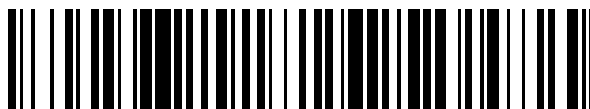


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 014**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/002 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/118 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
C07K 1/32 (2006.01)
A01N 37/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.1999** **E 10011076 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013** **EP 2295065**

54 Título: **Complejo de péptido antigénico-proteína de choque térmico modificada**

30 Prioridad:

20.02.1998 US 75358 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.01.2014

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF MIAMI (100.0%)
1600 N.W. 10th Avenue
Miami, FL 33136, US

72 Inventor/es:

PODACK, ECKARD R.;
SPIELMAN, JULIE y
YAMAZAKI, KOICHI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 439 014 T3

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

DESCRIPCIÓN

Complejo de péptido antigénico-proteína de choque térmico modificada

- 5 Este invento fue realizado con ayuda gubernamental bajo la subvención número CA57904 concedida por "National Institutes of Health". El gobierno tiene ciertos derechos en el invento.

1. Introducción

- 10 El presente invento se refiere a métodos para preparar un material inmunogénico que es útil como una vacuna para la prevención y/o el tratamiento del cáncer o de enfermedades infecciosas. La vacuna está compuesta de complejos no covalentes de proteínas de choque térmico (hsps; del inglés, heat shock proteins) modificadas, incluyendo, pero sin limitarse a, hsp70, hsp90, gp96 y proteína disulfuro isomerasa, y péptidos antigénicos. La vacuna es capaz de
15 provocar o aumentar la respuesta inmune de un sujeto contra tipos particulares de cáncer o contra células infectadas.

2. Antecedentes del invento

2.1. Patobiología del cáncer

- 20 El cáncer se caracteriza esencialmente por un aumento del número de células anormales procedentes de un tejido normal dado. El proceso morboso también implica la invasión de tejidos adyacentes por estas células anormales y la propagación de estas células anormales a ganglios linfáticos regionales y a sitios distantes (metástasis) a través del sistema circulatorio. Datos clínicos y estudios de biología molecular indican que el cáncer es un proceso de múltiples
25 fases que comienza con cambios preneoplásicos menores que, bajo ciertas condiciones, pueden progresar hasta la neoplasia.

- El crecimiento de células anormales premalignas viene ejemplificado por hiperplasia, metaplasia o, muy particularmente, displasia (para una revisión de dichos estados de crecimiento anormal, véase Basic Pathology de
30 Robbins y Angell, 1976, 2ª edición, W. B. Saunders Co., Philadelphia, EE.UU., páginas 68-79). La hiperplasia es una forma de proliferación celular controlada que acarrea un aumento del número de células en un tejido o un órgano, sin alteración significativa de la estructura o la función. Sólo como ejemplo, la hiperplasia endometrial precede a menudo al cáncer endometrial. La metaplasia es una forma de crecimiento celular controlado en que un tipo de célula adulta o totalmente diferenciada es sustituido por otro tipo de célula adulta. La metaplasia puede tener lugar
35 en células de tejido epitelial o conjuntivo. La metaplasia atípica afecta a un epitelio metaplásico algo desordenado. La displasia es frecuentemente un proceso precursor del cáncer y se encuentra principalmente en los epitelios; es la forma más desordenada de crecimiento celular no neoplásico, ocasionando una pérdida en la uniformidad de las células individuales y en la orientación arquitectónica de las células. Las células displásicas tienen a menudo núcleos anormalmente grandes y muy teñidos, y presentan pleomorfismo. La displasia se presenta
40 característicamente donde existe irritación o inflamación crónicas, y se encuentra a menudo en el cuello uterino, las vías respiratorias, la cavidad oral y la vesícula biliar. La lesión neoplásica puede evolucionar clonalmente y desarrollar una capacidad creciente de invasión, crecimiento, metástasis y heterogeneidad, especialmente bajo condiciones en que las células neoplásicas escapan a la vigilancia inmune del huésped (I. Roitt, J. Brostoff y D. Male, 1993, Immunology, 3ª edición, Mosby, Saint Louis, EE.UU., páginas 17.1-17.12).

2.2. Vacunación

- La vacunación ha permitido erradicar ciertas enfermedades, tales como poliomielitis, tétanos, varicela, sarampión, etc., en muchos países del mundo. Este planteamiento ha explotado la capacidad del sistema inmune para prevenir
50 enfermedades infecciosas. Dicha vacunación con materias no vivas, tales como proteínas, conduce generalmente a una respuesta de anticuerpos o una respuesta de células T cooperadoras CD4+ (Raychaudhuri y Morrow, 1993, Immunology Today, 14: 344-348). Por otra parte, la vacunación o infección con materias vivas, tales como células vivas o virus infecciosos, conduce generalmente a una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL; del inglés, cytotoxic T-lymphocyte) CD8+. Una respuesta de CTL es crucial para la protección frente a cánceres, virus
55 infecciosos y bacterias. Esto plantea un problema práctico, ya que la única forma de alcanzar una respuesta de CTL es usar agentes vivos que son de por sí patógenos. El problema es generalmente solventado usando cepas víricas y bacterianas atenuadas o matando células enteras que pueden ser usadas para vacunación. Estas estrategias han funcionado bien, pero el uso de cepas atenuadas siempre acarrea el riesgo de que el agente atenuado pueda recombinarse genéticamente con DNA del huésped y volverse una cepa virulenta. Por lo tanto, existe la necesidad
60 de métodos que puedan conducir a una respuesta de CTL CD8+ mediante la vacunación con materias no vivas, tales como proteínas, de un modo específico.

- La era de la inmunología tumoral comenzó con los experimentos de Prehn y Main, quienes mostraron que antígenos de los sarcomas inducidos con metilcolantreno (MCA) eran tumoralmente específicos ya que mediante los ensayos
65 para trasplante no se podían detectar estos antígenos en el tejido normal de los ratones (Prehn *et al.*, 1957, J. Natl. Cancer Inst. 18: 769-778). Esta idea fue confirmada mediante otros experimentos con los que se demostró que, en

el ratón en que se ha originado el tumor, se puede provocar una resistencia tumoralmente específica frente a tumores inducidos con MCA (Klein *et al.*, 1960, Cancer Res. 20: 1561-1572).

En estudios posteriores, también se hallaron antígenos tumoralmente específicos en tumores inducidos con otros carcinógenos químicos o físicos y en tumores espontáneos (Kripke, 1974, J. Natl. Cancer Inst. 53: 1333-1336; Vaage, 1968, Cancer Res. 28: 2477-2483; Carswell *et al.*, 1970, J. Natl. Cancer Inst. 44: 1281-1288). Puesto que en estos estudios se utilizó la inmunidad protectora frente al crecimiento de tumores trasplantados como criterio para los antígenos tumoralmente específicos, a estos antígenos se hace también comúnmente referencia como “antígenos de trasplante tumoralmente específicos” o “antígenos de rechazo tumoralmente específicos”. Diversos factores pueden influir en gran medida en la inmunogenicidad del tumor, incluyendo, por ejemplo, el tipo específico del carcinógeno implicado, la inmunocompetencia de huésped y el periodo de latencia (Old *et al.*, 1962, Ann. N.Y. Acad. Sci. 101: 80-106; Bartlett, 1972, J. Natl. Cancer Inst. 49: 493-504).

La mayoría de los carcinógenos, si no todos, son mutágenos que pueden causar mutación, lo que conduce a la expresión de antígenos tumoralmente específicos (Ames, 1979, Science 204: 587-593; Weisburger *et al.*, 1981, Science 214: 401-407). Algunos carcinógenos son inmunosupresores (Malmgren *et al.*, 1952, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79: 484-488). Cierta evidencia experimental sugiere que hay una correlación inversa constante entre la inmunogenicidad de un tumor y el periodo de latencia (tiempo transcurrido entre la exposición al carcinógeno y la aparición del tumor) (Old *et al.*, 1962, Ann. N.Y. Acad. Sci. 101: 80-106; y Bartlett, 1972, J. Natl. Cancer Inst. 49: 493-504). Otros estudios han revelado la existencia de antígenos tumoralmente específicos que no conducen a rechazo pero que, no obstante, pueden estimular potencialmente respuestas inmunes específicas (I. Roitt, J. Brostoff y D. Male, 1993, Immunology, 3ª edición, Mosby, Saint Louis, EE.UU., páginas 17.1-17.12).

2.3. Proteínas de choque térmico

A las proteínas de choque térmico (hsps) se hace indistintamente referencia como “proteínas de estrés”. Las primeras proteínas de estrés que se identificaron eran proteínas sintetizadas por una célula en respuesta a un choque térmico. Hasta la fecha, se han identificado tres familias principales de hsp basándose en su peso molecular. Las familias han sido llamadas hsp60, hsp70 y hsp90, en las que los números reflejan el peso molecular aproximado de las proteínas de estrés en kilodáltones. Posteriormente, se halló que muchos miembros de estas familias son inducidos en respuesta a otros estímulos estresantes, incluyendo privación de nutrientes, alteración metabólica, radicales del oxígeno, e infección por patógenos intracelulares (véanse Welch, mayo de 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; y Lindquist *et al.*, 1988, Annu. Rev. Genetics 22: 631-677).

Las principales hsps pueden acumularse con niveles muy elevados en células estresadas, pero se encuentran en niveles de bajos a moderados en células que no han resultado estresadas. Por ejemplo, la muy inducible hsp70 de mamífero es apenas detectable a temperaturas normales pero llega a ser una de las proteínas más activamente sintetizadas en la célula tras un choque térmico (Welch *et al.*, 1985, J. Cell. Biol. 101: 1198-1211). Por contraste, las proteínas hsp90 y hsp60 son abundantes a temperaturas normales en la mayoría de las células de mamífero, aunque no en todas, y son además inducidas por calor (Lai *et al.*, 1984, Mol. Cell. Biol. 4: 2802-2810; van Bergen en Henegouwen *et al.*, 1987, Genes Dev. 1: 525-531). Las proteínas de choque térmico están entre las proteínas más sumamente conservadas que existen. Por ejemplo, DnaK, la hsp70 de *E. coli*, tiene aproximadamente un 50% de identidad con proteínas hsp70 de excoriaciones en cuanto a las secuencias de aminoácidos (Bardwell *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 848-852). Las familias hsp60 y hsp90 también muestran niveles similarmente elevados de conservación intrafamiliar (Hickey *et al.*, 1989, Mol. Cell. Biol. 9: 2615-2626; Jindal, 1989, Mol. Cell. Biol. 9: 2279-2283). Además, se ha descubierto que las familias hsp60, hsp70 y hsp90 están compuestas por proteínas cuyas secuencias están relacionadas con las de las proteínas de estrés, teniendo, por ejemplo, más de un 35% de identidad de aminoácidos, pero cuyos niveles de expresión no son alterados por el estrés. Estudios sobre la respuesta celular al choque térmico y a otros estreses fisiológicos revelaron que las hsps están implicadas no sólo en la protección celular frente a estos estados adversos sino también en procesos bioquímicos e inmunológicos esenciales en células no estresadas. Las hsps llevan a cabo diferentes clases de funciones de acompañamiento. Por ejemplo, las hsp70, situadas en el citoplasma celular, el núcleo, las mitocondrias o el retículo endoplásmico (S. Lindquist *et al.*, 1988, Ann. Rev. Genetics 22: 631-677), están implicadas en la presentación de antígenos a las células del sistema inmune y están también implicadas en la transferencia, la plegadura y el ensamblaje de proteínas en células normales. Diversas proteínas de las que se piensa que están implicadas en funciones de acompañamiento son residentes de la luz del retículo endoplásmico (RE) e incluyen, por ejemplo, proteína disulfuro isomerasa (PDI; Gething *et al.*, 1992, Nature 355: 33-45), Grp94 o ERp99 (Sorger y Pelham, 1987, J. Mol. Biol. 194 (2): 341-4), que está relacionada con hsp90, y Grp78 o BiP, que está relacionada con hsp70 (Munro *et al.*, 1986, Cell 46: 291-300; Haas y Webl, 1983, Nature 306: 387-389). Se sabe que estas proteínas se unen a una diversidad de proteínas mutantes, no plegadas e incompletamente glicosiladas (Machamer *et al.*, 1990, J. Biol. Chem. 65: 6879-6883; Gething *et al.*, 1986, Cell 46: 939-950). La localización de estas hsps en el RE es mediada por un tetrapéptido carboxilo-terminal (Lys-Asp-Glu-Leu o KDEL) que es necesario para la retención en el RE (Munro y Pelham, 1987, Cell 48: 899-907). Generalmente, esta secuencia es KDEL en células de mamífero, y es HDEL en *Saccharomyces cerevisiae* y ADEL en *Schizosaccharomyces pombe* (Pidoux y Armstrong, 1992, EMBO J. 11: 1583-1591). Generalmente, las proteínas de choque térmico son capaces de unirse a proteínas o péptidos y de liberar, en

presencia de adenosina trifosfato (ATP), las proteínas o péptidos unidos. Se cree que, durante la participación de hsp en el curso del ensamblaje proteico, tiene lugar la hidrólisis de ATP (Flynn *et al.*, 1989, Science 245: 385-390).

2.4. Inmunogenicidades de las proteínas de choque térmico/estrés hsp70, hsp90 y gp96

Srivastava *et al.* demostraron la respuesta inmune de ratones cosanguíneos a sarcomas inducidos con metilcolantreno (1988, Immunol. Today 9: 78-83). En estos estudios, se halló que las moléculas responsables de la inmunogenicidad individualmente distinta de estos tumores eran identificadas como glicoproteínas de 96 kDa (gp96) de la superficie celular y proteínas intracelulares de 84 a 86 kDa (P. K. Srivastava *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3407- 3411; S. J. Ullrich *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3121-3125). La inmunización de ratones con gp96 o p84/86 aisladas de un tumor particular volvía a los ratones inmunes hacia ese tumor particular pero no hacia tumores antigénicamente distintos. El aislamiento y la caracterización de genes que codifican gp96 y p84/86 revelaron una significativa homología entre ellos y mostraron que gp96 y p84/86 eran réplicas de las mismas proteínas de choque térmico en, respectivamente, el retículo endoplásmico y el citosol (P. K. Srivastava *et al.*, 1988, Immunogenetics 28: 205-207; P. K. Srivastava *et al.*, 1991, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 167: 109-123). Además, se mostró que la hsp70 provocaba inmunidad hacia el tumor del que había sido aislada pero no hacia tumores antigénicamente distintos. Sin embargo, se halló que la hsp70 desprovista de péptidos pierde su actividad inmunogénica (M. Uono y P. K. Srivastava, 1993, J. Exp. Med. 178: 1391-1396). Estas observaciones sugerían que las proteínas de choque térmico no son inmunogénicas per se pero forman complejos no covalentes con péptidos antigénicos, y los complejos pueden provocar una inmunidad específica hacia los péptidos antigénicos (P. K. Srivastava, 1993, Adv. Cancer Res. 62: 153-177; H. Uono *et al.*, 1994, J. Immunol. 152: 5398-5403; R. Suto *et al.*, 1995, Science 269: 1585-1588).

El uso de complejos no covalentes de proteína de estrés y péptido, purificados de células cancerosas, para el tratamiento y la prevención del cáncer ha sido descrito en las publicaciones PCT WO 96/10411, de fecha 11 de abril de 1996, y WO 97/10001, de fecha 20 de marzo de 1997 (véanse también las solicitudes de patente de EE.UU., en tramitación conjunta, número de serie 08/796.319, presentada el 7 de febrero de 1997 por Srivastava y Chandawarkar, y número de serie 08/796.316, presentada el 7 de febrero de 1997 por Srivastava, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad).

Los complejos de proteína de estrés-péptido pueden ser también aislados de células infectadas con patógenos y ser usados para el tratamiento y la prevención de infecciones causadas por los patógenos, tales como virus y otros patógenos intracelulares, incluyendo bacterias, protozoos, hongos y parásitos. Véase la publicación PCT WO 95/24923, de fecha 21 de septiembre de 1995.

Los complejos inmunogénicos de proteína de estrés-péptido pueden ser también preparados por complejación in vitro de la proteína de estrés y péptidos antigénicos, y los usos de tales complejos para el tratamiento y la prevención del cáncer y enfermedades infecciosas han sido descritos en la publicación PCT WO 97/10000, de fecha 20 de marzo de 1997.

El uso de una proteína de choque térmico en combinación con un antígeno definido para el tratamiento del cáncer y de enfermedades infecciosas ha sido también descrito en la publicación PCT WO 97/06821, de fecha 27 de febrero de 1997.

En la publicación PCT WO 97/10002, de fecha 20 de marzo de 1997, se describe el uso de complejos de proteína de estrés-péptido para sensibilizar in vitro células presentadoras de antígeno para uso en inmunoterapia adoptiva.

En las publicaciones PCT WO 97/06685 y WO 97/06828, ambas de fecha 27 de febrero de 1997, se ha descrito la administración de polinucleótidos expresables que codifican proteínas de choque térmico eucarióticas a células de mamífero para estimular una respuesta inmune y para el tratamiento de enfermedades infecciosas y el cáncer.

Se ha descrito previamente la purificación de complejos de proteína de estrés-péptido a partir de productos de lisis celulares; véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 95/24923, de fecha 21 de septiembre de 1995.

"Breloer *et al* (1988) Eur. J. Innunol, 28(3):1016-21 dan a conocer preparaciones de HSP70 y gp96 que están asociadas con el epitopo OVA SIINFEKL. Nicchitta (1998) Curr. Opin. Immunol. 10(1):103-9 trata la base estructural de la unión peptídica a GRP94".

Con el fin de preparar una vacuna contra el cáncer, la cantidad de material inmunogénico obtenible para uso está directamente relacionada con la cantidad de células cancerosas de partida. Puesto que sólo puede obtenerse un pequeño número de células cancerosas de un sujeto, especialmente si el cáncer está en una fase temprana, el suministro de células cancerosas para producir el complejo de hsp-péptido es a menudo muy limitado. Para la producción comercial de una vacuna o un agente terapéutico, es ventajoso un suministro constante de grandes cantidades de complejos de hsp-péptido. Por lo tanto, existe la necesidad de una fuente segura de complejos de hsp-péptido. Los métodos del presente invento pueden ser utilizados para obtener complejos terapéuticos de hsp-péptido de un modo conveniente y rápido, incluso cuando sólo se dispone de una pequeñísima cantidad de tejido de

un paciente.

3. Sumario del invento

- 5 El presente invento se refiere a métodos para preparar una composición inmunogénica para uso en la prevención y el tratamiento del cáncer o de enfermedades infecciosas.

Las composiciones inmunogénicas preparadas mediante los métodos del invento comprenden complejos moleculares, no covalentemente asociados, de una proteína de choque térmico (hsp) modificada y un péptido antigénico (o inmunogénico). La proteína de choque térmico modificada del invento es secretada por una célula en la cual se expresa; carece de una secuencia de retención en el retículo endoplásmico, presente en la proteína de choque térmico no modificada; y comprende un marcador peptídico. Para una hsp que se encuentra naturalmente en el citoplasma, es modificada para que sea secretada por una célula en la cual se expresa; comprende un marcador peptídico; y comprende un péptido líder no presente en la proteína de choque térmico no modificada. La modificación no interfiere en, ni altera, la unión no covalente de péptidos por una proteína de choque térmico modificada, ni la capacidad de los complejos no covalentes para participar en la presentación de antígenos. Cuando las hsps modificadas se expresan en células recombinantes, son secretadas y pueden ser purificadas mediante el marcador peptídico usando cromatografía de afinidad.

20 Un aspecto de la presente divulgación se refiere a ácidos nucleicos que comprenden secuencias nucleotídicas que codifican hsps modificadas ("secuencias génicas de hsps modificadas"), y vectores de clonación, vectores de expresión, y células huésped que contienen dichos ácidos nucleicos. Generalmente, los métodos del invento comprenden construir una secuencia nucleotídica que codifica una proteína de choque térmico modificada, clonar la secuencia génica de hsp modificada en un vector de expresión, introducir la construcción génica de expresión en células huésped, cultivar las células huésped para que se exprese la hsp modificada, y purificar la hsp modificada y/o los complejos de hsp modificada-péptido.

El cDNA o DNA genómico que codifica una proteína de choque térmico puede ser obtenido y modificado mediante métodos convencionales de mutagénesis y clonación de DNA, mediante métodos de multiplicación de DNA o mediante métodos sintéticos. En general, la secuencia que codifica la hsp es insertada en un vector de clonación con fines de modificación y replicación genéticas antes de la expresión. Las secuencias génicas de hsp modificada se insertan en un vector de expresión o se integran intracromosómicamente, operativamente enlazadas a un(os) elemento(s) regulador(es), tal como un promotor, con el fin de hacer que las codificadas hsps modificadas se expresen in vitro e in vivo en células huésped adecuadas. Las secuencias génicas de hsps modificadas son introducidas en células huésped para que éstas las expresen, produciéndose de este modo complejos intracelulares no covalentes de hsp modificadas y péptidos (incluyendo los péptidos específicamente codificados por las células cancerosas o por el agente infeccioso patógeno).

En consecuencia, la divulgación se refiere a métodos para producir y purificar complejos inmunogénicos no covalentes de hsps modificadas y péptidos antigénicos en células antigénicas, que comprenden introducir una secuencia génica de hsp modificada en las células antigénicas, cultivar las células antigénicas recombinantes para permitir la expresión de la secuencia génica de hsp modificada, y recuperar del sobrenadante del cultivo celular, y purificar, los complejos de hsp modificada-péptido antigénico que son secretados por las células antigénicas recombinantes. Los péptidos antigénicos de los complejos son representativos de péptidos antigénicos hallados en células antigénicas, tales como células cancerosas o células infectadas con patógenos. Dichas células antigénicas recombinantes son útiles como vacunas para usos terapéuticos y profilácticos. Las células huésped recombinantes pueden ser cultivadas discontinua o continuamente a gran escala para la producción de grandes cantidades de los complejos inmunogénicos. Las células huésped que contienen las secuencias de hsps modificadas pueden ser guardadas (por ejemplo, mediante liofilización o congelación) para un uso futuro.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona métodos para producir y purificar hsps modificadas en células, que comprenden introducir una secuencia génica de hsp modificada en las células, cultivar las células recombinantes para permitir la expresión de la secuencia génica de hsp modificada, y recuperar del sobrenadante del cultivo celular, y purificar, la hsp modificada que es secretada por las células recombinantes. Preferiblemente, la purificación de las hsps modificadas es facilitada por el marcador peptídico y la cromatografía de afinidad. La divulgación da a conocer además que las hsps modificadas y purificadas puedan ser cargadas in vitro con péptidos antigénicos para formar complejos inmunogénicos no covalentes para usos terapéuticos y profilácticos.

En aún otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para producir y purificar complejos inmunogénicos no covalentes, que comprenden hacer que una secuencia génica de hsp modificada y una secuencia nucleotídica que codifica un péptido antigénico se coexpresen en células recombinantes, y recuperar del sobrenadante del cultivo celular, y purificar, los complejos de hsp modificada-péptido antigénico que son secretados por las células recombinantes. Estas células recombinantes pueden ser también utilizadas como una vacuna para usos terapéuticos y profilácticos.

En diversos aspectos de la divulgación, las hsps modificadas o los complejos de hsp modificada-péptido antigénico

pueden ser purificados mediante cromatografía de afinidad y utilizados como una vacuna para la prevención y el tratamiento del cáncer o de enfermedades infecciosas.

Las composiciones inmunogénicas, incluyendo complejos de hsp modificada-péptido así como células recombinantes que secretan complejos de hsp modificada-péptido, preparadas de acuerdo con los métodos dados a conocer aquí pueden provocar en un paciente una respuesta inmune, que es terapéutica o profilácticamente eficaz, contra las células cancerosas o contra el agente infeccioso. Preferiblemente, el paciente es el sujeto que proporcionó las células cancerosas para la expresión de una hsp modificada. Alternativamente, las células cancerosas o las células infectadas pueden proceder de uno o más sujetos distintos del paciente pero que tienen un cáncer del mismo tipo tisular (por ejemplo, cáncer de estómago, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, etc.) o enfermedades infecciosas causadas por el mismo tipo de patógeno.

En consecuencia, el invento se refiere a métodos para provocar una respuesta inmune contra un antígeno en un individuo, que comprenden administrar al individuo un complejo inmunogénico de una proteína de choque térmico modificada asociada no covalentemente con el antígeno o con un fragmento del mismo, y/o una célula recombinante que secreta dicho complejo inmunogénico. El invento también se refiere a métodos para tratar o prevenir el cáncer en un individuo que tiene cáncer o en quien se desea la prevención del cáncer, que comprenden administrar al individuo un complejo inmunogénico de una proteína de choque térmico modificada asociada no covalentemente con un antígeno o un fragmento del mismo derivado del cáncer, y/o una célula recombinante que secreta dicho complejo inmunogénico. Además, el invento se refiere a métodos para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un individuo que tiene una enfermedad infecciosa o en quien se desea la prevención de una enfermedad infecciosa, que comprenden administrar al individuo un complejo inmunogénico de una proteína de choque térmico modificada asociada no covalentemente con un antígeno o un fragmento del mismo derivado de una célula infectada o un agente infeccioso, y/o una célula recombinante que secreta dicho complejo inmunogénico. En las secciones y subsecciones que vienen a continuación se describen composiciones particulares del invento y sus métodos de preparación.

4. Breve descripción del dibujo

Figuras 1a-1c: Secreción y caracterización de gp96-Ig. Figura 1a: Ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA; del inglés, enzyme-linked immunosorption assay) para IgG murina de sobrenadantes de células de la línea n° 7 de carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC; del inglés, small cell lung carcinoma), no transfectadas y transfectadas con cDNA de gp16-Ig; se sembraron células en una concentración de 106/ml y se analizaron los sobrenadantes el día 3 y el día 6; IgG purificada de ratón (500 ng/ml) sirvió como patrón. Figura 1b: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE; del inglés, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), de gp96-Ig purificada con proteína A; carril 1: tinción con azul de Coomassie (1 µg de proteína); carril 2: transferencia Western con anti-gp96 monoclonal (anti-Grp94, 9G10; 100 ng de proteína). Figura 1c: Análisis, mediante SDS-PAGE, de la proteína de fusión gp96 modificada-Ig (gp96-Ig) purificada, en comparación con IgG de ratón (mIgG) y la proteína de fusión CD30-Ig (CD30-Ig), bajo condiciones reductoras y no reductoras. A la izquierda se indican los marcadores de pesos moleculares (en kDa).

Figuras 2a-2d: Secreción y localización intracelular de gp96-Ig. Figura 2a: círculos oscuros: gp96-Ig en el sobrenadante del cultivo, círculos claros: gp96-Ig en productos de lisis celulares. La gp96-Ig fue cuantificada mediante ELISA; se sembraron células SCLC-gp96-Ig en una concentración de 106/ml. Figura 2b: análisis de células SCLC-gp96-Ig permeabilizadas, mediante separación celular activada por fluorescencia (FACS; del inglés, fluorescence activated cell sorting); línea discontinua: anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-isotiocianato de fluoresceína (FITC; del inglés, fluorescein isothiocyanate) (testigo negativo); línea continua: anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-ficoeritrina. Figura 2c: análisis de células SCLC no permeabilizadas, mediante FACS; no transfectadas. Figura 2d: análisis de células SCLC no permeabilizadas, mediante FACS; células SCLC transfectadas con gp96-Ig; en ambos gráficos, la línea discontinua es anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-FITC; la línea continua es anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón- FITC.

Figuras 3a-3b: Tumorigenicidad disminuida de células E.G7 (figura 3a) y células LLC (figura 3b) (LLC = carcinoma pulmonar de Lewis, por sus siglas en inglés "Lewis lung carcinoma") (círculos oscuros) transfectadas con gp96-Ig, en comparación con células falsamente transfectadas (triángulos) y no transfectadas (círculos claros). Se usaron grupos de seis ratones por parámetro.

Figuras 4a-4d: La gp96-Ig secretora genera memoria tumoralmente específica. Se inmunizaron dos veces ratones C57BL/6, en intervalos bisemanales, con 106 células E.G7 transfectadas con gp96-Ig (círculos oscuros en todos los gráficos) o con 106 células E.G7 irradiadas (triángulos), o no se inmunizaron (círculos claros). Dos semanas más tarde, los ratones fueron estimulados (seis ratones por grupo) con el número de células tumorales que se indica en las figuras: figura 4a: E.G7; figura 4b: EL4; figura 4c: LLC; figura 4d: LLC-ova.

Figuras 5a-5h: Efecto del agotamiento de células inmunocompetentes sobre el rechazo de 106 células E.G7-gp96-Ig. Se muestran curvas de crecimiento tumoral en ratones individuales. Figuras 5a-5d (gráficos superiores): Agotamiento de células inmunocompetentes dos días antes de la inoculación tumoral subcutánea. Figuras 5e-5h

(gráficos inferiores): Agotamiento de células inmunocompetentes tres días después de la inoculación tumoral subcutánea.

5. Descripción detallada del invento

El presente invento se refiere a la aplicación de la tecnología de DNA recombinante para modificar proteínas de choque térmico que están implicadas en la presentación de antígenos, y para preparar composiciones inmunogénicas que puedan ser utilizadas para la prevención y el tratamiento del cáncer y de enfermedades infecciosas.

Las "células antigénicas" a las que se refiere el invento pueden ser cualesquier células antigénicas, incluyendo, pero sin limitarse a, células cancerosas, células preneoplásicas, células infectadas con un patógeno intracelular, y células obtenidas de un sujeto infectado con un agente infeccioso.

En células cancerosas o células infectadas con patógenos se producen naturalmente complejos inmunogénicos de hsp-péptido. Dichos complejos de hsp-péptido han sido utilizados para provocar, en el receptor de los complejos, una respuesta inmune específica contra la misma clase de células cancerosas o células infectadas y, por lo tanto, son útiles para la prevención y el tratamiento del cáncer o de enfermedades infecciosas. Sin embargo, dichos complejos inmunogénicos no son generalmente secretados en grandes cantidades por estas células. Además, puesto que no siempre es posible o factible obtener un gran número de células cancerosas o células infectadas (células antigénicas), la cantidad de los complejos de hsp-péptido obtenibles a partir de dichas células es a veces muy limitada. Por consiguiente, es deseable encontrar modos de superar el problema de tener un suministro limitado de los complejos inmunogénicos de hsp-péptido. Parte del problema es debido a los métodos para purificar complejos de hsp-péptido que se llevan normalmente a la práctica, los cuales requieren la lisis de las células. El presente invento se refiere a métodos para causar que los complejos inmunogénicos de hsp-péptido sean secretados por las células antigénicas al medio de cultivo. Las células antigénicas del invento pueden producir y secretar continuamente los deseados complejos inmunogénicos, los cuales son convenientemente recolectados del medio de cultivo. También se dan a conocer métodos mejorados para purificar dichos complejos inmunogénicos procedentes del medio de cultivo. Además, el invento se refiere a métodos para potenciar la inmunogenicidad de células cancerosas y células infectadas, para que estas células antigénicas puedan ser administradas directamente a un sujeto como una vacuna para prevenir y tratar el cáncer o enfermedades infecciosas.

En un aspecto de la divulgación, las composiciones inmunogénicas preparadas mediante los métodos del invento comprenden complejos moleculares no covalentemente asociados que contienen una proteína de choque térmico (hsp) modificada y un péptido antigénico que está presente en, o que es una porción de una proteína que está presente en, una célula antigénica. La proteína de choque térmico modificada del invento es secretada por una célula en la cual se expresa; carece de una secuencia de retención en el retículo endoplásmico, presente en la proteína de choque térmico no modificada; y comprende un marcador peptídico. Cuando las hsps modificadas se expresan en células recombinantes, son secretadas y pueden ser purificadas mediante el marcador peptídico usando cromatografía de afinidad.

En otro aspecto de la divulgación, una proteína de choque térmico modificada del invento es secretada por una célula en la cual se expresa; comprende un marcador peptídico; y comprende un péptido líder no presente en la proteína de choque térmico no modificada. Para las hsps que se encuentran naturalmente en el citoplasma, el péptido líder añadido al extremo amínico facilita su translocación en el RE.

Las hsps modificadas a las que se refiere el invento muestran la misma actividad biológica cualitativa que las hsps presentes en la naturaleza. Las modificaciones no afectan a las capacidades de las hsps modificadas para unirse específica y no covalentemente a péptidos antigénicos y para presentar dichos péptidos unidos a las células inmunes relevantes en el curso de la presentación antigénica. De esta manera, las hsps modificadas pueden formar complejos inmunogénicos no covalentes con péptidos antigénicos tanto in vitro como en células antigénicas. Los complejos de hsp modificadapéptido formados endógenamente en células antigénicas e in vitro son capaces de provocar una respuesta inmune específica en un animal contra las células antigénicas de las que proceden los péptidos antigénicos.

En particular, el invento se refiere a la modificación de secuencias nucleotídicas que codifican proteínas de choque térmico (hsp) que son naturalmente retenidas en el retículo endoplásmico de una célula animal. De acuerdo con el invento, una secuencia génica de hsp, preferiblemente una secuencia de cDNA, es modificada por sustitución o supresión de porciones de la secuencia de hsp que codifican un tramo de péptido que señala la retención de la hsp en el RE. Se sabe que la señal para la retención de una hsp en el RE se encuentra en un tramo de péptido que comprende Xaa-Asp-Glu-Leu (XDEL, en que X puede ser cualquier aminoácido), situado en el extremo carboxílico. La secuencia génica de hsp es además modificada al añadir a la secuencia de hsp una secuencia nucleotídica que codifica un marcador peptídico. La resultante secuencia de hsp modificada del invento codifica una proteína de fusión de hsp modificada que es secretada y no queda retenida en el RE.

Para una hsp que se encuentra naturalmente en el citoplasma, su secuencia génica es modificada al añadir no sólo

una secuencia nucleotídica que codifica un marcador peptídico sino también una secuencia nucleotídica que codifica un péptido líder. Esta secuencia se une al extremo 5' de la región codificadora de la secuencia génica de hsp. Las hsps que llevan dicho péptido líder hidrófobo son importadas a la luz del RE. El péptido líder es reconocido por una partícula de reconocimiento de la señal, que dirige la cadena peptídica de hsp en crecimiento a la superficie

5 citosólica de las membranas del RE rugoso. Las hsps secretables se translocan completamente a través de la membrana hasta la luz, donde el péptido líder es digerido por proteasas.

En relación con el invento se pueden utilizar diversos marcadores peptídicos, con diferentes funciones y afinidades, para facilitar la purificación de la hsp modificada o de los complejos de hsp modificada-péptido por cromatografía de

10 afinidad. Un marcador peptídico preferido comprende las regiones constantes de una inmunoglobulina. Dependiendo del marcador peptídico fusionado con una hsp, la hsp modificada puede adquirir nuevas propiedades, tal como una dimerización, que pueden ser ventajosamente explotadas para potenciar la función de la hsp modificada o de los complejos de hsp modificada-péptido. En la sección 5.1.4 se describen secuencias que codifican marcadores peptídicos y péptidos líder, y métodos para unir dichas secuencias a secuencias de hsp.

En consecuencia, el invento se refiere a moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias nucleotídicas que codifican hsps modificadas ("secuencias génicas de hsps modificadas"), y vectores de clonación, vectores de expresión, y células recombinantes que contienen dichas secuencias. El invento también se refiere a moléculas de

15 ácido nucleico que comprenden secuencias nucleotídicas que son complementarias de las secuencias génicas de hsps modificadas. Una secuencia génica de hsp modificada puede ser clonada y/o multiplicada por replicación en un vector de clonación en una célula intermedia, antes de la introducción en células huésped adecuadas para la producción de complejos de hsp modificada-péptido. Las construcciones de expresión o vectores de expresión que comprenden una secuencia génica de hsp modificada pueden ser construidas e introducidas en las células huésped mediante cualesquiera de los métodos conocidos en la técnica, como se describe en la sección 5.2.1. Dependiendo

20 de las necesidades, se pueden utilizar diversas células para la expresión de la hsp modificada, incluyendo células cancerosas, células infectadas por patógenos, y células normales.

La construcción génica de expresión a la que se refiere el invento comprende una secuencia nucleotídica que codifica una hsp modificada, preferiblemente una secuencia de DNA complementario (cDNA) que codifica una hsp

30 modificada. La secuencia génica de hsp modificada está operativamente asociada con al menos una región reguladora (por ejemplo, un promotor) que controla la expresión de la secuencia de hsp modificada en una célula huésped apropiada. Alternativamente, la secuencia de hsp modificada puede estar flanqueada por regiones que promueven la recombinación homóloga en la célula huésped con objeto de insertar la secuencia de hsp modificada en una posición intracromosómica para que la secuencia de hsp modificada este operativamente asociada con al menos una región reguladora que controla la expresión de la secuencia de hsp modificada en la célula huésped. A

35 ambos tipos de construcciones génicas de expresión que comprenden una secuencia génica de hsp modificada se hace también referencia como "secuencia génica expresable de hsp modificada". En consecuencia, el invento se refiere a una célula recombinante que contiene una secuencia génica expresable de hsp modificada.

En las secciones 5.1.1 y 5.1.4 se describen con detalle secuencias que codifican hsps y secuencias que codifican marcadores peptídicos, y métodos para obtener dichas secuencias. En la sección 5.1.2 se describen métodos para

40 modificar la secuencia génica de hsp por adición, supresión o sustitución de nucleótidos.

En otra realización, el invento se refiere a métodos para purificar hsps modificadas a partir de cultivos celulares, que comprenden cultivar las células recombinantes para permitir la expresión de la secuencia génica de hsp modificada,

45 y recuperar y purificar la hsp modificada que es secretada por las células recombinantes. Generalmente, la purificación de las hsps modificadas y secretadas a partir del sobrenadante del cultivo se ve facilitada por el marcador peptídico situado en la hsp modificada al utilizar el apropiado método de cromatografía de afinidad, tal como se describe en la sección 5.3. Los métodos mejorados no requieren lisar las células, lo que permite que éstas crezcan continuamente y produzcan hsps modificadas o complejos de hsp modificada-péptido.

50

Puesto que las hsps modificadas a las que se refiere el invento, como las hsps no modificadas, son capaces de unirse a péptidos, tras la expresión de la secuencia génica de hsp modificada en una célula antigénica recombinante, se produce la hsp modificada que llega a asociarse con péptidos en el RE para formar complejos no

55 covalentes. Puesto que algunas de las proteínas de las células antigénicas son antigénicas/inmunogénicas, los péptidos/proteínas que forman complejos con las hsps modificadas confieren una inmunidad específica a un huésped frente a la célula antigénica en que están presentes. Dichos complejos inmunogénicos no covalentes son secretados por las células recombinantes y se acumulan en el medio de cultivo.

En consecuencia, el invento también se refiere a métodos para producir, así como purificar, complejos inmunogénicos no covalentes de hsps modificadas y péptidos antigénicos en células. En un aspecto de la divulgación, el método comprende introducir una secuencia génica de hsp modificada en células antigénicas, cultivar

60 las células antigénicas recombinantes para permitir la expresión de la secuencia génica de hsp modificada, y recuperar del medio de cultivo, y purificar, los complejos de hsp modificada-péptido antigénico que son secretados por las células antigénicas recombinantes. Los péptidos antigénicos de los complejos son representativos de péptidos antigénicos hallados dentro de las células antigénicas, y no hay necesidad de aislar ni/o caracterizar los

65

antígenos, ni siquiera de conocer las identidades de estos antígenos, antes de utilizar el péptido antigénico para vacunar a un sujeto. Los métodos aplicables a la purificación de hsp modificadas procedentes del medio de cultivo celular, tales como los descritos en la sección 5.3, son también útiles en la purificación de complejos de hsp modificada-péptido antigénico con tal que no alteren las asociaciones no covalentes de las hsp modificadas y los péptidos antigénicos. En un aspecto específico de la divulgación, las células antigénicas recombinantes que comprenden secuencias génicas expresables de hsp modificadas pueden ser utilizadas en una composición inmunogénica para usos terapéuticos y profilácticos. La inmunogenicidad de dichas composiciones puede ser ensayada mediante métodos conocidos en la técnica y descritos en la sección 5.5 y la sección 6. Con el fin de preparar la hsp modificada que va a ser utilizada para preparar complejos de hsp-péptido in vitro, puede ser deseable utilizar células huésped que no sean en sí antigénicas para que la hsp modificada y secretada no resulte cargada con moléculas antigénicas indeseadas.

Al cultivar las células recombinantes continua o discontinuamente, a una escala adecuadamente grande, pueden producirse una hsp modificada o complejos de hsp modificada-péptido en grandes cantidades. Del medio de cultivo celular del cultivo continuo o discontinuo a gran escala de las células antigénicas recombinantes se puede purificar un complejo inmunogénico deseable que comprende una hsp modificada y proteínas/péptidos antigénicos recombinantemente producidos. Una línea celular permanente que secreta complejos de hsp modificada-péptido puede proporcionar una fuente consistente, reproducible y abundante de la composición inmunogénica útil. Dependiendo de las necesidades, las células recombinantes que contienen una secuencia génica de hsp modificada pueden ser reunidas y/o distribuidas en partes alícuotas, o multiplicadas, o guardadas mediante congelación y almacenamiento bajo nitrógeno líquido, para que, en el futuro, puedan recuperarse y utilizarse muchas veces partidas de las células huésped recombinantes.

En otro aspecto de la divulgación en que se conoce la secuencia de codificación de una proteína o péptido antigénico, se contempla que dicha secuencia que codifica la molécula antigénica pueda ser clonada en una construcción génica de expresión e introducida en una célula recombinante que contiene una secuencia expresable de hsp modificada. La clonación de una proteína o péptido antigénico en un vector de expresión puede ser llevada a cabo mediante técnicas estándares, tales como las descritas para la expresión de la hsp modificada (véase la sección 5.2). La proteína o péptido antigénico se expresa conjuntamente con una hsp modificada en la célula recombinante. Estas proteínas o péptidos antigénicos forman complejos no covalentes con la hsp modificada en el RE de la célula recombinante. Dicho péptido antigénico puede ser un fragmento de una proteína antigénica expresada en la célula cancerosa, tal como, por ejemplo, un fragmento de un antígeno tumoralmente específico o un antígeno asociado con un tumor. Los complejos de hsp modificada- péptido antigénico de estas células son secretados al medio de cultivo y, asimismo, pueden ser recuperados y ser purificados mediante cromatografía de afinidad del modo descrito en la sección 5.3. Las células recombinantes que contienen tanto una secuencia expresable de hsp modificada como la construcción génica de expresión que codifica el antígeno pueden ser también utilizadas como una composición inmunogénica para usos terapéuticos y profilácticos.

El invento se refiere además a que las hsp modificadas y purificadas puedan ser cargadas con péptidos antigénicos para formar complejos inmunogénicos no covalentes in vitro. Dichos complejos son útiles en el tratamiento y la prevención del cáncer o de enfermedades infecciosas. Los péptidos antigénicos pueden ser purificados a partir de fuentes celulares o pueden ser sintetizados, si se conocen las secuencias de los péptidos, mediante métodos conocidos en la técnica. En un aspecto específico de la divulgación, se incuban péptidos antigénicos con hsp modificadas que han sido reversiblemente inmovilizadas sobre una fase sólida mediante su marcador peptídico, de modo que se forman complejos no covalentes de péptidos antigénicos y hsp modificadas sobre la fase sólida.

En consecuencia, el invento se refiere a un método para preparar complejos de una proteína de choque térmico modificada del invento no covalentemente asociada con un péptido in vitro, que comprende incubar las proteínas de choque térmico modificadas y los péptidos durante un tiempo suficiente para la formación de los complejos.

Las composiciones inmunogénicas a las que se refiere el invento que incluyen tanto complejos de hsp modificada-péptido como células antigénicas recombinantes, preparados mediante los métodos reivindicados, pueden potenciar la inmunocompetencia de un individuo y generar una inmunidad específica tanto contra células neoplásicas como contra células infectadas con patógenos. Dichas composiciones inmunogénicas son también capaces de prevenir el desarrollo de tumores e inhibir el crecimiento y el progreso de células tumorales, y de prevenir el crecimiento de patógenos o de células infectadas con patógenos. Las composiciones inmunogénicas pueden ser utilizadas para provocar una reacción inflamatoria en el sitio del tumor y causar finalmente una regresión de la carga tumoral en los pacientes con cáncer tratados.

En consecuencia, el invento se refiere a un método para generar una respuesta inmune contra un antígeno en un individuo, que comprende administrar al individuo un complejo inmunogénico de una proteína de choque térmico modificada del invento no covalentemente asociada con el antígeno o con un fragmento del mismo. El invento también se refiere a un método para tratar o prevenir el cáncer en un individuo que tiene cáncer o en quien se desea la prevención del cáncer, que comprende administrar al individuo un complejo inmunogénico de una proteína de choque térmico modificada del invento no covalentemente asociada con el antígeno o con un fragmento del mismo. Además, el invento se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un individuo que

tiene una enfermedad infecciosa o en quien se desea la prevención de una enfermedad infecciosa, que comprende administrar al individuo un complejo inmunogénico de una proteína de choque térmico modificada del invento no covalentemente asociada con el antígeno o con un fragmento del mismo.

Las composiciones inmunogénicas pueden ser administradas autológicamente al individuo del cual se obtuvieron los tejidos o células cancerosas, o a individuos que presentan un riesgo aumentado de cáncer a causa de su historia familiar o de factores de riesgo ambientales. Asimismo, las composiciones inmunogénicas pueden ser administradas autológicamente al individuo del cual se obtuvieron las células antigénicas o las células infectadas con patógeno, o a individuos que presentan riesgo de infección por el mismo patógeno.

Los métodos de tratamiento o prevención del cáncer son también generalmente aplicables a otros individuos que no proporcionaron las células cancerosas para la expresión de la hsp modificada, con tal que tengan el mismo tipo de cáncer que el proveedor de las células cancerosas. El mismo principio se aplica al tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas ya que el método es aplicable a otros individuos con tal de que estén infectados con agentes infecciosos que sean antigénicamente similares al agente infeccioso que infectó al proveedor de las células huésped antigénicas. Los usos de las composiciones inmunogénicas para tratar o prevenir el cáncer y enfermedades infecciosas se describen en las secciones 5.7 y 5.8.

5.1. Construcción de secuencias génicas de hsps modificadas

Se describen aquí métodos para la construcción de una construcción génica que codifica una proteína de choque térmico (hsp) modificada que se puede expresar en células procarióticas y eucarióticas. Se describe específicamente la construcción de una secuencia nucleotídica que codifica una hsp modificada, la inserción de la secuencia génica de hsp modificada en un vector de clonación apropiado, y la introducción de la construcción génica de expresión en la apropiada célula huésped para la producción de una hsp modificada y complejos de hsp modificada-péptido.

Las proteínas de choque térmico, indistintamente aquí referidas como "proteínas de estrés", útiles en el tratamiento y la prevención del cáncer o de enfermedades infecciosas, pueden ser seleccionadas de entre cualquier proteína celular que satisfaga uno cualquiera de los criterios siguientes. Es una proteína cuya concentración intracelular aumenta cuando una célula está expuesta a estímulos estresantes, es capaz de unirse a otras proteínas o péptidos y es capaz de liberar, en presencia de adenosina trifosfato (ATP) o de un pH bajo, las proteínas o péptidos unidos; o es una proteína que muestra una homología de al menos 35% con cualquier proteína celular que tiene cualquiera de las propiedades anteriores. Las hsps de los complejos que pueden modificarse y prepararse mediante el presente invento incluyen, pero no se limitan a, hsp70, hsp90, gp96, BiP y proteína disulfuro isomerasa. Preferiblemente, las hsps son hsps humanas. Los complejos preferidos comprenden hsp60, hsp70, hsp90, proteína disulfuro isomerasa o BiP modificadas, unidas no covalentemente a un antígeno proteico. En una realización específica, el complejo comprende una forma modificada de gp96 humana que se encuentra normalmente en el retículo endoplásmico de células eucarióticas.

Hasta la fecha se han identificado tres familias principales de hsps; es decir, hsp60, hsp70 y hsp90. Además, también se incluyen la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y otras proteínas del retículo endoplásmico que contienen un(os) dominio(s) de tipo tiorredoxina, tales como, pero sin limitarse a, ERp72 y ERp61. Se contempla que se puedan modificar y preparar miembros de todas estas familias de hsps mediante la práctica de métodos a los que hace referencia el presente invento.

Se ha descubierto que las familias hsp60, hsp70, hsp90 y proteína disulfuro isomerasa están compuestas por proteínas cuyas secuencias están relacionadas con las de las proteínas de estrés, teniendo, por ejemplo, más de un 35% de identidad de aminoácidos, pero cuyos niveles de expresión no son alterados por el estrés. Por lo tanto, se considera que la definición de proteína de estrés o de choque térmico, como se utiliza aquí, abarca otras proteínas, muteínas, compuestos análogos y variantes de las mismas que tienen al menos de 35% a 55%, preferiblemente de 55% a 75%, y muy preferiblemente de 75% a 85%, de identidad de aminoácidos con miembros de estas familias, cuyos niveles de expresión en una célula resultan aumentados en respuesta a un estímulo estresante.

Se pueden seguir los procedimientos descritos en tratados estándares, tales como, por ejemplo, *Methods in Enzymology*, 1987, volumen 154, Academic Press; Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, New York, EE.UU.; y Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, EE.UU., para llevar a cabo reacciones rutinarias de biología molecular utilizadas para construir y modificar la construcción génica de hsp. Los métodos descritos con detalle más adelante son sólo para ilustración y no están a modo de limitación. También se pueden utilizar, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, diversos vectores de clonación y sistemas de expresión que están comercialmente disponibles.

5.1.1. Aislamiento de secuencias génicas de hsp

En diversos aspectos, el invento se refiere a secuencias de aminoácidos de proteínas de choque térmico (hsp)

modificadas, y a fragmentos y derivados de las mismas, que son funcionalmente activas. Como se usa aquí, hsp modificada "funcionalmente activa" se refiere a hsps modificadas que presentan una o más actividades funcionales conocidas asociadas con la hsp no modificada, tales como la unión de un péptido antigénico, la liberación, en presencia de adenosina trifosfato (ATP) o de un pH bajo, del péptido antigénico unido, etc. Se proporcionan ácidos nucleicos que codifican las hsps modificadas y fragmentos de las mismas anteriormente descritos, así como ácidos nucleicos complementarios de, y capaces de hibridarse con, dichos ácidos nucleicos.

Las secuencias de aminoácidos y secuencias de nucleótidos de las proteínas de choque térmico presentes en la naturaleza están generalmente disponibles en bases de datos de secuencias, tales como GenBank. Se pueden utilizar programas informáticos, tal como Entrez, para explorar la base de datos y recuperar cualquier dato de interés sobre secuencias de aminoácidos y secuencias genéticas mediante el número de acceso. También se puede buscar en estas bases de datos para identificar secuencias con diversos grados de similitud con respecto a una secuencia en cuestión usando programas, tales como FASTA y BLAST, que clasifican las secuencias similares por puntuaciones de alineación y estadística.

Las secuencias nucleotídicas de ejemplos no restrictivos de hsps que pueden ser modificadas y expresadas mediante métodos a los que hace referencia el invento están publicadas así: gp96 humana: n° de acceso X15187 de Genebank; Maki *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 5658-5662; gp96 de ratón: n° de acceso M16370 de Genebank; Srivastava *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 3807-3811; BiP de ratón: n° de acceso U16277 de Genebank; Haas *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2250-2254; BiP humana: n° de acceso M19645 de Genebank; Ting *et al.*, 1988, DNA 7: 275-286; hsp70 de ratón: n° de acceso M35021 de Genebank; Hunt *et al.*, 1990, Gene 87: 199-204; hsp70 humana: n° de acceso M24743 de Genebank; Hunt *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 6455-6489. A causa de la degeneración del código genético, la expresión "secuencia génica de hsp" no sólo se refiere a la secuencia nucleotídica presente la naturaleza, sino que también abarca todas las demás secuencias de DNA degeneradas que codifican la hsp.

Toda célula eucariótica puede servir potencialmente como fuente de ácido nucleico para obtener la región de codificación de un gen hsp. Las secuencias de ácido nucleico que codifican hsps pueden ser aisladas de fuentes de vertebrados, mamíferos y también primates, incluyendo seres humanos.

El DNA puede ser obtenido mediante procedimientos estándares conocidos en la técnica a partir de DNA clonado (por ejemplo, un "banco" de DNA) o mediante multiplicación de DNA. Los clones derivados de DNA genómico pueden contener regiones reguladoras y de DNA intrónico además de las regiones de codificación; los clones derivados de cDNA sólo contendrán secuencias exónicas. Sea cual sea la fuente, el gen hsp debería ser clonado molecularmente en un vector adecuado para la propagación del gen.

En la clonación molecular de un gen hsp a partir de DNA genómico, se generan y clonan fragmentos de DNA para formar un banco genómico. Puesto que algunas de las secuencias que codifican hsps relacionadas están disponibles y pueden ser purificadas y marcadas, los fragmentos de DNA clonados del banco de DNA genómico pueden ser explorados por hibridación de ácido nucleico con la sonda marcada (W. Benton y R. Davis, 1977, Science 196: 180; M. Grunstein y D. Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 3961). Se hibridarán los fragmentos de DNA que tengan una homología sustancial con respecto a la sonda. También es posible identificar el fragmento apropiado por digestión(es) con enzimas de restricción y por comparación de los tamaños de los fragmentos con los esperados de acuerdo con un mapa de restricción conocido, si se dispone de éste.

Las alternativas al aislamiento del DNA genómico de hsp incluyen, pero no se limitan a, sintetizar químicamente la propia secuencia génica a partir de una secuencia conocida o preparar cDNA correspondiente al mRNA que codifica la hsp. Por ejemplo, de células que expresan la hsp se puede aislar RNA para la clonación de cDNA del gen hsp. Se puede generar un banco de cDNA mediante métodos conocidos en la técnica y se puede explorar por métodos tales como los descritos para explorar un banco de DNA genómico. Si se dispone de un anticuerpo hacia la hsp, la hsp puede ser identificada mediante la unión del anticuerpo marcado a los clones que supuestamente sintetizan hsp.

A continuación se presentan como ejemplos, pero no a modo de limitación, otras realizaciones específicas para la clonación de una secuencia nucleotídica que codifica una hsp.

En una realización específica, se pueden identificar secuencias nucleotídicas que codifican una proteína de choque térmico de una familia y se pueden obtener por hibridación, bajo unas condiciones de rigor bajo a medio, con una sonda que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una hsp.

A modo de ejemplo y no de limitación, se indican a continuación procedimientos en que se utilizan dichas condiciones de bajo rigor (véase también Shilo y Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6789-6792). Los filtros que contienen DNA son previamente tratados durante 6 horas a 40°C en una disolución que contiene formamida al 35%, SSC 5x, Tris-HCl 50 mM (pH de 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,1%, Ficoll al 0,1%, albúmina sérica bovina (BSA; del inglés, bovine serum albumin) al 1% y 500 µg/ml de DNA desnaturalizado de esperma de salmón. Las hibridaciones se llevan a cabo en la misma disolución con las modificaciones siguientes: PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,2%, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón, y sulfato de dextrano al 10% (peso/volumen), y se

usan 5-20 x10⁶ cpm de sonda marcada con 32P. Los filtros son incubados en la mezcla de hibridación durante 18-20 horas a 40°C y son luego lavados durante 1,5 horas a 55°C en una disolución que contiene SSC 2x, Tris-HCl 25 mM (pH de 7,4), EDTA 5 mM y SDS al 0,1%. Se sustituye la disolución de lavado por disolución fresca y se incuba durante 1,5 horas más a 60°C. Se secan los filtros con papel secante y se expone película a ellos para autorradiografía. Si es necesario, se lavan los filtros una tercera vez a 65-68°C y se vuelve a exponer película a ellos. En la técnica se conocen bien otras condiciones de bajo rigor que se pueden utilizar (por ejemplo, las empleadas para hibridaciones de especies cruzadas).

En otro aspecto de la divulgación, se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, polymerase chain reaction) para multiplicar la secuencia deseada en un clon de DNA o en un banco genómico o de cDNA, antes de la selección. La PCR puede ser llevada a cabo, por ejemplo, mediante el uso de un termociclador y Taq polimerasa (GeneAmp™). El DNA que se multiplica puede incluir cDNA o DNA genómico de cualquier especie. En la PCR, como cebadores, se pueden utilizar cebadores oligonucleotídicos que representan conocidas secuencias de ácido nucleico de hsp relacionadas. En un aspecto preferido, los cebadores oligonucleotídicos representan al menos parte del gen hsp que está muy conservada entre hsp de diferentes especies. Para uso en las reacciones PCR, se puede elegir sintetizar diversos cebadores degenerados diferentes. También es posible variar el rigor de las condiciones de hibridación utilizadas en el cebado de las reacciones PCR, para permitir grados mayores o menores de similitud de secuencias nucleotídicas entre la secuencia nucleotídica de hsp conocida y la secuencia del compuesto homólogo de ácido nucleico que se aísla. Para la hibridación de especies cruzadas, se prefieren condiciones de bajo rigor. Para la hibridación de especies iguales, se prefieren condiciones de rigor moderado. Después de una multiplicación exitosa, la secuencia que codifica una hsp puede ser clonada y secuenciada. Si el tamaño de la región de codificación del gen hsp que se multiplica es demasiado grande para que la región sea multiplicada en una sola PCR, se pueden llevar a cabo varias PCR que cubran el gen entero, preferiblemente con regiones solapantes, y se pueden ligar los productos de la PCR entre sí para formar la secuencia de codificación completa. Alternativamente, si se multiplica un segmento de un gen hsp, ese segmento puede ser clonado y ser utilizado como sonda para aislar un clon genómico o de cDNA completo.

Antes de la modificación, el gen hsp puede ser insertado en un vector de clonación apropiado y ser introducido en células huésped para que se generen muchas copias de la secuencia génica. Se puede utilizar un gran número de sistemas de vector-huésped conocidos en la técnica, tales como, pero sin limitarse a, bacteriófagos tales como derivados de lambda, o plásmidos tales como pBR322 o derivados del plásmido pUC, o el vector Bluescript (Stratagene).

Mediante los métodos anteriores no se pretende limitar los métodos mediante los cuales pueden obtenerse o propagarse clones de proteínas hsp. Las proteínas de choque térmico modificadas a las que hace referencia el invento son modificadas para que sean secretadas y puedan ser fácilmente purificadas del medio de cultivo celular. En particular, una hsp modificada a la que hace referencia el invento carece de un segmento del polipéptido que señala la retención de la hsp en el retículo endoplásmico (RE). La señal de retención es invalidada por supresión del péptido o por sustitución por un péptido que no actúa como señal. Además, la hsp modificada comprende un marcador peptídico que facilita la recuperación y la purificación. El marcador peptídico puede ser fusionado con cualquier porción de la hsp que no esté implicada en la unión con el péptido antigénico, tal como, por ejemplo, el extremo carboxílico. Además, si la hsp se encuentra naturalmente en el retículo endoplásmico, se añade un péptido líder para dirigir su translocación a través de la membrana del RE, para su secreción. En una realización preferida, el péptido de retención de una hsp que está normalmente situado en el extremo carboxílico es sustituido por un marcador peptídico.

5.1.2. Modificación de genes de proteínas de choque térmico

Las proteínas de choque térmico modificadas a las que hace referencia el invento son modificadas para que sean secretadas por las células en que se expresan, y pueden ser fácilmente purificadas del medio de cultivo celular. En particular, una hsp modificada a la que hace referencia el invento carece de un segmento del polipéptido que señala la retención de la hsp en el retículo endoplásmico (RE). Dicho péptido se encuentra en hsp que permanecen en el RE, tal como, pero sin limitarse a, gp96. La señal de retención es invalidada por supresión del péptido o por sustitución por un péptido que no actúa como señal. Además, la hsp modificada comprende un marcador peptídico que facilita la recuperación y la purificación. El marcador peptídico puede ser fusionado con cualquier porción de la hsp que no esté implicada en la unión con el péptido antigénico, tal como, por ejemplo, el extremo carboxílico. Preferiblemente, el péptido de retención de una hsp que está normalmente situado en el extremo carboxílico es sustituido por un marcador peptídico. Además, si la hsp se encuentra naturalmente en el citoplasma, se añade un péptido líder para dirigir su translocación a través de la membrana del RE, para su secreción.

Las modificaciones presentes en hsp modificadas a las que hace referencia el invento pueden ser producidas mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Las manipulaciones que dan lugar a su producción pueden tener lugar a nivel génico o proteico, preferiblemente a nivel génico. Por ejemplo, la región de codificación clonada de una hsp puede ser modificada mediante cualquiera de los numerosos métodos de DNA recombinante conocidos en la técnica (Sambrook *et al.*, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.; Ausubel *et al.* en el capítulo 8 de Current Protocols in Molecular

Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, EE.UU.). A partir de la discusión siguiente, será evidente que se introducen o combinan sustituciones, supresiones, inserciones o cualquier combinación de las mismas para alcanzar una secuencia nucleotídica final que codifica una hsp modificada.

- 5 Alternativamente, la hsp modificada puede ser sintetizada químicamente. Por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador peptídico, se puede sintetizar un péptido que corresponda a una porción de una hsp que comprende las modificaciones deseadas.

5.1.3. Péptido de retención

- 10 El péptido que causa que una hsp permanezca en el retículo endoplásmico (RE) está típicamente situado en el extremo carboxílico y tiene la secuencia Xaa-Asp-Glu-Leu (o XDEL) (Munro y Pelham, 1987, Cell 48: 899-907). La expresión "péptido de retención" se usa aquí para referirse a esta secuencia tetrapeptídica, que es KDEL (Lys- Asp-Glu-Leu) en la mayoría de las hsps de mamífero. Se ha hallado que la secuencia peptídica de retención en
15 *Saccharomyces cerevisiae* y en *Schizosaccharomyces pombe* es HDEL (His-Asp-Glu-Leu) y ADEL (Ala-Asp-Glu-Leu), respectivamente (Pidoux y Armstrong, 1992, EMBO J. 11: 1583-1591).

- El péptido de retención de las hsps puede ser invalidado suprimiendo el péptido de retención o anulando la señal con sustituciones de aminoácidos en el péptido de retención. Como propuesta general, debería eliminarse toda
20 señal presente en la secuencia de hsp modificada que, si está presente, tiende a evitar la secreción de la hsp modificada por la célula. Dependiendo de la hsp individual, dichas señales pueden incluir dominios transmembranales y dominios citoplásmicos. Con objeto de eliminar el segmento de DNA que codifica la secuencia del péptido de retención u otras señales, la secuencia génica de hsp puede ser escindida en sitios apropiados con una(s) endonucleasa(s) de restricción si dichos sitios son asequibles, liberándose un fragmento de DNA que codifica
25 el péptido de retención. El resto de la región de codificación de hsp es luego aislado y es ligado para formar la secuencia génica de hsp modificada.

- Alternativamente, si los sitios de restricción convenientes no son asequibles, se puede liberar un fragmento mayor de DNA usando sitios de restricción situados en secuencias que flanquean la región que codifica la secuencia del
30 péptido de retención, y sustituir por un fragmento similar de DNA sintético que carezca de la secuencia que codifica el péptido de retención. Hay que tener cuidado para asegurar que se mantiene el marco de lectura de traducción apropiado.

- Si es deseable, pueden crearse sitios de restricción en las posiciones apropiadas mediante métodos de mutagénesis dirigida al sitio y/o métodos de multiplicación de DNA conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Shankarappa *et al.*, 1992, PCR Method Appl. 1: 277-278. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es utilizada comúnmente para introducir cambios de secuencia deseados en el DNA de interés. Todos los cambios en la secuencia cebadora pueden ser fácilmente incorporados al producto de DNA de la PCR, lo que facilita la subsiguiente incorporación de los cambios a la secuencia génica. Por ejemplo, oligonucleótidos sintéticos que llevan incorporado el sitio de
40 restricción deseado son usados junto con los apropiados cebadores de la secuencia flanqueadora para multiplicar dos fragmentos de DNA adyacentes. Cada uno de estos fragmentos multiplicados contendrá un nuevo sitio de restricción en un extremo. Después de una digestión enzimática tanto en el nuevo sitio como en el sitio flanqueador, los fragmentos multiplicados son ligados y son subclonados en un vector dispuesto para ulteriores manipulaciones. Es imprescindible que la introducción de sitios de restricción no altere la secuencia de aminoácidos de la proteína
45 codificada.

- Cualquier técnica de mutagénesis conocida en este campo técnico puede ser usada para modificar nucleótidos individuales de una secuencia de DNA con el fin de crear una(s) sustitución(es) de aminoácido(s) en la secuencia peptídica expresada o con el fin de crear/suprimir sitios de restricción para facilitar ulteriores manipulaciones. Dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis química, mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* (C. Hutchinson *et al.*, 1978, J. Biol. Chem. 253: 6551), mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (Smith, 1985, Ann. Rev. Genet. 19: 423-463; Hill *et al.*, 1987, Methods Enzymol. 155: 558-568), extensión de solapamiento basada en PCR (Ho *et al.*, 1989, Gene 77: 51-59), mutagénesis del megacebador basada en PCR (Sarkar *et al.*, 1990, Biotechniques 8: 404-407), etc. Las modificaciones pueden ser confirmadas por secuenciación didesoxi de DNA de doble cadena.
55

- El método anterior puede ser aplicado para sustituir uno o más de los restos de aminoácido de la secuencia tetrapeptídica de retención, especialmente los restos Asp, Glu y Leu. Los sustitutos para un aminoácido de la secuencia del péptido de retención pueden ser seleccionados entre miembros de una clase diferente a la que pertenece el aminoácido. Los aminoácidos apolares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos polares neutros incluyen glicocola, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos positivamente cargados (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos negativamente cargados (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las sustituciones de las que, en general, se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades bioquímicas serán aquellas en que (a) un resto hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo, sustituye a, o es sustituido por, un resto hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o una prolina sustituye a, o es
65 sustituida por, cualquier otro resto; (c) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo,

arginilo o histidilo, sustituye a, o es sustituido por, un resto electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (d) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, sustituye a, o es sustituido por, un resto que no tiene cadena lateral, por ejemplo, glicocola.

- 5 Con los métodos anteriores no se pretende limitar los métodos mediante los cuales se puede suprimir o anular la secuencia del péptido de retención y/o otra señal en una hsp.

5.1.4. Fusión de un marcador peptídico y/o un péptido líder

- 10 La hsp modificada a la que hace referencia el invento es también una proteína de fusión que comprende un marcador peptídico. En ciertas realizaciones, se puede también fusionar un péptido líder con una hsp modificada para, de este modo, facilitar el transporte de la hsp modificada al retículo endoplásmico (RE) para su secreción.

- 15 En diversas realizaciones, dicha proteína de fusión puede prepararse al ligar una secuencia génica de hsp con la secuencia que codifica el marcador peptídico o el péptido líder en el marco de lectura apropiado. Si se usan secuencias genómicas, hay que tener cuidado para asegurar que el gen modificado permanece en el mismo marco de lectura de la traducción, ininterrumpido por señales de parada de la traducción y/o falsas señales de corte y empalme del RNA mensajero.

- 20 En una realización preferida, el marcador peptídico está fusionado por su extremo amínico con el extremo carboxílico de la hsp. El sitio exacto del extremo carboxílico en que se produce la fusión no es crítico. Por ejemplo, el marcador peptídico puede tomar el lugar del péptido de retención. El sitio óptimo puede ser determinado mediante una experimentación rutinaria. Las inmunogenicidades de las hsps modificadas pueden ser ensayadas mediante los métodos descritos en la sección 5.5.

- 25 En la modificación de una hsp se pueden utilizar diversos marcadores peptídicos conocidos en la técnica, tales como, pero sin limitarse a, las regiones constantes de inmunoglobulinas, una secuencia de polihistidina (Petty, 1996, "Metal-chelate affinity chromatography", en Current Protocols in Molecular Biology, volumen 2, compilado por Ausubel *et al.*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience), glutatión S-transferasa (GST; Smith, 1993, Methods Mol. Cell. Biol. 4: 220-229), la proteína ligante de maltosa de *E. coli* (Guan *et al.*, 1987, Gene 67: 21-30), y diversos dominios ligantes de celulosa (Patentes de EE.UU. números 5.496.934, 5.202.247 y 5.137.819; Tomme *et al.*, 1994, Protein Eng. 7: 117-123), etc. Algunos marcadores peptídicos pueden proporcionar las nuevas propiedades estructurales a la hsp modificada, tal como la capacidad para formar multímeros. La dimerización de una hsp modificada con un péptido unido puede aumentar la avidez de la interacción entre la hsp y su pareja en el curso de la presentación antigénica. Estos marcadores peptídicos proceden habitualmente de proteínas que existen normalmente como homopolímeros. Marcadores peptídicos tales como los dominios extracelulares de CD8 (Shiue *et al.*, 1988, J. Exp. Med. 168: 1993-2005), o CD28 (Lee *et al.*, 1990, J. Immunol. 145: 344-352), o porciones de la molécula inmunoglobulínica que contienen sitios para enlaces disulfuro intercatenarios, podrían conducir a la formación de multímeros. Otros posibles marcadores peptídicos son secuencias cortas de aminoácidos para las que se dispone de anticuerpos monoclonales, tales como, pero sin limitarse a, los ejemplos bien conocidos siguientes: el epítipo FLAG, los aminoácidos 408-439 del epítipo myc, y el epítipo de la hemaglutinina (HA) de influenzavirus. Otros marcadores peptídicos son reconocidos por parejas ligantes específicas y, de esta manera, facilitan el aislamiento mediante la unión por afinidad con la pareja ligante, la cual está preferiblemente inmovilizada y/o sobre un soporte sólido. Como apreciarán los expertos en la técnica, se pueden utilizar muchos métodos para obtener la región de codificación de los marcadores peptídicos anteriormente mencionados, incluyendo, pero sin limitarse a, clonación de DNA, multiplicación de DNA y métodos sintéticos. Algunos de los marcadores peptídicos y de los reactivos para su detección y aislamiento son comercialmente asequibles.

- 50 Un marcador peptídico preferido es una porción no variable de la molécula inmunoglobulínica. Típicamente, dichas porciones comprenden al menos unos dominios CH2 y CH3 funcionales de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. También se realizan fusiones utilizando el extremo carboxílico de la porción Fc de un dominio constante, o una región inmediatamente amino-terminal con respecto al dominio CH1 de la cadena pesada o ligera. El adecuado marcador peptídico basado en inmunoglobulina puede obtenerse de los subtipos IgG-1, -2, -3 y -4, IgA, IgE, IgD e IgM, pero preferiblemente de IgG1. Preferiblemente, se utiliza una inmunoglobulina humana cuando la hsp modificada está destinada a un uso in vivo para seres humanos. Se conocen muchos DNAs que codifican regiones constantes de cadena inmunoglobulínica ligera o pesada, o son fácilmente obtenibles de bancos de cDNA. Véanse, por ejemplo, Adams *et al.*, 1980, Biochemistry 19: 2711-2719; Gough *et al.*, 1980, Biochemistry 19: 2702-2710; Dolby *et al.*, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 6027-6031; Rice *et al.*, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 7862-7865; Falkner *et al.*, 1982, Nature 298: 286-288; y Morrison *et al.*, 1984, Ann. Rev. Immunol. 2: 239-256. Puesto que se dispone de muchos sistemas de marcación y reactivos inmunológicos para la detección de inmunoglobulinas, la proteína de fusión de hsp modificada-Ig ("hsp modificada-Ig") puede ser fácilmente detectada y cuantificada mediante diversas técnicas inmunológicas conocidas en este campo técnico, tal como el uso de ensayos de inmovinabsorción con enzimas ligadas (ELISA), inmunoprecipitación, separación celular activada por fluorescencia (FACS), etc. Similarmente, si el marcador peptídico es un epítipo con anticuerpos fácilmente asequibles, dichos reactivos pueden ser utilizados con las técnicas anteriormente mencionadas para detectar, cuantificar y aislar la hsp modificada que contiene el marcador peptídico. En muchos casos, no hay necesidad de

desarrollar anticuerpos específicos para la hsp modificada.

Una realización particularmente preferida es una fusión de una hsp modificada, que carece del péptido de retención, con los dominios bisagra, CH2 y CH3 de inmunoglobulina G-1 (IgG-1) murina (Bowen *et al.*, J. Immunol. 156: 442-9). Este péptido contiene tres restos de cisteína que están normalmente implicados en el enlace disulfuro con otras cisteínas de la molécula de Ig. Puesto que no se requiere ninguna de las cisteínas para que el péptido actúe como marcador, uno o más de estos restos de cisteína puede ser opcionalmente sustituido por otro resto de aminoácido, tal como, por ejemplo, serina. Para realizar dichas sustituciones se pueden aplicar métodos tales como los descritos en la sección 5.1.2.

Se pueden utilizar diversas secuencias líder conocidas en la técnica para la secreción eficaz de las hsps modificadas desde células bacterianas y de mamífero (von Heijne, 1985, J. Mol. Biol. 184: 99-105). Los péptidos líder son seleccionados basándose en la futura célula huésped, y pueden incluir secuencias de bacterias, levaduras, virus, animales y mamíferos. Por ejemplo el péptido líder de la glicoproteína D de herpesvirus es adecuado para uso en una diversidad de células de mamífero. Un péptido líder preferido para uso en células de mamífero puede obtenerse de la región VJ2- C de la cadena inmunoglobulínica kappa de ratón (Bernard *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 5812-5816).

En la práctica de este invento, son adecuadas las secuencias de DNA que codifican el péptido líder o el marcador peptídico deseados y son conocidas o fácilmente asequibles de bancos o proveedores comerciales. Para obtener secuencias que codifiquen un marcador peptídico o un péptido líder, también se pueden aplicar los métodos para obtener secuencias de hsp descritos en la sección 5.1.1.

5.2. Producción de hsps modificadas

En diversos aspectos de la divulgación, las secuencias que codifican hsps modificadas son insertadas en un vector de expresión para la propagación y expresión en células recombinantes.

Una construcción de expresión, como se usa aquí, se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica una hsp modificada, operativamente asociada con una o más regiones reguladoras que permiten la expresión de la hsp modificada en una célula huésped apropiada. "Operativamente asociada" se refiere a una asociación en que las regiones reguladoras y la secuencia de hsp modificada que se va a expresar están unidas y dispuestas de tal modo que permiten la transcripción y, finalmente, la traducción.

Las regiones reguladoras necesarias para la transcripción de la hsp modificada pueden ser proporcionadas por el vector de expresión. También se puede proporcionar un codón de iniciación de la traducción (ATG) si se va a expresar la secuencia de hsp modificada que carece de su codón de iniciación similar. En un sistema de construcción-huésped compatible, se unirán factores de transcripción celulares, tal como RNA polimerasa, a las regiones reguladoras de la construcción de expresión para efectuar la transcripción de la secuencia de hsp modificada en el organismo huésped. La naturaleza exacta de las regiones reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar de célula huésped a célula huésped. Generalmente, se requiere un promotor que sea capaz de unirse a RNA polimerasa y promover la transcripción de una secuencia de ácido nucleico operativamente asociada. Dichas regiones reguladoras pueden incluir las secuencias no codificadoras 5' implicadas en la iniciación de la transcripción y la traducción, tales como la caja TATA, la secuencia de remate ("capping"), la secuencia CAAT, y similares. La región no codificadora 3' con respecto a la secuencia codificadora puede contener secuencias reguladoras de la terminación de la transcripción, tales como terminadores y sitios de poliadenilación.

Para la expresión de la hsp modificada se pueden utilizar regiones reguladoras tanto constitutivas como inducibles. Puede ser deseable utilizar promotores inducibles cuando las condiciones óptimas para el crecimiento de las células recombinantes y las condiciones para la expresión de alto nivel de la hsp modificada son diferentes. Más adelante, en la sección siguiente, se proporcionan ejemplos de regiones reguladoras útiles.

Con objeto de fijar secuencias de DNA con funciones reguladoras, tales como promotores, a la secuencia génica de hsp modificada o insertar la secuencia génica de hsp modificada en el sitio de clonación de un vector, se pueden ligar conectores o adaptadores, que proporcionan los apropiados sitios de restricción compatibles, a los extremos de los cDNAs mediante técnicas bien conocidas en este campo técnico (Wu *et al.*, 1987, Methods in Enzymol. 152: 343-349). La escisión con una enzima de restricción puede ir seguida de una modificación para crear extremos romos, por digestión o compleción, en los extremos del DNA de cadena sencilla antes de la ligación. Alternativamente, se puede introducir un sitio deseado para enzima de restricción en un fragmento de DNA por multiplicación del DNA mediante el uso de una PCR con cebadores que contienen el deseado sitio para enzima de restricción.

Una construcción de expresión que comprende una secuencia de hsp modificada operativamente asociada con regiones reguladoras puede ser introducida directamente en apropiadas células huésped para la expresión y producción de complejos de hsp modificada-péptido sin una clonación ulterior. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.580.859. Las construcciones de expresión pueden también contener secuencias de DNA que faciliten la integración de la secuencia de hsp modificada en el genoma de la célula huésped mediante, por ejemplo,

recombinación homóloga. En este caso, no es necesario emplear un vector de expresión que comprenda un origen de replicación adecuado para las células huésped apropiadas con objeto de que la hsp modificada se propague y se exprese en las células huésped.

5 5.2.1. Sistemas de huésped-vector

Se describen aquí sistemas de vectores y células huésped que pueden ser utilizados para la expresión de hsps modificadas. En el presente invento, se pueden utilizar diversos vectores de expresión que incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, cósmidos, fagos, fagómidos, y virus modificados. Típicamente, dichos vectores de expresión comprenden un origen funcional de replicación para la propagación del vector en una célula huésped apropiada, uno o más sitios de endonucleasas de restricción para la inserción de la secuencia génica de hsp modificada, y uno o más marcadores de selección. El vector de expresión puede ser utilizado con una célula huésped compatible que puede proceder de un organismo procariótico o eucariótico, incluyendo, pero sin limitarse a, bacterias, levaduras, insectos, mamíferos y seres humanos.

Se introducen vectores y construcciones de expresión en células huésped con el fin de producir hsps modificadas y secretadas. Se puede utilizar cualquier tipo celular que pueda producir proteínas de choque térmico y sea compatible con el vector de expresión, incluyendo los que han sido cultivados in vitro y los genéticamente diseñados. Las células huésped pueden ser obtenidas de sujetos normales o afectados, incluyendo seres humanos sanos, pacientes con cáncer y pacientes con una enfermedad infecciosa, depósitos de laboratorios privados, colecciones públicas de cultivos, tal como la American Type Culture Collection, y proveedores comerciales.

Las células en que puede introducirse una secuencia génica de hsp modificada con los fines de producción y secreción in vivo de complejos de hsp modificada-péptido antigénico pueden incluir, pero no se limitan a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos y granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas como las obtenidas, por ejemplo, de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc. La elección del tipo celular depende del tipo de tumor o enfermedad infecciosa que se trata o se previene, tipo que puede ser determinado por quien tiene experiencia en la técnica.

Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y la modificación de proteínas. Se puede elegir una célula huésped que modifique y procese los expresados productos génicos de una manera específica similar a la forma en que el receptor procesa sus hsps. Con el fin de producir grandes cantidades de hsp, es preferible que el tipo de célula huésped utilizado en el presente invento haya sido utilizado para la expresión de genes heterólogos y esté razonablemente bien caracterizado y desarrollado para procedimientos de producción a gran escala. En una realización específica, las células huésped son del mismo paciente a quien posteriormente se van a administrar complejos de hsp modificada-péptido o células recombinantes que secretan complejos de hsp modificada-péptido; es decir, la célula utilizada para la expresión de la hsp modificada y para la administración a un sujeto es autóloga con respecto al sujeto.

En un aspecto particular de la divulgación, una construcción de expresión que comprende una secuencia génica de hsp modificada es introducida en una célula antigénica. Como se utilizan aquí, las células antigénicas pueden incluir células preneoplásicas que están infectadas con un agente infeccioso causativo de cáncer, tal como un virus, pero que aún no son neoplásicas; o células antigénicas que han estado expuestas a un mutágeno o un agente causativo de cáncer, tales como, por ejemplo, agentes que dañan el DNA, radiación, etc. Otras células que pueden ser utilizadas son las células preneoplásicas que están en transición desde una forma normal a una forma neoplásica, según son caracterizadas por su morfología o sus funciones fisiológicas o bioquímicas.

Preferiblemente, las células cancerosas y células preneoplásicas utilizadas en los métodos del invento son de origen mamífero. Los mamíferos considerados por este aspecto del invento incluyen seres humanos, animales de compañía (por ejemplo, perros y gatos), ganado (por ejemplo, ovejas, vacas, cabras, cerdos y caballos), animales de laboratorio (por ejemplo, ratones, ratas y conejos) y animales salvajes cautivos o libres.

En diversos aspectos de la divulgación, se pueden utilizar cualesquier células cancerosas, preferiblemente células cancerosas humanas, en los presentes métodos para la producción de complejos de hsp modificada-péptido o para uso como una vacuna. Las células cancerosas proporcionan los péptidos antigénicos que llegan a asociarse no covalentemente con la hsp modificada y expresada. Los cánceres que pueden ser tratados o prevenidos con composiciones inmunogénicas preparadas mediante métodos del invento incluyen, pero no se limitan a, tumores tales como sarcomas y carcinomas. En la sección 5.7 se enumeran ejemplos de cánceres que son sensibles a los métodos del invento. En consecuencia, en el presente invento se pueden usar cualesquier tejidos o células aislados de una lesión preneoplásica o un cáncer, incluyendo el cáncer que ha producido metástasis en múltiples sitios remotos. Por ejemplo, se pueden utilizar células halladas en un tejido anormalmente creciente, células leucémicas circulantes, lesiones metastásicas y también un tejido tumoral sólido.

En otro aspecto de la divulgación, también se pueden utilizar líneas celulares derivadas de una lesión preneoplásica,

tejidos cancerosos o células cancerosas con tal que las células de la línea celular tengan al menos uno o más determinantes antigénicos en común con antígenos de las células cancerosas diana. Se prefieren tejidos cancerosos, células cancerosas, células infectadas con un agente causativo de cáncer, otras células preneoplásicas y líneas celulares de origen humano. Preferiblemente, se usan células cancerosas que son extirpadas del paciente al que se van a administrar finalmente los complejos, es decir, la realización autóloga del invento, aunque éste no ha de ser necesariamente el caso (por ejemplo, las células cancerosas pueden proceder de uno o más individuos diferentes).

Las células cancerosas y preneoplásicas pueden ser identificadas mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las células cancerosas pueden ser identificadas por morfología, ensayos enzimáticos, ensayos de proliferación, caracterización citogenética, mapeo de DNA, secuenciación de DNA, presencia de un virus causativo de cáncer, o una historia de exposición a un mutágeno o un agente causativo de cáncer, formación de imágenes, etc. Como otro ejemplo, las células cancerosas pueden ser obtenidas por cirugía, endoscopia u otras técnicas de biopsia. Si se conocen algunas características distintivas de las células cancerosas, éstas pueden ser también obtenidas o purificadas mediante cualesquier métodos bioquímicos o inmunológicos conocidos en la técnica, tales como, pero sin limitarse a, cromatografía de afinidad y separación celular activada por fluorescencia (por ejemplo, con un anticuerpo fluorescentemente marcado, contra un antígeno expresado por las células cancerosas).

No hay necesidad alguna de usar una población clonal u homogénea o purificada de células cancerosas. Los tejidos cancerosos, las células cancerosas o las líneas celulares pueden ser obtenidas de un solo individuo o reunidas de varios individuos. No es esencial usar células de la diana final in vivo (por ejemplo, células del tumor del futuro receptor) con tal que al menos uno o más determinantes antigénicos de las células cancerosas diana estén presentes en las células utilizadas para la expresión de una hsp modificada. Además, se pueden utilizar células procedentes de metástasis distantes para preparar una composición inmunogénica contra el cáncer primario. Se puede utilizar una mezcla de células con tal que un número sustancial de células de la mezcla sean células cancerosas y compartan al menos un determinante antigénico con la célula cancerosa diana. En una realización específica, las células cancerosas que se van a utilizar en la expresión de una hsp modificada son purificadas.

Los vectores basados en *E. coli* son los sistemas más populares y versátiles para la expresión de alto nivel de proteínas extrañas (Makrides, 1996, Microbiol. Rev. 60: 512-538). Los ejemplos no restrictivos de regiones reguladoras que pueden ser utilizadas para la expresión en *E. coli* pueden incluir, pero sin limitarse a, lac, trp, lpp, phoA, recA, tac, T3, T7 y ϕ P_L (Makrides, 1996, Microbiol. Rev. 60: 512-538). Los ejemplos no restrictivos de vectores de expresión procarióticos pueden incluir la serie de vectores ϕ gt, tal como ϕ gt11 [Huynh *et al.*, 1984, en "DNA Cloning Techniques, A Practical Approach", vol. I (compilado por D. Glover), páginas 49-78, IRL Press, Oxford], y la serie de vectores pET (Studier *et al.*, 1990, Methods Enzymol. 185: 60-89). Sin embargo, un posible inconveniente de un sistema de vector-huésped procariótico es la incapacidad para llevar a cabo gran parte del procesamiento postraducciona de las células de mamífero. Por lo tanto, se prefiere un sistema de vector-huésped eucariótico y se prefiere más un sistema de vector-huésped de mamífero, y lo más preferido es un sistema de vector-huésped humano.

Para la expresión de hsps modificadas en células huésped de mamífero, se puede utilizar una diversidad de regiones reguladoras, tales como, por ejemplo, los promotores precoz y tardío de SV40, el promotor precoz inmediato de citomegalovirus (CMV) y el promotor de la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (RSV-LTR; del inglés, Rous sarcoma virus long terminal repeat). Los promotores inducibles que pueden ser útiles en células de mamífero incluyen, pero no se limitan a, los asociados con el gen de metalotioneína II, repeticiones terminales largas sensibles a glucocorticoides del virus del tumor mamario de ratón (MMTV-LTR; del inglés, mouse mammary tumor virus LTR), el gen del interferón γ y el gen de hsp90 (Williams *et al.*, 1989, Cancer Res. 49: 2735-42; Taylor *et al.*, 1990, Mol. Cell Biol. 10: 165-75). Puede resultar ventajoso usar promotores de choque térmico o promotores de estrés para conducir la expresión de la hsp modificada en células huésped recombinantes.

Las siguientes regiones reguladoras de animales, que presentan especificidad tisular y han sido utilizadas en animales transgénicos, pueden ser también utilizadas en células tumorales de un tipo tisular concreto: región de control del gen de la elastasa I, que es activa en células acinares pancreáticas (Swift *et al.*, 1984, Cell 38: 639-646; Ornitz *et al.*, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7: 425-515); región de control del gen de la insulina, que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, Nature 315: 115-122); región de control del gen de inmunoglobulinas, que es activa en células linfoides (Grosschedl *et al.*, 1984, Cell 38: 647-658; Adams *et al.*, 1985, Nature 318: 533-538; Alexander *et al.*, 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 1436-1444); región de control del virus del tumor mamario de ratón, que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder *et al.*, 1986, Cell 45: 485-495); región de control del gen de la albúmina, que es activa en el hígado (Pinkert *et al.*, 1987, Genes and Devel. 1: 268-276); región de control del gen de la alfa-fetoproteína, que es activa en el hígado (Krumlauf *et al.*, 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1639-1648; Hammer *et al.*, 1987, Science 235: 53-58); región de control del gen de la alfa 1-antitripsina, que es activa en el hígado (Kelsey *et al.*, 1987, Genes and Devel. 1: 161-171); región de control del gen de la beta-globina, que es activa en células mieloides (Mogram *et al.*, 1985, Nature 315: 338-340; Kollas *et al.*, 1986, Cell 46: 89-94); región de control del gen de la proteína básica de la mielina, que es activa en células oligodendrocíticas del cerebro (Readhead *et al.*, 1987, Cell 48: 703-712); región de

control del gen de la cadena ligera 2 de la miosina, que es activa en el músculo esquelético (Sani, 1985, Nature 314: 283-286); y región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropinas, que es activa en el hipotálamo (Mason *et al.*, 1986, Science 234: 1372- 1378).

5 La eficacia de la expresión de la hsp modificada en una célula huésped puede ser potenciada mediante la inclusión de apropiados elementos potenciadores de la transcripción en el vector de expresión, tales como los hallados en el virus SV40, el virus de la hepatitis B, el citomegalovirus, genes de inmunoglobulinas, metalotioneína y α -actina (véanse Bittner *et al.*, 1987, Methods in Enzymol. 153: 516-544; y Gorman, 1990, Curr. Op. in Biotechnol. 1: 36-47).

10 El vector de expresión puede también contener secuencias que permitan el mantenimiento y la replicación del vector en más de un tipo de célula huésped, o la integración del vector en el cromosoma del huésped. Dicha secuencias pueden incluir, pero no se limitan a, orígenes de replicación, secuencias de replicación autónoma (ARS; del inglés, autonomously replicating sequences), DNA de centrómero y DNA de telómero. También puede resultar ventajoso utilizar vectores lanzadera que pueden replicarse y mantenerse en al menos dos tipos de células huésped.

15 Además, el vector de expresión puede contener genes marcadores seleccionables o explorables para aislar, identificar o rastrear inicialmente las células huésped que contienen DNA que codifica una hsp modificada. Para la producción de larga duración y alto rendimiento de complejos de hsp modificada-péptido, se prefiere una expresión estable en células de mamífero. Para células de mamífero, se pueden utilizar diversos sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitarse a, los genes de timidina quinasa del virus herpes simplex (Wigler *et al.*, 1977, Cell 11: 223), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, 1980, Cell 22: 817), empleados en células tk⁻, hgprt⁻ y aprt⁻, respectivamente. Además, se puede usar la resistencia a antimetabolitos como base de selección para dihidrofolato reductasa (dhfr), que confiere resistencia al metotrexato (Wigler *et al.*, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567; O'Hare *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072), neomicina fosfotransferasa (neo), que confiere resistencia al aminoglicosido G-418 (Colberre-Garapin *et al.*, 1981, J. Mol. Biol. 150:1); e higromicina fosfotransferasa (hyg), que confiere resistencia a la higromicina (Santerre *et al.*, 1984, Gene 30: 147). También se pueden usar otros marcadores seleccionables, tales como, pero sin limitarse a, histidinol y ZeocinTM.

30 Las células huésped de mamífero preferidas incluyen, pero no se limitan a, las derivadas de seres humanos, monos y roedores (véase, por ejemplo, M. Kriegler en "Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual", New York, EE.UU., Freeman & Co., 1990), tales como la línea de células renales de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), línea de riñón embrionario humana (células 293, 293-EBNA, o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión; Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36: 59, 1977), células renales de cría de hámster [BHK (del inglés, baby hamster kidney), ATCC CCL 10], células de ovario de hámster chino (CHO; del inglés, chinese hamster ovary)-DHFR (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 4216, 1980), células de Sertoli de ratón (Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251, 1980), fibroblastos de ratón (NIH-3T3), células renales de mono (CVI, ATCC CCL 70), células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587), células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2), células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34), células de hígado de rata Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442), células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75), células hepáticas humanas (hep G2, HB 8065) y células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL 51). A continuación se indican tipos ejemplares de células cancerosas utilizados para demostrar la utilidad de las células recombinantes (que producen complejos de hsp modificada-péptido) como vacuna para el cáncer: línea celular NIH3T3 de fibroblastos de ratón, línea celular LLC de carcinoma pulmonar de Lewis en ratón, línea celular P815 de mastocitoma de ratón, línea celular EL4 de linfoma de ratón y su transfectante E.G7 de ovoalbúmina, línea celular B16F10 de melanoma de ratón, línea celular MC57 de fibrosarcoma de ratón, y líneas celulares SCLC n° 2 y SCLC n° 7 de carcinoma pulmonar humano de células pequeñas.

50 Diversos sistemas de expresión basados en virus pueden ser también utilizados con células de mamífero para producir hsps modificadas. Los vectores en que se usan esqueletos de virus DNA han sido obtenidos del virus 40 de simios (SV40; del inglés, simian virus 40) (Hamer *et al.*, 1979, Cell 17: 725), adenovirus (Van Doren *et al.*, 1984, Mol. Cell. Biol. 4: 1653), virus adenoasociados (McLaughlin *et al.*, 1988, J. Virol. 62: 1963) y papillomavirus bovinos (Zinn *et al.*, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 4897). En los casos en que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia de DNA del donante puede ser ligada con un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede ser luego 17 insertado en el genoma adenovirico mediante recombinación in vitro o in vivo. La inserción en una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, la región E1 o E3) dará lugar a un virus recombinante que es viable y capaz de expresar productos heterólogos en huéspedes infectados [véase, por ejemplo, Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81: 3655-3659].

65 El papillomavirus bovino (BPV; del inglés, bovine papillomavirus) puede infectar a muchos vertebrados superiores, incluido el hombre, y su DNA se replica como un episoma. Para la expresión de genes recombinantes se han desarrollado diversos vectores lanzadera que existen como elementos extracromosómicos, estables y de múltiples copias (20- 300 copias/célula) en células de mamífero. Típicamente, estos vectores contienen un segmento de DNA de BPV (el genoma entero o un fragmento de transformación del 69%), un promotor para una amplia variedad de

huéspedes, una señal de poliadenilación, señales de corte y empalme, un marcador seleccionable, y secuencias plasmídicas "atóxicas" que permiten que el vector se propague en *E. coli*. Después de la construcción y la multiplicación en bacterias, células de mamífero en cultivo son transfectadas con la construcción génica de expresión mediante, por ejemplo, la técnica de coprecipitación con fosfato cálcico. Para aquellas células huéspedes que no manifiestan un fenotipo transformado, la selección de transformantes es llevada a cabo mediante el uso de un marcador seleccionable dominante, tal como la resistencia a histidinol y a G418. Como se describe en la sección 6, se insertó una secuencia génica de hsp modificada en dos vectores de BPV, pBCMGSNeo y pBCMGRHis (Karasuyama *et al.*, Eur. J. Immunol. 18: 97-104; Ohe *et al.*, Human Gene Therapy 6: 325-33), con los que luego se transfeció una diversidad de tipos celulares para la expresión de la hsp modificada.

Alternativamente, se puede usar el promotor 7.5K del virus vaccinia [véanse, por ejemplo, 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. 79: 4927-4931]. En los casos en que se usa una célula huésped humana, se pueden usar vectores basados en el origen (OriP) del virus de Epstein-Barr (EBV; del inglés, Epstein-Barr virus) y el antígeno nuclear 1 de EBV (EBNA-1; del inglés, Epstein-Barr nuclear antigen 1; un factor de replicación que actúa en trans). Dichos vectores, por ejemplo, EBO-pCD (Spickofsky *et al.*, 1990, DNA Prot. Eng. Tech. 2 14-18), y pDR2 y $\square$ DR2 (asequibles de Clontech Laboratories), pueden ser usados con una gran variedad de células huésped humanas.

También se pueden preparar hsp modificadas con un sistema de expresión basado en retrovirus. Se pueden usar retrovirus, tal como el virus de la leucemia murina de Moloney, ya que la mayor parte de la secuencia génica viral puede ser eliminada y ser sustituida con la secuencia génica de hsp modificada, mientras que las funciones víricas que faltan pueden ser provistas en trans. Por contraste con la transfección, los retrovirus pueden infectar y transferir genes eficazmente a una gran variedad de tipos celulares, incluyendo, por ejemplo, células hematopoyéticas primarias. Además, la variedad de huéspedes para infección por un vector retroviral puede ser manipulada mediante la elección de la envoltura usada para el empaquetamiento del vector.

Por ejemplo, un vector retroviral puede comprender una repetición terminal larga (LTR) 5', una LTR 3', una señal de empaquetamiento, un origen de replicación bacteriano y un marcador seleccionable. El DNA de hsp modificada es insertado en una posición entre la LTR 5' y la LTR 3' para que la transcripción a partir del promotor de LTR 5' transcriba el DNA clonado. La LTR 5' comprende un promotor, incluyendo, pero sin limitarse a, un promotor de LTR, una región R, una región U5 y un sitio de unión al cebador, en ese orden. Las secuencias nucleotídicas de estos elementos de la LTR son bien conocidas en la técnica. En el vector de expresión también se pueden incluir un promotor heterólogo así como múltiples marcadores de selección por fármacos, para facilitar la selección de las células infectadas. Véanse McLauchlin *et al.*, 1990, Prog. Nucleic Acid Res. and Molec. Biol. 38: 91-135; Morgenstern *et al.*, 1990, Nucleic Acid Res. 18: 3587-3596; Choulifa *et al.*, 1996, J. Virol. 70: 1792-1798; Boesen *et al.*, 1994, Biotherapy 6: 291-302; Salmons y Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4: 129-141; y Grossman y Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3: 110-114.

Otros sistemas de vector-huésped eucariótico útiles pueden incluir sistemas de levaduras y de insectos. En levaduras, se pueden usar diversos vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles con *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadero), *Schizosaccharomyces pombe* (levadura de bipartición), *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* (levaduras metilótropas). Para una revisión, véanse "Current Protocols in Molecular Biology", vol. 2, 1988, compilado por Ausubel *et al.*, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, capítulo 13; Grant *et al.*, 1987, "Expression and Secretion Vectors for Yeast", en Methods in Enzymology, compilado por Wu y Grossman, 1987, Acad. Press, New York, EE.UU., vol. 153, páginas 516-544; Glover, 1986, "DNA Cloning", vol. II, IRL Press, Washington, Distrito de Columbia, EE.UU., capítulo 3; Bitter, 1987, "Heterologous Gene Expression in Yeast", Methods in Enzymology, compilado por Berger y Kimmel, Acad. Press, New York, EE.UU., vol. 152, páginas 673-684; y "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*", 1982, compilado por Strathern *et al.*, Cold Spring Harbor Press, volúmenes I y II.

En un sistema de insecto, se puede usar un baculovirus, el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV; del inglés, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus) como un vector para que se exprese una hsp modificada en células de *Spodoptera frugiperda*. Las secuencias génicas de hsp modificada pueden ser clonadas en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y ser dispuestas bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina). Estos virus recombinantes son luego usados para infectar células huésped en las que se expresa el DNA insertado (véanse, por ejemplo, Smith *et al.*, 1983, J. Virol. 46: 584; Smith, patente de EE.UU. n° 4.215.051).

Cualquiera de los vectores de clonación y expresión aquí descritos puede ser sintetizado y ensamblado, a partir de secuencias de DNA conocidas, mediante técnicas bien conocidas en este campo técnico. Las regiones reguladoras y los elementos potenciadores pueden tener diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. Algunos vectores y algunas células huésped se pueden obtener comercialmente. En el apéndice 5 de Current Protocols in Molecular Biology, 1988, compilado por Ausubel *et al.*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, que se incorpora aquí por referencia, y en los catálogos de proveedores comerciales tales como Clontech Laboratories, Stratagene Inc. e Invitrogen Inc., se describen ejemplos no restrictivos de vectores útiles.

5.2.2. Expresión de hsps modificadas

Las construcciones de expresión que contienen secuencias nucleotídicas clonadas que codifican hsps modificadas pueden ser introducidas en la célula huésped mediante diversas técnicas conocidas en este campo técnico, incluyendo, pero sin limitarse a, para células procarióticas, transformación bacteriana (Hanahan, 1985, en "DNA Cloning, A Practical Approach", 1: 109-136), y, para células eucarióticas, transfección mediada por fosfato cálcico (Wigler *et al.*, 1977, Cell 11: 223-232), transfección mediada por liposomas (Schaefer-Ridder *et al.*, 1982, Science 215: 166-168), electroporación (Wolff *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 3344) y microinyección (Cappechi, 1980, Cell 22: 479-488). La expresión conjunta de una hsp modificada y un antígeno en la misma célula huésped puede ser llevada esencialmente a cabo mediante los mismos métodos.

Para la producción de larga duración y alto rendimiento de una hsp modificada o de complejos de hsp modificada-péptido, apropiadamente procesados, se prefiere una expresión estable en células de mamífero. Las líneas celulares que expresan establemente una hsp modificada o complejos de hsp modificada-péptido pueden ser generadas usando un vector que contiene un marcador seleccionable. A modo de ejemplo pero no de limitación, después de la introducción de las construcciones de expresión, se puede dejar que las células generadas crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable de la construcción de expresión confiere resistencia a la selección y permite óptimamente que las células integren establemente la construcción de expresión en sus cromosomas y crezcan en cultivo y se multipliquen en líneas celulares. Dichas células pueden ser cultivadas durante un largo periodo de tiempo mientras se expresa continuamente la hsp modificada.

Las células recombinantes pueden ser cultivadas bajo condiciones estándares de temperatura, tiempo de incubación, densidad óptica y composición de medios. Alternativamente, unas células antigénicas recombinantes pueden ser cultivadas bajo unas condiciones que emulen las necesidades nutricionales y fisiológicas de la célula cancerosa o la célula infectada. Sin embargo, las condiciones para el crecimiento de las células recombinantes pueden ser diferentes de aquéllas para la expresión de hsps modificadas y proteínas antigénicas. Se pueden utilizar también medios y condiciones de cultivo modificados para potenciar la producción de complejos de hsp-péptido. Por ejemplo las células recombinantes que contienen hsps modificadas con sus promotores afines pueden ser expuestas a calor o a otro estrés ambiental, o a estrés químico. Se pueden aplicar cualesquier técnicas conocidas en este campo técnico para establecer las condiciones óptimas para producir la hsp modificada o complejos de hsp modificada-péptido.

En una realización en que las células recombinantes que expresan la hsp modificada se utilizan como una vacuna, la secuencia génica de hsp modificada es introducida en una célula antes de la administración in vivo de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede ser llevada a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo la técnica de terapia génica, tal como, pero sin limitarse a, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector vírico o bacteriófago que contiene las secuencias génicas de hsps modificadas, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosoma, transferencia génica mediada por microcélula, fusión de esferoplastos, etc. Numerosas técnicas conocidas en este campo técnico para la introducción de genes extraños en células (véanse, por ejemplo, Loeffler y Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217: 599-618; Cohen *et al.*, 1993, Meth. Enzymol. 217: 618-644; Cline, 1985, Pharmac. Ther. 29: 69-92) pueden ser utilizadas de acuerdo con el presente invento con tal que no se alteren las necesarias funciones de las células receptoras en cuanto al desarrollo y la fisiología. La técnica debería proporcionar la transferencia estable de la secuencia génica de hsp modificada a la célula para que la secuencia fuera expresable por la célula y preferiblemente heredable y expresable por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes pueden ser suministradas a un paciente mediante diversos métodos conocidos en la técnica. En un aspecto preferido de la divulgación, se inyectan células epiteliales, por ejemplo, subcutáneamente. En otro aspecto, se pueden aplicar células cutáneas recombinantes al paciente como un injerto de piel. Preferiblemente, las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas) son administradas intravenosamente. La cantidad de células destinadas al uso depende del efecto deseado, el estado del paciente, etc., y puede ser determinada por un experto en la técnica.

5.2.3. Expresión conjunta de hsps modificadas y antígenos

En un aspecto alternativo de la divulgación, una forma expresable de una secuencia nucleotídica que codifica un antígeno proteico o porciones del mismo puede ser introducida en una célula recombinante que contiene una secuencia génica expresable de hsp modificada, para que el antígeno se exprese conjuntamente con una hsp modificada. En la sección 5.4.5 se describen métodos para obtener la secuencia nucleotídica que codifica un antígeno. Se pueden utilizar cualesquier técnicas para la introducción de la forma expresable de la secuencia génica del antígeno, tales como, pero sin limitarse a, las descritas en la sección 5.2.2. El antígeno proteico o las porciones del mismo llegan a asociarse no covalentemente con la hsp modificada en el RE de la célula recombinante, y se secreta el complejo de hsp modificada-péptido antigénico resultante. Dicho complejo puede ser purificado de los medios de cultivo celular mediante cualquiera de los métodos descritos en la sección 5.3 y mediante otros métodos conocidos en la técnica. El complejo purificado de hsp modificada-antígeno puede ser utilizado como una vacuna

para estimular una respuesta inmune contra la proteína antigénica en un sujeto con el fin del tratamiento o la prevención del cáncer o de enfermedades infecciosas.

Además, las células recombinantes que contienen formas expresables tanto de una secuencia génica de hsp modificada como de una secuencia nucleotídica que codifica una proteína antigénica pueden ser utilizadas directamente como una vacuna, para su inyección a un sujeto. Como se describió anteriormente, dichas células secretan un complejo de hsp modificada-antígeno que puede estimular una respuesta inmune contra la proteína antigénica en el sujeto con el fin del tratamiento o la prevención del cáncer o de enfermedades infecciosas.

En las secciones 5.7 y 5.8 se describen los usos de dicho complejo de hsp modificada-péptido y de células recombinantes que contienen formas expresables de una hsp modificada y una secuencia génica de antígeno, para tratar o prevenir el cáncer o enfermedades infecciosas.

5.3. Purificación de complejos de hsp modificada-péptido

Generalmente, la hsp modificada a la que se refiere el invento puede ser recuperada y purificada de cultivos de células recombinantes mediante métodos conocidos, incluyendo precipitación con sulfato amónico, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía sobre fosfocelulosa, cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía sobre hidroxipatito y cromatografía con lectinas.

Se ha descrito previamente la purificación de complejos de hsp70-péptido procedentes de productos de lisis celulares; véase, por ejemplo, Udono *et al.*, 1993, J. Exp. Med. 178: 1391-1396. Se ha descrito la purificación de complejos de hsp90-péptido y de complejos de gp96-péptido a partir de productos de lisis celulares en, por ejemplo, los documentos WO 95/24923, de fecha 21 de septiembre de 1995, y WO 97/10000, de fecha 20 de marzo de 1997. Estos métodos pueden ser utilizados para purificar la hsp modificada o los complejos de hsp modificada-péptido del invento procedentes de las células recombinantes y, con unas modificaciones menores conocidas en la técnica, la hsp modificada o los complejos de hsp modificada-péptido procedentes del cultivo celular.

Sin embargo, el invento se refiere a métodos mejorados para la purificación de las hsps modificadas, que se basan en las propiedades del marcador péptidico presente en la hsp modificada. Un procedimiento se basa en interacciones moleculares específicas entre un marcador y su pareja de unión. El otro procedimiento se basa en la unión inmuno-específica de un anticuerpo a un epítipo presente en el marcador. El principio de la cromatografía de afinidad, bien conocido en la técnica, es generalmente aplicable a estos dos procedimientos.

Más adelante se describen diversos métodos basados en interacciones moleculares específicas entre un marcador y su pareja de unión.

Un método que es generalmente aplicable a la purificación de hsps modificadas que están fusionadas con las regiones constantes de una inmunoglobulina es la cromatografía de afinidad con proteína A, una técnica que es bien conocida en este campo técnico. La proteína A de estafilococo es un polipéptido de 42 kDa que se une específicamente a una región situada entre las regiones constantes segunda y tercera de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas. A causa de los dominios Fc de las diferentes clases, subclases y especies de inmunoglobulinas, la afinidad de la proteína A hacia regiones Fc humanas es elevada, pero puede variar en el caso de otras especies. Las subclases que son menos preferidas incluyen IgG-3 humana y la mayoría de las subclases de rata. Para ciertas subclases, puede utilizarse proteína G (de estreptococo) en lugar de proteína A en la purificación. La proteína A-Sepharose (Pharmacia o BioRad) es una fase sólida comúnmente utilizada para la purificación de anticuerpos por afinidad, y puede ser utilizada esencialmente de la misma manera para la purificación de una hsp modificada fusionada con un fragmento Fc de inmunoglobulina. La hsp modificada y secretada presente en el sobrenadante celular se une específicamente a la proteína A de la fase sólida, mientras que los contaminantes son eliminados por lavado. La hsp modificada unida puede ser eluida mediante diversos sistemas tampón conocidos en la técnica, incluyendo una sucesión de tampones de citrato, acetato y glicocola- HCl que reducen gradualmente el pH. Este método es menos preferido si las células recombinantes también producen anticuerpos que serán purificados conjuntamente con la hsp modificada. Véanse, por ejemplo, Langone, 1982, J. Immunol. Meth. 51: 3; Wilchek *et al.*, 1982, Biochem. Intl. 4: 629; Sjöbring *et al.*, 1991, J. Biol. Chem. 26: 399; y las páginas 617-618 de "Antibodies, A Laboratory Manual", compilado por Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

Alternativamente, se puede utilizar un marcador de polihistidina, en cuyo caso, la hsp modificada puede ser purificada mediante cromatografía con quelatos metálicos. El marcador de polihistidina, normalmente una secuencia de seis histidinas, presenta una elevada afinidad por iones metálicos divalentes, tales como los iones níquel (Ni^{2+}), que pueden ser inmovilizados en una fase sólida, tal como las matrices de ácido nitrilotriacético. La polihistidina presenta una afinidad bien caracterizada por Ni^{2+} -NTA-agarosa y puede ser eluida mediante cualquiera de dos tratamientos suaves: imidazol (0,1-0,2 M), que competirá eficazmente con la resina por los sitios de unión; y reducción del pH justo por debajo de 6,0, lo que protonará las cadenas laterales de la histidina e impedirá la unión. El método de purificación comprende cargar el sobrenadante del cultivo celular en la columna de Ni^{2+} -NTA-agarosa, eliminar los contaminantes por lavado, y eluir la hsp modificada con imidazol o con un ácido débil. La Ni^{2+} -NTA-agarosa puede ser obtenida de proveedores comerciales tales como Sigma (St. Louis) y Qiagen. También se

dispone de anticuerpos que reconocen el marcador de polihistidina, los cuales pueden ser utilizados para detectar y cuantificar la hsp modificada.

Otro marcador peptídico ejemplar que se puede utilizar es la secuencia de glutatión-S-transferasa (GST), originalmente clonada del helmineto *Schistosoma japonicum*. En general, una fusión de hsp modificada-GST expresada en una célula huésped procariótica, tal como *E. coli*, puede ser purificada del sobrenadante del cultivo celular mediante absorción con glóbulos de glutatión-agarosa, seguida de una elución en presencia de glutatión reducido libre a pH neutro. No se requieren condiciones desnaturalizantes en ninguna fase durante la purificación y, por lo tanto, puede ser deseable para uso en la carga de una hsp modificada e inmovilizada con péptidos antigénicos. Además, puesto que se sabe que la GST forma dímeros bajo ciertas condiciones, se puede obtener una hsp modificada dímera. Véase, Smith. 1993, *Methods Mol. Cell. Biol.* 4: 220-229.

Otro marcador peptídico útil que puede ser utilizado es la proteína ligante de maltosa (MBP; del inglés, maltose binding protein) de *E. coli*, que es codificada por el gen *malE*. La secretada hsp modificada-MBP que está presente en el sobrenadante celular se une a una resina de amilosa mientras los contaminantes son eliminados por lavado. La unida hsp modificada-MBP es eluida de la resina de amilosa mediante maltosa. Véase, por ejemplo, Guan *et al.*, 1987, *Gene* 67: 21-30.

El segundo procedimiento para purificar la hsp modificada es aplicable a marcadores peptídicos que contienen un epítipo para el que se dispone de anticuerpos policlonales o monoclonales. Se pueden utilizar diversos métodos conocidos en la técnica para la purificación de proteínas por unión inmunoespecífica, tales como cromatografía de inmunofinidad e inmunoprecipitación. Véanse, por ejemplo, el capítulo 13 de "Antibodies, A Laboratory Manual", compilado por Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; y el capítulo 8, Secciones I y II, de "Current Protocols in Immunology", compilado por Coligan *et al.*, John Wiley, 1991; la descripción de los cuales se incorpora aquí por referencia.

Los aspectos de la divulgación anteriormente descritos pueden ser utilizados para recuperar y purificar complejos secretados de hsp modificada-péptido procedentes del medio de cultivo celular de células de mamífero, tales como células humanas, que expresan una hsp modificada del invento. Los métodos pueden ser adaptados para llevar a cabo una purificación a escalas media y grande de una hsp modificada y/o un complejo de hsp modificada-péptido. Los métodos que no requieren reducción del pH ni condiciones desnaturalizantes son muy preferidos para la purificación de los complejos de hsp modificada-péptido. Aunque descritos para células tumorales en los ejemplos, los métodos descritos pueden ser utilizados para aislar hsps de cualesquier células eucarióticas, por ejemplo, tejidos, células aisladas, líneas celulares eucarióticas inmortalizadas, infectadas con un patógeno intracelular, o células obtenidas de un sujeto infectado con un patógeno.

5.4. Producción in vitro de complejos de hsp-molécula antigénica

En un aspecto de la divulgación en que no se emplean complejos de hsps modificadas y los péptidos con los que se asocian endógenamente en las células recombinantes, se producen in vitro complejos de hsps modificadas con moléculas antigénicas. Como apreciarán los expertos en la técnica, los péptidos antigénicos aislados mediante los procedimientos descritos más adelante o químicamente sintetizados o recombinantemente producidos pueden ser reconstituidos in vitro con una diversidad de proteínas de choque térmico modificadas, para generar complejos inmunogénicos no covalentes de hsp modificada-péptido. Dichos complejos pueden ser utilizados para las vacunas inmunoterapéuticas o profilácticas del invento. Los métodos de producción in vitro de complejos de hsp modificada-péptido pueden ser adaptados para que se lleven a cabo a media escala o gran escala.

Los antígenos o porciones antigénicas de los mismos que son específicos para uno o más tipos de células cancerosas, o que son específicos para una célula infectada o un agente infeccioso, pueden ser seleccionados, para uso como péptidos antigénicos para formar complejos con hsps modificadas, entre los conocidos en la técnica o entre aquellos de los que se ha determinado por inmunoensayo que son capaces de unirse a moléculas de anticuerpo o del complejo principal de histocompatibilidad (MHC; del inglés, major histocompatibility complex) (antigenicidad) o de generar una respuesta inmune (inmunogenicidad).

5.4.1. Moléculas antigénicas exógenas

Para determinar la inmunogenicidad o antigenicidad de un supuesto antígeno detectando la unión a un anticuerpo, se pueden usar diversos inmunoensayos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos en que se utilizan técnicas tales como radio inmunoensayos, ELISA, inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones con precipitinas y difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos in vivo (usando, por ejemplo, marcadores de oro coloidal, enzimáticos o radioisotópicos), transferencias Western, reacciones de inmunoprecipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel y ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos con proteína A, ensayos de inmunoelectroforesis, etc. En un aspecto, la unión del anticuerpo es detectada al detectarse un marcador en el anticuerpo primario. En otro aspecto, el anticuerpo primario es detectado al detectarse la unión de un reactivo o anticuerpo secundario con el anticuerpo primario. En un aspecto

más, el anticuerpo secundario está marcado. En la técnica se conocen muchos medios para detectar la unión en un inmunoensayo, que son diseñados para el uso. En una realización para detectar inmunogenicidad, se pueden analizar las respuestas mediadas por células T mediante métodos estándares, tales como, por ejemplo, ensayos de citotoxicidad *in vitro* o ensayos de hipersensibilidad de tipo retardado *in vivo*.

Los antígenos potencialmente útiles, o derivados de los mismos, para uso como moléculas antigénicas pueden ser también identificados mediante diversos criterios, tales como la implicación del antígeno en la neutralización de la infectividad de un patógeno (en que se desea tratar o prevenir la infección por dicho patógeno) (Norrby, 1985, Summary, en "Vaccines 85", compilado por Lerner *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU., páginas 388-389), la especificidad de tipo o de grupo, el reconocimiento por células inmunes o antisueros del paciente, y/o la demostración de efectos protectores de antisueros o células inmunes específicos para el antígeno. Además, cuando se desea tratar o prevenir una enfermedad causada por un patógeno, el epítipo codificado del antígeno debería presentar preferiblemente un grado pequeño o nulo de variación antigénica en el tiempo o entre diferentes productos de aislamiento del mismo patógeno.

Preferiblemente, cuando se desea tratar o prevenir el cáncer, se usan antígenos tumoralmente específicos conocidos o fragmentos o derivados de los mismos. Por ejemplo, dichos antígenos tumoralmente específicos o tumoralmente asociados incluyen, pero no se limitan a, el antígeno KS 1/4 de pancarcinoma [Perez y Walker, 1990, J. Immunol. 142: 3662-3667; Bumal, 1988, Hybridoma 7 (4): 407-415]; antígeno (CA125) de carcinoma ovárico [Yu *et al.*, 1991, Cancer Res. 51 (2): 468-475]; fosfatasa ácida prostática [Tailor *et al.*, 1990, Nucl. Acids. Res. 18 (16): 4928]; antígeno específico de próstata [Henttu y Vihko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 160 (2): 903-910; Israeli *et al.*, 1993, Cancer Res. 53: 227-230]; antígeno p97 asociado a melanoma [Estin *et al.*, 1989, J. Natl. Cancer Inst. 81 (6): 445-446]; antígeno gp75 de melanoma [Vijayasardahl *et al.*, 1990, J. Exp. Med. 171 (4): 1375-1380]; antígeno de melanoma, de alto peso molecular [Natali *et al.*, 1987, Cancer 59: 55-63] y antígeno de membrana específico de próstata.

En un aspecto específico de la divulgación, un antígeno o fragmento o derivado del mismo, específico para cierto tumor, es seleccionado para la complejación con una hsp modificada y la subsiguiente administración a un paciente que tiene ese tumor.

Preferiblemente, cuando se desea tratar o prevenir enfermedades víricas, se usan moléculas que comprenden epítopos de virus conocidos. Por ejemplo, dichos epítopos antigénicos pueden ser preparados a partir de virus que incluyen, pero no se limitan a, virus de la hepatitis de tipo A, virus de la hepatitis de tipo B, virus de la hepatitis de tipo C, influenza virus, varicella virus, adenovirus, virus herpes simple (HSV; del inglés, herpes simplex virus) de tipo I (HSV-I), virus herpes simple de tipo II (HSV-II), virus de la peste bovina, rinovirus, echovirus, rotavirus, virus respiratorio sincitial, papillomavirus, papovavirus, citomegalovirus, echinovirus, arbovirus, hantavirus, coxsackievirus, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubéola, poliovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (HIV; del inglés, human immunodeficiency virus) de tipo I (HIV-I) y virus de la inmunodeficiencia humana de tipo II (HIV-II).

Preferiblemente, cuando se desea tratar o prevenir infecciones bacterianas, se usan moléculas que comprenden epítopos de bacterias conocidas. Por ejemplo, dichos epítopos antigénicos pueden ser preparados a partir de bacterias que incluyen, pero no se limitan a, aquellas de los géneros *Mycobacterium*, *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Neisseria* y *Legionella*.

Preferiblemente, cuando se desea tratar o prevenir infecciones protozoarias, se usan moléculas que comprenden epítopos de protozoos conocidos. Por ejemplo, dichos epítopos antigénicos pueden ser preparados a partir de protozoos que incluyen, pero no se limitan a, aquellos de los géneros *Leishmania*, *Kokzidio* y *Trypanosoma*. Preferiblemente, cuando se desea tratar o prevenir infecciones parasitarias, se usan moléculas que comprenden epítopos de parásitos conocidos. Por ejemplo, dichos epítopos antigénicos pueden proceder de parásitos que incluyen, pero no se limitan a, aquellos de los géneros *Chlamydia* y *Rickettsia*.

5.4.2. Péptidos de complejos de hsp-péptido

Los péptidos antigénicos para la complejación *in vitro* con la hsp modificada a la que se refiere el invento pueden ser también obtenidos de complejos endógenos de péptidos y hsps. Se pueden usar dos métodos para eluir el péptido de un complejo de hsp-péptido. Un procedimiento implica incubar el complejo de hsp péptido en presencia de ATP. El otro procedimiento implica incubar los complejos en un tampón de bajo pH.

En resumen, el complejo de interés es centrifugado en un sistema Centricon 10 (Millipore) para separar toda materia de bajo peso molecular débilmente asociada con el complejo. La fracción de alto peso molecular puede ser separada y ser analizada mediante SDS-PAGE, mientras que la fracción de bajo peso molecular puede ser analizada por cromatografía en estado líquido a alta presión (HPLC; del inglés, high pressure liquid chromatography), como se describe más adelante. En el protocolo de incubación con ATP, el complejo de hsp-péptido de la fracción de alto peso molecular es incubado con ATP 10 mM durante 30 minutos a temperatura ambiental. En el protocolo de bajo pH, se añade ácido acético o ácido trifluoroacético (TFA) al complejo de hsp-péptido para obtener una concentración final de 10% (volumen/volumen) y se incuba la mezcla a temperatura

ambiental o en un baño de agua a ebullición, o a cualquier temperatura intermedia, durante 10 minutos (véanse Van Bleek *et al.*, 1990, *Nature* 348: 213-216; y Li *et al.*, 1993, *EMBO Journal* 12: 3143-3151).

Las muestras resultantes son centrifugadas en un sistema Centricon 10, como se mencionó previamente. Se recuperan las fracciones de pesos moleculares alto y bajo. Los complejos de hsp-péptido de alto peso molecular restantes pueden ser vueltos a incubar con ATP o en un pH bajo para separar los péptidos restantes.

Las fracciones de menor peso molecular resultantes son reunidas, concentradas por evaporación y disueltas en TFA al 0,1%. La materia disuelta es luego fraccionada mediante HPLC en fase inversa utilizando, por ejemplo, una columna de fase inversa VYDAC C18 equilibrada con TFA al 0,1%. La materia unida es luego eluida a un caudal de aproximadamente 0,8 ml/min, desarrollándose la columna con un gradiente lineal de acetonitrilo a de 0 a 80% en TFA al 0,1%. Se puede controlar la elución de los péptidos mediante la densidad óptica a 210 nm (DO₂₁₀), y se pueden recoger las fracciones que contienen los péptidos.

5.4.3. Péptidos de complejos de MHC-péptido

Los péptidos unidos a moléculas del MHC pueden ser también utilizados para formar *in vitro* complejos con hsps modificadas a las que hace referencia el invento. El aislamiento de péptidos potencialmente inmunogénicos a partir de moléculas del MHC es bien conocido en la técnica y, por lo tanto, no es descrito aquí con detalle (véanse Falk *et al.*, 1990, *Nature* 348: 248-251; Rotzsche *et al.*, 1990, *Nature* 348: 252-254; Elliot *et al.*, 1990, *Nature* 348: 191-197; Falk *et al.*, 1991, *Nature* 351: 290-296; Demotz *et al.*, 1989, *Nature* 343: 682-684; y Rotzsche *et al.*, 1990, *Science* 249: 283-287; cuyas descripciones se incorporan aquí por referencia).

En resumen, los complejos de MHC-péptido pueden ser aislados mediante un procedimiento de inmunoafinidad convencional. Los péptidos pueden ser luego eluidos del complejo de MHC-péptido al incubar los complejos en presencia de TFA a aproximadamente 0,1% en acetonitrilo. Los péptidos eluidos pueden ser fraccionados y purificados mediante HPLC en fase inversa, como antes.

5.4.4. Péptidos sintéticos

Las secuencias de aminoácidos de los péptidos eluidos de moléculas del MHC o de hsps pueden ser determinadas mediante técnicas manuales o automatizadas para secuenciación de aminoácidos, bien conocidas en este campo técnico. Una vez que se ha determinado la secuencia de aminoácidos de un péptido potencialmente protector, el péptido puede ser sintetizado en cualquier cantidad deseada usando síntesis peptídica convencional u otros protocolos bien conocidos en la técnica.

Los péptidos que tienen la misma secuencia de aminoácidos que los aislados anteriormente pueden ser sintetizados mediante síntesis peptídica en fase sólida utilizando procedimientos similares a los descritos por Merrifield, 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149. Durante la síntesis, aminoácidos N- α -protegidos que tienen cadenas laterales protegidas son añadidos gradualmente a una cadena polipeptídica en crecimiento unida por su extremo C a un soporte polímero insoluble, es decir, glóbulos de poliestireno. Los péptidos son sintetizados por unión de un grupo amino de un aminoácido N- α -desprotegido a un grupo α -carboxilo de un aminoácido N- α -protegido que ha sido activado al hacerlo reaccionar con un reactivo tal como dicitclohexilcarbodiimida. La fijación de un grupo amino libre al carboxilo activado conduce a la formación de un enlace peptídico. Los grupos N- α -protectores más comúnmente utilizados incluyen Boc, que es lábil frente a ácidos, y Fmoc, que es lábil frente a bases. Los detalles de las químicas, resinas, grupos protectores, aminoácidos protegidos y reactivos apropiados son bien conocidos en la técnica y, por lo tanto, no se discuten aquí con detalle (véanse Atherton *et al.*, 1989, "Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach", IRL Press; y Bodanszky, 1993, "Peptide Chemistry, A Practical Textbook", 2ª edición, Springer-Verlag).

La purificación de los péptidos resultantes es llevada a cabo utilizando procedimientos convencionales, tales como HPLC preparativa en que se usa filtración en gel, reparto y/o cromatografía de intercambio iónico. Los tampones y matrices apropiados son bien conocidos en la técnica y, por lo tanto, no se describen aquí con detalle.

5.4.5. Secuencias genéticas que codifican antígenos

En un aspecto particular de la divulgación, una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno proteico o porciones del mismo puede ser introducida en una célula huésped para la producción del antígeno. La secuencia de nucleótidos que codifica cualquier proteína antigénica puede ser obtenida y ser clonada en un vector de expresión para su expresión, mediante unos métodos esencialmente iguales a los descritos para la clonación y expresión de una secuencia génica de hsp. Las técnicas se describen en las secciones 5.1-5.1.1 y 5.2-5.2.2 y son bien conocidas en este campo técnico. La proteína antigénica recombinante o porciones de la misma pueden ser purificadas mediante cualesquier métodos apropiados para la proteína y ser luego usadas para formar *in vitro* complejos con hsps modificadas, como se describe en la sección 5.4.6. Dicho complejo de hsp modificada-antígeno puede ser utilizado como una vacuna para estimular una respuesta inmune contra la proteína antigénica en un sujeto con el fin de tratar o prevenir el cáncer o enfermedades infecciosas.

5.4.6. Formación de complejos de hsp modificada-péptido *in vitro*

A continuación se proporciona un protocolo ejemplar preferido para la complejación no covalente de una hsp modificada y una molécula antigénica *in vitro*. Puede que sea ventajoso utilizar hsps modificadas que estén reversiblemente unidas a una fase sólida por su marcador peptídico, para facilitar el intercambio de tampones, los lavados y el aislamiento de los complejos antes o después de la reacción de complejación.

Antes de la complejación, las hsps modificadas son previamente tratadas con ATP o pH bajo para separar los péptidos que puedan estar asociados con la hsp de interés. Cuando se utiliza el procedimiento del ATP, el ATP en exceso es eliminado de la preparación mediante la adición de apirasa, del modo descrito por Levy *et al.*, 1991, Cell 67: 265-274. Cuando se utiliza el procedimiento del pH bajo, el pH del tampón es reajustado a un valor neutro mediante la adición de reactivos modificadores del pH.

Las moléculas antigénicas (1 µg) y la hsp modificada y pretratada (9 µg) son mezcladas para obtener una relación molar de molécula antigénica:hsp de aproximadamente 5:1. A continuación, la mezcla es incubada durante un periodo de 15 minutos a 3 horas, a una temperatura de 4°C a 45°C, en un tampón de unión adecuado tal como uno que contiene fosfato sódico 20 mM, pH de 7,2, NaCl 350 mM, MgCl₂ 3 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonyl (PMSF; del inglés, phenyl methyl sulfonyl fluoride) 1 mM. Las preparaciones son centrifugadas en un sistema Centricon 10 (Millipore) para separar todo péptido no unido. Si la hsp modificada está unida a una fase sólida, los complejos formados de hsp modificada-péptido pueden ser liberados del péptido no unido, por lavado, antes de la elución del complejo de hsp modificada-péptido de la fase sólida. La asociación de los péptidos con la hsp modificada puede ser analizada mediante SDS-PAGE. Este es el método preferido para la complejación *in vitro* de péptidos aislados de complejos de MHC-péptido, o de péptidos disociados de complejos endógenos de hsp-péptido.

En un aspecto alternativo de la divulgación, preferido para producir complejos de hsp70 modificada con moléculas antigénicas exógenas tales como proteínas, se incuban 5-10 microgramos de hsp purificada con cantidades equimolares de la molécula antigénica en tampón de fosfato sódico 20 mM, pH de 7,5, NaCl 0,5 M, MgCl₂ 3 mM y ADP 1 mM en un volumen de 100 µl, a 37°C, durante 1 hora. Esta mezcla de incubación es adicionalmente diluida hasta 1 ml con disolución salina tamponada con fosfato.

En otro aspecto alternativo de la divulgación, preferido para producir complejos de gp96 modificada con péptidos, se incuban 5-10 microgramos de gp96 modificada, inmovilizada a una fase sólida por su marcador de afinidad, con cantidades equimolares o en exceso del péptido antigénico en un tampón adecuado, tal como uno que contiene fosfato sódico 20 mM, pH de 7,5, NaCl 0,5 M y MgCl₂ 3 mM, a aproximadamente 50°C durante aproximadamente 10 minutos. Por ejemplo, para este procedimiento, la gp96 modificada que contiene el marcador Ig puede ser inmovilizada a proteína A-Sepharose. Esta mezcla de incubación es luego adicionalmente incubada durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiental. La fase sólida con los complejos de hsp modificada-péptido unidos es lavada varias veces para eliminar todo péptido no unido. Los complejos de hsp modificada-péptido son luego eluidos de la fase sólida mediante la técnica apropiada.

Después de la complejación, los complejos inmunogénicos de hsp-molécula antigénica pueden ser opcionalmente analizados *in vitro* usando, por ejemplo, el ensayo mixto de células diana y linfocitos (MLTC; del inglés, mixed lymphocyte target cell) descrito más adelante. Una vez que los complejos inmunogénicos han sido aislados, pueden ser opcionalmente más caracterizados en modelos animales utilizando los preferidos protocolos de administración y excipientes discutidos más adelante.

5.5. Determinación de la inmunogenicidad de complejos de hsp-péptido

En un procedimiento opcional, la inmunogenicidad de los complejos purificados de hsp modificada-péptido puede ser analizada usando el ensayo del cultivo mixto de células diana y linfocitos (MLTC), bien conocido en la técnica.

A modo de ejemplo pero no de limitación, se puede utilizar el procedimiento siguiente. En resumen, se inyectan subcutáneamente los complejos candidatos de hsp modificada-péptido a ratones. A otros ratones se inyectan o bien otros complejos de hsp-péptido procedentes de células normales no recombinantes, o bien células infectadas completas que actúan como testigos positivos para el ensayo. Los ratones reciben dos inyecciones separadas por 7-10 días. Diez días después de la última inmunización, se extraen los bazo y se liberan los linfocitos. Los linfocitos liberados pueden ser posteriormente estimulados de nuevo *in vitro* mediante la adición de células muertas que expresan el complejo de interés.

Por ejemplo, 8x10⁶ células inmunes de bazo pueden ser estimuladas con 4x10⁴ células infectadas con patógeno (o células transfectadas con un gen que codifica un antígeno del agente infeccioso, según el caso) y tratadas con mitomicina C o sometidas a radiación (0,05-100 Gy), o con células tumorales en 3 ml de medio RPMI que contiene suero de ternera fetal (FCS; del inglés, fetal calf serum) al 10%. En ciertos casos, se puede incluir interleucina 2 (IL-2) o sobrenadante de cultivo mixto secundario de linfocitos al 33% en el medio de cultivo como fuente de factores de crecimiento de células T (véase Glasebrook *et al.*, 1980, J. Exp. Med. 151: 876). Para ensayar la respuesta primaria de células T citotóxicas después de la inmunización, se pueden cultivar células de bazo sin estimulación. En algunos

experimentos, células de bazo de los ratones inmunizados pueden ser también estimuladas de nuevo con células antigénicamente distintas para determinar la especificidad de la respuesta de células T citotóxicas.

Seis días más tarde, los cultivos son ensayados en cuanto a la citotoxicidad mediante un ensayo de liberación de ^{51}Cr durante 4 horas (véanse Palladino *et al.*, 1987, Cancer Res. 47: 5074-5079; y Blachere *et al.*, 1993, J. Immunotherapy 14: 352-356). En este ensayo, el cultivo mixto de linfocitos es añadido a una suspensión de células diana para obtener diferentes relaciones de efector:diana (E:T; del inglés, effector:target) (normalmente de 1:1 a 40:1). Las células diana son premarcadas al incubarse 1×10^6 células diana en medio de cultivo que contiene $7,4 \times 10^9$ Bq de $^{51}\text{Cr}/\text{ml}$, durante una hora a 37°C . Las células son lavadas tres veces después de la marcación. Cada punto del ensayo (relación E:T) se lleva a cabo por triplicado, y se incorporan los testigos apropiados para medir la liberación espontánea de ^{51}Cr (no se añaden linfocitos en el ensayo) y el 100% de liberación (células lisadas con detergente). Una vez incubadas las mezclas celulares durante 4 horas, las células son recogidas como sedimento por centrifugación a 200 g durante 5 minutos. La cantidad de ^{51}Cr liberado al sobrenadante es medida mediante un contador de radiación gamma. El porcentaje de citotoxicidad es medido como las cpm en la muestra de ensayo menos las cpm espontáneamente liberadas, dividido por la cpm totales liberadas con detergente menos las cpm espontáneamente liberadas.

Con objeto de bloquear la cascada de MHC de clase I, se añade un sobrenadante concentrado derivado de células del hibridoma K-44 (un hibridoma anti-MHC de clase I) a las muestras de ensayo hasta una concentración final de 12,5% (Heike *et al.*, 1994, J. Immunotherapy 15: 165-174).

Una alternativa al ensayo de liberación de cromo es el ensayo ELISPOT, en el que se mide la liberación in vitro de citoquinas por células T citotóxicas después de una estimulación con un antígeno específico. La liberación de citoquinas es detectada mediante anticuerpos que son específicos para una citoquina particular, tal como la interleucina 2, el factor γ de necrosis tumoral o el interferón γ (véase, por ejemplo, Scheibenbogen *et al.*, 1997, Int. J. Cancer 71: 932-936). El ensayo es llevado a cabo en una placa de microtitulación que ha sido previamente revestida con un anticuerpo específico para una citoquina de interés, que captura la citoquina secretada por las células T. Después de la incubación de las células T durante 24-48 horas en los pocillos revestidos, las células T citotóxicas son separadas y son sustituidas por un segundo anticuerpo marcado que reconoce un epítipo diferente de la citoquina. Después de un lavado a fondo para separar el anticuerpo no unido, se añade a la placa un sustrato enzimático que produce un producto de reacción coloreado. El número de células productoras de citoquinas es contado bajo un microscopio. Este método presenta las ventajas de un tiempo de ensayo corto y de sensibilidad sin necesidad de un gran número de células T citotóxicas.

5.6. Formulación

Los complejos no covalentes de hsp modificadas y proteínas o péptidos antigénicos, purificados mediante los métodos referidos en el invento, pueden ser formulados en preparaciones farmacéuticas para administración a mamíferos, para el tratamiento o la prevención del cáncer o de enfermedades infecciosas. La solubilidad del fármaco y el sitio de absorción son factores que deberían ser considerados a la hora de elegir la vía de administración de un agente terapéutico. Los complejos de hsp modificada-molécula antigénica del invento pueden ser administrados usando cualquier vía deseada de administración, incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, las vías subcutánea, intravenosa e intramuscular, aunque se prefiere la vía intradérmica o mucosa. Las ventajas de la administración intradérmica o mucosa incluyen el uso de dosis menores y una rápida absorción, respectivamente. Las vías mucosas de administración incluyen, pero no se limitan a, las administraciones oral, rectal y nasal. Las preparaciones para administraciones mucosas son adecuadas en diversas formulaciones como las descritas más adelante. La vía de administración puede ser variada durante el curso del tratamiento. Las dosificaciones, vías de administración y regímenes terapéuticos preferidos para los complejos de péptidos y hsp presentes en la naturaleza se describen en las solicitudes internacionales de patente PCT publicadas como WO 96/10411 y WO 97/10001.

En aspectos preferidos, se administra a un ser humano una cantidad de complejo de gp96 modificada-péptido que está en el intervalo de aproximadamente 10 a 600 μg , preferiblemente de 10 a 100 μg , muy preferiblemente de aproximadamente 25 μg , administrada intradérmicamente una vez a la semana durante aproximadamente 4-6 semanas, variando sucesivamente el sitio de administración.

Las composiciones que comprenden complejos no covalentes formulados en un vehículo farmacéutico compatible pueden ser preparadas, envasadas y etiquetadas para el tratamiento del tumor indicado, tales como sarcomas y carcinomas humanos, por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma

de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma; leucemias, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), y leucemia crónica [leucemia mielocítica (granulocítica) crónica y leucemia linfocítica crónica]; y policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadenas pesadas, etc. Si el complejo es soluble en agua, puede ser entonces formulado en un tampón apropiado, tal como, por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato u otras disoluciones fisiológicamente compatibles. Alternativamente, si el complejo resultante tiene una escasa solubilidad en disolventes acuosos, puede ser entonces formulado con un agente tensioactivo no iónico tal como Tween, o con polietilenglicol. Por lo tanto, los complejos no covalentes y sus solvatos fisiológicamente aceptables pueden ser formulados para administración por inhalación o insuflación (sea a través de la boca o sea a través de la nariz), o para administración oral, bucal, parenteral o rectal, o, en el caso de tumores, para inyección directa en un tumor sólido.

Para administración oral, la preparación farmacéutica puede estar en forma líquida, por ejemplo, como disoluciones, jarabes o suspensiones, o puede presentarse como un producto farmacéutico para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden ser preparadas por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes suspendedores (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa y grasas hidrogenadas comestibles), agentes emulsivos (por ejemplo, lecitina y goma arábica), vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos y aceites vegetales fraccionados), y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo y propilo y ácido sórbico). Las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, tabletas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona e hidroxipropilmetilcelulosa), cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina e hidrogenofosfato cálcico), lubricantes (por ejemplo, estearato magnésico, talco y sílice), agentes disgregantes (por ejemplo, almidón de patata y almidón-glicolato sódico) y agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato sódico). Las tabletas pueden ser revestidas mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Las preparaciones para administración oral pueden ser adecuadamente formuladas para proporcionar la liberación controlada de los complejos. Dichas composiciones pueden tomar la forma de tabletas o grageas formuladas de un modo convencional.

Para administración por inhalación, los complejos pueden ser convenientemente suministrados en forma de una presentación para pulverización de aerosoles desde envases presurizados o desde un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, tal como, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede ser determinada proporcionando una válvula que distribuya una cantidad calibrada. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador, que contengan una mezcla pulverulenta de los complejos y una base pulverulenta adecuada tal como lactosa o almidón.

Los complejos pueden ser formulados para administración parenteral por inyección mediante, por ejemplo, una inyección en bolo o una infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden ser presentadas en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones y emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes suspendedores, estabilizadores y/o dispersivos. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos, antes de su uso.

Los complejos pueden ser también formulados en composiciones rectales tales como supositorios y enemas de retención, que contienen, por ejemplo, bases convencionales para supositorios, tales como manteca de cacao y otros glicéridos.

Además de las formulaciones previamente descritas, los complejos pueden ser también formulados en forma de preparación para depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden ser administradas por implantación (por ejemplo, subcutánea o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. De este modo, por ejemplo, los complejos pueden ser formulados con adecuados materiales polímeros o hidrófobos (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de distribución para fármacos hidrófilos.

Si se desea, los complejos pueden ser presentados en un envase o dispositivo distribuidor que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen los complejos no covalentes. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina metálica o plástica, tal como un envase "blíster". El envase o dispositivo distribuidor puede ir acompañado de instrucciones para la administración.

El invento también se refiere a sistemas para llevar a cabo los regímenes terapéuticos a los que se refiere el invento.

Dichos sistemas comprenden, en uno o más recipientes, cantidades terapéutica o profilácticamente eficaces de los complejos no covalentes de hsp modificada-péptido en una forma farmacéuticamente aceptable. Los complejos de hsp modificada-péptido en un vial de un sistema del invento pueden estar en forma de una disolución farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, en combinación con disolución salina, disolución de dextrosa o disolución tamponada estériles, o con otro fluido estéril farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, el complejo puede estar liofilizado o desecado; en este caso, el sistema comprende además opcionalmente, en un recipiente, una disolución farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, disolución salina, disolución de dextrosa, etc.), preferiblemente estéril, para reconstituir el complejo con objeto de formar una disolución con el fin de inyección.

En otro aspecto, un sistema al que se refiere el invento comprende además una aguja o jeringa para inyectar el complejo, preferiblemente envasada en forma estéril, y/o una almohadilla alcohólica envasada. Se incluyen opcionalmente instrucciones para la administración de los complejos de hsp modificada-péptido por un clínico o por el paciente.

5.7. Prevención y tratamiento del cáncer

Hay muchas razones sobre por qué se desea, para uso en pacientes con cáncer, una inmunoterapia como la proporcionada por los complejos no covalentes de hsp modificada-péptido o por células recombinantes que expresan las hsps modificadas, preparadas mediante el presente invento. En primer lugar, si los pacientes con cáncer están inmunosuprimidos y la cirugía con anestesia, y la subsiguiente quimioterapia, pueden empeorar la inmunosupresión, entonces, con la inmunoterapia apropiada en el periodo preoperatorio, está inmunosupresión puede ser evitada o invertida. Esto podría conducir a menos complicaciones infecciosas y a una cicatrización acelerada de las heridas. En segundo lugar, el volumen tumoral es mínimo después de la cirugía y es muy probable que la inmunoterapia sea eficaz en esta situación. Una tercera razón es la posibilidad de que células tumorales hayan pasado a la circulación en el momento de la cirugía, con lo que una inmunoterapia eficaz aplicada en ese momento podría eliminar esas células.

En un aspecto específico al que se refiere el invento, la utilidad preventiva y terapéutica del invento se dirige a potenciar la inmunocompetencia del paciente con cáncer antes, durante o después de la cirugía y a inducir una inmunidad tumoralmente específica hacia células cancerosas, siendo el objetivo la inhibición del cáncer y siendo el objetivo clínico último la regresión y erradicación totales del cáncer.

De acuerdo con la divulgación aquí a la que se refiere el invento, los métodos preferidos para el tratamiento o la prevención del cáncer comprenden aislar células cancerosas de uno o más individuos, preferiblemente del individuo que necesita el tratamiento, e introducir en dichas células unas secuencias génicas expresables de hsp modificada, preferiblemente como una construcción génica de expresión. La secuencia génica de hsp modificada es manipulada mediante los métodos anteriormente descritos en la sección 5.1 para que la secuencia génica de hsp modificada, en forma de una construcción de expresión o intracromosómicamente integrada, sea adecuada para la expresión de la hsp modificada en las células recombinantes. Las células recombinantes que contienen las construcciones génicas de expresión son cultivadas bajo unas condiciones tales que las hsps modificadas, codificadas por la construcción génica de expresión, son expresadas por las células huésped recombinantes. Los complejos de proteína de choque térmico modificada, no covalentemente asociada con péptidos de la célula cancerosa, son secretados y son preferiblemente purificados del medio de cultivo mediante los métodos descritos en la sección 5.2. Dependiendo de la vía de administración, los complejos de hsp modificada-péptido son formulados consecuentemente del modo descrito en la sección 5.4 y son administrados autólogamente al individuo (por ejemplo, para tratar el cáncer primario o metástasis del mismo), o a otros individuos que necesitan ser tratados de un cáncer de tipo tisular similar, o a individuos que presentan un riesgo aumentado de cáncer a causa de su historia familiar o de factores de riesgo ambientales. En las publicaciones PCT WO 96/10411, de fecha 11 de abril de 1996, y WO 97/10001, de fecha 20 de marzo de 1997, también se han descrito métodos ejemplares para usos terapéuticos y profilácticos de complejos de hsp-péptido.

Por ejemplo, el tratamiento con complejos de hsp modificada-péptido preparados del modo anteriormente descrito puede comenzar en cualquier momento después de la cirugía. Sin embargo, si el paciente ha recibido quimioterapia, los complejos de hsp-antígeno son normalmente administrados después de un intervalo de cuatro semanas o más para permitir que el sistema inmune se recupere. El régimen terapéutico puede incluir inyecciones semanales del complejo de hsp modificada-antígeno, disuelto en disolución salina o en otra disolución fisiológicamente compatible. La vía y el lugar de la inyección se varían cada vez; por ejemplo, la primera inyección se administra subcutáneamente en el brazo izquierdo, la segunda inyección en el brazo derecho, la tercera inyección en la región abdominal izquierda, la cuarta inyección en la región abdominal derecha, la quinta inyección en el muslo izquierdo, la sexta inyección en el muslo derecho, etc. El mismo sitio es repetido después de un intervalo de una o más inyecciones. Además, se dividen las inyecciones y cada media dosis se administra el mismo día en un sitio diferente. En general, las cuatro a seis inyecciones primeras se administran a intervalos semanales. Posteriormente, se administran dos inyecciones a intervalos bisemanales, lo que va seguido de un régimen de inyecciones a intervalos mensuales.

Alternativamente, las células tumorales recombinantes que secretan complejos de hsp modificada-péptido pueden

ser utilizadas como una vacuna para inyección a un paciente con objeto de estimular una respuesta inmune contra las células tumorales o contra células que llevan antígenos tumorales. Se prefieren células tumorales recombinantes autólogas que expresan y secretan establemente complejos de hsp modificada-péptido. Para determinar la dosis apropiada, se cuantifica la cantidad de complejo de hsp modificada-péptido secretado por las células recombinantes y se ajusta en consecuencia el número de células recombinantes utilizadas para la vacunación con el fin de asegurar un nivel consistente de secreción in vivo. Una dosis preferida es el número de células recombinantes que pueden secretar aproximadamente 100 ng de gp96 modificada en 24 horas. Para la seguridad del paciente, las células tumorales recombinantes pueden ser irradiadas (120 Gy) inmediatamente antes de la inyección al paciente. Las células irradiadas no proliferan y pueden continuar secretando complejos de hsp modificada-péptido durante aproximadamente 7-10 días, lo que es suficiente para provocar una respuesta inmune.

Los cánceres que pueden ser tratados o prevenidos al utilizar complejos no covalentes de hsp-péptido preparados mediante los métodos a los que se refiere el presente invento incluyen, pero no se limitan a, sarcomas y carcinomas humanos, por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma; leucemias, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), y leucemia crónica [leucemia mielocítica (granulocítica) crónica y leucemia linfocítica crónica]; y policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, y enfermedad de cadenas pesadas. En las secciones posteriores se describen ejemplos específicos de tales cánceres.

En un aspecto específico, el cáncer es metastásico. En otra realización específica, el paciente que tiene cáncer está inmunosuprimido por la razón de haber sido sometido a una terapia anticancerosa (por ejemplo, quimioterapia o radiación) antes de la administración de los complejos de hsp-molécula peptídica del invento. En otro aspecto específico, el cáncer es un tumor.

El efecto de la inmunoterapia con complejos de hsp modificada-péptido sobre el progreso de las enfermedades neoplásicas puede ser controlado mediante cualesquier métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, la medición de: a) hipersensibilidad retardada como estimación de la inmunidad celular; b) actividad de linfocitos T citolíticos *in vitro*; c) niveles de antígenos tumoralmente específicos, por ejemplo, de antígenos carcinoembrionarios (CEA; del inglés, carcinoembryonic antigens); d) cambios en la morfología de tumores, utilizando técnicas tales como barrido tomográfico computarizado (CT; del inglés, computed tomographic scan); e) cambios en los niveles de supuestos biomarcadores de riesgo para un cáncer particular en individuos de alto riesgo; y f) cambios en la morfología de tumores, usando un sonograma. Otras técnicas que también pueden ser utilizadas incluyen la gammagrafía y la endoscopia.

El efecto preventivo de la inmunoterapia al usar complejos de hsp modificada-péptido puede ser también estimado al determinar los niveles de un supuesto biomarcador de riesgo para un cáncer específico. Por ejemplo, en individuos que presentan un riesgo aumentado de cáncer de próstata, se mide el antígeno específico de próstata (PSA; del inglés, prostate-specific antigen) en suero mediante el procedimiento descrito por Brawer *et al.*, 1992, J. Urol. 147: 841- 845, y Catalona *et al.*, 1993, JAMA 270: 948-958; en individuos con riesgo de cáncer colorrectal, se mide el CEA mediante métodos conocidos en la técnica; y, en individuos con riesgo aumentado de cáncer de mama, se mide la 16- α -hidroxilación de estradiol mediante el procedimiento descrito por Schneider *et al.*, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3047-3051.

5.8. Prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas

Se ha descubierto también que los complejos de hsp modificada-péptido a los que se refiere el invento pueden ser preparados a partir de células infectadas con un patógeno intracelular así como de células que han sido transformadas mediante un patógeno intracelular. Por ejemplo, se pueden aislar complejos inmunogénicos de hsp-péptido a partir de células eucarióticas transformadas con un virus transformante tal como SV40.

En un aspecto preferido de la divulgación, las vacunas purificadas de hsp modificada-péptido pueden tener una utilidad concreta en el tratamiento de enfermedades humanas causadas por patógenos intracelulares. Sin embargo, se apreciará que las vacunas desarrolladas al utilizar los principios aquí descritos serán útiles en el tratamiento de enfermedades de otros mamíferos, tales como, por ejemplo, animales de granja, incluyendo ganado vacuno, caballos, ovejas, cabras y cerdos, y animales caseros, incluyendo gatos y perros, que son similarmente causadas por patógenos intracelulares.

De acuerdo con los métodos aquí descritos, se pueden preparar vacunas que estimulen una respuesta inmune, en particular una respuesta de células T citotóxicas, contra células infectadas con virus que incluyen, pero no se limitan a, virus de la hepatitis de tipo A, virus de la hepatitis de tipo B, virus de la hepatitis de tipo C, influenza virus, varicellavirus, adenovirus, HSV-I, HSV-II, virus de la peste bovina, rinovirus, echovirus, rotavirus, virus respiratorio sincitial, papillomavirus, papovavirus, citomegalovirus, echinovirus, arbovirus, hantavirus, coxsackievirus, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubéola, poliovirus, HIV-I y HIV-II. Similarmente, también se pueden preparar vacunas que estimulen respuestas de células T citotóxicas contra células infectadas con bacterias intracelulares, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellas de los géneros *Mycobacterium*, *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Neisseria* y *Legionella*. Además, también se pueden preparar vacunas que estimulen respuestas de células T citotóxicas contra células infectadas con protozoos intracelulares, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos de los géneros *Leishmania*, *Kokzidia* y *Trypanosoma*. Además, se pueden preparar vacunas que estimulen respuestas de células T citotóxicas contra células infectadas con parásitos intracelulares, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos de los géneros *Chlamydia* y *Rickettsia*.

Como apreciarán los expertos en la técnica, los protocolos aquí descritos pueden ser utilizados para aislar complejos de hsp-péptido procedentes de cualquier célula genéticamente manipulada para que exprese una hsp modificada, por ejemplo, tejidos, células aisladas o líneas celulares eucarióticas inmortalizadas, infectadas con un patógeno intracelular. Cuando se utilizan líneas celulares animales inmortalizadas como fuente del complejo de hsp modificadapéptido, es importante utilizar líneas celulares que puedan ser infectadas con el patógeno de interés. Además, es preferible utilizar células que procedan de la misma especie que el futuro receptor de la vacuna. En la anterior sección 5.2.2 se describen técnicas para introducir una forma expresable de las secuencias génicas de hsp modificada en estas líneas celulares.

Si se espera que un patógeno cause la lisis de las células huésped, se prefiere introducir la secuencia génica expresable de hsp modificada en la célula huésped antes de infectar las células con el patógeno. Por ejemplo, con objeto de preparar un complejo de hsp-péptido para administración a seres humanos, que pueda ser eficaz contra el HIV-1, se puede propagar el virus en células humanas que incluyen, pero no se limitan a, células T CD4+ humanas, células HepG2 y células promonocíticas U937, que ya han sido transfectadas con una secuencia génica expresable de hsp modificada. Similarmente, se pueden propagar influenza virus en, por ejemplo, células MDCK y líneas celulares de fibroblastos humanos transfectadas, y se pueden cultivar micobacterias en, por ejemplo, células de Schwann humanas transfectadas.

El sobrenadante celular que contiene el complejo secretado de hsp modificada-péptido puede ser recogido justo antes de la lisis de la célula huésped.

En otro aspecto de la divulgación, si se ha identificado el gen que codifica un determinante antigénico particular de un patógeno, se puede transfectar una línea celular humana o de mamífero con el gen que codifica el antígeno junto con una secuencia génica de hsp modificada y hacer que ambos se coexpresen en dicha línea celular, usando técnicas bien conocidas en este campo técnico. Dichas células antigénicas recombinantes que secretan complejos de hsp modificadapéptido pueden ser utilizadas como una vacuna para inyectar a un paciente con el fin de estimular una respuesta inmune contra unas células infectadas o contra células que llevan el antígeno. Se prefieren células antigénicas recombinantes autólogas que expresan y secretan establemente complejos de hsp modificada-péptido.

El efecto de la inmunoterapia con complejos de hsp modificada-péptido sobre el progreso de enfermedades infecciosas puede ser controlado mediante cualesquier métodos conocidos por los expertos en la técnica.

6. Ejemplo: Producción de gp96 modificada-Ig en células de mamífero

Se produjo una hsp modificada, gp96-IG, construyendo una secuencia nucleotídica que codificaba una proteína química que comprendía una gp96 sin el péptido de retención (KDEL) y las regiones constantes de IgG1 murina, clonando en una construcción de expresión la secuencia génica de gp96 modificada, y transfectando diversas células de mamífero con la construcción génica de expresión. Los métodos para construir la secuencia génica de hsp modificada, preparar las células recombinantes y purificar la gp96 modificada se describen en las secciones siguientes.

6.1. Construcción de una secuencia génica de gp96 modificada-Ig

La región de codificación de la gp96 humana tiene una longitud de 2412 bases, las cuales codifican un péptido señal en el extremo amínico (21 restos de aminoácido), una posible región transmembranal rica en restos hidrófobos y, en el extremo carboxílico, la secuencia (KDEL) del péptido de retención en el retículo endoplásmico (RE). La proteína tiene 804 aminoácidos y un peso molecular estimado de aproximadamente 96 KDa. Esta región de codificación fue multiplicada sin las secuencias que codifican el tetrapéptido KDEL, aunque se incluía una secuencia que codificaba los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgG1 murina. El marcador de base inmunoglobulínica facilita la detección por ELISA, la purificación por cromatografía de afinidad en columnas de proteína A-Sepharose, y el análisis mediante separación celular activada por fluorescencia. Una forma secretora de una gp96 modificada es producida por las

células transfectadas con la secuencia génica de hsp modificada, y la gp96 modificada contiene péptidos unidos.

Con objeto de construir una secuencia génica de gp96 modificada, se extrajo el RNA total de células Jurkat (una línea celular humana) con isotiocianato de guanidinio ácido-fenol-cloroformo. Se preparó cDNA de doble cadena a partir del RNA utilizando el sistema GeneAmp para PCR de RNA (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Connecticut, EE.UU.) y se multiplicó la región de codificación de gp96 humana por PCR utilizando las Pwo y Taq polimerasas del sistema Expand™ para PCR de molde largo (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indiana, EE.UU.). Las condiciones de los ciclos de la PCR fueron: desnaturalización del DNA molde a 94°C durante 2 minutos; luego 10 ciclos a 94°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos; y luego 25 ciclos a 94°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 minutos con una elongación de ciclo de 20 segundos para cada ciclo, y una etapa de elongación final a 68°C durante 7 minutos. Los cebadores de PCR usados fueron: 1) 5'-ATTACTCGAGGGCCGACGCCATGAGGG-3', que incluía un sitio XhoI (cebador 1 directo), y 2) 5'-GCCCCGATCCTTCAGCTGTAGATTCCTTTGC-3', que incluía un sitio BamHI (cebador 2 inverso). El producto de la multiplicación, que es un fragmento de 2,4 kb, fue purificado por electroforesis en gel de agarosa, clonado en el vector pCRII por clonación TA (Invitrogen, San Diego, California, EE.UU.) y luego reclonado en el fagómido Bluescript II SK (+/-).

La secuencia que codifica los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgG1 murina (el marcador Ig) fue obtenida por PCR usando, como molde, cDNA de IgG1 murina o el plásmido IgG1 murina-pCRII. Los tres restos de cisteína de la porción bisagra de IgG1 habían sido cambiados por restos de serina mediante técnicas estándares. Las condiciones 29 de los ciclos de la PCR fueron: desnaturalización a 95°C durante 2 minutos; luego 30 ciclos a 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, y una etapa de elongación final a 72°C durante 10 minutos. Los cebadores de PCR fueron: 5'-GCGAGGATCCGTGCCAGGGATTCTGGTTCTAAG-3', que contenía un sitio BamHI (cebador 3 directo), y 5'-CTAAGCGGCCGCAAGGACACTGGGATCATTTACCAGG-3', que contenía un sitio NotI (cebador 4 inverso). El producto de PCR es un fragmento de 0,68 kb que fue purificado por electroforesis en gel de agarosa, clonado en pCRII por clonación TA, e insertado en el fagómido Bluescript II SK (+/-).

Para unir la gp96 modificada clonada con el marcador Ig clonado, la secuencia que codifica gp96 fue insertada en los sitios XhoI y BamHI de pBluescript mientras que el marcador Ig fue insertado en los sitios BamHI y NotI de pBluescript. La expresión de la proteína de fusión, gp96-Ig, fue confirmada por transcripción/traducción acopladas in vitro (Promega, Madison, EE.UU.). La secuencia que codifica la fusión gp96 modificada-Ig fue luego cortada con XhoI y NotI y fue insertada en los vectores de expresión eucarióticos pBCMGSNeo y pBCMgHis, que expresan gp96-Ig bajo el promotor de CMV, y pBMgHis, que expresa gp96-Ig bajo el promotor de metalotioneína. El tamaño de la secuencia de gp96 modificada-Ig era 3,08 kb, y se estimó que el peso molecular de la gp96 quimérica secretada era aproximadamente 121 kDa.

6.2. Producción de gp96 modificada-Ig en células de mamífero

Para la expresión de la secuencia génica de gp96 modificada-Ig se usaron la línea celular NIH3T3 de fibroblastos de ratón, la línea celular LLC de carcinoma pulmonar de Lewis en ratón, la línea celular P815 de mastocitoma de ratón, la línea celular EL4 de linfoma de ratón y su transfectante E.G7 de ovoalbúmina, la línea celular B16F10 de melanoma de ratón, la línea celular MC57 de fibrosarcoma de ratón, y las líneas celulares SCLC nº 2 y SCLC nº 7 de carcinoma pulmonar humano de células pequeñas. Se usaron técnicas estándares para introducir las construcciones génicas de expresión en esas células. Se usaron los vectores de expresión episómicamente mantenidos pBCMGSNeo y pBCMgHis, basados en el papillomavirus bovino (BPV), que contenían la secuencia modificada (gp96-Ig-pBCMGSNeo y gp96-Ig-pBCMgHis), para transfectar células LLC, B16F10, MC57, SCLC nº 2 y SCLC nº 7 mediante Lipofectin (GIBCO BRL, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.), células NIH3T3 mediante fosfato cálcico, y células EL4, E.G7 y P815 mediante electroporación. Se cultivó NIH3T3 en medio IMDM (GIBCO BRL, Grand Island, New York, EE.UU.) complementado con suero de ternera al 10%, térmicamente inactivado (GIBCO BRL). Se cultivaron E.G7 y E14 en medio IMDM complementado con FCS al 10%, térmicamente inactivado (GIBCO BRL) y β -mercaptoetanol 50 μ M (Bio-Rad, California, EE.UU.). Todas las demás líneas celulares se cultivaron en medio IMDM complementado con FCS al 10%, térmicamente inactivado. Las líneas NIH3T3, MC57, SCLC nº 2 y SCLC nº 7 fueron mantenidas como cultivos en monocapa y fueron disgregadas mediante un corto tratamiento con tripsina al 0,05% más EDTA (GIBCO BRL) según se necesitara. Las células transfectadas se seleccionaron con 1 mg/ml de G418 (GIBCO) o L-histidinol 2,5 mM (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.) durante 2 semanas, y se amplió su número por dilución y otro cultivo. Por dilución limitante, se obtuvieron clones que producían grandes cantidades de la proteína de fusión gp96-Ig secretada.

Las líneas celulares no transfectadas no secretaban IgG de ratón al sobrenadante del cultivo, pero las líneas celulares transfectadas con la secuencia génica de gp96 modificada-Ig secretaban gp96 modificada.

Se sembraron 10^6 células/ml en AIMV o IMDM con FCS al 10% y se recolectaron sobrenadantes de los cultivos en diferentes momentos. Para el análisis de la expresión intracelular de gp96-Ig, las células fueron sembradas similarmente, recolectadas, lavadas en disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline) y lisadas mediante tres ciclos de congelación-descongelación. Se centrifugaron los productos de lisis a 600 g durante 10 minutos y se centrifugaron de nuevo los sobrenadantes a 13.000 g durante 60 minutos. El sobrenadante

final fue usado para cuantificar la expresión intracelular de gp96-Ig.

La concentración de gp96-Ig en los medios de cultivo celular fue determinada por ELISA usando el marcador Ig como un antígeno. El marcador Ig fue detectado por un anticuerpo marcado anti-ratón. Para el ELISA, se revistieron placas de 96 pocillos de fondo plano (Becton Dickinson Labware, Oxnard, California, EE.UU.) con IgG anti-ratón generada en cabra (5 µg/ml), a 4°C durante la noche, y se bloquearon con gelatina al 1% en PBS a 37°C durante 1 hora. Se incubaron los pocillos con sobrenadantes de cultivo o con IgG murina (ICN, Costa Mesa, California, EE.UU.) como testigo, a 37°C durante 1 hora, y se realizó el desarrollo con el fragmento F(ab')₂ AffiniPure, conjugado con peroxidasa, de anti-IgG (H+L) de ratón generada en cabra, a 37°C durante 1 hora, lo que fue seguido de una incubación con ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (Sigma). Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm con Immunorader SLT-Labinstruments EAR 400AT (Austria). La concentración de gp96-Ig fue determinada comparando su absorbancia con la del patrón de IgG murina.

TABLA 1. Secreción de gp96-Ig a sobrenadantes de cultivos

Líneas celulares	Gp96-Ig/10 ⁶ células x 24h
SCLC#2	140 ng
SCLC#7	500 ng
NIH3T3	500 ng
EL4	160 ng
E.G7	60 ng
P815	<5 ng
LLC	70 ng
B16F10	312,5 ng
MC57	3300 ng

^a Promotor de metalotioneína

Todas las líneas celulares murinas y humanas transfectadas con gp96-Ig en los vectores de expresión episómicos basados en papilomavirus secretaban la proteína de fusión (figura 1a y tabla 1). Las células simuladamente transfectadas no secretaban gp96-Ig. Bajo condiciones estandarizadas, los niveles de proteína de fusión secretada variaban de 5 ng/ml a 3300 ng/ml dependiendo del transfectante.

La secreción de gp96-Ig dio lugar a su acumulación lineal, dependiente del tiempo, en el sobrenadante (figura 2). Se detectó gp96-Ig intracelular, en un nivel de estado estacionario bajo y constante, en productos de lisis de células transfectadas, lo que indicaba que no se acumula en la célula.

6.3. Secreción de gp96-Ig por células de mamífero

Para teñir la membrana de células SCLC transfectadas con gp96-Ig, se utilizó FITC-anti-IgG de ratón generada en cabra o FITC-anti-IgG de conejo generada en cabra como testigo, para una tinción de 15 minutos a 4°C, y se realizó un análisis mediante un citómetro de flujo FACScan de Becton Dickinson. Para la tinción intracelular, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y fueron permeabilizadas con saponina al 1%, lo que fue seguido de tinción con FITC-anti-IgG de ratón generada en cabra (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indiana, EE.UU.), PE-anti-IgG de ratón generada en cabra (Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama, EE.UU.), FITC-anti-IgG de conejo generada en cabra o FITC-anti-IgG de hámster sirio generada en cabra (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, EE.UU.) durante 15 minutos a 4°C y análisis mediante un citómetro de flujo.

Un análisis de células tumorales transfectadas de membrana intacta, por FACS, reveló falta de tinción con el anterior fondo de anti-IgG de ratón, lo que indica que el resto Ig de la proteína de fusión no se presenta en la hoja externa de la membrana plasmática. Por contraste, tras la permeabilización de la membrana, se detecta intracelularmente gp96-Ig con un anticuerpo anti-IgG de ratón generado en cabra pero no mediante anticuerpos testigo anti-IgG de conejo generados en cabra. El dominio transmembranal de gp96 no interfiere en la secreción de gp96-Ig ni conduce a una acumulación intracelular. Estos datos son consistentes con informes previos que sugerían que el dominio transmembranal no se utiliza para el anclaje de gp96 a la membrana y que gp96 no es una proteína integral de membrana.

6.4. Purificación de gp96 modificada-Ig

Se purificó gp96-Ig por cromatografía de afinidad en una columna de proteína A (Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.). El medio de cultivo agotado, exento de suero, procedente de SCLC n° 7 transfectada con gp96-Ig (SCLC n° 7-gp96-Ig) fue utilizado como una fuente para la purificación de la proteína de fusión de Ig. Se sembraron 10⁶

células NIH-3T3 transfectadas con gp96-Ig/ml en medio AIMV y se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos después de 6-8 días. Tras la eliminación de los fragmentos celulares por centrifugación y filtración, la proteína completa del sobrenadante fue concentrada mediante precipitación con sulfato amónico (saturación del 55%) y fue dializada frente a PBS. Las muestras fueron diluidas 1:2 con NaCl 3,5 M, glicocola 1,6 M, pH de 9,0 (tampón de unión), y fueron aplicadas a la columna de proteína A. La columna fue lavada a fondo con tampón de unión, y la proteína unida fue eluida con ácido cítrico 0,1 M, pH de 6,5. Las fracciones que contenían proteína fueron reunidas y fueron dializadas frente a PBS. La concentración de gp96-Ig fue determinada mediante el sistema de reactivos Micro BCA para el ensayo de proteínas (Pierce, Rockford, Illinois, EE.UU.).

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en geles de glicocola-Tris al 4-15% (Bio-Rad), realizándose la tinción con azul de Coomassie. Para la transferencia Western, las proteínas de la SDS-PAGE fueron transferidas a nitrocelulosa y sondadas con un anticuerpo monoclonal de rata específico para Grp94 (9G10; StressGen, Victoria, Canadá), seguido del fragmento F(ab')₂ AffiniPure, conjugado con peroxidasa, de anti-IgG (H+L) de rata generada en cabra (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, EE.UU.).

Cuando la gp96-Ig purificada mediante cromatografía con proteína A fue analizada por SDS-PAGE, la materia migró como una banda principal del peso molecular previsto, 120 kDa, y dos bandas menores de mayor peso molecular, previamente comunicadas también para la gp96 no modificada (figura 1b). Una transferencia Western con un anticuerpo monoclonal específico para gp96 confirmó la identidad de la proteína de fusión. Sólo resulta teñida la banda principal, lo que sugiere que las bandas menores son variantes de glicosilación de gp96, no reconocidas por el anticuerpo.

Las moléculas secretadas de gp96 modificada-Ig fueron también analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida- dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras y no reductoras. La figura 1C muestra una comparación de moléculas purificadas de gp96-Ig secretadas por SCLC n° 2, IgG murina, y una proteína de fusión de CD30 y el marcador peptídico Ig. La proteína de fusión gp96-Ig, que comprende gp96 (96 kDa) y el marcador Ig (25 kDa), aparece en el apropiado intervalo de tamaños. Los tripletes que representan gp96 modificada-Ig tanto en las fracciones reducidas como en las no reducidas habían sido previamente descritos para gp96.

7. Ejemplo: Tumorigenicidad de células tumorales que producen gp96 modificada-Ig

De acuerdo con el invento, las células tumorales recombinantes que secretan complejos de hsp modificada-peptido son útiles como vacuna. Se analizó la inmunogenicidad in vivo de dichas células recombinantes evaluando su tumorigenicidad en animales que no tenían tumores preexistentes.

Se inyectaron células tumorales recombinantes a ratones para determinar si la tumorigenicidad de dichas células recombinantes había sido reducida con respecto a la de células tumorales no modificadas del mismo tipo (es decir, sin la construcción génica de expresión). Los resultados siguientes indican que estas células tumorales recombinantes son menos activas que las células tumorales originales en cuanto a la formación de tumores en los animales de ensayo. Esto sugiere que el sistema inmune de estos animales ha generado una respuesta inmune eficaz contra dichas células que son más inmunogénicas y/o antigénicas que las células tumorales originales. Las células tumorales que persistían en los animales de ensayo a los que se habían inyectado originalmente células tumorales recombinantes fueron aisladas y vueltas a cultivar. La observación de que estas células tumorales dejaban de secretar las moléculas de hsp modificada-Ig sugiere que estas células tumorales eran variantes seleccionadas y no eran eficazmente focalizadas por los mecanismos efectores inmunes.

7.1. Comparación de las tumorigenicidades relativas de E.G7 y E.G7-gp96-Ig

A dos grupos de ratones C57BL/6 se inyectó subcutáneamente el número indicado de células tumorales E.G7 y E.G7-gp96-Ig vivas, respectivamente. Los resultados se muestran en la tabla 2.

TABLA 2

N.º de células usadas para la inyección	Ratones con tumor	
	E.G7	E.G7-gp96-Ig
1x10 ⁷	2/2	1/7
1x10 ⁶	20/23	1/5
1x10 ⁵	4/10	0/2

Casi todos los ratones a los que se había inyectado E.G7 tenían tumores en desarrollo. Sin embargo, los tumores E.G7-gp96-Ig fueron rechazados por la mayoría de los ratones. Esto sugiere que la gp96 modificada, secretada por E.G7-gp96-Ig, conserva péptidos tumorales de E.G7 y puede inducir inmunidad tumoral contra E.G7. Se extirparon tumores de 2 ratones con tumores E.G7-gp96-Ig y se devolvieron al medio de cultivo. Estas células tumorales no secretaban gp96 modificada-Ig al cultivo. Se cree que estas variantes tumorales que han perdido la capacidad para

secretar gp96 modificada-Ig fueron seleccionadas *in vivo*.

7.2. Comparación de las tumorigenicidades relativas de EL4 y EL4-gp96-Ig

- 5 A dos grupos de ratones C57BL/6 se inyectó subcutáneamente el número indicado de células tumorales EL4 y EL4-gp96-Ig vivas, respectivamente. Los resultados se muestran en la tabla 3.

TABLA 3

N.º de células usadas para la inyección	Ratones con tumor	
	EL4	EL4-gp96-Ig
1x10 ⁶	2/2	3/5
1x10 ⁵	7/7	2/5
1x10 ⁴	9/10	2/5

- 10 Casi todos los ratones a los que se había inyectado EL4 tenían tumores en desarrollo. Sin embargo, los tumores EL4-gp96-Ig fueron rechazados por casi el 50% de los ratones a los que se había inyectado. Esta observación sugiere que la gp96 secretada por EL4-gp96-Ig conserva péptidos tumorales de EL4 y puede inducir inmunidad tumoral contra células EL4. Se extirparon tumores de 3 ratones con tumores EL4-gp96-Ig y se devolvieron al medio de cultivo. Similarmente, estas variantes tumorales dejaron de secretar gp96 modificada-Ig, lo que sugiere que
- 15 escaparon de los mecanismos efectores inmunes *in vivo*.

7.3. Comparación de las tumorigenicidades relativas de MC57 y MC57-gp96-Ig ++

- 20 A ratones C57BL/6 se inyectó subcutáneamente el número indicado de células tumorales vivas. Todos los ratones a los que se había inyectado MC57 sobrevivieron sin tumor. Sin embargo, un ratón al que se habían inyectado células MC57-gp96-Ig presentaba tumores en desarrollo. Se extirpó el tumor y se devolvió al medio de cultivo. El nivel de moléculas de gp96 modificada-Ig en el sobrenadante del cultivo del tumor extirpado había disminuido a 100 µg/ml.

TABLA 4

N.º de células usadas para la inyección	Ratones con tumor	
	MC57	MC57-gp96-Ig
1x10 ⁷	0/4	1/2
1x10 ⁶	0/2	0/2
1x10 ⁵	0/2	0/2

25

7.4. Comparación de las tumorigenicidades relativas de B16F10 y B16F10-gp96-Ig

- 30 A dos grupos de ratones C57BL/6 se inyectó subcutáneamente el número indicado de células tumorales B16F10 y B16F10-gp96-Ig vivas, respectivamente. Ninguno de los ratones a los que se habían inyectado células B16F10-gp96-Ig rechazó el tumor. Dos ratones a los que se habían inyectado 1x10⁴ células B16F10 rechazaron el tumor.

TABLA 5

N.º de células usadas para la estimulación	Ratones con tumor	
	B16F10	B16F10-gp96-Ig
1x10 ⁶	2/2	2/2
1x10 ⁵	2/2	2/2
1x10 ⁴	0/2	2/2

7.5. Tumorigenicidades de E.G7-gp96-Ig y LLC-gp96-Ig

- 35 Se seleccionaron dos líneas celulares para un ulterior estudio *in vivo*. E.G7 es un transfectante de ovoalbúmina del linfoma EL4. E.G7 forma tumores letales en ratones C57BL/6 a pesar de su inmunogenicidad relativa. La transfección de E.G7 con gp96-Ig permite determinar si la inmunización con E.G7-gp96-Ig inmuniza frente a los antígenos asociados con EL4 o frente al antígeno sustituto de ovoalbúmina, o frente a ambos. El segundo tumor,
- 40 LLC transfectado con secuencias que codifican gp96-Ig u ovoalbúmina, fue usado porque, por contraste con E.G7, es un tumor no hematopoyético y poco inmunogénico. Ambas líneas celulares secretan cantidades comparables de gp96-Ig (véase la tabla 1).

La tumorigenicidad in vivo fue determinada mediante la inyección subcutánea de células tumorales vivas en 200 μ l de PBS, en las ijadas de los ratones. Se midió el tamaño bidimensional de los tumores dos veces a la semana durante al menos 2 meses. Cuando el crecimiento tumoral medio excedió los 10 mm de diámetro después de 3 semanas, los ratones fueron clasificados como tumoralmente positivos y fueron sacrificados. Los ratones fueron inmunizados mediante la inyección subcutánea de 10^6 células E.G7 irradiadas, como testigo, o E.G7-gp96-Ig vivas (en 200 μ l de PBS) administradas en la ijada derecha. Se realizaron dos inmunizaciones a intervalos de 2 semanas.

La secreción de gp96-Ig disminuye en más de cien veces la tumorigenicidad de E.G7 en ratones C57BL/6, en comparación con la de E.G7 simuladamente transfectada o no transfectada. La inoculación subcutánea de diez millones de células tumorales que secretan proteínas de choque térmico causó tumores en sólo el 10% de los ratones sometidos a inoculación (figura 3). Con EL4 se observó una reducción similar de la tumorigenicidad por secreción de gp96-Ig. La secreción de gp96-Ig por LLC dio lugar a una disminución más moderada de la tumorigenicidad, de aproximadamente cinco veces (figura 3). Estos resultados sugieren que la gp96-Ig secretora disminuía posiblemente la tumorigenicidad de los tumores al aumentar su inmunogenicidad.

8. Ejemplo: Efecto protector de la vacunación con células que expresan gp96 modificada-Ig

Con objeto de demostrar la capacidad de células tumorales recombinantes que están produciendo gp96 modificada-Ig, para estimular una respuesta inmune protectora, los ratones fueron primero vacunados con células tumorales recombinantes y fueron luego estimulados con una inyección de células tumorales que no contenían la construcción génica de gp96 modificada-Ig.

Se inmunizaron grupos de ratones mediante la inyección subcutánea de 1×10^6 células E.G7-gp96-Ig vivas, administrada en la ijada derecha. Se realizaron dos inmunizaciones a intervalos de 2 semanas. Los ratones fueron luego estimulados mediante inyecciones subcutáneas, en la ijada izquierda, del número indicado de células E.G7 o EL4 vivas 2 semanas después de la última inmunización. Las células E.G7 son células EL4 transfectadas con una construcción génica de ovalbúmina.

TABLA 6

N.º de células usadas para la estimulación	Ratones con tumor	
	E.G7-gp96-Ig	No vacunados
E.G7		
	3×10^6	5/5
	1×10^6	20/23
	8×10^5	3/3
EL4		
	1×10^5	7/7
	3×10^4	2/2
	1×10^4	9/10
	3×10^3	3/5

Los resultados de la tabla 6 muestran que menos ratones vacunados con células E.G7-gp96-Ig recombinantes desarrollaban tumores E.G7 y EL4 y, por lo tanto, indican que dichas células tumorales recombinantes pueden ser usadas profilácticamente para prevenir o reducir la incidencia de tumores antigénicamente relacionados específicos.

8.1. Efecto protector de E.G7-gp96-Ig frente a células tumorales E.G7 y LLC

Se seleccionaron las líneas celulares E.G7 y LLC para ulteriores estudios in vivo. Como se describió anteriormente, los ratones fueron inmunizados mediante la inyección subcutánea, en la ijada derecha, de células E.G7 no irradiadas que secretaban gp96-Ig. Se realizaron dos inmunizaciones a intervalos de 2 semanas. Posteriormente, fueron estimulados con E.G7 no transfectada o simuladamente transfectada, con EL4, con LLC no transfectada y con LLC-ova. Para preparar LLC-ova, se usó el gen de ovalbúmina de gallina clonado en el vector de expresión pAc-NEO-OVA para transfectar LLC mediante Lipofectin (GIBCO BRL). Las células transfectadas fueron seleccionadas con 1 mg/ml de G418 (GIBCO BRL) durante al menos 2 semanas, y sus niveles de secreción fueron analizados mediante ELISA. Los ratones inmunizados con E.G7 irradiada y los ratones no vacunados sirvieron como testigos de vacunación.

Los resultados se muestran en la figura 4. Los ratones inmunizados con E.G7-gp96-Ig resultaron protegidos frente a

una dosis de estimulación con E.G7 diez veces mayor, en comparación con los ratones no inmunizados o los ratones vacunados con células irradiadas. El efecto de la inmunización resultó aún más acusado cuando se estimuló con EL4, lo que permitía un aumento de dosis de estimulación de 50 veces en comparación con los testigos. Como se esperaba, la inmunización con E.G7-gp96-Ig no proporcionó protección frente a la estimulación con células LLC no transfectadas o transfectadas con el vector, mientras que, cuando se usaron células LLC transfectadas con ovoalbúmina, se observó un aumento de protección moderado, de aproximadamente tres veces. La intensa protección frente a la estimulación con EL4 proporcionada a los ratones inmunizados con E.G7-gp96-Ig puede ser debida a los múltiples antígenos tumorales compartidos por E.G7 y EL4. Por contraste, la débil protección obtenida con LLC-ova depende de células T que reconocen un solo epítipo o un número limitado de epítopos derivados de ovoalbúmina y presentados por moléculas H2^b.

9. Ejemplo: Agotamiento o inactivación in vivo de células inmunes competentes en animales sometidos a inoculación

La implicación de mecanismos inmunes en el rechazo de E.G7-gp96-Ig fue adicionalmente examinado mediante el agotamiento o la inactivación in vivo de células inmunes competentes.

Los anticuerpos monoclonales utilizados para el agotamiento in vivo de los subgrupos celulares CD4⁺ y CD8⁺ fueron, respectivamente, GK1.5 y 2.43; fueron purificados de sobrenadantes de hibridomas por cromatografía de afinidad con proteína G. Se administraron 100 µg de GK1.5 o 2.43 en 200 µl de PBS, mediante inyección intraperitoneal, 2 días antes o 3 días después de la inoculación subcutánea de 10⁶ células E.G7-gp96-Ig vivas (en 200 µl de PBS). El agotamiento de las células CD4 y CD8 fue verificado mediante un análisis por FACS. Para la inhibición funcional de macrófagos, se administró 1 mg de carragenanos (tipo II; Sigma) en 200 µl de PBS mediante inyección intraperitoneal.

Se inocularon un millón de células tumorales que secretaban gp96-Ig a un animal, una dosis suficiente para establecer tumores que crecen hasta un diámetro medio de aproximadamente 8 mm y posteriormente encogen y son rechazados. El rechazo del tumor resulta bloqueado en los ratones tratados con el anticuerpo 2.43 anti-CD8 ya sea dos días antes o ya sea tres días después de la inoculación del tumor (figura 5). El anticuerpo GK1.5 anti-CD4 no tenía efecto alguno sobre el rechazo del tumor independientemente del momento de la inyección, aun cuando agotó completamente las células CD4 durante más de 14 días. Similarmente, los carragenanos, conocidos por inactivar macrófagos in vivo, no tenían efecto alguno sobre el rechazo del tumor.

Estos datos son consistentes con la explicación de que péptidos asociados con la gp96-Ig secretada son presentados por el MHC de clase I y estimulan una respuesta de CTL CD8⁺ tumoralmente específica que conduce al rechazo del tumor. Parece que esta respuesta es independiente de la ayuda de CD4 y no requiere macrófagos. En el presente sistema modelo, la gp96-Ig es secretada por células tumorales vivas y sirve para inmunizar al ratón y dar lugar al subsiguiente rechazo del tumor. El crecimiento tumoral empezó a enlentecerse del día 6 al 8, lo que indicaba que se había iniciado la inmunidad antitumoral, y los tumores fueron rechazados en la semana subsiguiente. No se requirieron células CD4 ni macrófagos para el rechazo del tumor independientemente del momento de su agotamiento, dos días antes o tres días después de la inoculación del tumor. Esto indica que las células CD4 y los macrófagos no son esenciales para la inducción de inmunidad ni son requeridos en la fase efectora en este sistema tumoral. Por otra parte, las células CD8 son críticamente importantes en todas las fases de la respuesta a gp96-Ig secretora

Lista de secuencias

<110> University of Miami
 <120> Complejo de péptido antigénico-proteína de choque térmico modificada
 <130> 6410(2) TJH
 <140> Documento EP 07007299.6
 <141> 10-04-2007
 <160> 4
 <170> PatentIn versión 3.4
 <210> 1
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador directo-1
 <400> 1
 attactcgag ggccgcacgc catgaggg 28
 <210> 2
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

```

<220>
<223> cebador inverso-2
<400> 2
gcccggatcc ttcagctgta gattcctttg c 31
5 <210> 3
   <211> 34
   <212> DNA
   <213> Artificial
   <220>
10 <223> cebador directo-3
   <400> 3
   gcgaggatcc gtgccaggg attctgggtc taag 34
   <210> 4
   <211> 37
15 <212> DNA
   <213> Artificial
   <220>
   <223> cebador inverso-4
   <400> 4
20 ctaagcggcc gcaaggacac tgggatcatt taccagg 37

```

REIVINDICACIONES

1. Una dosis inyectable de una vacuna, comprendiendo la dosis células recombinantes no proliferativas modificadas por ingeniería genética para secretar complejos de una proteína de choque térmico gp96 modificada y un antígeno en una cantidad suficiente para provocar la activación de una respuesta de linfocitos T CD8, independientes de CD4, frente al antígeno cuando se administra a un sujeto, en la que la proteína de choque térmico modificada carece de una secuencia de retención en el retículo endoplásmico.
2. La dosis de la reivindicación 1, en la que las células recombinantes son células humanas.
3. La dosis de la reivindicación 1, en la que las células recombinantes son células cancerosas.
4. La dosis de la reivindicación 3, en la que las células cancerosas son células de cáncer de pulmón.
5. La dosis de la reivindicación 3, en la que las células recombinantes comprenden al menos dos tipos diferentes de células cancerosas originándose cada uno de los tipos diferentes de células cancerosas de diferentes donantes.
6. La dosis de la reivindicación 1, en la que las células recombinantes se han irradiado.
7. La dosis de la reivindicación 1, en la que la dosis de células secreta al menos 100 ng de los complejos en 24 horas de cultivo *in vitro*.
8. La dosis de la reivindicación 1, en la que el antígeno es un antígeno asociado a tumor expresado por las células.
9. La dosis de la reivindicación 1, en la que el antígeno es un antígeno viral o bacteriano.
10. La dosis de la reivindicación 1, en la que el antígeno es un antígeno de HIV.
11. La dosis de la reivindicación 1, en la que las células recombinantes comprenden un vector que codifica para el antígeno.
12. La dosis de la reivindicación 1, en la que las células recombinantes se congelan y se contienen en una pluralidad de alícuotas.
13. Un medicamento que comprende la dosis de células recombinantes de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, como ingrediente activo.
14. Uso de una composición que comprende la dosis de células recombinantes de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa o cáncer.
15. Un método que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar un cultivo de células recombinantes modificadas por ingeniería genética para secretar complejos de una proteína de choque térmico gp96 modificada y un antígeno, en el que la proteína de choque térmico carece de una secuencia de retención en el retículo endoplásmico;
 - (b) determinar la tasa de secreción de complejo por las células recombinantes cultivadas;
 - (c) preparar una dosis de las células recombinantes basándose en la tasa determinada en la etapa (b);
 - (d) irradiar la dosis de las células recombinantes para eliminar su proliferación mientras se mantiene su capacidad para secretar los complejos de proteína de choque térmico modificada-antígeno; y
 - (e) congelar las células recombinantes irradiadas en una pluralidad de alícuotas.

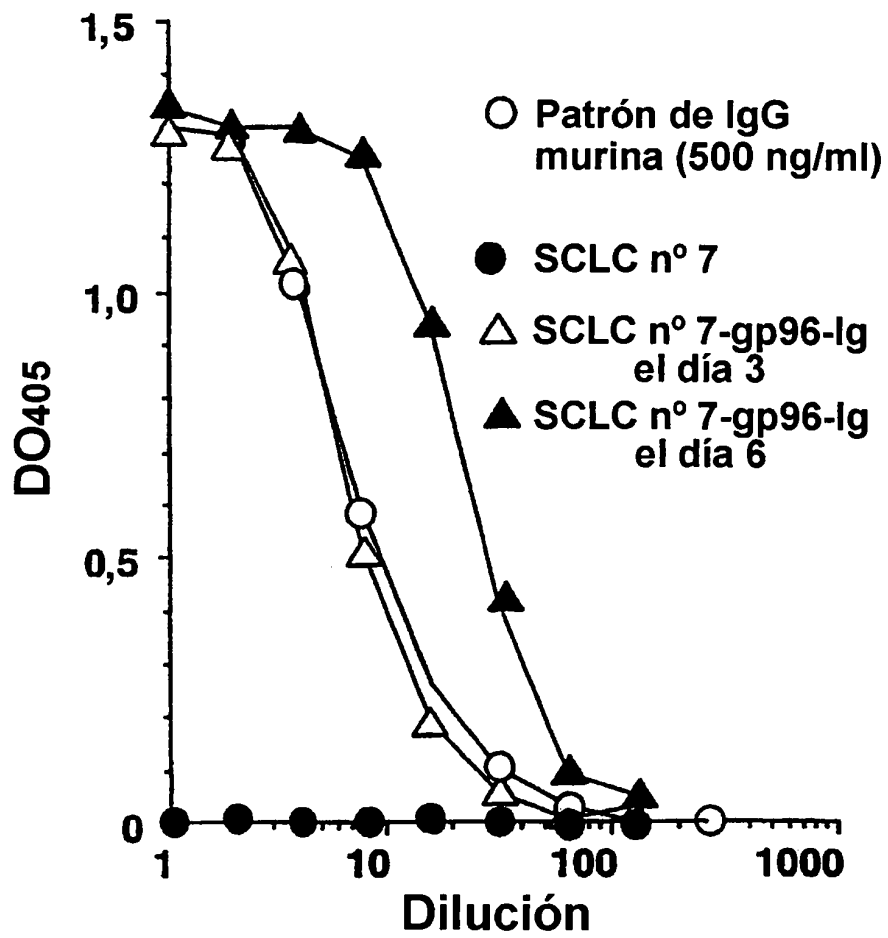


FIG.1A

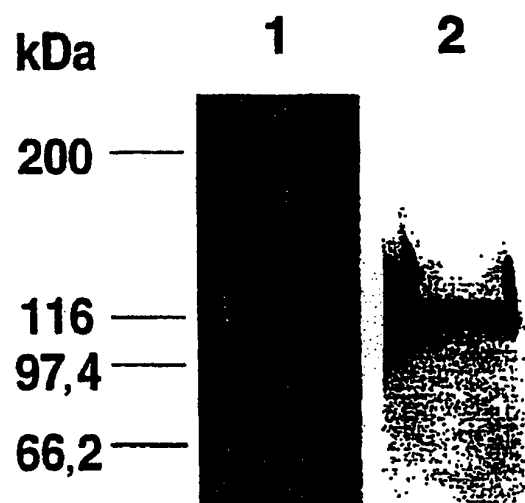


FIG.1B

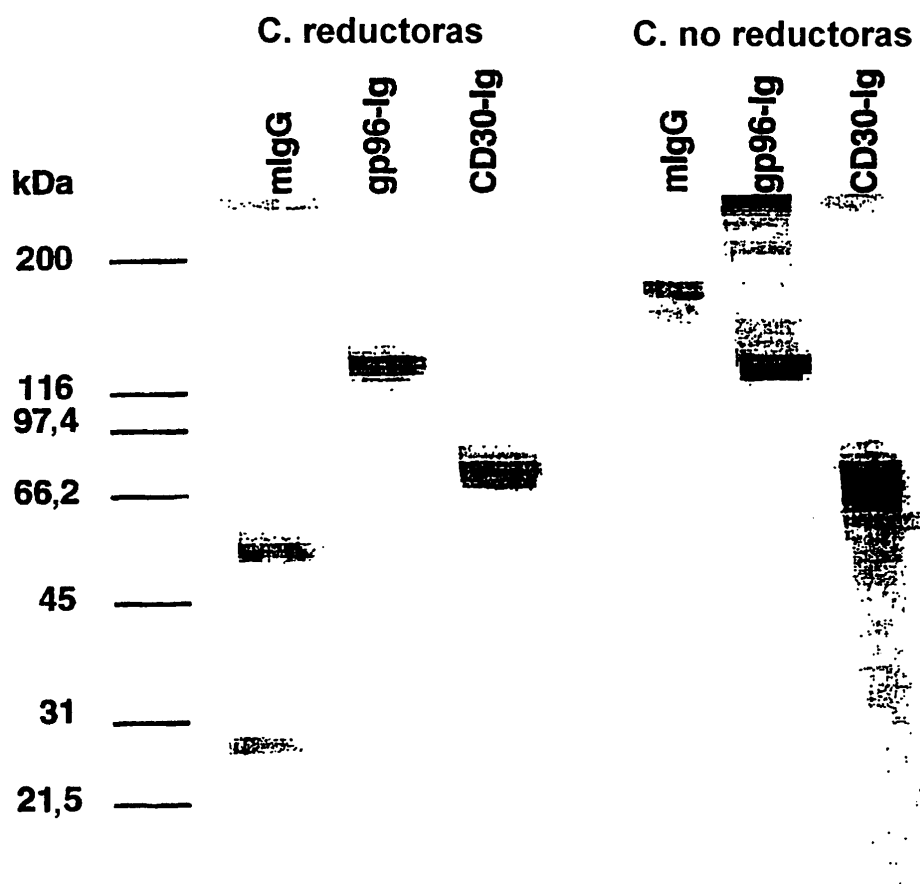


FIG.1C

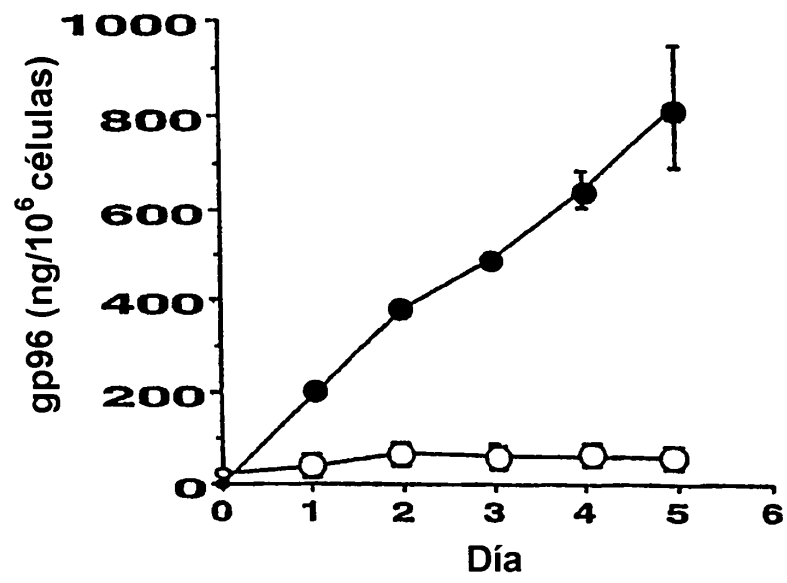


FIG.2A

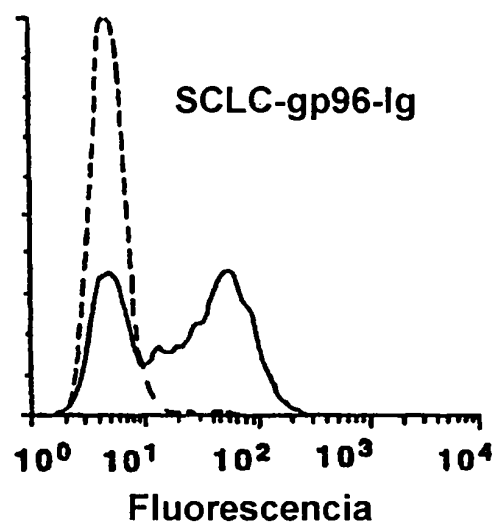


FIG.2B

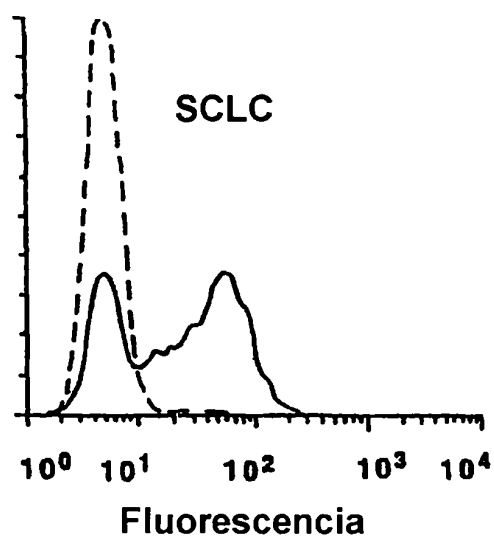


FIG.2C

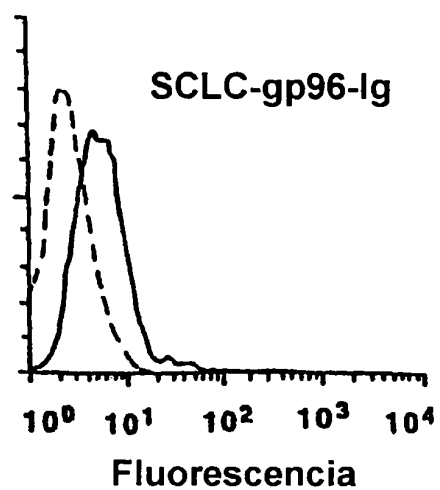


FIG.2D

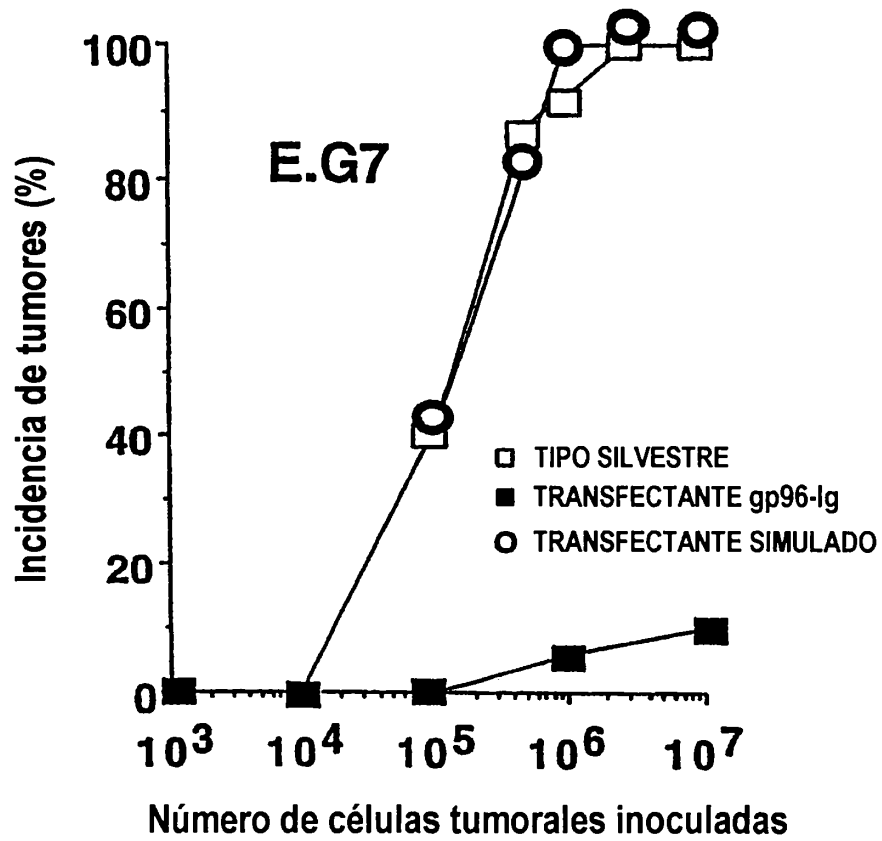


FIG.3A

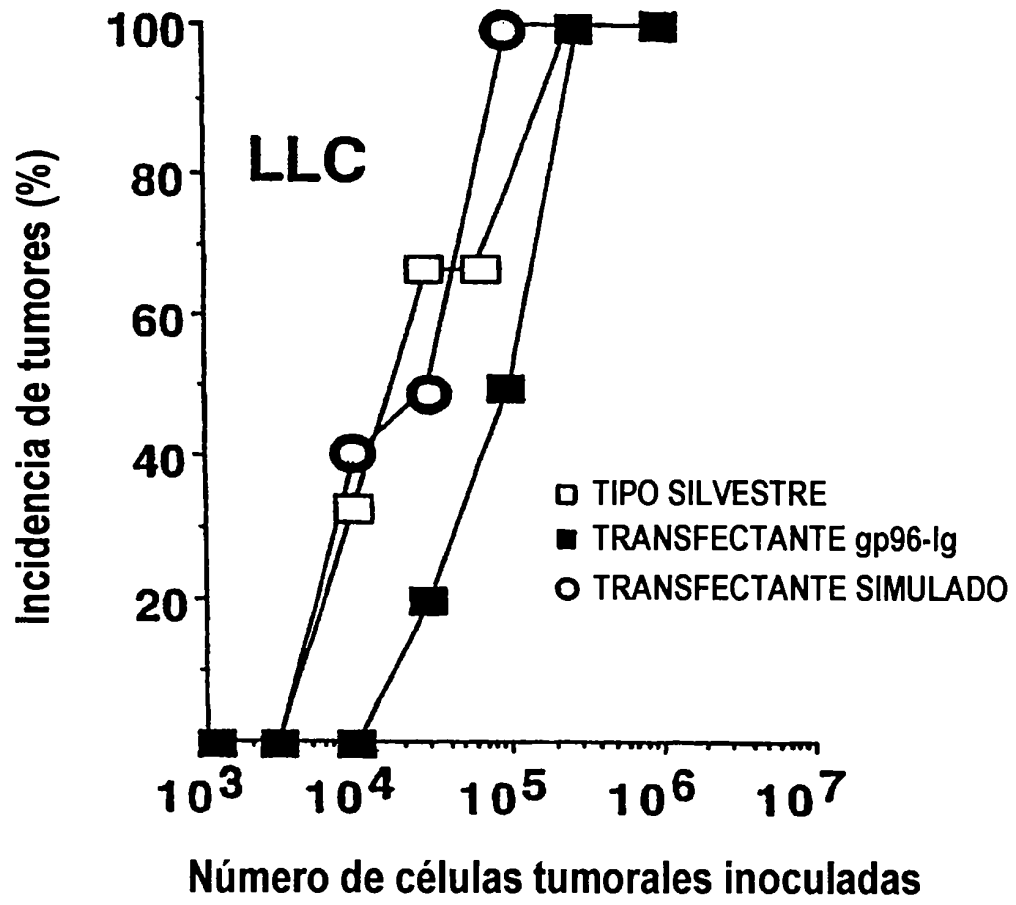
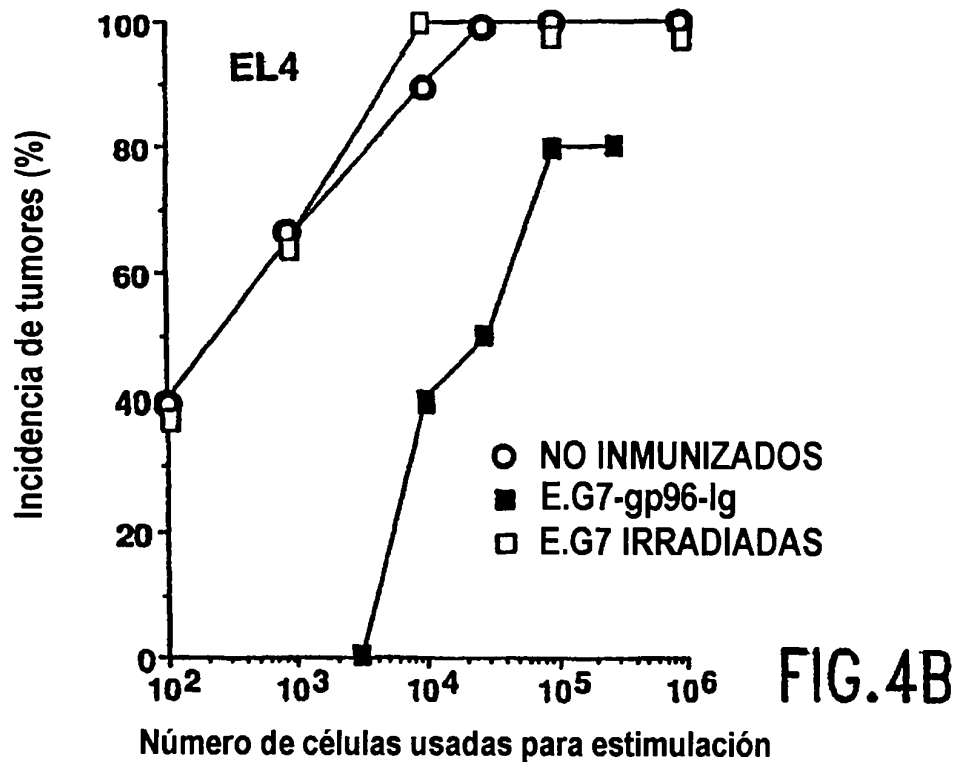
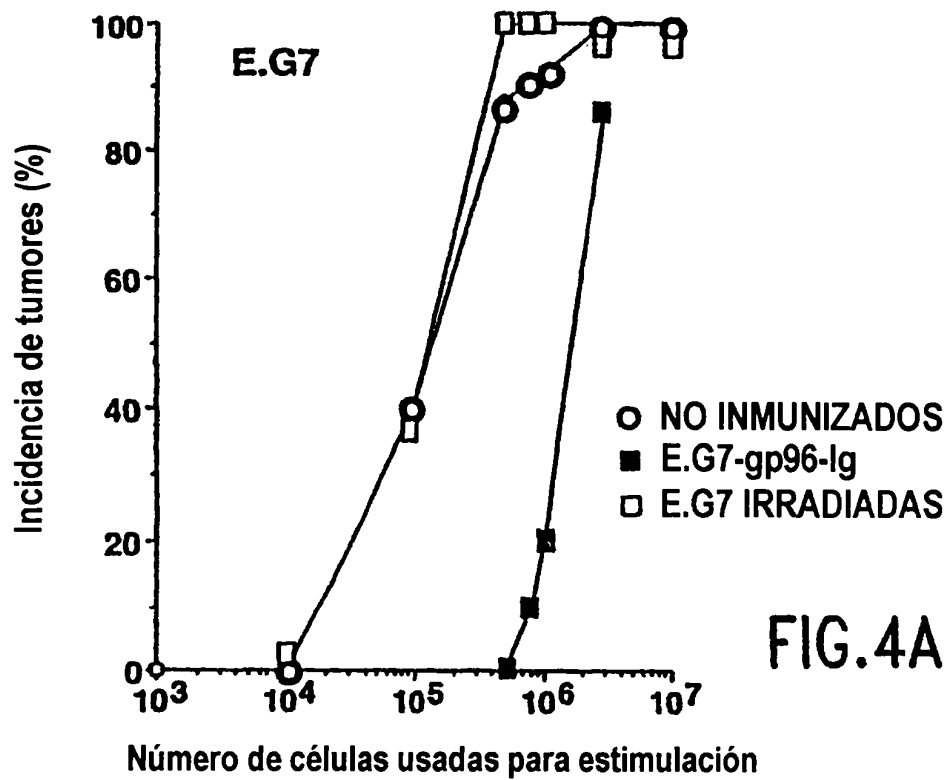
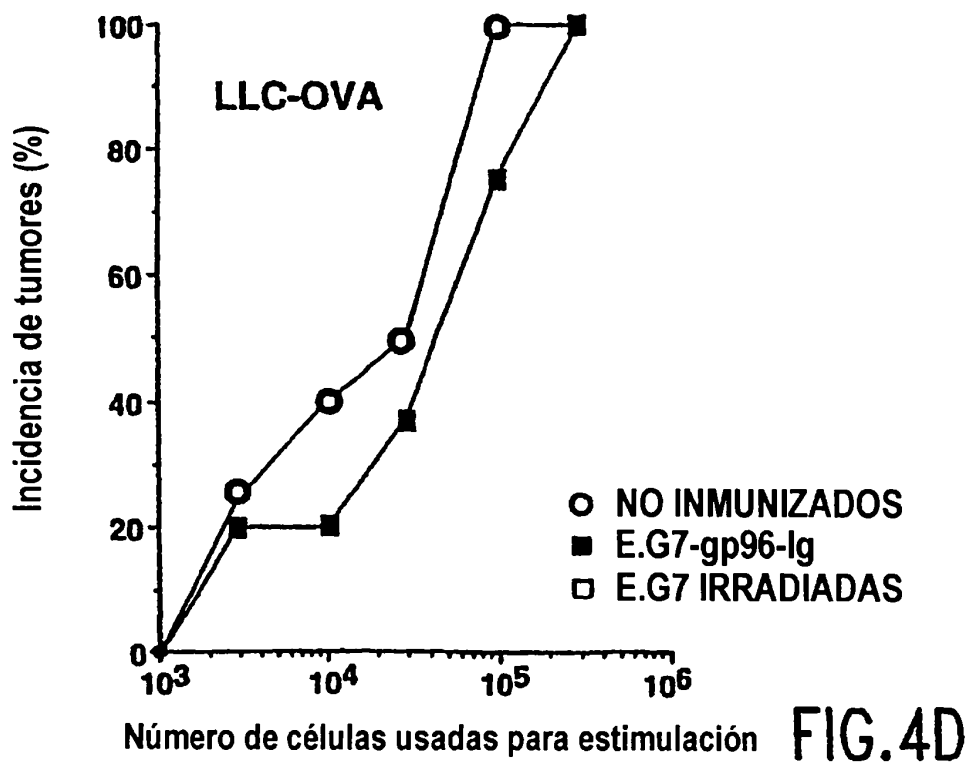
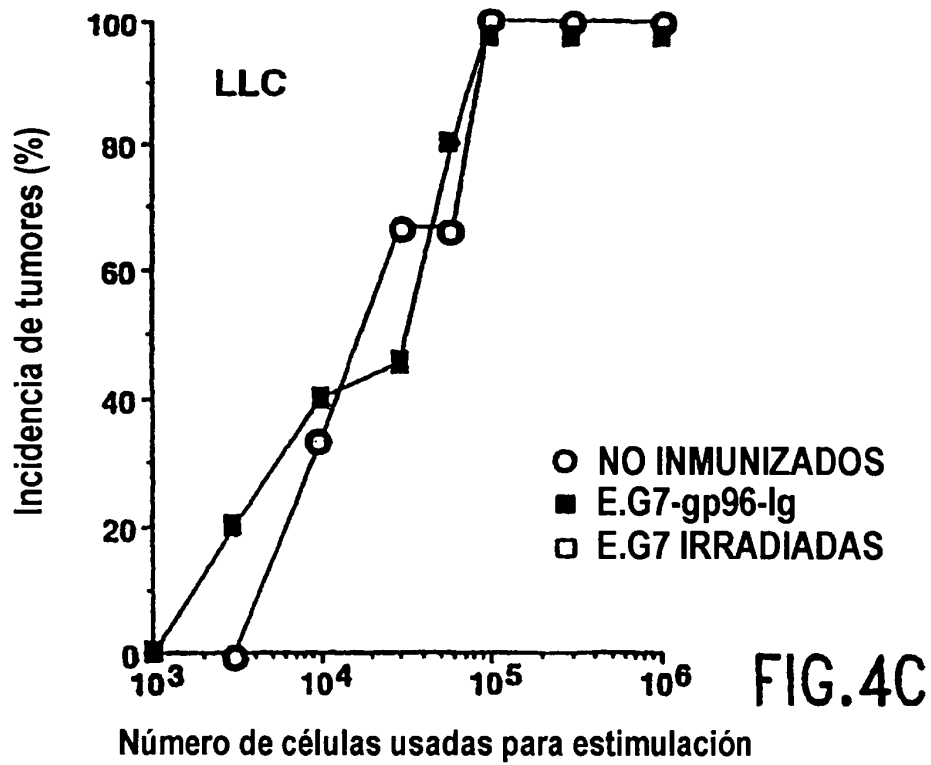


FIG.3B





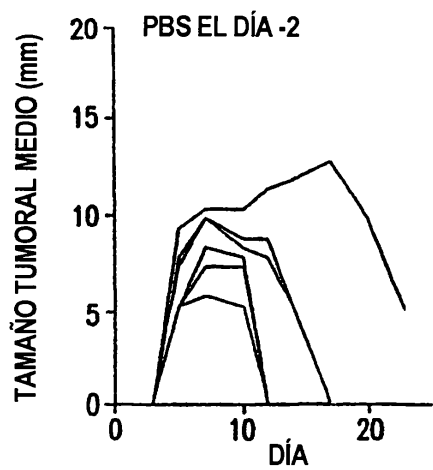


FIG.5A

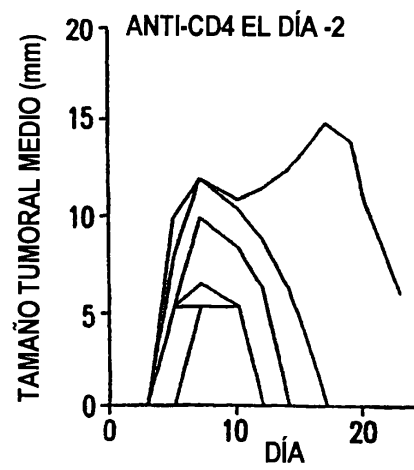


FIG.5B

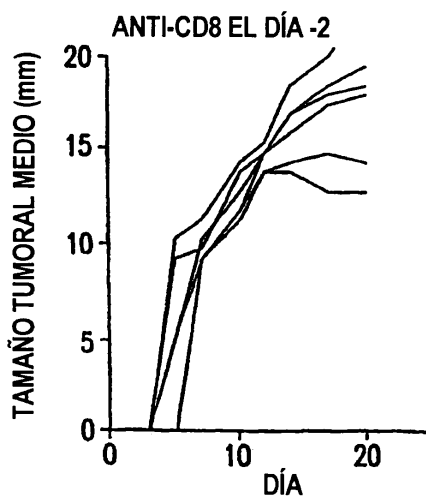


FIG.5C

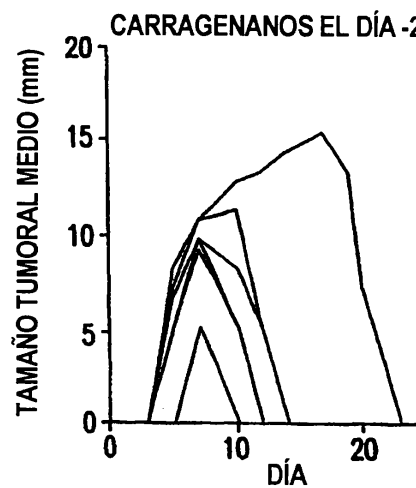


FIG.5D

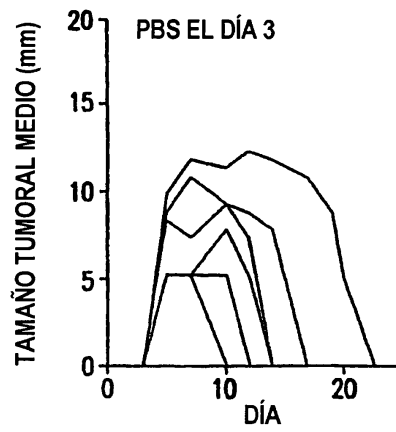


FIG.5E

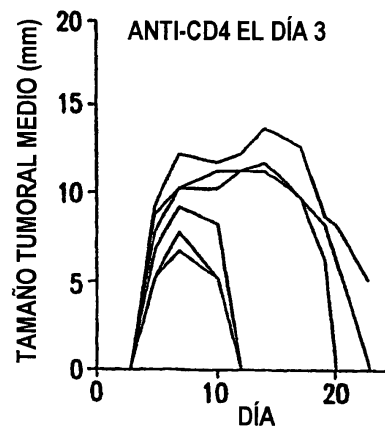


FIG.5F

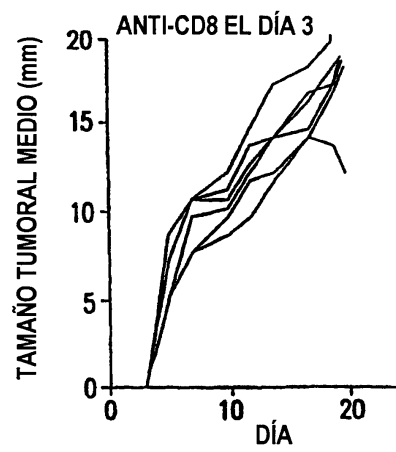


FIG.5G

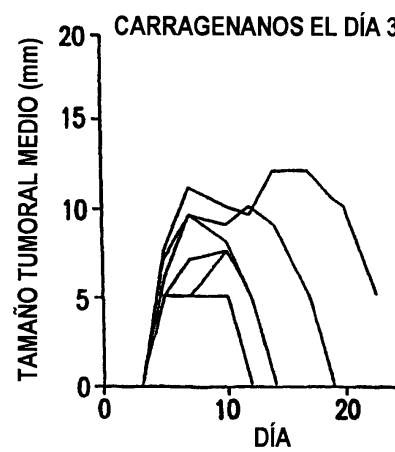


FIG.5H