластического клеточного роста к неоплазии обычно состоит из гиперплазии, метаплазии и дисплазии (см. обзор, посвященный условиям указанного патологического роста, Robbins and Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, стр.68-79). Неограничивающий перечень злокачественных опухолей, клетки которых можно использовать по настоящему изобретению, представлен в разделе 4.5.2., ниже.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения любую клетку, которая инфицирована патогеном или инфекционным агентом, т.е. инфицированную клетку, можно использовать в качестве антигенной клетки для получения антигенных пептидов. В частности, клетки, инфицированные внутриклеточным патогеном, таким как вирус, бактерия, гриб, паразит или простейшее, являются предпочтительными. Перечень примеров инфекционных агентов, которые могут инфицировать клетки, которые можно

использовать по настоящему изобретению, представлен в разделе 4.5.1.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения любой патоген или инфекционный агент, который может вызывать инфекционное заболевание, можно использовать в качестве антигенной клетки для получения антигенных пептидов. Варианты патогена или инфекционного агента, такие как, ограничиваясь ими, репликационно дефектные варианты, непатогенные или аттенуированные варианты, неинфекционные варианты, также можно использовать в качестве антигенной клетки для данной цели. Например, многие вирусы, бактерии, грибы, паразиты и простейшие, которые можно культивировать *in vitro* или изолировать из инфицированных материалов, могут служить источником антигенных клеток. Для размножения указанных патогенов, включая вирусные частицы, можно использовать способы, известные специалистам.

В качестве антигенных клеток можно использовать также клеточные линии, полученные из тканей злокачественных опухолей, злокачественные клетки или инфицированные клетки. Злокачественные или инфицированные ткани, клетки или клеточные линии, которые происходят от человека, являются предпочтительными. Злокачественные клетки, инфицированные клетки или антигенные клетки можно идентифицировать и выделять любым способом, известным специалистам. Например, злокачественные клетки или инфицированные клетки можно идентифицировать морфологическими средствами, ферментными анализами, анализами пролиферации или наличием патогенов или вирусов, вызывающих злокачественные опухоли. Если характеристики антигенов, представляющих интерес, известны, антигенные клетки также можно идентифицировать или выделять любыми биохимическими или иммунологическими способами, известными специалистам. Например, злокачественные клетки или инфицированные клетки можно выделять хирургическими, эндоскопическими или другими методиками взятия биоптатов, аффинной хроматографией и клеточным сортированием с активацией флюоресценции (например, с использованием флюоресцентно меченного антитела против антигена, экспрессируемого клетками). Антигенные клетки, которые демонстрируют сходную антигенность, имеют одну или более общих антигенных детерминант, против которых желателен иммунный ответ у субъекта (например, для терапевтических или профилактических целей).

Если количество антигенных клеток, полученных от субъекта, недостаточно, клетки можно культивировать *in vitro* с помощью стандартных способов увеличения количества клеток перед их использованием в настоящих способах. Нет необходимости использовать клональную или гомогенную или очищенную популяцию антигенных клеток. Можно использовать смесь клеток при условии, что значительное число клеток в смеси содержит антигены, представляющие интерес. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения антигенные клетки и/или иммунные клетки являются очищенными.

С целью получения клеток, инфицированных патогеном, неинфицированные клетки, чувствительные к инфицированию патогеном или инфекционным агентом, который вызывает заболевание, можно инфицировать *in vitro*. В зависимости от способа передачи и биологии патогена или инфекционного агента, можно использовать стандартные методики для облегчения инфицирования патогеном или инфекционным агентом и размножения инфицированных клеток. Например, вирусы гриппа можно использовать для инфицирования нормальных человеческих фибробластов, а микобактерии можно использовать для инфицирования нормальных человеческих клеток Шванна. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения варианты инфекционного агента, такие как репликационно дефектные вирусы, непатогенные или аттенуированные мутанты или чувствительные к температуре мутанты, также можно использовать для инфицирования или трансформирования клеток с целью получения антигенных клеток для изготовления антигенных пептидов. Если для инфицирования клеток необходимо большое количество патогена, или если патогены используются непосредственно в качестве антигенных клеток, для размножения и роста патогенов можно использовать любой способ, известный специалистам. Данные способы будут зависеть от патогена и могут не включать инфицирование хозяина. Например, специалистам известно множество методик

выращивания патогенных бактерий, грибов и других невирусных микроорганизмов в культуре, включая ферментацию в больших количествах.

Альтернативно, если ген, кодирующий опухолевый антиген (например, опухолеспецифический антиген или связанный с опухолью антиген), или антиген патогена

5 доступен, нормальные клетки подходящего клеточного типа от предполагаемого реципиента можно трансформировать или трансфицировать *in vitro* экспрессионной конструкцией, включающей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный антиген, таким образом, что антиген экспрессируется клетками реципиента. В одном варианте осуществления настоящего изобретения связанный с опухолью антиген
10 представляет собой антиген, который экспрессируется с более высоким уровнем в опухолевой клетке по сравнению с нормальной клеткой; опухолеспецифический антиген представляет собой антиген, который экспрессируется только опухолевой клеткой и не экспрессируется нормальной клеткой. Необязательно, таким способом в клетке реципиента можно экспрессировать более одного подобного антигена, что будет оценено
15 специалистами; любые известные методики, такие как те, которые описаны у Ausubel et al. (1989, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience), можно использовать для трансформации или трансфектирования и последующей рекомбинантной экспрессии гена антигена в клетках реципиента.

Подходящие белки и пептиды, которые могут экспрессироваться в указанных клетках,
20 включают, без ограничения, те из них, которые демонстрируют антигенность (для лечения или профилактики злокачественной опухоли): опухолевых антигенов, включая тирозиназу, gp100, мелан-А, gp75, муцины, и (для лечения или профилактики инфекционного заболевания): вирусных белков, включая белки вируса иммунодефицита типа I (ВИЧ-I), вируса иммунодефицита человека типа II (ВИЧ-II), гепатита типа A, гепатита типа B,
25 гепатита типа C, гриппа. Varicella, аденовируса, простого герпеса типа I (HSV-I), простого герпеса типа II (HSV-II), чумы крупного рогатого скота, риновируса, эховируса, ротавируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса папилломы, паповавируса, цитомегаловируса, эхиновируса, арбовируса, гантавируса, вируса Коксаки, вируса эпидемического паротита, вируса кори, вируса краснухи и вируса полиомиелита, а
30 также белки или фрагменты белков инфекционного агента, включая, без ограничения, микобактерий, риккетсии, микоплазмы, нейссерии, легионеллы, лейшмании, кокцидии, трипаносомы, хламидии и риккетсии.

4.2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ АНТИГЕННЫХ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Согласно настоящему изобретению, композиции по настоящему изобретению включают
35 антигенные белки, связанные в комплекс с HSP, в которых антигенные белки происходят из препарата белков антигенных клеток, представляющих интерес. Композиции по настоящему изобретению также включают антигенные белки, связанные в комплекс с $\alpha 2M$, в которых антигенные белки происходят из препарата белков антигенных клеток, представляющих интерес. Композиции по настоящему изобретению также включают
40 комплексы HSP и антигенных пептидов или комплексы $\alpha 2M$ и антигенных пептидов, которые изготовлены сначала генерированием популяции пептидов из препаратов белков антигенных клеток, представляющих интерес, а затем - связыванием в комплекс пептидов с HSP или $\alpha 2M$.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения для доведения до
45 максимума и сохранения разнообразия антигенных белков и пептидов способы, которые применяются для изготовления белкового препарата антигенных клеток, не удаляют или не сохраняют избирательно любой конкретный белок или пептид из других белков и пептидов в антигенной клетке. Даже в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, когда используются цитозольные белки или полученные из мембраны белки,
50 способы, используемые для изготовления препаратов, не удаляют или не сохраняют избирательно любой конкретный белок цитозоля или мембран. Следовательно, основная часть белков, присутствующих в цитозоле или мембранах, присутствует также в соответствующих препаратах антигенных белков и пептидов из антигенных клеток. В

предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения практически весь репертуар антигенных белков и пептидов антигенных клеток и практически все антигенные белки и пептиды в цитозоле или в мембранах присутствуют в реакции комплексообразования и образуют комплексы с HSP и/или $\alpha 2M$.

5 4.2.1 БЕЛКОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ АНТИГЕННЫХ КЛЕТОК

В одном варианте осуществления настоящего изобретения создан белковый препарат, который получен из злокачественной клетки, инфицированной клетки или патогена. Например, для лечения злокачественной опухоли после оперативного вмешательства изготавливают белковые препараты из опухолевых клеток, полученных от пациента, имеющего злокачественную опухоль. В другом варианте осуществления настоящего изобретения один или более антигенных белков, представляющих интерес, синтезируют в клеточных линиях, модифицированных внедрением рекомбинантных экспрессионных систем, которые кодируют указанные антигены, и указанные клетки используют для получения белков. Белки можно получать из одной или более клеточных фракций, например цитозоля антигенных клеток, или их можно экстрагировать или солюбилизовать из мембран или клеточных стенок антигенных клеток. Можно использовать любую известную специалистам методику для лизиса клеток, фракционирования клеточного содержимого и обогащения или выделения белков. См., например, Current Protocols in Immunology, vol 2, chapter 8, Coligan et al. (ed.), John Wiley & Sons, Inc.; Pathogenic and Clinical Microbiology: A Laboratory Manual, Rowland et al., Little Brown & Co., June 1994; которые целиком включены в настоящий документ в качестве ссылок. В зависимости от методики, используемой для фракционирования клеточного содержимого, клеточная фракция включает по меньшей мере 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или 20000 различных белков.

Используемый в настоящем документе термин "белковый препарат" относится к смеси белков, полученных из антигенных клеток, клеточной фракции антигенных клеток или вирусных частиц. Белки можно получать из клеточной фракции, такой как цитозоль. Белки также могут представлять собой нецитозольные белки (например, белки из клеточных стенок, клеточных мембран или органелл) или и те, и другие. Клеточные фракции могут включать, без ограничения, цитозольные фракции, мембранные фракции и фракции органелл, такие как ядерные, митохондриальные, лизосомальные и полученные из эндоплазматической сети фракции. Белковые препараты можно получать из нерекомбинантных или рекомбинантных клеток. Термин "антигенные белки", используемый в настоящем документе, также охватывает антигенные полипептиды и антигенные пептиды, которые могут присутствовать в препарате. Белковый препарат, полученный из антигенных клеток или их клеточных фракций или вирусных частиц, можно, необязательно, очищать до различных степеней от других небелковых материалов с помощью методик, известных специалистам. Белковый препарат может включать по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% различных белков и пептидов, присутствующих в антигенных клетках или вирусных частицах или фракции антигенных клеток.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения белковые препараты не подвергаются какому бы то ни было способу получения, который избирательно удаляет или сохраняет один или более конкретных белков из других белков антигенных клеток.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения белковый препарат представляет собой лизат цельных клеток, который не был фракционирован и/или очищен, и может содержать другие небелковые материалы клеток. В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения белковый препарат представляет собой общий белок клеточной фракции, который не подвергался дополнительному фракционированию или очистке, и может содержать другие небелковые материалы клеток. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения белковый препарат представляет собой общий белок в препарате вирусных частиц. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения белковый препарат включает общий клеточный белок, общие

цитозольные белки или общие полученные из мембраны белки антигенной клетки (клеток). В различных вариантах осуществления настоящего изобретения белковый препарат включает по меньшей мере 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или 20000 различных белков. Множество различных антигенных белков присутствует в белковом препарате антигенных клеток. Кроме того, белки в белковом препарате могут подвергаться стадии ферментативного расщепления протеиназой перед связыванием в комплекс *in vitro* с HSP или $\alpha 2M$. Альтернативно белки в белковом препарате не подвергаются стадии ферментативного расщепления протеиназой перед связыванием в комплекс *in vitro* с HSP или $\alpha 2M$.

Для изготовления белкового препарата антигенных клеток или вирусных частиц лизирование антигенных клеток или разрушение клеточных стенок, клеточных мембран или структуры вирусных частиц можно осуществлять с помощью стандартных схем, известных специалистам. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения антигенные клетки можно лизировать, например, механическим измельчением, обработкой ультразвуком, замораживанием и оттаиванием, подбором осмолярности среды, окружающей клетки или комбинацией данных методик. В менее предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения антигенные клетки могут быть лизированы химическими агентами, такими как поверхностно-активные вещества.

После того как клетки были лизированы, желательнo удалить клеточный дебрис, материалы, которые не являются белковыми, или материалы, которые не содержат цитозольные и/или полученные из мембраны белки (включая белки в мембранах органелл). Удаление данных компонентов можно осуществлять такими методиками, как центрифугирование на малых скоростях или фильтрование. После удаления клеточного дебриса и интактных клеток можно использовать стадию центрифугирования на больших скоростях, чтобы отделить цитозольные белки, которые собираются в надосадочной жидкости, и полученные из мембраны белки, которые собираются в центрифужном осадке. Стандартные процедуры, общеизвестные в данной области, позволяют выделять также полученные из мембраны белки из центрифужного осадка. Стандартные методики, общеизвестные в данной области, можно использовать для экстрагирования вирусных белков из вирусных частиц. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения используемые способы не удаляют или не сохраняют избирательно любой белок (белки) из других белков, присутствующих в антигенных клетках, в цитозоле или в мембранах, или не приспособлены для этого.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения, необязательно, белки их антигенных клеток можно разделять по их общим биохимическим и/или биофизическим свойствам, таким как размер, заряд или их комбинации. Для осуществления разделения можно использовать любые методики, известные специалистам. Выбранные фракции белков/пептидов, которые включают по меньшей мере 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или 20000 различных белков, или которые включают по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% различных белков, присутствующих в антигенных клетках или их клеточной фракции или в вирусных частицах, используют для образования комплексов с HSP или $\alpha 2M$.

Пример способа, без ограничения, который можно использовать для изготовления белкового препарата, включающего цитозольные белки, является следующим.

Клетки, которые могут представлять собой опухолевые клетки, полученные биопсией у пациента, или опухолевые клетки, культивируемые *in vitro*, или клетки, инфицированные патогенным агентом, суспендируют в 3 объемах 1X лизисного буфера, содержащего 30 мМ бикарбоната натрия, pH 7,5, 1 мМ PMSF, инкубируют на льду в течение 20 минут, а затем разбухшие в гипотонической среде клетки гомогенизируют в гомогенизаторе Dounce до тех пор, пока не лизируется >95% клеток. В качестве альтернативы механическому измельчению клетки можно обрабатывать ультразвуком на льду, до тех пор, пока не лизируется >99% клеток, что определяют исследованием под микроскопом. В случае, когда используется ультразвуковая обработка, клетки суспендируют в буфере, таком как

физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS), который может содержать 1 мМ PMSF, перед ультразвуковой обработкой.

Лизат центрифугируют при 1000 g в течение 10 минут для удаления интактных клеток, ядер и другого клеточного дебриса. Полученную надосадочную жидкость повторно

центрифугируют приблизительно при 100000 g в течение приблизительно одного часа, и надосадочную жидкость собирают. Надосадочную жидкость, полученную при 100000 g, можно диализировать в течение 36 часов при 4°C (три раза, по 100 объемов каждый) против PBS или другого подходящего буфера, для получения растворимых цитозольных белков по настоящему изобретению. Если это необходимо, нерастворимый материал в

препарате можно удалять фильтрованием или центрифугированием на малых скоростях. Пример способа, без ограничения, который можно использовать для изготовления

белкового препарата, включающего полученные из мембраны белки, является следующим: Клетки, которые могут представлять собой опухолевые клетки, полученные биопсией у пациента, или опухолевые клетки, культивированные *in vitro*, или клетки, инфицированные патогенным агентом, суспендируют в 3 объемах 1X лизисного буфера, содержащего 30 мМ бикарбоната натрия, pH 7,5, 1 мМ PMSF, инкубируют на льду в течение 20 минут, а затем разбухшие в гипотонической среде клетки гомогенизируют в гомогенизаторе Dounce до тех пор, пока не лизируется >95% клеток. В качестве альтернативы механическому измельчению клетки можно обрабатывать ультразвуком на льду, до тех пор, пока не лизируется >99% клеток, что определяют исследованием под микроскопом. В случае, когда используется ультразвуковая обработка, клетки суспендируют в буфере, таком как физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS), который может содержать 1 мМ PMSF, перед ультразвуковой обработкой.

Лизат затем центрифугируют при 100000 g в течение 10 минут для сбора клеточных мембран. Полученные из мембраны белки можно удалить из липидного двойного слоя и изолировать из центрифужного осадка, полученного при 100000 g (где располагаются полученные из мембраны белки), путем ресуспендирования центрифужного осадка в 5 объемах PBS, содержащего 1% дезоксихолата натрия (без Ca^{2+} и Mg^{2+}), и инкубировать на льду в течение 1 ч. Полученную суспензию центрифугируют в течение 30 мин при 20000 g и полученную надосадочную жидкость собирают и диализируют против нескольких смен PBS (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) для удаления поверхностно-активного вещества. Полученный диализат центрифугируют в течение 90 мин при 100000 g и надосадочную жидкость подвергают дальнейшей очистке. Затем к надосадочной жидкости добавляют кальций и магний до конечных концентраций 2 мМ. Если это необходимо, нерастворимый материал в препарате можно удалять фильтрованием или центрифугированием на малых скоростях.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения популяцию цитозольных и/или полученных из мембраны белков, полученную из антигенных клеток, можно связать в комплекс с HSP или $\alpha 2\text{M}$ непосредственно, без обработки протеиназами или любого дополнительного процесса экстрагирования или селекции. Альтернативно, перед образованием комплекса белки можно подвергать обработке протеиназами.

4.2.2. ПЕПТИДЫ ИЗ АНТИГЕННЫХ КЛЕТОК

Согласно настоящему изобретению цитозольные и полученные из мембраны белки, полученные из антигенных клеток, можно, необязательно, подвергать ферментативной обработке для получения антигенных пептидов. В одном варианте осуществления настоящего изобретения в ферментативной обработке используют цитозольные или полученные из мембраны белки. В другом варианте осуществления настоящего изобретения цитозольные и полученные из мембраны белки объединяют в реакции ферментативного расщепления для получения антигенных пептидов. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения белковые препараты, которые используют в ферментативном расщеплении протеиназами, не подвергают каким бы то ни было способам изготовления, которые удаляют или сохраняют избирательно один или более конкретных белков из других белков в антигенных клетках, или цитозоль или мембраны антигенных клеток.

В настоящем изобретении можно использовать различные протеиназы или протеолитические ферменты для получения из белковых препаратов антигенных клеток популяции пептидов, которая включает антигенные пептиды. Ферментативное расщепление можно осуществлять индивидуально или в подходящих комбинациях с любым из протеолитических ферментов, которые хорошо известны специалистам, включая, без ограничения, трипсин, стафилококковую пептидазу I (известную также как протеиназа V8), химо tripsин, пепсин, катепсин G, термолизин, эластазу и папаин. Трипсин представляет собой высокоспецифичную сериновую протеиназу, которая расщепляет карбоксил-концевой участок лизина и аргинина. В силу ограниченного количества участков расщепления, он, как ожидается, оставляет много МНС-связывающих эпитопов интактными. Стафилококковая пептидаза I, сериновая протеиназа, обладает специфичностью в отношении расщепления после остатков глутаминовой и аспарагиновой кислоты. Ферментативное расщепление можно осуществлять одной протеиназой или смесью протеиназ. Используемые протеиназы или протеолитические ферменты инкубируют в условиях, подходящих для конкретного фермента. Предпочтительно фермент является очищенным. Неферментативные способы, такие как расщепление цианогенбромидом, также можно использовать для получения пептидов. Белковый препарат, предназначенный для ферментативного расщепления, можно разделить на аликвоты для множества реакций, в каждой из которых используются разные ферменты, и полученные пептиды можно, необязательно, объединять для использования. Может не быть необходимым полностью ферментативно расщеплять белки в ферментативных реакциях. Данные реакции приводят к генерации разнообразного и отличающегося ряда пептидов для каждого белка, который присутствует в белковом препарате. Получение различных рядов пептидов дает более высокую вероятность получения антигенных пептидов, которые способны индуцировать иммунный ответ на антигены в белковом препарате, когда их комплексируют с HSP или $\alpha 2M$. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения белковый препарат, предназначенный для ферментативного расщепления, разделяют на аликвоты для двух отдельных реакций, и два различных протеолитических фермента используют для получения двух различных рядов пептидов белков, присутствующих в белковом препарате. В зависимости от белков, ферментов и условий реакции в реакционных смесях могут оставаться нерасщепленные белки. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения трипсин и стафилококковую пептидазу I используют по отдельности для ферментативного расщепления белкового препарата.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения протеолитические ферменты, используемые в настоящем изобретении, демонстрируют сходную активность с протеолитической активностью, которая обнаруживается в протеасоме. Протеасома отвечает за экстрализосомальную, эндокаталитическую деградацию цитозольных и ядерных белков в клетке, которые имеют неправильную укладку или повреждены. Протеасома может разрушать белки полностью, до аминокислот, может генерировать оптимальные эпитопы связывания главного комплекса гистосовместимости класса I (МНС I) и может генерировать более длинные пептидные предшественники, которые могут потенциально претерпевать дальнейший тримминг где-либо в клетке для получения эпитопов цитотоксических Т-клеток. Протеасома предпочтительно расщепляет карбоксил(COOH)-участок основных, кислых и гидрофобных аминокислот. Три известные протеолитические ферментативные активности, которые присутствуют в протеасоме, представляют собой химо tripsиноподобную активность, трипсиноподобную активность и пептидилглутамилпептид-гидролизующую активность (Uebel and Tampe, 1999, Curr. Opin. Immunol. 11:2 203-208). В качестве таковых, ферменты, обладающие указанной активностью и специфичностью, можно использовать по отдельности или в комбинации для ферментативного расщепления белкового препарата. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения используют трипсин, химо tripsин и/или пептидилглутамилпептид-гидролазу.

Полученные пептидные продукты ферментативного расщепления включают антигенные пептиды, неантигенные пептиды и одиночные аминокислотные остатки. Реакционные смеси могут также содержать нерасщепленные или не полностью расщепленные антигенные белки. Продукты расщепления протеолитическими ферментами по настоящему изобретению подвергают мониторингу для генерации пептидов, которые имеют желательные пределы длины. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения полученные пептиды состоят приблизительно из 7-20 аминокислотных остатков. Большинство антигенных пептидов, которые презентуются Т-клеткам МНС класса I и класса II, находятся в указанных пределах. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения популяция пептидов включает пептиды, имеющие пределы размеров от 6 до 21, от 8 до 19, от 10 до 20 или по меньшей мере 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 45 или 50 аминокислотных остатков. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения антигенные пептиды имеют 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных остатков. Для мониторинга хода ферментативного расщепления белков можно выполнять тест-реакцию, когда из реакционной смеси изымаются малые аликвоты продукта ферментативного расщепления белков и отслеживается ход ферментативного расщепления посредством электрофореза в трицин-полиакриламидном геле ("трицин-PAGE"), высокоэффективной жидкостной хроматографии ("ВЭЖХ") или масс-спектрометрии или любого другого способа определения размера пептидов, известного специалистам. Используя подобную тест-реакцию, можно определить, когда пептидные фрагменты конкретных пределов размера будут генерированы при определенной концентрации фермента. Другие переменные параметры реакции, которыми можно манипулировать, включают количество белка в реакционной смеси, температуру, продолжительность инкубирования, присутствие кофакторов и т.п.

После установки подходящих условий для генерации пептидных фрагментов конкретных пределов размера из типа антигенной клетки, условия ферментативной реакции можно продублировать для генерации антигенных пептидов, которые можно объединять. Предпочтительно, чтобы ферментативное расщепление прекращалось до того, как пептиды будут образовывать комплекс с HSP или $\alpha 2M$. В одном варианте осуществления настоящего изобретения для терминации ферментативного расщепления можно использовать ингибиторы. Ингибиторы ферментов, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают, без ограничения, PMSF, бестатин, амастатин, лейпептин и цистатин, в зависимости от того, какие ферменты использовались для ферментативного расщепления. Ингибиторы большинства протеиназ хорошо известны специалистам. Альтернативно, другим способом терминации ферментативного расщепления является физическое удаление фермента из реакционной смеси. Это можно осуществить закреплением фермента выбора на твердой фазе, такой как смола или материал, который можно легко удалить из реакционной смеси хорошо известными способами, такими как центрифугирование или фильтрование. Белковому препарату позволяют контактировать или протекать через твердую фазу в течение определенного периода времени. Указанные иммобилизованные ферменты можно приобрести из коммерческих источников или можно изготовить с помощью процедур, хорошо известных специалистам.

В конце реакции ферментативного расщепления пептиды в препарате можно, необязательно, отделить от низкомолекулярных материалов, таких как дипептиды или отдельные аминокислотные остатки. Например, пептиды можно изолировать центрифугированием через мембрану, такую как Centriprep-3. Необязательно, пептиды можно отделить по их общим биохимическим и/или биофизическим свойствам, таким как размер, заряд или их комбинации. Для осуществления разделения можно использовать любые методики, известные специалистам, в результате чего получают препарат ферментативного расщепления белков, содержащий по меньшей мере 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 20000, 50000 или 100000 различных пептидов.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения пептиды, которые эндогенно присутствуют в антигенных клетках, можно использовать по настоящему изобретению, как в отдельности, так и в комбинации с пептидами, генерированными протеолитическим расщеплением цитозольных и полученных из мембраны белков. Пептиды, которые

5 эндогенно присутствуют в антигенных клетках, включают пептиды, которые *in vivo* образуют комплекс с HSP и/или молекулами MHC класса I и II. Согласно настоящему изобретению, данные пептиды, которые непосредственно изолируют из белкового препарата антигенных клеток, можно связать в комплекс с HSP и/или $\alpha 2M$.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения в процессе выделения

10 используют как цитозольные, так и полученные из мембраны белки. В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения цитозольные и полученные из мембраны белки в процессе выделения объединяют. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения белковые препараты, которые используют в выделении, не подвергаются каким бы то ни было способам получения, которые избирательно удаляют

15 или сохраняют один или более конкретных белков из других белков в антигенных клетках, или цитозоль или мембраны антигенных клеток. Антигенные пептиды выделяют непосредственно из белкового препарата клетки без предварительного выделения комплексов антигенных пептидов с HSP или молекулами MHC. Предпочтительно белковый препарат включает по меньшей мере 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или 20000

20 различных белков или включает по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% различных белков, присутствующих в антигенных клетках или их клеточной фракции или в вирусных частицах.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения способ включает воздействие на белковый препарат АТФ, гидрохлоридом гуанидия и/или кислотными

25 условиями, таким образом, что антигенные пептиды, которые связаны с белками, такими как HSP и молекулы MHC класса I и II в белковом препарате, могут быть элюированы. Можно использовать многие различные кислоты, включая, без ограничения, трифторуксусную кислоту. Специалистам известны способы изолирования пептидов из комплексов HSP-пептид, такие как в работе Menoret et al., 1999, Biochem. Biophys.

30 Res. Commun. 262(3):813-8, которая целиком включена в настоящий документ в качестве ссылки. Также для диссоциации белковых агрегатов можно использовать способы, известные специалистам, такие как в работе Marston and Hartley (1990, Meth. Enzymol. 182:264-276).

В частности, процесс выделения включает воздействие на белковый препарат

35 антигенных клеток АТФ, например, при комнатной температуре в течение одного часа, и/или воздействие на белковый препарат антигенных клеток трифторуксусной кислотой (TFA), например, 0,1% TFA. Воздействие, предпочтительно, включает обработку белкового препарата ультразвуком в 0,1% TFA. В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения на белковый препарат сначала воздействуют АТФ,

40 а затем обрабатывают его ультразвуком в 0,1% TFA. Перед процессом лизирования клеток и выделения можно использовать различные ингибиторы протеиназ, чтобы предотвратить или уменьшить расщепление клеточного белка, которое может привести к образованию пептидов, которые не являются эндогенно связанными с HSP или $\alpha 2M$. Например, можно использовать смесь 14 ингибиторов протеиназ: фенилметилсульфонилфторид (PMSF) 2

45 мМ, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) 1 мМ, этиленгликоль-бис (Р-аминоэтиловый эфир) N,N,N',N'-тетрауксусная кислота (EGTA) 1 мМ (все получены от компании Sigma, St. Louis, MO) и антипаин 20 мг/мл, бестатин 5 мг/мл, хемостатин 20 ттг/мл, E64 20 Jig/мл, лейпептин 1 ттг/мл, пепстатин 1 гг/мл, пефаблок 40 Аг/мл и апопротеин 1 - ткг/мл (все получены от компании Boehringer Mannheim, Indianapolis,

50 IN). Пептиды, полученные из белкового препарата, включают антигенные пептиды и неантигенные пептиды различных размеров, варьирующих в пределах от по меньшей мере 1, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 45 или 50 аминокислотных остатков. В конце процесса пептиды предпочтительно получают отделением от белков в препарате перед

образованием комплекса с HSP или $\alpha 2M$. Например, пептиды можно получать центрифугированием через мембрану, такую как Centriprep-3, сушкой в условиях вакуума или хроматографией с обращенной фазой, например фракционированием на колонке BioCad20 microanalytical HPLC Poros RH2 (Perseptive Biosystems, Cambridge, MA), уравновешенной 0,1% TFA в воде, и элюированием ацетонитрилом. Соответственно, антигенные пептиды, которые эндогенно присутствуют в антигенных клетках и которые выделяют непосредственно из белкового препарата, можно образовывать комплекс с HSP и/или $\alpha 2M$. Альтернативно, смешанную популяцию пептидов, включающую пептиды, которые эндогенно присутствуют в антигенных клетках, и пептиды из подвергнутых ферментативному расщеплению цитозольных и полученных из мембраны белков, можно образовывать комплекс с HSP и/или $\alpha 2M$.

4.3. ПОЛУЧЕНИЕ HSP И $\alpha 2M$

Согласно настоящему изобретению, антигенные пептиды, полученные из антигенных клеток, образуют комплекс с HSP и/или $\alpha 2M$. Описанные в настоящем документе в качестве примера способы можно использовать для выделения и получения HSP и $\alpha 2M$ для использования в настоящем изобретении.

Хитшоковые белки, которые в настоящем документе упоминаются взаимозаменяемым образом как стрессовые белки, пригодные для практического осуществления настоящего изобретения, можно выбирать из любых клеточных белков, которые удовлетворяют следующим критериям. Это белок, чья внутриклеточная концентрация возрастает, когда клетка подвергается воздействию стрессогенного раздражителя, он способен связываться с другими белками или пептидами, он способен высвобождать связанные белки или пептиды в присутствии аденозинтрифосфата (АТФ) или в кислотных условиях; и он представляет собой белок, демонстрирующий по меньшей мере 35% гомологичность с любым клеточным белком, имеющим указанные выше свойства.

Первыми идентифицированными стрессовыми белками были хитшоковые белки (HSP). Как следует из их названия, HSP синтезируются клеткой в ответ на тепловой шок. В настоящее время идентифицировано пять главных классов HSP на основе молекулярной массы членов семейства. Данные классы называют sHSP (малыми хитшоковыми белками), HSP60, HSP70, HSP90 и HSP100, где числа отражают приблизительную молекулярную массу HSP в килодальтонах. Помимо основных семейств HSP, белок, располагающийся в эндоплазматической сети, кальретикулин, также был идентифицирован как хитшоковый белок, способный вызывать иммунный ответ при связывании в комплекс с антигенными молекулами (Basu and Srivastava, 1999, J. Exp. Med. 189:797-202). Другие стрессовые белки, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают, без ограничения, grp78 (или BiP), протеин-дисульфид-изомеразу (PDI), HSP 110 и grp170 (Lin et al., 1993, Mol. Biol. Cell, 4:1109-1119; Wang et al., 2001, J. Immunol., 165:490-497).

Впоследствии было установлено, что многие члены данных семейств индуцируются в ответ на другие стрессогенные раздражители, включая, без ограничения, недостаточность питания, метаболические нарушения, кислородные радикалы, гипоксию и инфекцию внутриклеточными патогенами (см. работы Welch, May 1993, Scientific American 56-64; Young, 1990, Annu. Rev. Immunol. 8:401-420; Craig, 1993, Science 260:1902-1903; Gething et al., 1992, Nature 355:33-45 и Lindquist et al., 1988, Annu. Rev. Genetics 22:631-677), описания которых включены в настоящий документ в качестве ссылок.

Предполагается, что HSP/стрессовые белки, принадлежащие ко всем данным семействам, можно использовать в практическом осуществлении настоящего изобретения.

Главные HSP могут накапливаться в очень больших количествах в клетках, подвергнутых стрессу, но они наблюдаются в клетках, которые не подвергались стрессу, в малых и умеренных количествах. Например, высокоиндуцируемый HSP70 млекопитающих с трудом выявляется при нормальных температурах, но становится одним из наиболее активно синтезируемых белков в клетке после теплового шока (Welch, et al., 1985, J. Cell. Biol. 101:1198-1211). Напротив, белки HSP90 и HSP60 присутствуют в избытке при нормальных температурах в большинстве, но не во всех, клетках

млекопитающих и еще более индуцируются теплом (Lai, et al., 1984, Mol. Cell. Biol. 4: 2802-10; van Bergen en Henegouwen, et al., 1987, Genes Dev. 1:525-31).

Хитшоковые белки являются одними из наиболее консервативных существующих белков. Например, DnaK, HSP70 из *E.coli*, имеет приблизительно 50% идентичность аминокислотной последовательности с белками HSP70 из экскориатов (Bardwell, et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:848-852). Семейства HSP60 и HSP90 также демонстрируют сходно высокие уровни консерватизма внутри семейства (Hickey, et al., 1989, Mol. Cell. Biol. 9:2615-2626; Jindal, 1989, Mol. Cell. Biol. 9:2279-2283). Кроме того, было установлено, что семейства HSP60, HSP70 и HSP90 состоят из белков, которые являются родственными стрессовым белкам в последовательности, например имеют более 35% аминокислотной идентичности, но чьи уровни экспрессии не изменяются стрессом. Таким образом, полагают, что определение хитшокового белка или стрессового белка, используемое в настоящем документе, охватывает другие белки, их мутеины, аналоги и варианты, имеющие по меньшей мере от 35% до 55%, предпочтительно от 55% до 75% и наиболее предпочтительно от 75% до 85% аминокислотной идентичности с членами трех семейств, уровни экспрессии которых в клетке повышаются в ответ на стрессогенный раздражитель.

В том варианте осуществления настоящего изобретения, в котором HSP часть комплекса HSP-антиген пептид желательнo очистить от клеток, можно использовать процедуры очистки, примеры которых описаны в разделах 4.3.1-4.3.3, ниже, для очистки комплексов HSP-пептид, после чего HSP можно отделить от эндогенных комплексов HSP-пептид в присутствии АТФ или в кислотных условиях, для последующего связывания в комплекс *in vitro* с популяцией антигенных пептидов. См. работы Peng, et al., 1997, J. Immunol. Methods, 204:13-21; Li and Srivastava, 1993, EMBO J. 12:3143-3151, которые включены в настоящий документ в качестве ссылок. Несмотря на то что протоколы, описанные ниже, описаны для опухолевых клеток, их можно использовать для выделения HSP из любых инфицированных клеток и любых эукариотических клеток, например тканей, изолированных клеток или иммортализованных линий эукариотических клеток, инфицированных внутриклеточным патогеном, опухолевых клеток или линий опухолевых клеток.

4.3.1. ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА КОМПЛЕКСОВ HSP70-ПЕПТИД

Очистка комплексов HSP70-пептид была описана ранее, см., например, Udono et al., 1993, J. Exp. Med. 178:1391-1396. Процедура, которую можно использовать, представленная в качестве примера, без ограничения, описана ниже.

Сначала опухолевые клетки суспендируют в 3 объемах 1X лизисного буфера, состоящего из 30 мМ бикарбоната натрия, pH 7,5, 1 мМ PMSF. Затем центрифужный осадок обрабатывают ультразвуком на льду до тех пор, пока не лизируется >99% клеток, что определяют исследованием под микроскопом. В качестве альтернативы ультразвуковой обработке, клетки можно лизировать механическим измельчением путем гомогенизации клеток в гомогенизаторе Dounce, до тех пор, пока не лизируется >95% клеток.

Затем лизат центрифугируют при 1000 g в течение 10 минут для удаления неразрушенных клеток, ядер и другого клеточного дебриса. Полученную надосадочную жидкость повторно центрифугируют при 100000 g в течение 90 минут, надосадочную жидкость собирают, а затем смешивают с сефарозой Con A, уравновешенной физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS), содержащим 2 мМ Ca^{2+} и 2 мМ Mg^{2+} . В случае, когда клетки лизируют механическим измельчением, надосадочную жидкость разводят равным объемом 2X лизисного буфера перед смешиванием с сефарозой Con A. Надосадочной жидкости затем позволяют связываться с сефарозой Con A в течение 2-3 часов при 4°C. Материал, который остался несвязанным, собирают и диализируют в течение 36 часов (три раза, 100 объемов каждый) против 10 мМ трис-ацетата, pH 7,5, 0,1 мМ EDTA, 10 мМ NaCl, 1 мМ PMSF. Затем диализат центрифугируют при 17000 об/мин (ротатор Sorvall SS34) в течение 20 минут. Затем полученную надосадочную жидкость собирают и помещают на колонку Mono Q FPLC, уравновешенную

в 20 mM трис-ацетате, pH 7,5, 20 mM NaCl, 0,1 mM EDTA и 15 mM 2-меркаптоэтаноле. Колонку затем доводят градиентом NaCl от 20 mM до 500 mM, а затем элюируют фракции, фракционированные электрофорезом в натрий-додецилсульфат-полиакриламидном геле (SDS-PAGE), и охарактеризовывают их иммуноблоттингом с использованием подходящего

5 анти-HSP70 антитела (такого как из клона N27F3-4 от компании StressGen).

Фракции, демонстрирующие высокую иммунореактивность с анти-HSP70 антителом, объединяют, и комплексы HSP70-пептид осаждают сульфатом аммония; конкретно, с отсекающей концентрацией сульфата аммония 50%-70%. Полученный осадок затем собирают центрифугированием при 17000 об/мин (ротатор SS34 Sorvall) и промывают 70%

10 сульфатом аммония. Промытый осадок затем солюбилизируют, а любой остаточный сульфат аммония удаляют гель-фильтрацией на колонке Sephadex® G25 (Pharmacia). Если это необходимо, полученный таким способом препарат HSP70 можно повторно очистить на колонке Mono Q FPLC, как описано выше.

HSP70-пептидный комплекс можно очистить до несомненной гомогенности с помощью

15 данного способа. Обычно 1 мг HSP70-пептидного комплекса можно выделить из 1 г клеток/ткани.

Улучшенный способ очистки HSP70 включает контактирование клеточных белков с АТФ или негидролизуемым аналогом АТФ, закрепленным на твердом субстрате, таким образом, что HSP70 в лизате может связываться с АТФ или негидролизуемым аналогом АТФ, и

20 элюирование связанного HSP70. В предпочтительном способе используют колоночную хроматографию с АТФ, закрепленным на твердом субстрате (например, с АТФ-агарозой). Полученные препараты HSP70 имеют более высокую степень чистоты и не содержат контаминирующих пептидов. Выходы HSP70 также значительно увеличиваются приблизительно более чем в 10 раз.

Альтернативно, для очистки комплексов HSP70-пептид можно использовать

25 хроматографию с негидролизуемыми аналогами АДФ, вместо АТФ. В качестве примера, без ограничения, выделение HSP70, не содержащего пептидов, с использованием хроматографии с АТФ-агарозой, можно проводить следующим образом.

Клетки саркомы Meth A (500 миллионов клеток) гомогенизируют в гипотоническом

30 буфере и лизат центрифугируют при 100000 g в течение 90 минут при 4°C. Надосадочную жидкость помещают на колонку с АТФ-агарозой. Колонку промывают буфером и элюируют 5 объемами колонки 3 mM АТФ. HSP70 элюируется во фракциях с 2 по 10 всего из 15 элюированных фракций. Элюированные фракции анализируют с использованием SDS-PAGE. С помощью данной процедуры можно очищать HSP70 до несомненной

35 гомогенности.

4.3.2. ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА КОМПЛЕКСОВ HSP90-ПЕПТИД

Процедура, которую можно использовать, представленная в качестве примера, без ограничения, описана ниже.

Сначала опухолевые клетки суспендируют в 3 объемах 1X лизисного буфера,

40 состоящего из 30 mM бикарбоната натрия, pH 7,5, 1 mM PMSF. Затем центрифужный осадок обрабатывают ультразвуком на льду, до тех пор, пока не лизируется >99% клеток, что определяют исследованием под микроскопом. В качестве альтернативы ультразвуковой обработке клетки можно лизировать механическим измельчением путем гомогенизации клеток в гомогенизаторе Dounce до тех пор, пока не лизируется >95% клеток.

Затем лизат центрифугируют при 1000 g в течение 10 минут для удаления

45 неразрушенных клеток, ядер и другого клеточного дебриса. Полученную надосадочную жидкость повторно центрифугируют при 100000 g в течение 90 минут, надосадочную жидкость собирают, а затем смешивают с сефарозой Con A, уравновешенной физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS), содержащим 2 mM Ca^{2+} и 2 mM

50 Mg^{2+} . В случае, когда клетки лизируют механическим измельчением, надосадочную жидкость разводят равным объемом 2X лизисного буфера перед смешиванием с сефарозой Con A. Надосадочной жидкости затем позволяют связываться с сефарозой Con A в течение 2-3 часов при 4°C. Материал, который остался несвязанным, собирают и

диализируют в течение 36 часов (три раза, 100 объемов каждый) против 10 мМ трис-ацетата, pH 7,5, 0,1 мМ EDTA, 10 мМ Nad, 1 мМ PMSF. Затем диализат центрифугируют при 17000 об/мин (ротатор Sorvall SS34) в течение 20 минут. Затем полученную надосадочную жидкость собирают и помещают на колонку Mono Q FPLC, уравновешенную

5 лизисным буфером. Затем элюируют белки с градиентом NaCl от 200 мМ до 600 мМ.

Элюированные фракции фракционируют с использованием SDS-PAGE, и фракции, содержащие HSP90-пептидные комплексы, идентифицируют иммуноблоттингом с использованием анти-HSP90 антитела, такого как 3G3 (Affinity Bioreagents). HSP90-пептидные комплексы можно очистить до несомненной гомогенности с помощью данного

10 способа. Обычно 150-200 мкг HSP90-пептидного комплекса можно выделить из 1 г клеток/ткани.

4.3.3. ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА КОМПЛЕКСОВ CP96-ПЕПТИД

Процедура, которую можно использовать, представленная в качестве примера, без ограничения, описана ниже.

15 Центрифужный осадок опухолевых клеток суспендируют в 3 объемах буфера, состоящего из 30 мМ бикарбоната натрия (pH 7,5) и 1 мМ PMSF, и клетки оставляют набухать на льду в течение 20 минут. Затем центрифужный осадок клеток гомогенизируют в гомогенизаторе Dounce (подходящий клиренс гомогенизатора будет варьироваться в зависимости от типа клеток) на льду, до тех пор, пока не лизируется >95% клеток.

20 Лизат центрифугируют при 1000 g в течение 10 минут для удаления неразрушенных клеток, ядер и другого клеточного дебриса. Полученную на данном этапе центрифугирования надосадочную жидкость затем повторно центрифугируют при 100000 g в течение 90 минут. Комплекс gr96-пептид можно выделять из осадка после центрифугирования при 100000 g или из надосадочной жидкости.

25 В случае, когда выделение происходит из надосадочной жидкости, надосадочную жидкость разбавляют равным объемом 2X лизисного буфера и надосадочную жидкость смешивают в течение 2-3 часов при 4°C с сефарозой Con A, уравновешенной PBS, содержащим 2 мМ Ca²⁺ и 2 мМ Mg²⁺. Затем взвесь помещают на колонку и промывают 1X лизисным буфером, до тех пор, пока величина ОП₂₈₀ не уменьшится до исходного

30 значения. Затем колонку промывают 1/3 колоночного объема

10% α-метилманнозидом (α-MM), растворенным в PBS, содержащем 2 мМ Ca²⁺ и 2 мМ Mg²⁺, колонку герметизируют кусочком парафильма и инкубируют при 37°C в течение 15 минут.

35 Затем колонку охлаждают до комнатной температуры, а парафильм удаляют со дна колонки. На колонку помещают пять колоночных объемов буфера α-MM и элюат анализируют с помощью SDS-PAGE. Обычно полученный материал имеет степень чистоты около 60-95%, однако это зависит от типа клеток и использованного соотношения ткань-лизисный буфер. Затем полученный образец помещают на колонку Mono Q FPLC (Pharmacia), уравновешенную буфером, содержащим 5 мМ фосфат натрия, pH 7. Затем из

40 колонки элюируют белки с градиентом NaCl 0-1 М, а фракция gr96 элюируется между 400 мМ до 550 мМ NaCl.

Данную процедуру, однако, можно модифицировать двумя дополнительными этапами, используемыми по отдельности или в комбинации, для надежного получения четко

45 гомогенных комплексов gr96-пептид. Один необязательный этап включает осаждения сульфатом аммония до этапа очистки с Con A, а другой необязательный этап включает очистку с DEAE-сефарозой после этапа очистки с Con A, но до этапа с Mono Q FPLC.

На первом необязательном этапе, описанном для примера следующим образом, надосадочную жидкость, полученную после этапа центрифугирования при 100000 g, доводят до конечной концентрации 50% сульфата аммония добавлением сульфата

50 аммония. Сульфат аммония добавляют медленно при осторожном перемешивании раствора в химическом стакане, помещенном на поддон с ледяной водой. Раствор перемешивают в течение приблизительно от 4 до 12 часов при 4°C, и полученный раствор

центрифугируют на 6000 об/мин (ротор Sorvall SS34). Полученную на данном этапе надосадочную жидкость удаляют, доводят до 70% насыщения сульфата аммония добавлением раствора сульфата аммония и центрифугируют на 6000 об/мин (ротор Sorvall SS34). Полученный на данном этапе центрифужный осадок собирают и суспендируют в PBS, содержащем 70% сульфата аммония, чтобы промыть центрифужный осадок. Данную смесь центрифугируют на 6000 об/мин (ротор Sorvall SS34) и центрифужный осадок растворяют в PBS, содержащем 2 мМ Ca^{2+} и Mg^{2+} . Нерастворившийся материал удаляют кратковременным центрифугированием на 15000 об/мин (ротор Sorvall SS34). Затем раствор смешивают с сефарозой Con A и процедуру повторяют.

На втором необязательном этапе, описанном для примера следующим образом, фракции, содержащие gr96, элюированные из колонки Con A, объединяют и буфер заменяют на 5 мМ буфер фосфата натрия, pH 7, 300 мМ NaCl диализом или предпочтительно заменой буфера на колонке Sephadex G25. После замены буфера раствор смешивают с DEAE-сефарозой, предварительно уравновешенной 5 мМ буфером фосфата натрия, pH 7, 300 мМ NaCl. Белковый раствор и гранулы осторожно перемешивают в течение 1 часа и выливают на колонку. Затем колонку промывают 5 мМ буфером фосфата натрия, pH 7, 300 мМ NaCl, до тех пор, пока поглощение на 280 нм не уменьшится до исходного значения. Затем связанный белок элюируют из колонки пятью объемами 5 мМ буфера фосфата натрия, pH 7, 700 мМ NaCl. Фракции, содержащие белок, объединяют и разбавляют 5 мМ буфером фосфата натрия, pH 7, чтобы уменьшить концентрацию соли до 175 мМ. Полученный материал затем помещают на колонку Mono Q FPLC (Pharmacia), уравновешенную 5 мМ буфером фосфата натрия, pH 7, и белок, который связывается на колонке Mono Q FPLC (Pharmacia), элюируют, как описано выше.

Специалист оценит тот факт, что с помощью обычного экспериментирования можно получить преимущества от внедрения в протокол очистки второго необязательного этапа. Кроме того, следует также оценить тот факт, что выгода от добавления каждого из необязательных этапов будет зависеть от источника исходного материала.

В случае, когда gr96 фракцию выделяют из осадка, полученного центрифугированием при 100000 g, центрифужный осадок суспендируют в 5 объемах PBS, содержащего 1% дезоксихолата натрия или 1% октилглюкопиранозида (но без Mg^{2+} и Ca^{2+}), и инкубируют на льду в течение 1 часа. Суспензию центрифугируют при 20000 g в течение 30 минут, а полученную надосадочную жидкость диализируют против нескольких перемен PBS (также без Mg^{2+} и Ca^{2+}) для удаления детергента. Диализат центрифугируют при 100000 g в течение 90 минут, надосадочную жидкость собирают и добавляют кальций и магний к надосадочной жидкости до получения конечных концентраций 2 мМ, соответственно. Затем образец очищают немодифицированным или модифицированным способом для выделения комплекса gr96-пептид из надосадочной жидкости, полученной центрифугированием при 100000 g, см. выше.

Комплексы gr96-пептид можно очистить до несомненной гомогенности с помощью данной процедуры. Из 1 г клеток/ткани можно выделить приблизительно 10-20 мкг gr96.

4.3.3. ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА $\alpha 2\text{M}$

Альфа-2-макроглобулин можно приобрести из коммерческих источников или получить выделением его из человеческой крови. Для выделения $\alpha 2\text{M}$ из крови в качестве примера можно использовать следующий неограничивающий протокол.

У субъекта забирают кровь и позволяют ей свернуться. Затем ее центрифугируют в течение 30 минут при 14000 g для получения сыворотки, которую затем помещают на колонку для гель-фильтрации (Sephacryl S-300R), уравновешенную 0,04 М трис-буфером, pH 7,6, плюс 0,3 М NaCl. Приблизительно для 10 мл сыворотки используют 65 мл колонку. Собирают фракции по 3 мл, и каждую фракцию тестируют на наличие $\alpha 2\text{M}$ анализом дот-блоттинг, с использованием специфичного в отношении $\alpha 2\text{M}$ антитела. Фракции, положительные по $\alpha 2\text{M}$, объединяют и помещают на колонку PD10 для замены буфера на 0,01 М буфер фосфата натрия, pH 7,5, с PMSF. Объединенные фракции затем помещают на колонку Con A (10 мл), уравновешенную фосфатным буфером. Колонку промывают и

белок элюируют 5% пиранозидом метилманнозы. Элюент пропускают через колонку PD 10 для замены буфера на буфер ацетата натрия (0,05 М; pH 6,0). Затем колонку DEAE уравнивают ацетатным буфером и образец помещают на колонку DEAE. Колонку промывают и белок элюируют 0,13 М ацетатом натрия. Затем фракции с $\alpha 2M$ объединяют.

5 С помощью данной процедуры $\alpha 2M$ можно очищать до несомненной гомогенности, что показывает электрофорез в додецилсульфат-натрий-полиакриламидном геле.

4.3.5. РЕКОМБИНАНТНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ХИТШОКОВЫХ БЕЛКОВ И $\alpha 2M$

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения HSP и $\alpha 2M$ можно
 10 получать из клеток, которые экспрессируют высокие уровни HSP и $\alpha 2M$, посредством рекомбинантных методик. Аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности многих HSP и $\alpha 2M$ обычно доступны в базах данных последовательностей, такие как GenBank. Для поиска в базе данных можно использовать компьютерные программы, такие как Entrez, и доставлять любые данные об
 15 аминокислотных последовательностях и генетических последовательностях, представляющих интерес, по номеру доступа. Можно также производить поиск в указанных базах данных для идентификации последовательностей с различными степенями сходности с изучаемой последовательностью с использованием программ, таких как FASTA и BLAST, которые выстраивают ранг сходных последовательностей по линейным баллам и статистике. Указанные нуклеотидные последовательности неограничивающих примеров
 20 HSP, которые можно использовать для композиций, способов и получения комплексов HSP-пептид по настоящему изобретению, являются следующими: человеческий HSP70, доступ в GenBank №M24743, Hunt et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82:6455-6489; человеческий HSP90, доступ в GenBank №X15183, Yamazaki et al., Nucl. Acids Res. 17: 7108; человеческий gp96: доступ в GenBank №X15187, Maki et al., 1990, Proc. Natl.
 25 Acad. Sci USA 87:5658-5562; человеческий BiP: доступ в GenBank №M19645; Ting et al., 1988, DNA 7: 275-286; человеческий HSP27, доступ в GenBank №M24743; Hickey et al., 1986, Nucleic Acids Res. 14:4127-45; мышинный HSP70: доступ в GenBank №M35021, Hunt et al., 1990, Gene 87:199-204; мышинный gp96: доступ в GenBank №M16370, Srivastava et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:3807-3811 и мышинный BiP: доступ в GenBank
 30 №U16277, Haas et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:2250-2254. Можно использовать также вырожденные последовательности HSP.

Используемый в настоящем документе термин " $\alpha 2M$ " охватывает другие полипептидные фрагменты, аналоги и варианты $\alpha 2M$, имеющие аминокислотную идентичность с $\alpha 2M$ по
 35 меньшей мере от 35% до 55%, предпочтительно от 55% до 75% и наиболее предпочтительно от 75% до 85% и способные образовывать комплекс с антигенным пептидом; указанный комплекс способен захватываться антиген-презентирующей клеткой и вызывать иммунный ответ против антигенной молекулы. Молекулу $\alpha 2M$ по настоящему изобретению можно приобрести из коммерческих источников или выделить из натуральных
 40 источников (Kurecki et al., 1979, Anal. Biochem. 99:415-420), синтезировать химически или получить рекомбинантным путем. Неограничивающие примеры последовательностей $\alpha 2M$, которые можно использовать для получения $\alpha 2M$ полипептидов по настоящему изобретению, следующие: доступ в GenBank №№MI 1313, P01023, AAA51551; Kan et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci USA 82:2282-2286. Можно также
 45 использовать вырожденную последовательность, кодирующую $\alpha 2M$.

После идентификации нуклеотидной последовательности, кодирующей HSP или $\alpha 2M$ выбора, нуклеотидную последовательность или ее фрагмент можно получить и клонировать в вектор экспрессии для рекомбинантной экспрессии. Вектор экспрессии можно внедрить в клетку-хозяин для размножения HSP или $\alpha 2M$. Способы
 50 рекомбинантного получения HSP или $\alpha 2M$ подробно описаны ниже.

ДНК можно получить амплификацией ДНК или молекулярным клонированием непосредственно из ткани, клеточной культуры или клонированной ДНК (например, "библиотеки" ДНК) с использованием стандартных методик молекулярной биологии (см.,

например, работы Methods in Enzymology, 1987, том 154, Academic Press; Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2-е издание. Cold Spring Harbor Press, New York; и Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. (изд.), Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, каждая из которых

5 целиком включена в настоящий документ в качестве ссылки). Клоны, полученные из геномной ДНК, могут содержать регуляторные и интронные области ДНК, помимо кодирующих областей; клоны, полученные из кДНК, будут содержать только экзонные последовательности. Независимо от их источника ген HSP или $\alpha 2M$ должен быть клонирован в подходящий вектор для размножения гена.

10 В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения ДНК можно амплифицировать из геномной или кДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплификации с использованием праймеров, построенных из известной последовательности родственного или гомологичного HSP или $\alpha 2M$. ПЦР используют для амплификации желательной последовательности в клоне ДНК или геномной или кДНК

15 библиотеке, перед селекцией. ПЦР можно осуществлять, например, с использованием термального циклера или Taq-полимеразы (Gene AMP®). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) широко используют для получения генов или фрагментов генов, представляющих интерес. Например, нуклеотидную последовательность, кодирующую HSP или $\alpha 2M$ любой желательной длины, можно генерировать с использованием ПЦР-праймеров, которые

20 фланкируют нуклеотидную последовательность, кодирующую открытую рамку считывания. Альтернативно, последовательность гена HSP или $\alpha 2M$ можно расщеплять в подходящих участках рестрикционной эндонуклеазой (эндонуклеазами), если указанные участки доступны, высвобождая фрагмент ДНК, кодирующий ген HSP или $\alpha 2M$. Если подходящие участки рестрикции не доступны, их можно создать на подходящих позициях с помощью

25 сайт-направленного мутагенеза и/или способами амплификации ДНК, известными специалистам (см., например, Shankarappa et al., 1992, PCR Method Appi. 1:277-278). Фрагмент ДНК, который кодирует HSP или $\alpha 2M$, затем выделяют и лигируют в подходящий вектор экспрессии, предпринимая меры для того, чтобы гарантировать сохранение

30 должной трансляционной рамки считывания.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, для молекулярного клонирования гена HSP или $\alpha 2M$ из геномной ДНК генерируют фрагменты ДНК для формирования геномной библиотеки. Поскольку некоторые из последовательностей, кодирующих родственные HSP или $\alpha 2M$, являются доступными и

35 могут быть выделены и помечены, клонированные фрагменты ДНК в библиотеке геномной ДНК можно подвергать скринингу путем гибридизации нуклеиновой кислоты в меченый зонд (Benton and Davis, 1977, Science 196: 180; Grunstein and Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci USA 72:3691). Те фрагменты ДНК, которые являются практически гомологичными зонду, будут гибридизироваться. Также возможно идентифицировать подходящий

40 фрагмент рестрикционным ферментативным расщеплением (расщеплениями) и сравнивать размеры фрагментов с теми, которые ожидаются, согласно известной рестрикционной карте.

Альтернативы изоляции геномной ДНК HSP или $\alpha 2M$ включают, без ограничения, химический синтез самой генной последовательности из известной последовательности

45 или синтез кДНК в мРНК, которая кодирует HSP или $\alpha 2M$. Например, РНК для клонирования кДНК гена HSP или $\alpha 2M$ можно изолировать из клеток, которые экспрессируют HSP или $\alpha 2M$. Библиотеку кДНК можно создать способами, известными специалистам, и производить скрининг такими способами, как те, которые описаны для скрининга библиотеки геномной ДНК. Если антитело против HSP или $\alpha 2M$ является

50 доступным, HSP или $\alpha 2M$ можно идентифицировать связыванием антитела с клонами, синтезирующими HSP или $\alpha 2M$.

Другие конкретные варианты клонирования нуклеотидной последовательности, кодирующей HSP или $\alpha 2M$, представлены в качестве примеров, без ограничения,

следующим образом: в конкретном варианте осуществления настоящего изобретения нуклеотидные последовательности, кодирующие HSP или $\alpha 2M$, могут быть идентифицированы и получены гибридизацией с зондом, включающим нуклеотидную последовательность, кодирующую HSP или $\alpha 2M$, при различных условиях строгости, которые хорошо известны специалистам (включая те, которые применяют при межвидовых гибридизациях).

Любую методику мутагенеза, известную специалистам, можно использовать для модификации отдельных нуклеотидов в последовательности ДНК, для целей замены (замен) аминокислот в экспрессируемой пептидной последовательности или для создания/устранения сайтов рестрикции для облегчения дальнейших манипуляций. Такие методики включают, без ограничения, химический мутагенез, сайт-направленный мутагенез *in vitro* (Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551), олигонуклеотид-направленный мутагенез (Smith, 1985, Ann. Rev. Genet. 19: 423-463; Hill et al., 1987, Methods Enzymol. 155:558-568), перекрывающее растяжение на основе ПЦР (Ho et al., 1989, Gene 77:51-59), мегапраймерный мутагенез на основе ПЦР (Sarkar et al., 1990, Biotechniques 8:404-407) и т.п. Модификации можно подтверждать секвенированием двухцепочечной дидезоксинуклеотидной ДНК.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения в практическом осуществлении способов по настоящему изобретению используют нуклеиновую кислоту, кодирующую секреторную форму несекретированного HSP. Указанную нуклеиновую кислоту можно сконструировать делецией кодирующей последовательности для ретенционного сигнала ER, KDEL. Необязательно, последовательность, кодирующую KDEL, заменяют молекулярной меткой для облегчения распознавания и выделения HSP, такого как Fc-часть мышиного IgG1. В другом варианте осуществления настоящего изобретения молекулярную метку можно добавлять к секретируемым в естественных условиях HSP или $\alpha 2M$. PCT публикация №WO 99/42121 показывает, что делеция ретенционного сигнала ER gp96 приводит к секреции комплексов gp96-Ig-пептид из трансфицированных опухолевых клеток, и слияние gp96, не имеющего KDEL, с мышиным IgG1 облегчает его обнаружение с помощью анализа ELISA и FACS и очистку с помощью аффинной хроматографии с использованием белка A.

4.3.5.1. ЭКСПРЕССИОННЫЕ СИСТЕМЫ

Нуклеотидные последовательности, кодирующие молекулу HSP или $\alpha 2M$, можно вставить в вектор экспрессии для размножения и экспрессии в рекомбинантных клетках. Экспрессионная конструкция, как этот термин используется в настоящем документе, относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей HSP или $\alpha 2M$, оперативно связанной с одной или более регуляторных областей, которая позволяет экспрессировать молекулу HSP или $\alpha 2M$, в подходящей клетке-хозяине. "Оперативно связанный" относится к связи, в которой регуляторные области и полипептидная последовательность HSP или $\alpha 2M$, которая предназначена для экспрессии, соединены и позиционированы таким образом, чтобы была возможной транскрипция и, в конечном итоге, трансляция последовательности HSP или $\alpha 2M$. Для экспрессирования HSP или $\alpha 2M$ можно использовать различные векторы экспрессии, включая, без ограничения, плазмиды, космиды, фаг, фагмиды или модифицированные вирусы. Примеры включают бактериофаги, такие как производные лямбда, или плазмиды, такие как производные плазмиды pBR322 или pUC, или вектор Bluescript (Stratagene). Обычно указанные векторы экспрессии включают функциональный репликатор для размножения вектора в подходящей клетке-хозяине, один или более сайтов рестрикции эндонуклеазы для инсерции последовательности гена HSP или $\alpha 2M$ и один или более селективных маркеров.

Для экспрессии HSP или $\alpha 2M$ в клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать ряд регуляторных областей, например ранние и поздние промоторы SV40, немедленный ранний промотор цитомегаловируса (CMV) и промотор длинного концевой повтора вируса саркомы Рауса (RSV-LTR). Индуцибельные промоторы, которые могут быть полезными в

клетках млекопитающих, включают, без ограничения, такие промоторы, которые связаны с геном металлотионеина II, чувствительными к глюкокортикоидам длинными концевыми повторами мышиного вируса опухоли молочной железы (MMTV-LTR), геном β -интерферона и геном HSP70 (Williams et al., 1989, Cancer Res. 49:2735-42; Taylor et al., 1990, Mol. Cell. Biol. 10:165-75). Эффективность экспрессии HSP или α 2M в клетке-хозяине можно

усилить включением подходящих транскрипционных энхансерных элементов в вектор экспрессии, такие как элементы, обнаруженные в вирусе SV40, вирусе гепатита В, цитомегаловирусе, генах иммуноглобулина, металлотионеина, β -актина (см. Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153: 516-544; German, 1990, Curr. Op. in Biotechnol. 1:36-47).

Вектор экспрессии может также содержать последовательности, которые позволяют поддерживать и реплицировать вектор в более чем одном типе клетки-хозяина, или интегрировать вектор в хромосому хозяина. Указанные последовательности могут включать, без ограничения, репликаторы, автономно реплицирующиеся последовательности (ARS), центромерная ДНК и теломерная ДНК. Также может быть

выгодным использование челночных векторов, которые могут реплицироваться и поддерживаться по меньшей мере в двух типах клеток-хозяев.

Помимо этого, вектор экспрессии могут содержать селектируемые или отбираемые маркерные гены для первичного выделения или идентификации клеток-хозяев, которые содержат ДНК, кодирующую HSP или α 2M. Для долгосрочной выработки HSP или α 2M с высоким выходом предпочтительна стабильная экспрессия в клетках млекопитающих. Для клеток млекопитающих можно использовать ряд селективных систем, включая, без ограничения, гены тимидин-киназы вируса простого герпеса (Wigler et al., 1977, Cell 11:223), гипоксантин-гуаниновой фосфорибозил-трансферазы (Szybalski and Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026) и адениновой фосфорибозил-трансферазы (Lowy et al., 1980, Cell 22:817), которые можно использовать в клетках tk^- , $hgprt^-$ или $aprt^-$ соответственно. Также можно использовать резистентность к антиметаболитам в качестве основы селекции на дигидрофолат-редуктазу ($dhfr$), которая сообщает резистентность к метотрексату (Wigler et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Ha et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527), gpt , которая сообщает резистентность к микофеноловой кислоте (Mulligan and Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); неомицин-фосфотрансферазу (neo), которая сообщает резистентность к аминогликозиду G-418 (Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1) и гидромицин-фосфотрансферазу (hyg), которая сообщает резистентность к гидромицину (Santerre et al., 1984, Gene 30: 147). Также можно использовать другие селектируемые маркеры, такие как, без ограничения, гистидинол и ZeocinTM.

Экспрессионную конструкцию, включающую последовательность, кодирующую HSP или α 2M, оперативно связанную с регуляторными областями, можно непосредственно вводить в подходящие клетки-хозяева для экспрессии и выработки комплексов HSP или α 2M по настоящему изобретению, без дальнейшего клонирования (см., например, патент США №5580859). Экспрессионные конструкции также могут содержать последовательности ДНК, которые облегчают интеграцию кодирующей последовательности в геном клетки-хозяина, например, посредством гомологичной рекомбинации. В данном случае нет необходимости применять вектор экспрессии, включающий репликатор, удобный для подходящих клеток-хозяев, для размножения и экспрессии молекулы HSP или α 2M в клетках-хозяевах.

Экспрессионные конструкции, содержащие клонированные последовательности, кодирующие HSP или α 2M, можно вводить в клетку-хозяина млекопитающего посредством различных методик, известных специалистам, включая, без ограничения, трансфекцию, опосредованную фосфатом кальция (Wigler et al., 1977, Cell 11:223-232), трансфекцию, опосредованную липосомами (Schaefer-Ridder et al., 1982, Science 215:166-168), электропорацию (Wolff et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3344) и микроинъекцию (Carpechi, 1980, Cell 22: 479-488).

Любой из клонирующих или экспрессирующих векторов, описанных в настоящем документе, можно синтезировать и собрать из известных последовательностей ДНК с помощью методик, хорошо известных специалистам. Регуляторные области и энхансерные элементы могут иметь различное происхождение, как натуральное, так и синтетическое.

5 Некоторые векторы и клетки-хозяева можно приобрести коммерческим путем. Неограничивающие примеры пригодных векторов описаны в приложении 5 *Current Protocols in Molecular Biology*, 1988, ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, которое включено в настоящий документ в качестве ссылки, и в каталогах коммерческих поставщиков, таких как Clontech Laboratories, Stratagene Inc., и Invitrogen, Inc.

10 Альтернативно, ряд экспрессионных систем на основе вирусов также можно использовать с клетками млекопитающих для рекомбинантной экспрессии HSP или $\alpha 2M$. Векторы, использующие ДНК скелеты вирусов, были получены из обезьяньего вируса 40 (SV40) (Hamer et al., 1979, *Cell* 17:725), аденовируса (Van Doren et al., 1984, *Mol. Cell Biol.* 4:1653), аденоассоциированного вируса (McLaughlin et al., 1988, *J. Virol.* 62:1963) и вируса папилломы крупного рогатого скота (Zinn et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4897). В случаях, когда в качестве вектора экспрессии используют аденовирус, последовательность донорской ДНК можно лигировать с контрольной областью транскрипции/трансляции аденовируса, например, поздним промотором и трехчленной лидерной последовательностью. Данный химерный ген затем можно вставить

20 в геном аденовируса с помощью рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Вставка в неэссенциальную область вирусного генома (например, в область E1 или E3) дает рекомбинантный вирус, который является жизнеспособным и способным экспрессировать гетерологичные продукты в инфицированных хозяевах (см., например, Logan and Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659).

25 Вирус папилломы крупного рогатого скота (BPV) может инфицировать многих высших позвоночных, включая человека, и его ДНК реплицируется как эписома. Для экспрессии рекомбинантного гена разработан ряд челночных векторов, которые существуют в клетках млекопитающих как стабильные многокопийные (20-300 копий на клетку) экстрахромосомные элементы. Обычно данные векторы содержат сегмент ДНК BPV (весь

30 геном или 69% трансформирующий фрагмент), промотор с обширным рядом хозяев, сигнал полиаденилирования, сигналы сплайсинга, селектируемый маркер и "неудовольствие" плазмидные последовательности, которые позволяют вектору размножаться в *E. coli*. После конструирования и амплификации в бактериях конструкцию экспрессируемого гена трансфицируют в культивируемые клетки млекопитающих, например, посредством

35 методики соосаждения фосфатом кальция или электропорации. Для тех клеток, которые не манифестируют трансформированный фенотип, селекция трансформантов достигается использованием доминантного селектируемого маркера, такого как устойчивость к гистидинолу и G418. Например, векторы BPV, такие как pBCMGSNeo и pBCMHis, можно использовать для экспрессирования HSP или $\alpha 2M$ (Karasuyama et al., *Eur. J. Immunol.*

40 18: 97-104; Ohe et al., *Human Gene Therapy* 6:325-33), которые затем можно трансфектировать в целый ряд клеточных типов для экспрессирования HSP или $\alpha 2M$.

Альтернативно, можно использовать промотор вируса коровьей оспы 7,5K (см., например, Mackett et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7415-7419; Mackett et al., 1984, *J. Virol.* 49: 857-864; Panicali et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

45 79: 4927-4931). В случаях, когда используют человеческую клетку-хозяина, можно использовать векторы на основе репликатора (OriP) вируса Эпштейна-Барра (EBV) и ядерный антиген 1 EBV (EBNA-1; трансдействующий фактор репликации). Указанные векторы можно использовать для обширного ряда человеческих клеток-хозяев, например EBO-pCD (Spickofsky et al., 1990, *DNA Prot. Eng. Tech.* 2:14-18), pDR2 и λ DR2 (от компании

50 Clontech Laboratories).

Экспрессии рекомбинантного HSP или $\alpha 2M$ можно добиться с помощью экспрессионной системы на основе ретровируса. В противоположность трансфекции, ретровирусы могут эффективно инфицировать и трансформировать гены в обширный ряд клеточных типов,

включая, например, первичные гемопоэтические клетки. В ретровирусах, таких как вирус мышиного лейкоза Moloney, большинство последовательностей генов вируса можно удалить и заменить на последовательность, кодирующую HSP или $\alpha 2M$, в то время как утраченные вирусные функции можно обеспечить в trans. Рядом хозяев для инфекции ретровирусным вектором также можно манипулировать посредством выбора оболочки, используемой для упаковки вектора.

Например, ретровирусный вектор может включать 5' длинный концевой повтор (LTR), 3' LTR, сигнал упаковки, бактериальный репликатор и селектируемый маркер. ДНК ND-ассоциированного антигенного пептида вставляют на позицию между 5' LTR и 3' LTR, таким образом, что транскрипция с промотора 5' LTR транскрибирует клонированную ДНК. 5' LTR включает промотор, включая, без ограничения, промотор LTR, R-область, H5-область и сайт связывания праймера, в указанном порядке. Нуклеотидные последовательности указанных элементов LTR хорошо известны специалистам. В вектор экспрессии также можно включать гетерологичный промотор, а также множественные лекарственные селективные маркеры, чтобы облегчить отбор инфицированных клеток (см. McLaughlin et al., 1990, Prog. Nucleic Acid Res. and Molec. Biol. 38:91-135; Morgenstern et al., 1990, Nucleic Acid Res. 18:3587-3596; Chouluka et al., 1996, J. Virol. 70:1792-1798; Boesen et al., 1994, Biotherapy 6:291-302; Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141 и Grossman and Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114).

Рекомбинантные клетки можно культивировать в стандартных условиях температуры, времени инкубации, оптической плотности и состава сред. Альтернативно, клетки можно культивировать в условиях, превосходящих питательные и физиологические потребности клетки, в которой эндогенно экспрессируется HSP. Модифицированные условия культивирования и среды можно использовать для увеличения выработки комплексов HSP-пептид. Например, рекомбинантные клетки можно выращивать в условиях, которые ускоряют индуцируемую экспрессию HSP.

Полипептиды альфа-2-макроглобулина и HSP по настоящему изобретению могут экспрессироваться как слитые белки для облегчения их выделения и очистки из клеток, в которых они экспрессируются. Например, полипептид HSP или $\alpha 2M$ может содержать лидерный пептид сигнальной последовательности для направления его транслокации через ER мембрану для секреции в культуральную среду. Далее, полипептид HSP или $\alpha 2M$ может содержать аффинную метку, такую как аффинная метка, слитая с любой частью полипептида HSP или $\alpha 2M$, не участвующей в связывающем антигенном пептиде, такой как, например, карбоксильный конец. Аффинную метку можно использовать для облечения выделения белка путем связывания с аффинной партнерской молекулой-партнером.

Различные способы получения указанных слитых белков хорошо известны специалистам. Манипуляции, которые приводят к их выработке, могут иметь место на генном или белковом уровне, предпочтительно на генном уровне. Например, клонированную кодирующую область полипептида HSP или $\alpha 2M$ можно модифицировать любым из многочисленных способов рекомбинантной ДНК, известных специалистам (Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Ausubel et al., cm. Chapter 8, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York). Из следующего обсуждения будет ясно, что замещения, делеции, инсерции или любые их комбинации внедрены или скомбинированы для получения конечной нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид HSP или $\alpha 2M$.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения слитые белки, включающие полипептид HSP или $\alpha 2M$, могут быть получены с использованием методики рекомбинантной ДНК. Например, рекомбинантный ген, кодирующий полипептид HSP или $\alpha 2M$, можно сконструировать путем введения фрагмента гена HSP или $\alpha 2M$ в подходящей рамке считывания в вектор, содержащий последовательность аффинной

метки, таким образом, что полипептид HSP или $\alpha 2M$ экспрессируется как слитый белок с пептидной меткой. Аффинные метки, которые могут распознаваться специфичными связывающими партнерами, можно использовать для аффинной очистки полипептида HSP или $\alpha 2M$.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения аффинная метка слита своим аминоконцом с карбоксильным концом HSP или $\alpha 2M$. Точный участок, на котором осуществляется слияние по карбоксильному концу, не является существенным. Оптимальный участок можно определить с помощью рутинного экспериментирования.

Можно использовать ряд аффинных меток, известных специалистам, таких как, без ограничения, константные области иммуноглобулина, полигистидиновая последовательность (Petty, 1996, Metal-chelate affinity Chromatography, см. Current Protocols in Molecular Biology, Vol 2, Ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. and Wiley Interscience), глутатион-S-трансфераза (GST; Smith, 1993, Methods Mol. Cell Biol. 4:220-229), белок, связывающий мальтозу E.coli (Guan et al., 1987, Gene 67:21-30), и различные домены, связывающие целлюлозу (патенты США №№5496934, 5202247, 5137819; Tomme et al., 1994, Protein Eng. 7:117-123) и т.п. Другие аффинные метки могут сообщать свойства флуоресценции полипептиду HSP или $\alpha 2M$, например части зеленого флуоресцентного белка и т.п. Другие возможные аффинные метки представляют собой аминокислотные последовательности, к которым имеются моноклональные антитела, такие как, без ограничения, следующие хорошо известные примеры, эпитоп FLAG, мус эпитоп на аминокислотах 408-439, эпитоп гемагглютинаина (HA) вируса гриппа. Другие аффинные метки распознаются специфичными связывающими партнерами и, таким образом, облегчают выделение путем аффинного связывания со связывающим партнером, который может быть иммобилизован на твердом носителе. Некоторые аффинные метки могут сообщать полипептиду HSP или $\alpha 2M$ новые структурные свойства, такие как способность образовывать мультимеры. Димеризация полипептида HSP или $\alpha 2M$ со связанным пептидом может повысить avidность взаимодействия между полипептидом HSP или $\alpha 2M$ и его партнером в ходе презентации антигенов. Указанные аффинные метки обычно получают из белков, которые в норме существуют в виде гомополимеров. Такие аффинные метки как внеклеточные домены CD8 (Shiue et al., 1988, J. Exp. Med. 168: 1993-2005), или CD28 (Lee et al., J. Immunol. 145:344-352), или части молекулы иммуноглобулина, содержащие сайты для межцепочечных дисульфидных связей, могут приводить к образованию мультимеров. Специалисты оценят тот факт, что можно использовать множество способов для получения кодирующей области упомянутых выше аффинных меток, включая, без ограничения, клонирование ДНК, амплификацию ДНК и синтетические способы. Некоторые из аффинных меток и реагентов для их выявления и выделения доступны из коммерческих источников.

Предпочтительной аффинной меткой является невариабельная часть молекулы иммуноглобулина. Обычно указанные части включают по меньшей мере функциональный оперативный домен CH2 и CH3 константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Слияния также осуществляют с использованием карбоксильного конца Fc части константного домена, или области, непосредственно аминоконцевой по отношению с CH1 тяжелой или легкой цепи. Подходящую аффинную метку на основе иммуноглобулина можно получить из подтипов IgG-1, -2, -3 или -4, IgA, IgE, IgD или IgM, но предпочтительно, IgG1. Предпочтительно, человеческий иммуноглобулин используют тогда, когда полипептид HSP или $\alpha 2M$ предназначается для применения in vivo для человека. Многие ДНК, кодирующие константные области легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина, известны или легко доступны из библиотек кДНК. См., например, Adams et al., Biochemistry, 1980, 19:2711-2719; Gough et al., 1980, Biochemistry, 19:2702-2710; Dolby et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:6027-6031; Rice et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:7862-7865; Falkner et al., 1982, Nature, 298:286-288 и Morrison et al., 1984, Ann. Rev. Immunol., 2:239-256. Поскольку для выявления иммуноглобулинов имеется множество иммунологических реагентов и систем мечения,

слитый белок HSP или $\alpha 2M$ полипептид-Ig можно легко выявлять и определять его количественно с помощью разнообразных иммунологических методик, известных специалистам, таких как использование твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), иммунопреципитации, клеточного сортирования с возбуждением флуоресценции (FACS) и т.п. Подобно этому, если аффинная метка представляет собой эпитоп с легко доступными антителами, указанные реагенты можно использовать с методиками, упомянутыми выше, для выявления, количественного определения и выделения полипептида HSP или $\alpha 2M$, содержащего аффинную метку. Во многих случаях нет необходимости получать специфичные антитела к полипептиду HSP или $\alpha 2M$.

Особенно предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой слияние полипептидов HSP или $\alpha 2M$ с шарнирными, CH2 и CH3 доменами человеческого иммуноглобулина G-1 (IgG-1, см. Bowen et al., 1996, J. Immunol. 156:442-49). Данная шарнирная область содержит три цистеиновых остатка, которые в норме участвуют в образовании дисульфидных связей с другими цистеиновыми остатками в молекуле Ig. Поскольку для того, чтобы пептид функционировал в качестве метки, не нужно никаких цистеинов, то один или более цистеиновых остатков можно, необязательно, заменять на другой аминокислотный остаток, такой как, например, серин.

Различные лидерные последовательности, известные специалистам, можно использовать для эффективной секреции полипептида HSP или $\alpha 2M$ из клеток бактерий и млекопитающих (von Heijne, 1985, J. Mol. Biol. 184:99-105). Лидерные пептиды выбираются на основе предполагаемой клетки-хозяина и могут включать последовательности бактерий, дрожжей, вирусов, животных и млекопитающих. Например, лидерный пептид гликопротеина D вируса герпеса является подходящим для использования в ряде клеток млекопитающих. Предпочтительный лидерный пептид для использования в клетках млекопитающих можно получить из области V-J2-C каппа-цепи мышиного иммуноглобулина (Bernard et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. 78:5812-5816). Предпочтительные лидерные последовательности на экспрессию желательного полипептида HSP или $\alpha 2M$ в бактериальных клетках включают, без ограничения, лидерные последовательности белков OmpA E.coli (Hobom et al., 1995, Dev. Biol. Stand. 84:255-262), Pho A (Oka et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 82:7212-16), OmpT (Johnson et al., 1996, Protein Expression 7:104-113), LamB и OmpF (Hoffman & Wright, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5107-5111), β -лактамазы (Kadonaga et al., 1984, J. Biol. Chem. 259:2149-54), энтеротоксинов (Morioka-Fujimoto et al., 1991, J. Biol. Chem. 266:1728-32) и белка A Staphylococcus aureus (Abrahmsen et al., 1986, Nucleic Acids Res. 14: 7487-7500) и эндоглюканазы B.subtilis (Lo et al., Appl. Environ. Microbiol. 54:2287-2292), а также искусственные и синтетические сигнальные последовательности (MacIntyre et al., 1990, Mol. Gen. Genet. 221:466-74; Kaiser et al., 1987, Science, 235:312-317).

Последовательности ДНК, кодирующие желательную аффинную метку или лидерный пептид, которые легко можно получить из библиотек, произведенных синтетическим путем или приобретенных из коммерческих источников, являются подходящими для практического осуществления настоящего изобретения. Указанные способы хорошо известны специалистам.

4.4. ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ С HSP И $\alpha 2M$

В настоящем документе описаны примеры способов образования комплексов in vitro HSP или $\alpha 2M$ с популяцией белков и/или пептидов, которые были получены из антигенных клеток, их клеточной фракции или вирусных частиц. Популяция белков и/или пептидов происходит из белкового препарата антигенных клеток, как описано в разделе 4.2.1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пептиды являются результатом ферментативного расщепления белкового препарата антигенных клеток, их клеточной фракции или вирусных частиц. Реакция образования комплексов может приводить к образованию ковалентной связи между HSP и белком или пептидом антигенной клетки или вирусной частицы. Реакция образования комплексов может

приводить к образованию ковалентной связи между $\alpha 2M$ и белком или пептидом антигенной клетки или вирусной частицы. Реакция образования комплексов может также приводить к образованию нековалентной связи между HSP и белком и/или пептидом или $\alpha 2M$ и белком и/или пептидом.

5 Перед образованием комплекса HSP можно предварительно обрабатывать АТФ или подвергать воздействию кислотных условий для удаления любых пептидов, которые могут быть нековалентно связаны с HSP, представляющим интерес. В случае, когда используется процедура с АТФ, избыток АТФ удаляют из препарата добавлением апираназы, как описано Levy, et al., 1991, Cell 67:265-274. В случае, когда
10 используются кислотные условия, буфер повторно доводят до нейтрального значения pH добавлением реагентов, модифицирующих pH. Предпочтительный пример протокола для нековалентного образования комплекса популяции пептидов (средняя длина от 7 до 20 аминокислот) с HSP или $\alpha 2M$ in vitro обсуждается ниже.

15 Популяцию пептидов (1 мкг) и предварительного обработанного HSP (9 мкг) смешивают с получением молярного соотношения приблизительно 5 пептидов (или белков): 1 HSP. Затем смесь инкубируют в течение периода времени от 15 минут до 3 часов при температуре от 4°C до 45°C в подходящем связывающем буфере, таком как буфер, содержащий 20 mM фосфат натрия, pH 7,2, 350 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$ и 1 mM
20 фенилметилсульфонилфторид (PMSF). Препараты центрифугируют через блок Centricon 10 (Millipore) для удаления любого несвязанного пептида. Нековалентную ассоциацию белков/пептидов с HSP можно анализировать с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или масс-спектрометрии (МС).

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, предпочтительном для изготовления нековалентных комплексов HSP70 с белками/пептидами, 5-10
25 микрограммов очищенного HSP70 инкубируют с эквимоллярными количествами белков/пептидов в 20 mM буфере фосфата натрия, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 3 mM $MgCl_2$ и 1 mM АДФ в объеме 100 микролитров при 37°C в течение 1 ч. Указанную инкубационную смесь центрифугируют один или более раз, если это необходимо, через блок Centricon 10 (Millipore) для удаления любого несвязанного пептида.

30 В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, предпочтительном для изготовления нековалентных комплексов gr96 или HSP90 с пептидами, 5-10 микрограммов очищенного gr96 или HSP90 инкубируют с эквимоллярными или избыточными количествами белков/пептидов в подходящем буфере, таком как буфер, содержащий 20 mM буфер фосфата натрия, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 3 mM $MgCl_2$ при 60-65°C в течение 5-20 мин. Указанную инкубационную смесь оставляют остывать до комнатной температуры и центрифугируют один или более раз, если это необходимо, через блок
35 Centricon 10 (Millipore) для удаления любого несвязанного пептида.

После образования комплекса с антигенными белками и/или антигенными пептидами иммуногенный комплекс HSP или комплекс $\alpha 2M$ можно, необязательно, анализировать с помощью, например, анализа клеток-мишеней смешанной культурой лимфоцитов (MLTC), описанного ниже. После того как комплексы HSP-пептид и/или HSP-белок были выделены и разбавлены, их можно, необязательно, дополнительно изучать на экспериментальных животных с использованием предпочтительных протоколов введения и наполнителей,
40 обсуждаемых ниже.

45 В качестве альтернативы изготовлению нековалентных комплексов HSP с белками/пептидами популяцию белков/пептидов можно связывать с HSP ковалентными связями.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения HSP ковалентно связывают с белками и/или пептидами посредством химического поперечного сшивания. Способы химического поперечного сшивания хорошо известны специалистам. Например, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения можно использовать химическое поперечное сшивание с глутаровым альдегидом. Химическое поперечное сшивание с глутаровым альдегидом использовалось для образования ковалентных
50

комплексов пептидов и HSP (см. Barrios et al., 1992, Eur. J. Immunol. 22:1365-1372). Предпочтительно 1-2 мг комплекса HSP-пептид сшивают в присутствии 0,002% глутарового альдегида в течение 2 часов. Глутаровый альдегид удаляют диализом против физиологического раствора с фосфатным буфером (PBS) в течение ночи (Lussow et al., 1991, Eur. J. Immunol. 21: 2297-2302). Альтернативно, HSP и популяцию белков/пептидов можно сшивать с помощью ультрафиолетового (УФ) поперечного сшивания при условиях, известных специалистам.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения популяцию белков и/или пептидов в белковом препарате можно нековалентно связать в комплекс с α 2M путем инкубирования белков/пептидов с α 2M в молярном соотношении 50:1 при 50°C в течение 10 минут, с последующим инкубированием при 25°C в течение 30 минут. Свободные (не образовавшиеся комплексы) пептиды можно удалять фильтрованием через фильтры подобранных размеров. Комплексы предпочтительно измеряют на сцинтилляционном счетчике, чтобы убедиться, что на молярной основе каждый HSP или α 2M связывает эквивалентные количества белков/пептидов (приблизительно 0,1% от исходного количества пептида). Подробности см. в работе Binder, 2001, J. Immunol. 166(8):4968-72, которая целиком включена в настоящий документ в качестве ссылки. Для того чтобы уменьшить склонность к образованию ковалентных комплексов α 2M с белками и пептидами в данных реакциях, перед образованием комплекса желателно ингибировать или удалять активность протеиназ. Этого можно добиться использованием ингибиторов протеиназ, например, способами, описанными в разделе 4.2.1. Также желателно добавлять к реакционным смесям восстанавливающий агент (такой как 2-меркаптоэтанол), чтобы нейтрализовать нуклеофильные соединения, присутствующие в белковом препарате, которые могут активировать α 2M для ковалентных связей.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения популяцию антигенных белков и/или антигенных пептидов в белковом препарате можно ковалентно связать в комплекс с α 2M с помощью способов, описанных в РСТ публикациях WO 94/14976 и WO 99/50303 для образования комплекса пептида с α 2M, которые целиком включены в настоящий документ в качестве ссылок. Например, антигенные белки и/или антигенные пептиды можно инкорпорировать в α 2M с использованием аммиака или метиламина (или других малых, аминовых нуклеофилов, таких как этиламин) во время реверсирования нуклеофильной активации, применяя нагревание (работа Gron and Pizzo, 1998, Biochemistry, 37:6009-6014, которая целиком включена в настоящий документ в качестве ссылки). Для получения комплексов α 2M по настоящему изобретению можно применять такие условия, которые позволяют случайный захват пептидов α 2M. Ковалентное связывание популяции антигенных белков/пептидов с α 2M также можно осуществлять с использованием бифункционального агента сшивания. Указанные агенты сшивания и способы их применения также хорошо известны специалистам.

Предпочтительно, агент сшивания инактивируют и/или удаляют после образования комплексов.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения популяцию белков/пептидов можно связать в комплексы со смесью HSP и α 2M с помощью той же реакции нековалентными или ковалентными способами, описанными выше.

Комплексы HSP и антигенных белков и/или пептидов после отдельных ковалентных и/или нековалентных реакций образования комплексов можно, необязательно, перед введением субъекту объединять с образованием композиции. Комплексы α 2M и антигенных белков и/или пептидов после отдельных ковалентных и/или нековалентных реакций образования комплексов также можно, необязательно, перед введением субъекту объединять с образованием композиции.

4.5. ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ И ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В соответствии с настоящим изобретением композицию по настоящему изобретению,

которая включает комплексы антигенных пептидов, полученных ферментативным расщеплением цитозольных и/или полученных из мембраны белков антигенных клеток или вирусных частиц, с HSP и/или $\alpha 2M$, вводят субъекту, имеющему злокачественную опухоль или инфекционное заболевание. В одном варианте осуществления настоящего изобретения "лечение" относится к улучшению злокачественной опухоли или инфекционного заболевания или по меньшей мере одного его различного симптома. В другом варианте осуществления настоящего изобретения "лечение" относится к улучшению по меньшей мере одного измеримого физического параметра, связанного со злокачественной опухолью или инфекционным заболеванием, необязательно различного субъектом. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения "лечение" относится к ингибированию прогрессирования злокачественной опухоли или инфекционного заболевания, как физически, например, к стабилизации различного симптома, так и физиологически, например, к стабилизации физического параметра, или и к тому, и к другому.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения композиции по настоящему изобретению вводят субъекту в качестве профилактической меры против указанной злокачественной опухоли или инфекционного заболевания. Используемый в настоящем изобретении термин "профилактика" относится к уменьшению риска приобретения указанной злокачественной опухоли или инфекционного заболевания. В одном варианте практического осуществления настоящего изобретения композиции по настоящему изобретению вводят в качестве профилактической меры субъекту, имеющему генетическое предрасположение к злокачественной опухоли. В другом варианте практического осуществления настоящего изобретения композиции по настоящему изобретению вводят в качестве профилактической меры субъекту, подвергнутому воздействию канцерогенов, включая, без ограничения, химические вещества и/или облучение, или субъекту, подвергнутому воздействию агента, вызывающего инфекционное заболевание.

Предпочтительным субъектом в терапевтических и профилактических способах по настоящему изобретению является человек.

Композиции, изготовленные способами по настоящему изобретению, включают комплексы хитшокового белка (белков) с популяцией антигенных пептидов и/или комплексы альфа-2-макроглобулина с популяцией антигенных пептидов. Композиция, как представляется, индуцирует воспалительную реакцию на участке опухоли и может в конечном итоге вызвать регрессию опухолевой нагрузки у подвергаемых лечению пациентов, имеющих злокачественную опухоль. Композиции, изготовленные способами по настоящему изобретению, могут усиливать иммунную компетентность субъекта и создавать специфичный иммунитет против инфекционных агентов или специфичный иммунитет против пренеопластических и неопластических клеток. Указанные композиции обладают способностью предотвращать начало и прогрессирование инфекционных заболеваний и ингибировать рост и прогрессирование опухолевых клеток.

Терапевтические схемы и фармацевтические композиции по настоящему изобретению, которые включают комплексы цитозольных и полученных из мембраны белков, можно применять в сочетании с дополнительными усилителями иммунного ответа или модификаторами биологического ответа, включая, без ограничения, цитокины IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, TNF или другие цитокины, влияющие на иммунные клетки, а также с комплексами хитшоковых белков и антигенных молекул. Помимо этого, композиции по настоящему изобретению можно вводить с адъювантом или, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, без адъюванта.

4.5.1. ИНФЕКЦИОННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ-МИШЕНИ

Инфекционные заболевания, которые можно лечить или предотвращать способами по настоящему изобретению, вызываются инфекционными агентами, включая, без ограничения, вирусы, бактерии, грибы, простейшие и паразиты. Настоящее изобретение не ограничивается лечением или профилактикой инфекционных заболеваний, вызываемых

внутриклеточными патогенами.

Вирусные заболевания, которые можно лечить или предотвращать способами по настоящему изобретению, включают, без ограничения, заболевания, вызванные вирусами гепатита А, гепатита В, гепатита С, гриппа, варицеллой, аденовирусом, простого герпеса типа I (HSV-I), простого герпеса типа II (HSV-II), чумы крупного рогатого скота, риновирусом, эховирусом, ротавирусом, респираторно-синцитиальным вирусом, вирусом папилломы, паповавирусом, цитомегаловирусом, эхиовирусом, арбовирусом, хантавирусом, вирусом Коксаки, вирусом эпидемического паротита, вирусом кори, вирусом краснухи, вирусом полиомиелита, вирусом иммунодефицита человека типа I (ВИЧ-I) и вирусом иммунодефицита человека типа II (ВИЧ-II).

Бактериальные заболевания, которые можно лечить или предотвращать способами по настоящему изобретению, вызываются бактериями, включая, без ограничения, бактерии, которые имеют внутриклеточную стадию своего жизненного цикла, микобактерию, риккетсию, микоплазму, нейссерии и легионеллу.

Протозойные заболевания, которые можно лечить или предотвращать способами по настоящему изобретению, вызываются простейшими, включая, без ограничения, лейшманию, кокцидию и трипаносому.

Паразитарные заболевания, которые можно лечить или предотвращать способами по настоящему изобретению, вызываются паразитами, включая, без ограничения, хламидию и риккетсию.

4.5.2. ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ОПУХОЛИ-МИШЕНИ

Типы злокачественных опухолей, которые можно лечить или предотвращать способами по настоящему изобретению, включают, без ограничения, саркомы и карциномы человека, например фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, хондрому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, рак толстого кишечника, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, раз предстательной железы, плоскоклеточный рак, базально-клеточный рак, аденокарциному, рак потовой железы, рак сальной железы, папиллярный рак, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарциному, медуллярный рак, бронхогенный рак, почечно-клеточный рак, гепатому, рак желчного протока, хорионэпителиому, семиному, эмбриональный рак, опухоль Уильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак мочевого пузыря, эпителиальный рак, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, акустическую неврину, олигодендроглиому, менингиому, меланому, нейробластому, ретинобластому; лейкозы, например, острый лимфолейкоз и острый миелолейкоз (миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз); хронический лейкоз (хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфолейкоз); и истинную полицитемию, лимфому (болезнь Ходжкина и неходжкинскую лимфому), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема и болезнь тяжелых цепей.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения злокачественная опухоль является метастатической. В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения у пациента, имеющего злокачественную опухоль, иммунная система подавлена по причине проведенной противоопухолевой терапии (например, химиотерапии, облучения) перед введением комплексов HSP- и/или α 2M-пептид или введением АПК, сенсibilизированных HSP и/или α 2M.

Существует множество причин, в силу которых иммунотерапия по настоящему изобретению является желательной для применения у пациентов, имеющих злокачественную опухоль. Во-первых, если у пациентов, имеющих злокачественную опухоль, иммунная система подавлена, оперативное вмешательство с анестезией и последующей химиотерапией может ухудшить иммуносупрессию. С помощью подходящей иммунотерапии в дооперационном периоде указанную иммуносупрессию можно

предотвратить или реверсировать. Это может давать меньше инфекционных осложнений и обеспечивать ускоренное заживление раны. Во-вторых, масса опухоли после оперативного вмешательства является минимальной, и иммунотерапия в данной ситуации, наиболее вероятно, будет эффективной. Третьей причиной является возможность, что опухолевые

клетки после оперативного вмешательства могут проникнуть в кровоток, и эффективная иммунотерапия в этот период времени может элиминировать указанные клетки.

Профилактические и терапевтические способы по настоящему изобретению направлены на усиление иммунной компетентности пациента, имеющего злокачественную опухоль, как до, так и во время или после оперативного вмешательства, и на индуцирование опухолеспецифического иммунного ответа на злокачественные клетки, с целью ингибирования злокачественной опухоли и с конечной клинической целью полной регрессии и уничтожения злокачественной опухоли. Способы по настоящему изобретению можно также применять у индивидуумов, имеющих повышенный риск развития конкретного типа злокачественной опухоли, например, в силу семейного анамнеза или факторов риска окружающей среды.

4.5.3. АУТОЛОГИЧНЫЙ ВАРИАНТ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Специфичная иммуногенность HSP и α 2M обеспечивается не самими HSP или α 2M, а связанными с ними антигенными пептидами. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения комплексы в композициях по настоящему изобретению для применения в качестве вакцин против злокачественных опухолей представляют собой аутологичные комплексы, что позволяет обойти два из наиболее трудно преодолимых препятствий при иммунотерапии злокачественных опухолей. Первым является вероятность того, что злокачественные опухоли человека, подобно злокачественным опухолям экспериментальных животных, являются антигенно различными. Для преодоления данного препятствия, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения HSP и/или α 2M образуют комплексы с антигенными белками и пептидами, и комплексы используют для лечения злокачественных опухолей у того же субъекта, от которого получены белки или пептиды. Во-вторых, большинство современных подходов к иммунотерапии злокачественных опухолей фокусируется на определении эпитопов линий злокачественных клеток распознаваемых CTL. Указанный подход требует доступности клеточных линий и CTL против злокачественных опухолей. Данные реагенты являются недоступными при подавляющем количестве случаев злокачественных опухолей у людей. В варианте осуществления настоящего изобретения, направленном на применение аутологичных антигенных пептидов, иммунотерапия злокачественных опухолей не зависит от доступности клеточных линий или CTL, а также не требует определения антигенных эпитопов в злокачественных клетках. Указанные преимущества делают комплексы HSP и/или α 2M, связанных с аутологичными антигенными пептидами, привлекательными иммуногенами против злокачественных опухолей.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения антигенные пептиды в терапевтических или профилактических комплексах можно получать из злокачественной ткани того же типа злокачественной опухоли от субъекта, аллогенного субъекту, которому вводят комплексы.

4.6. АДАПТИВНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ

Адаптивная иммунотерапия относится к терапевтическому подходу лечения злокачественной опухоли или инфекционных заболеваний, при котором иммунные клетки вводят хозяину с той целью, что клетки будут опосредовать, как прямо, так и косвенно, специфичный иммунитет против опухолевых клеток и/или антигенных компонентов или регрессию опухоли или лечение инфекционных заболеваний, как это может случиться. (См., например, патент США №5985270, выданный 16 ноября 1999 г., который целиком включен в настоящий документ в качестве ссылки).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антиген-презентирующие клетки (АПК) для использования в адаптивной иммунотерапии сенсибилизируют HSP и/или α 2M, связанными в комплекс с антигенными белками и пептидами, полученными в

соответствии со способами, описанными в настоящем документе. Комплексы можно изготавливать, получая комплексы хитшокового белка или альфа-2-макроглобулина с антигенными белками, которые получены по меньшей мере из 50% различных белков или по меньшей мере 100 различных белков, присутствующих в антигенных клетках или вирусных частицах, которые экспрессируют антигенную детерминанту агента, который вызывает инфекционное заболевание. Комплексы можно также изготавливать (а) воздействием на белковый препарат, полученный из клеток указанного типа злокачественной опухоли, ферментативным расщеплением протеиназами или контактом с АТФ, гидрохлоридом гуанидия и/или кислотой, для генерирования популяции антигенных пептидов и (b) образуя комплексы популяции антигенных пептидов с хитшоковым белком или альфа-2-макроглобулином.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапию введением полученных в виде комплексов *in vitro* антигенных пептидов и HSP и/или α 2M, изготовленных способами по настоящему изобретению, можно комбинировать с адоптивной иммунотерапией с использованием АПК, сенсibilизированных комплексами HSP и/или α 2M с антигенными пептидами, полученных любым способом, известным специалистам (см., например, патент США №5985270), при котором антигенные пептиды демонстрируют желательную антигенность (например, типа злокачественной опухоли или патогена). Сенсibilизированные АПК можно вводить отдельно, в комбинации с полученными комплексами *in vitro* белками/пептидами и HSP и/или α 2M, или до или после введения полученных комплексов белков/пептидов и HSP и/или α 2M. В частности, использование сенсibilизированных АПК для профилактики и лечения злокачественной опухоли может дополнительно включать введение субъекту в количестве, эффективном для указанного лечения или профилактики, комплексов, включающих хитшоковый белок и/или альфа-2-макроглобулин, связанных в комплекс с антигенными белками/пептидами; причем указанные комплексы получают, как описано выше. Подобно этому, использование сенсibilизированных АПК для лечения или профилактики типа инфекционного заболевания может дополнительно включать введение субъекту в количестве, эффективном для указанного лечения или профилактики, комплексов, включающих хитшоковый белок и/или альфа-2-макроглобулин, связанных в комплексы с антигенными белками/пептидами.

Помимо этого, способ введения связанных в комплексы *in vitro* антигенных белков/пептидов и HSP и/или α 2M можно варьировать, включая, без ограничения, например, подкожный, внутривенный или внутримышечный способ введения, хотя предпочтительным является внутрикожный способ. В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения адоптивную иммунотерапию введением антиген-презентирующих клеток, сенсibilизированных комплексами, изготовленными в соответствии с настоящим изобретением, можно комбинировать с терапией введением комплексов HSP- и/или α 2M-антигенная молекула (например, пептид), изготовленными любым способом, известным специалистам (см., например, патенты США №5750119, 5837251, 5961979, 5935576, РТС публикации WO 94/14976 или WO 99/50303), в котором антигенные молекулы демонстрируют желательную антигенность (например, типа злокачественной опухоли или патогена).

4.6.1. ПОЛУЧЕНИЕ АНТИГЕН-ПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТОК

Антиген-презентирующие клетки, включая, без ограничения, макрофаги, дендритные клетки и В-клетки, предпочтительно получают *in vitro* из стволовых клеток и клеток-предшественников из периферической крови или костного мозга человека, как описано Inaba, K., et al., 1992, J. Exp. Med. 176:1693-1702. Дендритные клетки можно получить любым из разнообразных способов, известных специалистам. В качестве примера, но не ограничения, дендритные клетки можно получить способами, описанными в работах Sallusto et al., 1994, J. Exp. Med. 179:1109-1118 и Caux et al., 1992, Nature 360, 258-261, которые целиком включены в настоящий документ в качестве ссылок. В предпочтительном аспекте используют дендритные клетки человека, полученные из клеток

крови человека.

АПК можно получать любым из разнообразных способов, известных специалистам. В одном аспекте используют макрофаги человека, полученные из клеток крови человека. В качестве примера, но не ограничения, макрофаги можно получить следующим образом.

- 5 Мононуклеарные клетки изолируют из периферической крови пациента (предпочтительно того, пациента, которого будут лечить) центрифугированием в градиенте Ficoll-Нураque и засевают на матрасы для культур тканей, которые предварительно покрывают собственной сывороткой пациента или другой АВ+ сывороткой человека. Клетки инкубируют при 37°C в течение 1 часа, затем незакрепившиеся клетки удаляют пипеткой. К закрепившимся клеткам, оставшимся на матрасах, добавляют на холоду (4°C) 1 mM EDTA в физиологическом растворе с фосфатным буфером и матрасы оставляют при комнатной температуре на 15 минут. Клетки собирают, промывают буфером RPMI и суспендируют в буфере RPMI. Увеличенные количества макрофагов можно получить инкубированием при 37°C с колониестимулирующим фактором макрофагов (M-CSF).

4.6.2. СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ МАКРОФАГОВ И АНТИГЕН-ПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТОК КОМПЛЕКСАМИ HSP-ПЕПТИД ИЛИ α 2M-ПЕПТИД

- АПК сенсibiliзируют HSP или α 2M, связанными с антигенными пептидами, предпочтительно инкубированием клеток *in vitro* с указанными комплексами. АПК сенсibiliзируют комплексами HSP или α 2M с антигенными молекулами инкубированием *in vitro* с HSP-комплексом или α 2M-комплексом при 37°C в течение периода времени от 15 минут до 24 часов. В качестве примера, но не ограничения, 4×10^7 дендритных клеток можно инкубировать с 10 микрограммами комплексов gr96-пептид на мл или 100 микрограммами комплексов HSP90-пептид на мл при 37°C в течение периода времени от 15 минут до 24 часов в 1 мл среды RPMI без испытуемых компонентов. Клетки промывают три раза и ресуспендируют в физиологической среде, предпочтительно стерильной, в подходящей концентрации (например, 1×10^7 /мл) для инъекции пациенту. Предпочтительно пациент, которому инъектируют сенсibiliзированные дендритные клетки, является пациентом, от которого дендритные клетки были исходно выделены (аутологичный вариант осуществления настоящего изобретения).

- Необязательно, способность сенсibiliзированных АПК стимулировать, например, антиген-специфичные ограниченные классом I цитотоксичные Т-лимфоциты (CTL) можно контролировать по их способности стимулировать CTL для высвобождения фактора некроза опухолей и по их способности действовать в качестве мишеней указанных CTL.

4.6.3. РЕИНФУЗИЯ СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ АПК

- Сенсibiliзированные АПК реинфузируют пациенту системно, предпочтительно внутривенно, с помощью обычных клинических процедур. Указанные активированные клетки реинфузируют предпочтительно путем системного введения аутологичному пациенту. Пациенты обычно получают приблизительно от 10^6 до приблизительно 10^{12} сенсibiliзированных дендритных клеток, в зависимости от состояния пациента. В некоторых схемах пациенты могут, необязательно, получать вдобавок подходящую дозу модификатора биологического ответа, включая, без ограничения, цитокины IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, TNF или другой цитокиновый фактор роста.

4.7. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ И СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ

- Комплексы антигенных пептидов, связанных с HSP и/или α 2M, полученные способами по настоящему изобретению, можно вводить пациенту в терапевтически эффективных дозах для лечения или улучшения нарушения, связанного с пролиферацией клеток или инфекционного заболевания. Терапевтически эффективная доза относится к количеству комплексов, достаточному для получения улучшения симптомов указанного нарушения.

4.7.1. ЭФФЕКТИВНАЯ ДОЗА

Композиции по настоящему изобретению, включающие иммуногенное, эффективное количество комплексов популяции антигенных пептидов с HSP и/или α 2M, вводят

субъекту, который нуждается в лечении по поводу злокачественной опухоли или инфекционного заболевания, в качестве способа индуцирования иммунного ответа против указанной злокачественной опухоли или инфекционного заболевания. Токсичность и терапевтическую эффективность указанных комплексов можно определить стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, для определения LD_{50} (дозы, смертельной для 50% популяции) и ED_{50} (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс, и его можно выразить как соотношение LD_{50}/ED_{50} . Комплексы, которые имеют большие терапевтические индексы, являются предпочтительными. Поскольку можно использовать комплексы, которые демонстрируют токсические побочные эффекты, следует предпринять меры по созданию такой системы доставки, которая нацеливает указанные комплексы на область пораженной ткани, с целью свести к минимуму потенциальное повреждение неинфицированных клеток и, следовательно, уменьшить побочные эффекты.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения данные, полученные в результате исследований на клеточных культурах и экспериментальных животных, можно использовать для установления пределов доз для применения у человека. Дозировка комплексов лежит предпочтительно в пределах циркулирующих концентраций, которые включают ED_{50} с малой токсичностью или без токсичности. Дозировка может варьироваться в указанных пределах в зависимости от используемой лекарственной формы и пути введения. Для любых комплексов, используемых в способе по настоящему изобретению, терапевтически эффективную дозу можно первоначально установить по результатам исследований на клеточных культурах. Дозу можно устанавливать на экспериментальных животных для достижения пределов концентраций в плазме крови, которые включают IC_{50} (т.е. концентрацию испытуемого соединения, при которой достигается половина максимального ингибирования симптомов), по результатам исследований на клеточных культурах. Указанную информацию можно использовать для более точного определения пригодных для человека доз. Уровни в плазме можно измерять, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения вводят количество комплексов HSP70- и/или gp96-антигенная молекула, которое находится в пределах приблизительно от 10 микрограммов до приблизительно 600 микрограммов для пациента-человека. Дозировка комплексов HSP90-пептид по настоящему изобретению для пациента-человека находится в пределах приблизительно от 50 до 5000 микрограммов, предпочтительно 100 микрограммов. Дозы, указанные выше, предпочтительно вводят один раз в неделю в течение периода времени приблизительно 4-6 недель, а способ или область введения предпочтительно варьируется с каждым введением. Таким образом, в качестве примера, но не ограничения, первую инъекцию можно производить подкожно на левой руке, вторую - на правой руке, третью - на левой стороне живота, четвертую - на правой стороне живота, пятую - на левом бедре, шестую - на правом бедре и т.п. Один и тот же участок может повторяться после промежутка в одну или более инъекций. Также можно производить инъекции по частям. Так, например, половину дозы можно ввести в одну область, а другую - в другую область в один и тот же день. Альтернативно, способы введения последовательно варьируют, например, еженедельные инъекции производят последовательно, внутривенно, внутримышечно, интравенно или интраперитонеально. Через 4-6 недель дальнейшие инъекции предпочтительно производят с двухнедельными интервалами в течение периода времени один месяц. Позже инъекции можно производить ежемесячно. Частоту более поздних инъекций можно изменять, в зависимости от клинического прогресса и чувствительности к иммунотерапии пациента.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения вводят такое количество комплексов HSP70- и/или gp96-антигенный пептид, которое находится в пределах приблизительно от 0,1 микрограмма приблизительно до 60 микрограммов для пациента-человека. В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения

терапевтически эффективное количество комплексов HSP70- и/или gp96-антигенная молекула составляет менее 10 микрограммов, например в пределах от 0,1 до 9 микрограммов; предпочтительная дозировка для человека является практически эквивалентной дозировке, используемой для мыши с массой тела 25 г, например, в пределах от 0,5 до 2,0 микрограммов. Предпочтительная дозировка для комплексов HSP90-антигенная молекула для пациента-человека, изготовленных согласно настоящему изобретению, находится в пределах приблизительно от 5 до 500 микрограммов. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения терапевтически эффективное количество комплексов HSP90-антигенная молекула составляет менее 50 микрограммов, например в пределах от 5 до 49 микрограммов; предпочтительная дозировка для человека находится в пределах от 5 до 40 микрограммов. Указанные дозы предпочтительно вводят внутривенно или через слизистые оболочки. В качестве примера, дозы можно вводить, предпочтительно, внутривенно, через день, всего 5 инъекций. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения дозы, указанные выше, предпочтительно вводят один раз в неделю в течение периода времени приблизительно 4-6 недель, а способ или область введения предпочтительно варьируется с каждым введением. В предпочтительном примере производят внутривенные введения, каждая область введения последовательно меняется.

Соответственно, настоящее изобретение относится к способам профилактики и лечения злокачественной опухоли или инфекционного заболевания у субъекта, включающим введение композиции, которая стимулирует иммунную компетентность индивидуума-хозяина и вызывает специфичный иммунитет против пренеопластических и/или неопластических клеток или инфицированных клеток.

4.7.2. КОМПОЗИЦИИ И ПРИМЕНЕНИЕ

Фармацевтические композиции для применения в соответствии с настоящим изобретением можно изготавливать обычными способами, используя один или более физиологически приемлемых носителей или наполнителей.

Так, комплексы и их физиологически приемлемые соли и сольваты можно изготавливать для введения путем ингаляции или инсуффляции (через рот или через нос) или для перорального, парентерального или ректального введения.

Для перорального введения фармацевтическим композициям можно придавать форму, например, таблеток или капсул, изготовленных обычными способами с фармацевтически приемлемыми наполнителями, такими как связующие агенты (например, прежелатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлоза), наполнители (например, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза или гидрофосфат кальция), лубриканты (например, стеарат магния, тальк или диоксид кремния), дезинтегранты (например, картофельный крахмал или гликолят натрия-крахмала) или увлажняющие агенты (например, лаурилсульфат натрия). На таблетки можно наносить покрытие способами, хорошо известными специалистам. Жидким препаратам для перорального введения можно придавать форму, например, растворов, сиропов или суспензий, или они могут быть представлены в виде сухого продукта для восстановления водой или другим подходящим носителем перед применением. Указанные жидкие препараты можно изготавливать обычными способами с фармацевтически приемлемыми добавками, такими как суспендирующие агенты (например, сироп сорбита, производные целлюлозы или гидрогенизированные съедобные жиры), эмульгирующие агенты (например, лецитин или аравийская камедь), неводные носители (например, миндальное масло, масляные сложные эфиры, этиловый спирт или фракционированные растительные масла) и консерванты (например, метил- или пропил-п-гидроксibenзоаты или сорбиновая кислота). Препараты могут также содержать буферные соли, корректирующие вкус и запах, окрашивающие и подслащающие агенты, как это принято.

Препараты для перорального введения удобно изготавливать с обеспечением контролируемого высвобождения активных комплексов.

Для трансбуккального введения композициям можно придавать форму таблеток или

пастилок, изготовленных обычными способами.

Для введения путем ингаляции комплексы для применения по настоящему изобретению удобно доставляются в форме аэрозольного спрея из упаковок под давлением или небулайзера, с использованием подходящего пропеллента, например

- 5 дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, диоксида углерода или другого подходящего газа. В случае аэрозоля, находящегося под давлением, дозировку может определять клапан для доставки отмеренного количества. Можно изготавливать капсулы и картриджи, например, из желатина для использования в ингаляторе или инсуффляторе, содержащие порошкообразную смесь комплексов и подходящую
- 10 порошкообразную основу, такую как лактоза или крахмал.

Комплексы можно изготавливать для парентерального введения инъекцией, например болюсной инъекцией или продолжительной инфузией. Композиции для инъекций могут быть представлены в единичной дозированной форме, например, в ампулах или контейнерах со множеством доз, с добавлением консерванта. Композициям можно

15 придавать такую форму как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и они могут содержать вспомогательные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, активный ингредиент может быть в форме порошка для восстановления подходящим носителем, например стерильной апиrogenной водой, перед применением.

- 20 Комплексы можно изготавливать в форме ректальных композиций, таких как суппозитории или удерживающие клизмы, например, содержащие обычные основы для суппозитория, такие как масло какао или другие глицериды.

Помимо композиций, описанных выше, комплексы также можно изготавливать в форме препаратов-депо. Указанные композиции длительного действия можно вводить путем

25 имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или внутримышечной инъекцией. Так, например, комплексы можно изготавливать с подходящими полимерными или гидрофобными материалами (например, в форме эмульсии в приемлемом масле) или ионообменными смолами или в форме умеренно растворимых производных, например умеренно растворимой соли.

- 30 Композиции могут, если это желательно, быть представлены в форме упаковки или дозирующего устройства, которые могут содержать одну или более единичных дозированных форм, содержащих активный ингредиент. Упаковка может, например, включать металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. К упаковке или дозирующему устройству может прилагаться инструкция по применению.

35 4.7.3. НАБОРЫ

Настоящее изобретение относится также к наборам для осуществления способов и/или терапевтических схем по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления настоящего изобретения указанные наборы содержат в одном или более контейнерах

40 белковые препараты, включающие антигенные белки и пептиды для объединения с HSP и/или $\alpha 2M$, которые содержатся во втором контейнере. В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанные наборы содержат в одном или более контейнерах ферментативно расщепленные пептиды, включающие антигенные пептиды для объединения с HSP и/или $\alpha 2M$, которые содержатся во втором контейнере. Альтернативно, белки и/или пептиды могут поставляться в одном или более контейнерах для образования

45 комплексов с HSP или $\alpha 2M$, выделенными от конкретного пациента для аутологичного введения. Необязательно, очищенный HSP для образования комплексов с белками и пептидами дополнительно поставляется во втором контейнере.

- В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанные наборы содержат в одном или более контейнерах терапевтически или профилактически эффективные
- 50 количества комплексов с белками/пептидами HSP или $\alpha 2M$, предпочтительно очищенных, в фармацевтически приемлемой форме. Наборы, необязательно, дополнительно включают во втором контейнере сенсibilизированные АПК, предпочтительно очищенные.

Комплексы HSP или $\alpha 2M$ в контейнере набора по настоящему изобретению могут быть в

форме фармацевтически приемлемого раствора, например, в комбинации со стерильным физиологическим раствором, раствором декстрозы или буферным раствором или другой фармацевтически приемлемой стерильной жидкостью. Альтернативно, комплексы HSP или α 2M могут быть лиофилизированы или обезвожены; в указанном случае набор, необязательно, дополнительно включает в контейнере фармацевтически приемлемый раствор (например, физиологический раствор, раствор декстрозы и т.п.), предпочтительно стерильный, для разведения HSP и α 2M или комплексов, содержащих α 2M и HSP, для получения раствора для инъекций.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанный набор дополнительно включает иглу или шприц, предпочтительно упакованные в стерильной форме, для инъектирования комплекса HSP и α 2M и/или упакованный спиртовой тампон. Необязательно, включают инструкции по введению комплексов α 2M- и HSP-пептид медицинским работником или пациентом.

4.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ КОМПЛЕКСОВ HSP И α 2M

Необязательно, комплексы HSP-белок, комплексы HSP-пептид, комплексы α 2M-белок и комплексы α 2M-пептид по настоящему изобретению можно изучить на предмет иммуногенности с использованием любого способа, известного специалистам. В качестве примера, но не ограничения, можно использовать одну из следующих процедур. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения используется анализ ELISPOT (см. ниже, раздел 4.9.4).

4.8.1. АНАЛИЗ MLTC

Кратко, мышам инъектируют некоторое количество комплексов HSP- и/или α 2M, используя любой удобный путь введения. В качестве отрицательного контроля, другим мышам инъектируют, например, HSP, в комплексе с белками и/или пептидами, полученными из нормальной ткани. Клетки, о которых известно, что они содержат специфичные антигены, например, опухолевые клетки или клетки, инфицированные агентом инфекционного заболевания, могут служить положительным контролем в исследовании. Мышам делают инъекции дважды, с интервалом 7-10 дней. Через десять дней после последней иммунизации удаляют селезенки и получают лимфоциты. Полученные лимфоциты впоследствии можно повторно стимулировать *in vitro* добавлением мертвых клеток, которые экспрессировали антиген, представляющий интерес.

Например, 8×10^6 иммунных клеток селезенки можно стимулировать с помощью 4×10^4 клеток, обработанных митомицином C или облученных γ -лучами (5-10000 рад), содержащих антиген, представляющий интерес (или клеток, трансфицированных соответствующим геном, как это может иметь место), в 3 мл среды RPMI, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки. В определенных случаях 33% надосадочной жидкости вторично смешанной культуры лимфоцитов можно включить в культуральную среду в качестве источника факторов роста Т-клеток (см. Glasebrook, et al., 1980, J. Exp. Med. 151:876). Для изучения первичного цитотоксического Т-клеточного ответа после иммунизации селезеночные клетки можно культивировать без стимуляции. В некоторых экспериментах селезеночные клетки иммунизированных мышей также можно повторно стимулировать антигенно отличными клетками, для определения специфичности цитотоксического Т-клеточного ответа.

Шесть дней спустя культуры тестируют на цитотоксичность в 4-часовом анализе высвобождения ^{51}Cr (см. Palladino, et al., 1987, Cancer Res. 47:5047-5079 и Blachere, et al., 1993, J. Immunotherapy 14:352-356). В данном исследовании смешанную культуру лимфоцитов добавляют к суспензии клеток-мишеней с получением различных соотношений эффектор:мишень (Э:М) (обычно, от 1:1 до 40:1). Клетки-мишени предварительно метят инкубированием 1×10^6 клеток-мишеней в культуральной среде, содержащей 20 мКи ^{51}Cr /мл, в течение одного часа при 37°C. После мечения клетки промывают три раза. Каждый пункт анализа (соотношение Э:М) выполняется в трех повторностях и с подходящими контролями, введенными для измерения спонтанного

высвобождения ^{51}Cr (без добавления лимфоцитов) и 100% высвобождения (клетки, лизированные детергентом). После инкубирования смесей клеток в течение 4 часов клетки собирают центрифугированием при 200 g в течение 5 минут. Количество высвободившегося в надосадочную жидкость ^{51}Cr измеряют гамма-счетчиком. Процент цитотоксичности измеряют как количество имп./мин в испытуемом образце минус количество имп./мин при спонтанном высвобождении, деленное на количество имп./мин при тотальном высвобождении детергентом минус количество имп./мин при спонтанном высвобождении.

С целью блокировать каскад МНС класса I концентрированную надосадочную жидкость гибридом, полученную из гибридных клеток К-44 (гибридома анти-МНС класса I), добавляют к испытуемым образцам до конечной концентрации 12,5%.

4.8.2. АНАЛИЗ ПРОЛИФЕРАЦИИ CD4+ Т-КЛЕТОК

Первичные Т-клетки получают из селезенки, свежей крови или CSF и очищают центрифугированием с использованием FICOLL-PAQUE (PLUS (Pharmacia, Upsalla, Швеция), главным образом, как описано Kruse и Sebal, 1992, EMBO J. 11:3237-3244. Мононуклеарные клетки периферической крови инкубируют в течение 7-10 дней с лизатом клеток, экспрессирующих антигенную молекулу. Антиген-презентирующие клетки можно, необязательно, добавлять к культуре за 24-48 часов до анализа с целью обработки и презентации антигена в лизате. Клетки затем собирают центрифугированием и промывают средой RPMI 1640 (GibcoBRL, Gaithersburg, Md.) 5×10^4 активированных Т-клеток на лунку помещают в среду RPMI 1640, содержащую 10% фетальной телячьей сыворотки, 10 mM HEPES, pH 7,5, 2 mM L-глутамина, 100 единиц/мл пенициллина G и 100 мкг/мл стрептомицина сульфата в 96-луночные планшеты на 72 часа при 37°C, с генерированием импульсов 1 мКи ^3H -тимидина (DuPont NEN, Boston, Mass.) на лунку на период времени 6 ч, собирают и измеряют радиоактивность на сцинтилляционном счетчике TOPCOUNT (Packard Instrument Co., Meriden, Conn.).

4.8.3. АНАЛИЗ АНТИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА

В определенном варианте осуществления настоящего изобретения иммуногенность HSP- или $\alpha 2\text{M}$ -комплекса определяют измерением антител, выработанных в ответ на вакцинацию комплексом. В одном варианте осуществления настоящего изобретения микротитрационные планшеты (96-луночные, Inununo Plate II, Nunc) покрывают в количестве 50 мкл на лунку раствором 0,75 мкг/мл не связанной в комплекс с HSP или $\alpha 2\text{M}$ формой белков/пептидов, используемых в вакцине, в PBS при 4°C на 16 часов и при 20°C на 1 час. Лунки опустошают и блокируют 200 мкл PBS-T-BSA) (PBS, содержащим 0,05% (об./об.) TWEEN 20 И 1% (масс./об.) альбумина телячьей сыворотки) на лунку при 20°C в течение 1 часа, затем промывают 3 раза PBS-T. Пятьдесят мкл на лунку плазмы или CSF от вакцинированного животного (такого как подопытная мышь или пациент-человек) наносят при 20°C на 1 час, и планшеты промывают 3 раза PBS-T. Затем определяют активность антипептидных антител калориметрически, после инкубирования при 20°C в течение 1 часа с антимышиным или античеловеческим иммуноглобулином в количестве 50 мкл на лунку, должным образом конъюгированным с пероксидазой хрена (Amersham), разведенной 1:1500 в PBS-T-BSA, и (после дополнительного промывания PBS-T 3 раза, как описано выше) с раствором субстрата о-фенилендиамин (OPD) - H_2O_2 в количестве 50 мкл. Реакцию останавливают через 5 минут с использованием 150 мкл 2 M H_2SO_4 и определяют поглощение на 492 нм (ст. 620 нм) на фотометре Kontron SLT-210 (SLT Lab-instr., Цюрих, Швейцария).

4.8.4. АНАЛИЗ ВЫЯВЛЕНИЯ ЦИТОКИНОВ

Пролиферативный ответ CD4+ Т-клеток на HSP- или $\alpha 2\text{M}$ -комплексы по настоящему изобретению можно измерить с помощью выявления и количественного определения уровней специфичных цитокинов. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, например, внутриклеточные цитокины можно измерять с использованием анализа для выявления IFN- γ , для определения иммуногенности комплекса по настоящему

изобретению. В примере данного способа моноклеарные клетки периферической крови от субъекта, которому вводили комплекс HSP-пептид или α 2M-пептид, стимулируют пептидными антигенами данной опухоли или пептидными антигенами агента инфекционного заболевания. Клетки затем окрашивают мечеными антителами, специфичными в отношении Т-клеток, выявляемыми проточной цитометрией, например FITC-конъюгированными анти-CD3 и PerCP-мечеными анти-CD4 антителами. После промывания клетки фиксируют, придают им проницаемость и осуществляют взаимодействие с мечеными краской антителами, реакционногенными в отношении человеческого IFN- γ (PE-анти-IFN- γ). Образцы анализируют проточной цитометрией с использованием стандартных методик.

Альтернативно, фильтрационный иммуноанализ, твердофазный иммуноспот анализ (ELISPOT) можно использовать для выявления специфичных цитокинов, окружающих Т-клетку. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, например, микротитрационный планшет с основой из нитроцеллюлозы покрывают очищенным цитокин-специфичным антителом, т.е. анти-IFN- γ , и планшет блокируют, чтобы избежать фона, возникающего вследствие неспецифичного связывания других белков. Разведения образца моноклеарных клеток крови, содержащего клетки, секретирующие цитокины, полученного от субъекта, получавшего лечение комплексом HSP-пептид и/или α 2M-пептид, помещают в лунки микротитрационного планшета. Добавляют меченое, например меченое биотином, вторичное антицитокинное антитело. Затем можно выявить комплекс антитело-цитокин, т.е. с помощью конъюгированного с ферментом стрептавидина клетки, секретирующие цитокины, будут выглядеть как "пятна" при использовании визуального, микроскопического или электронного способов выявления.

4.8.5. АНАЛИЗ ТЕТРАМЕРОВ

В другом варианте осуществления настоящего изобретения для идентификации антиген-специфичных Т-клеток можно использовать анализ "окрашивания тетрамеров" (Altman et al., 1996, Science 274:94-96). Например, в одном варианте осуществления настоящего изобретения молекулу МНС, содержащую специфичный пептидный антиген, такой как опухолеспецифический антиген, мультимеризируют для получения растворимых пептидных тетрамеров и метят, например, путем образования комплекса со стрептавидином. Комплекс МНС-пептидный антиген затем смешивают с популяцией Т-клеток, полученной от субъекта, получавшего лечение комплексом HSP-пептид или α 2M-пептид. Затем используют биотин для окрашивания Т-клеток, которые экспрессируют антиген, представляющий интерес, например опухолеспецифический антиген.

4.9. МОНИТОРИНГ ЭФФЕКТОВ ВО ВРЕМЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ИММУНОТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

Влияние иммунотерапии HSP- или α 2M-комплексами на развитие и прогрессирование неопластических заболеваний можно контролировать любым способом, известным специалистам, включая, без ограничения, определение: а) гиперчувствительности замедленного типа как оценки клеточного иммунитета; b) активности цитолитических Т-лимфоцитов in vitro; c) уровней опухолеспецифических антигенов, например карциноэмбриональных антигенов (CEA); d) изменений в морфологии опухолей, с использованием таких методик, как компьютерная томография (КТ), и e) изменений в уровнях мнимых биомаркеров риска для конкретной злокачественной опухоли у индивидуумов, входящих в группу риска, и f) изменений в морфологии опухолей с использованием сонограммы.

Следующие подразделы описывают необязательные, приведенные в качестве примеров, процедуры.

4.9.1. КОЖНАЯ ПРОБА НА ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА

Кожные пробы на гиперчувствительность замедленного типа представляют большую ценность для оценки общей иммунокомпетентности и клеточного иммунитета в отношении антигена. Неспособность реагировать на ряд распространенных кожных антигенов называют анергией (Sato, T., et al., 1995, Clin. Immunol. Pathol. 74:35-43).

Правильная методика проведения кожных проб требует хранения антигенов в стерильном виде при 4°C, с защитой от света и разведения непосредственно перед использованием. Игла калибра 25 или 27 гарантирует внутрикожное, а не подкожное введение антигена. Через двадцать четыре и 48 часов после внутрикожного введения антигена с помощью линейки измеряют наибольшие размеры эритемы и уплотнения. Снижение реакции на любой данный антиген или группу антигенов подтверждают тестированием с более высокими концентрациями антигена, или, при неоднозначных ситуациях, повторением пробы с промежуточной пробой.

4.9.2. АКТИВНОСТЬ ЦИТОЛИТИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ IN VITRO

8×10^6 Т-лимфоцитов периферической крови, полученных с помощью центрифугирования в градиенте Ficoll-Нугауе, повторно стимулируют с помощью 4×10^4 опухолевых клеток, обработанных митомицином С, в 3 мл среды RPMI, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки. В некоторых экспериментах 33% надосадочной жидкости вторично смешанной культуры лимфоцитов или IL-2 включают в культуральную среду в качестве источника факторов роста Т-клеток.

Для того чтобы измерить первичный ответ цитолитических Т-лимфоцитов после иммунизации, Т-клетки культивируют без стимулятора опухолевых клеток. В других экспериментах Т-клетки повторно стимулируют антигенно отличными клетками. Через шесть дней культуры тестируют на цитотоксичность в 4-часовом анализе высвобождения ^{51}Cr . Спонтанное высвобождение ^{51}Cr мишеней должно достигать уровня менее 20%. Для достижения анти-МНС класса I блокирующей активности концентрированную в десять раз надосадочную жидкость гибридомы W6/32 добавляют в тест в конечной концентрации 12,5% (Heike M., et al., J. Immunotherapy 15:165-174).

4.9.3. УРОВНИ ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ

Несмотря на то что выявление уникальных опухолевых антигенов на всех опухолях может быть невозможным, многие опухоли демонстрируют антигены, которые отличают их от нормальных клеток. Реагенты моноклональных антител позволяют выделить и биохимически охарактеризовать антигены и обладают неоценимыми диагностическими возможностями для различения трансформированных и нетрансформированных клеток и для определения клеточной линии трансформированных клеток. Наиболее хорошо изученными человеческими опухолеассоциированными антигенами являются онкофетальные антигены. Указанные антигены экспрессируются во время эмбриогенеза, но отсутствуют или очень трудно выявляются в нормальной ткани взрослых людей. Прототипным антигеном является карциноэмбриональный антиген (СЕА), гликопротеин, обнаруживаемый на кишечнике плода, на клетках рака толстого кишечника человека, но не на нормальных клетках толстого кишечника взрослого человека. Поскольку СЕА распространяется из клеток карциномы толстого кишечника и обнаруживается в сыворотке крови, сначала думали, что присутствие указанного антигена в сыворотке крови можно будет использовать для скрининга пациентов на рак толстого кишечника. Однако у пациентов, имеющих другие опухоли, такие как рак поджелудочной железы и молочной железы, также имеются повышенные уровни СЕА в сыворотке крови. Следовательно, мониторинг понижения и повышения уровней СЕА у пациентов, имеющих злокачественные опухоли, проходящих лечение, оказался полезным для прогнозирования прогрессирования опухоли и ее реакции на лечение.

Несколько других онкофетальных антигенов являются пригодными для диагностики и контроля опухолей у человека, например альфа-фетопротеин, альфа-глобулин, в норме секретируемый печенью плода и клетками желточного мешка, находят в сыворотке пациентов, имеющих опухоли печени и герминомы, и его можно использовать как показатель состояния болезни.

4.9.4. КОМПЬЮТЕРНАЯ ТОМОГРАФИЯ (КТ)

КТ остается методикой выбора для точного определения стадии злокачественных опухолей. КТ зарекомендовала себя как наиболее чувствительная и специфичная методика по сравнению с любой другой визуализирующей методикой для выявления метастазов.

4.9.5. ИЗМЕРЕНИЕ МНИМЫХ БИОМАРКЕРОВ

Уровни мнимого биомаркера риска конкретной злокачественной опухоли измеряют для контроля эффекта композиций, включающих цитозольные и полученные из мембраны белки. Например, у лиц с повышенным риском рака предстательной железы сывороточный простатоспецифический антиген (ПСА) измеряют с помощью процедуры, описанной Brawer, M.K., et al., 1992, J. Urol., 147:841-845, и Catalona, W.J., et al., 1993, JAMA 270: 948-958; или у лиц с повышенным риском колоректального рака измеряют СЕА, как описано выше в разделе 4.5.3., и у лиц с повышенным риском рака молочной железы измеряют 16-а-гидроксирование эстрадиола с помощью процедуры, описанной Schneider, J., et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3047-3051. Приведенные выше источники целиком включены в настоящий документ в качестве ссылок.

4.9.6. СОНОГРАММА

Сонограмма остается методикой альтернативного выбора для точного определения стадии злокачественных опухолей.

5. ПРИМЕР

Следующий эксперимент показывает, что комплексы (а) антигенных пептидов, полученных из клеточной фракции, с (b) HSP или альфа-2-макроглобулином ($\alpha 2M$) являются эффективными для профилактической защиты животного от роста злокачественных клеток.

5.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОД

5.1.1. Выделение белка

Для выделения $\alpha 2M$ сыворотку крови мышей разводили 1:1 0,04 М Tris с pH 1,6, 0,15 М NaCl и помещали на колонку 65 мл Sephacryl S 30 OR (SIGMA), уравновешенную и элюированную тем же буфером. Фракции, положительные по $\alpha 2M$, определяли с помощью дот-блоттинга, и буфер во фракции заменяли на 0,01 М буфер фосфата натрия с pH 7,5, с помощью колонки PD-10. Фракции, содержавшие белок, помещали на колонку с сефарозой Sepharavalin A. Связанный белок элюировали 0,2 М пиранозидом метилманнозы и помещали на колонку DEAE, уравновешенную 0,05 М буфером ацетата натрия. $\alpha 2M$ элюировали в чистом виде, как показывал анализ SDS-PAGE и иммуноблоттинг с 0,13 М ацетатом натрия.

В некоторых экспериментах $\alpha 2M$ приобретали у компании SIGMA.

Grp96 получали способом, описанным в разделе 4.3.3.

5.1.2. Анализы отторжения опухолей

Все иммунизации производили подкожно в 100 мкл объеме PBS. Две иммунизации осуществляли с интервалом в одну неделю. Семь микрограммов $\alpha 2M$ или 1 мкг grp96 использовали в одной инъекции, как в виде комплекса, так и отдельно. Живые опухолевые клетки (100000) дочиста отмывали от культуральной среды, ресуспендировали в PBS и инъецировали подкожно через одну неделю после последней иммунизации. Производили измерение размеров опухоли по двум промерам. Половину средней величины использовали как радиус опухоли для расчета объема опухоли. Величины Р определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

5.1.3. Получение комплексов

Лизат клеток получали из живых клеток Meth A с помощью гомогенизатора Dounce с последующим ультрацентрифугированием. Надосадочную жидкость после центрифугирования при 100000 g обрабатывали 0,1% трифторуксусной кислотой (TFA) и 3 мМ АТФ в течение 10 часов, с последующим центрифугированием через мембранный фильтр CENTRICON (Millipore) с пределом отсекаания лимитом 10 кДа. Пептиды менее 10 кДа (называемые "MethA10") выделяли дополнительно, путем связывания на колонке с обращенной фазой C18, с элюированием пептидов метанолом, сушкой пептидов в условиях вакуума и разведением пептидов буфером, подходящим для образования комплексов. Grp96, $\alpha 2M$ или альбумин (который использовали в качестве контроля) нагревали до 50°C в присутствии 50 молярного избытка MethA10. Реакционные смеси, содержавшие образовавшиеся комплексы, держали при комнатной температуре 30 минут, а

затем помещали на лед. Свободные, не связанные в комплекс пептиды удаляли с помощью CENTRICON 50 (Millipore). Полученные таким способом комплексы использовали для иммунизации.

5.2. РЕЗУЛЬТАТЫ

В данном эксперименте опухолевую модель Meth A использовали для демонстрации противоопухолевого иммунитета, вызванного комплексами gr96-пептид и комплексами α 2M-пептид. Антигенные эпитопы MHC I данной опухоли неизвестны. Клеточные лизаты MethA обрабатывали АТФ и трифторуксусной кислотой (TFA), и фракцию пептидов, которые были меньше 10 кДа (MethA10), собирали и получали комплекс с α 2M или gr96, как описано выше. Мышей BALB/c иммунизировали α 2M или gr96, в составе комплекса с MethA10 или самостоятельно. Мышей BALB/c иммунизировали также альбумином-MethA10 или PBS в качестве отрицательных контролей. Иммунизации производили дважды, с интервалом в одну неделю. Всем мышам проводили антигенную стимуляцию внутрикожной инъекцией 100000 живых клеток Meth A спустя одну неделю после последней иммунизации. Рост опухолей контролировали каждые 5 дней до 20 дня после антигенной стимуляции.

Таблица 1		
Композиции, использованные для иммунизации мышей	Кол-во мышей, получивших антигенную стимуляцию опухолевыми клетками на день 0	Кол-во мышей с измеримой опухолью на день 20
Только MethA10	5	5
Альбумин-MethA10	5	5
PBS	5	5
Комплексы α 2M-MethA 10	5	0
Комплексы gr96-MethA 10	5	0
Gr96, выделенный из печени	5	5
α 2M, выделенный из сыворотки	5	4

Данные, приведенные в таблице 1, показывают достоверную защиту от опухоли у мышей, иммунизированных комплексами α 2M-MethA10 ($p < 0,05$) или комплексами gr96-MethA10 ($p < 0,05$), но не у мышей, иммунизированных только α 2M, только gr96, альбумином-MethA10 или PBS.

5.3. ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперимент по иммунизации против опухолей, описанный в настоящем документе, демонстрирует новый подход к иммунотерапии злокачественных опухолей, при котором множество общих клеточный пептидов из опухоли, включая собственные и антигенные пептиды, образуют комплексы с HSP или α 2M. Указанные комплексы эффективно стимулируют иммунную систему хозяина для специфического ответа, как показано в настоящем документе. Данные показывают, что пригодность данного подхода для профилактики можно распространить на лечение доклинической стадии болезни, а также на лечение и профилактику патогенных инфекций.

Все источники, процитированные в настоящем документе, целиком включены в него в качестве ссылок для всех целей, до той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патент или патентная заявка была конкретно и индивидуально указана как включенная в качестве ссылки целиком для всех целей.

Множество модификаций и изменений настоящего изобретения можно осуществлять без отступления от его идеи и объема, как это будет понятно специалистам. Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, приводятся только в качестве примера, а настоящее изобретение ограничивается только прилагаемой формулой изобретения полным объемом эквивалентов, на которые указанная формула изобретения имеет право.

Формула изобретения

1. Способ получения комплексов, содержащих один или более хитшоковых белков, связанных в комплекс с антигенными пептидами, предусматривающий контактирование

популяции антигенных пептидов с одним или более различных хитшоковых белков *in vitro* в условиях, в которых указанные пептиды образуют комплекс с указанными хитшоковыми белками, где популяция антигенных пептидов содержит по меньшей мере 50 различных пептидов и получена способом, включающим (i) расщепление белкового препарата одной

5 или более протеиназами или (ii) расщепление белкового препарата при помощи одного или более неферментативных методов, где указанный белковый препарат происходит из антигенных клеток или их клеточной фракции и включает по меньшей мере 50% различных белков или по меньшей мере 50 различных белков указанных антигенных клеток или клеточной фракции соответственно.

10 2. Способ по п.1, в котором белковый препарат подвергают расщеплению одной или более протеиназами.

3. Способ по п.2, в котором по меньшей мере одна протеиназа выбрана из группы, состоящей из трипсина, стафилококковой пептидазы I, химотрипсина, пепсина, катеписина G, термолизина, эластазы и папаина.

15 4. Способ по п.2, в котором белковый препарат разделяют на аликвоты и расщепляют по отдельности различными протеиназами.

5. Способ по п.2, в котором после указанной стадии расщепления дополнительно проводят стадию инактивации протеиназ или отделение протеиназ от популяции антигенных пептидов.

20 6. Способ по п.1, который включает расщепление указанного белкового препарата при помощи одного или более неферментативных методов.

7.Способ по п.6, где расщепление проводят при помощи цианогенбромида.

8. Способ по любому из пп.1-7, где белковый препарат включает только цитозольные белки.

25 9. Способ по любому из пп.1-7, где белковый препарат включает только белки, полученные из мембраны.

10. Способ по любому из пп.1-7, где указанные антигенные клетки являются клетками злокачественной опухоли.

30 11. Способ по любому из пп.1-7, где указанные антигенные клетки являются клетками, которые проявляют антигенность агента, вызывающего инфекционное заболевание.

12. Способ по любому из пп.1-7, где указанные антигенные клетки являются клетками, которые трансформированы молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген инфекционного агента, и экспрессируют антиген.

35 13. Способ по любому из пп.1-7, где указанные антигенные клетки являются клетками, которые трансформированы молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей опухолеспецифический антиген или опухолеассоциированный антиген, и экспрессируют опухолеспецифический антиген или опухолеассоциированный антиген.

14. Способ по любому из пп.1-7, где указанные антигенные клетки являются человеческими клетками.

40 15. Способ по любому из пп.1-7, где указанные хитшоковые белки являются очищенными.

16. Способ по любому из пп.1-7, где указанные хитшоковые белки выбраны из группы, состоящей из HSP60, HSP70, HSP90, grp96, кальретикулина, grp78, протеин-дисульфид-изомеразы (PDI), HSP110 и grp170.

45 17. Способ по любому из пп.1-7, где указанные хитшоковые белки представляют собой комбинацию различных хитшоковых белков, выбранную из группы, состоящей из HSP60, HSP70, HSP90, grp96, кальретикулина, grp78, протеин-дисульфид-изомеразы (PDI), HSP110 и grp170.

50 18. Способ по любому из пп.1-7, в котором указанное контактирование включает обработку популяции антигенных пептидов и хитшоковых белков сшивающим агентом.

19. Способ по любому из пп.1-7, в котором указанное контактирование включает образование комплексов популяции антигенных пептидов и хитшоковых белков через нековалентную связь.

20. Способ по любому из пп.1-7, дополнительно включающий выделение популяции антигенных пептидов перед стадией образования комплексов.

21. Способ по любому из пп.1-7, где указанные хитшоковые белки являются человеческими хитшоковыми белками.

5 22. Способ по любому из пп.1-7, где указанные хитшоковые белки являются рекомбинантными хитшоковыми белками.

23. Способ по любому из пп.1-7, в котором хитшоковые белки являются представителями семейства хитшоковых белков, состоящего из HSP60, HSP70 и HSP90.

24. Способ по любому из пп.1-7, где популяция антигенных пептидов включает по 10 меньшей мере 100, 500, 1000, 5000 или 10000 различных пептидов.

25. Способ по любому из пп.1-7, где указанный белковый препарат состоит только из клеточных белков, только из цитозольных белков или только из белков, полученных из мембран указанных антигенных клеток.

15 26. Способ по любому из пп.1-7, где указанный белковый препарат состоит только из белков фракции органелл, которая представляет собой ядерную фракцию, митохондриальную фракцию, лизосомальную фракцию или фракцию, полученную из эндоплазматической сети.

27. Способ по любому из пп.1-7, где популяция пептидов включает пептиды, имеющие размер по меньшей мере 20 аминокислотных остатков.

20 28. Способ по любому из пп.1-7, где популяция пептидов включает пептиды, имеющие размер от 8 до 19 аминокислотных остатков.

29. Способ по п.8, где указанные антигенные клетки являются клетками злокачественной опухоли.

30. Способ по п.8, где указанные антигенные клетки являются человеческими клетками.

25 31. Способ по п.8, где указанные хитшоковые белки являются очищенными.

32. Способ по п.29, где указанные клетки злокачественной опухоли являются человеческими клетками злокачественной опухоли.

30 33. Способ по п.32, где указанные хитшоковые белки выбраны из группы, состоящей из HSP60, HSP70, HSP90, grp96, кальретикулина, grp78, протеин-дисульфид-изомеразы (PDI), HSP110 и grp170.

34. Способ по п.33, где указанные хитшоковые белки являются очищенными.

35. Способ по п.10, где указанные клетки злокачественной опухоли являются человеческими клетками злокачественной опухоли.

36. Способ по п.10, где указанные хитшоковые белки являются очищенными.

37. Способ по п.14, где указанные антигенные клетки являются клетками злокачественной опухоли.

38. Способ по п.14, где указанные хитшоковые белки являются очищенными.

39. Способ по п.15, где указанные антигенные клетки являются человеческими клетками.

40 40. Способ по п.15, где указанные антигенные клетки являются клетками злокачественной опухоли.

41. Способ по п.16, где указанные антигенные клетки являются клетками злокачественной опухоли.

42. Способ по п.16, где указанные антигенные клетки являются человеческими клетками.

43. Способ по п.16, где указанные хитшоковые белки являются очищенными.

45 44. Способ по п.19, где указанные антигенные клетки являются клетками злокачественной опухоли.

45. Способ по п.19, где указанные антигенные клетки являются человеческими клетками.

46. Способ по п.19, где указанные хитшоковые белки являются очищенными.

50 47. Способ по п.25, где указанные антигенные клетки являются клетками злокачественной опухоли.

48. Способ по п.25, где указанные антигенные клетки являются человеческими клетками.

49. Способ по п.25, где указанные хитшоковые белки являются очищенными.

50. Композиция, содержащая иммуногенное количество комплексов, содержащих

хитшоковые белки в комплексе с антигенными пептидами, где указанные комплексы получены способом по любому из пп.1-28.

51. Композиция по п.50, дополнительно содержащая адъювант.

52. Композиция по п.50, где указанные антигенные клетки являются клетками

5 злокачественной опухоли.

53. Композиция по п.50, где указанные антигенные клетки являются человеческими клетками.

54. Композиция по п.50, где указанные хитшоковые белки являются очищенными.

55. Композиция по п.52, где указанные клетки злокачественной опухоли являются

10 человеческими клетками злокачественной опухоли.

56. Композиция по п.55, где указанные хитшоковые белки выбраны из группы, состоящей из HSP60, HSP70, HSP90, grp96, кальретикулина, grp78, протеин-дисульфид-изомеразы (PDI), HSP110 и grp170.

57. Способ индуцирования иммунного ответа у субъекта против второй антигенной
15 клетки, включающий введение указанному субъекту эффективного количества композиции, содержащей иммуногенное количество комплексов, содержащих хитшоковые белки в комплексе с антигенными пептидами, где указанные комплексы получены способом по любому из пп.1-28, и где указанная вторая антигенная клетка экспрессирует по меньшей мере одну антигенную детерминанту, общую с антигенной клеткой, из которой происходит
20 указанная популяция антигенных пептидов.

58. Способ по п.57, где указанные антигенные клетки являются клетками злокачественной опухоли.

59. Способ по п.57, где указанные антигенные клетки являются человеческими клетками.

60. Способ по п.57, где указанные хитшоковые белки являются очищенными.

25 61. Способ лечения или предупреждения злокачественной опухоли, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении или предупреждении, композиции, содержащей такое количество комплексов, включающих хитшоковые белки в комплексе с антигенными пептидами, которое эффективно для указанного лечения или предупреждения, где указанные комплексы получены способом по любому из пп.1-10 и 14-
30 28, и где указанная популяция антигенных пептидов получена из антигенных клеток указанной злокачественной опухоли.

62. Способ по п.61, где указанные антигенные клетки являются человеческими клетками.

63. Способ по п.61, где указанные хитшоковые белки являются очищенными.

64. Способ по п.63, где указанные хитшоковые белки выбраны из группы, состоящей из
35 HSP60, HSP70, HSP90, grp96, кальретикулина, grp78, протеин-дисульфид-изомеразы (PDI), HSP110 и grp170.

65. Способ лечения или предупреждения инфекционного заболевания, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении или предупреждении, композиции, содержащей такое количество комплексов, включающих хитшоковые белки в комплексе с
40 антигенными пептидами, которое эффективно для указанного лечения или предупреждения, где указанные комплексы получены способом по любому из пп.1-9, 11, 12 и 14-28, и где указанная популяция антигенных пептидов получена из антигенных клеток, экспрессирующих антигенную детерминанту агента, который вызывает указанное инфекционное заболевание.

45 Приоритет по пп.1, 2, 4-25 и 27-65 от 20.08.2001, по п.26 от 06.12.2001, по п.3 приоритет от 20.08.2002.

Приоритет по пунктам:

20.08.2001 по пп.1, 2, 4-25 и 27-65;

06.12.2001 по п.26;

50 20.08.2002 по п.3.