



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 483**

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 Número de solicitud europea: **07007299 .6**

96 Fecha de presentación : **19.02.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1829551**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

54

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

30

Prioridad: **20.02.1998 US 75358 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.03.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.03.2011

73

Titular/es: **University of Miami**
1600 Northwest 10th Avenue
Miami, Florida 33136, US

72

Inventor/es: **Podack, Eckard R;**
Yamazaki, Koichi y
Spielman, Julie

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 355 483 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

La presente invención se realizó con ayuda gubernamental bajo el número de concesión CA57904 otorgada por el National Institutes of Health. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

1. INTRODUCCIÓN

5 La presente invención se refiere a procedimientos para preparar material inmunogénico que es útil como vacuna para la prevención y/o tratamiento del cáncer o de enfermedades infecciosas. La vacuna está compuesta por complejos no covalentes de proteínas de choque térmico (hsp) modificadas, incluyendo, pero sin limitación, hsp70, hsp90, gp96 y proteína disulfuro isomerasa, y péptidos antigénicos. La vacuna es capaz de generar o aumentar la respuesta inmune de un sujeto contra tipos particulares de células cancerosas o infectadas.

10 2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

2.1. Patobiología del cáncer

15 El cáncer se caracteriza principalmente por un aumento en el número de células anormales derivadas de un tejido normal dado. El proceso patológico 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. Los datos clínicos y los estudios de biología molecular indican que el cáncer es un proceso multietapa que comienza con cambios preneoplásicos minoritarios, que pueden progresar en determinadas condiciones a neoplasias.

20 El crecimiento de células anormales premalignas está ejemplificado por hiperplasia, metaplasia o, más particularmente, displasia (para una revisión de dichas condiciones de crecimiento anormal véase Robbins y Angeil, 1976, Basic Pathology, 2ª Ed., H.B. Saunders Co., Filadelfia, págs. 68-79). La hiperplasia es una forma de proliferación celular controlada que implica un aumento en el número de células en un tejido u órgano sin una alteración significativa en su estructura o función. Como un ejemplo, la hiperplasia endometrial a menudo precede al cáncer endometrial. La metaplasia es una forma de crecimiento celular controlado en la que un tipo de célula adulta o totalmente diferenciada sustituye a otro tipo de célula adulta. La metaplasia puede darse en células de tejidos epiteliales o conjuntivos. La metaplasia típica implica un epitelio metaplásico algo desordenado. La displasia es frecuentemente un precursor del cáncer, y se encuentra principalmente en los epitelios; es la forma más desordenada de crecimiento celular no neoplásico, implicando una pérdida de la uniformidad celular individual y de la orientación arquitectónica de las células. Las células displásicas tienen con frecuencia núcleos anormalmente grandes e intensamente teñidos y presentan pleomorfismo. La displasia aparece característicamente cuando existe una irritación o inflamación crónica, y se encuentra con frecuencia en el cuello uterino, vías respiratorias, cavidad oral y vesícula biliar.

30 La lesión neoplásica puede evolucionar de forma clonal y desarrollar una capacidad creciente para la invasión, crecimiento, metástasis y heterogeneidad, especialmente en condiciones en las que las células neoplásicas escapan a la vigilancia inmune del huésped (Roitt, I., Brostoff, J. y Male, D., 1993, Immunology, 3ª ed., Mosby, St. Louis, págs. 17.1-17.12).

35 El documento WO 96/10411 desvela un procedimiento para inhibir la proliferación de un tumor en un mamífero por uso de complejos de proteína de estrés/péptido.

El documento WO 95/24923 desvela vacunas que contienen complejos de proteína de estrés/péptido que pueden usarse para inducir una respuesta de células T contra un patógeno intracelular preseleccionado.

40 Breloer y col. (1998) Euro. J. Immunol. 28(3) 1016-21 desvela una proteína de choque térmico asociada con antígenos peptídicos en el sistema antigénico OVA bien definido.

2.2. Vacunación

45 La vacunación ha erradicado ciertas enfermedades tales como la polio, el tétanos, la viruela aviar, el sarampión, etc., en muchos países del mundo. Esta estrategia ha aprovechado la capacidad del sistema inmune para prevenir enfermedades infecciosas. Dicha vacunación con materiales no vivos tales como proteínas conduce generalmente a una respuesta de anticuerpos o respuesta de células T auxiliares CD4+ (Raychaudhuri y Morrow, 1993, Immunology Today, 14: 344-348). Por otro lado, la vacunación o infección con materiales vivos tales como células vivas o virus infecciosos conduce generalmente a una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+. Una

5 respuesta de CTL es crucial para la protección frente a cánceres, virus y bacterias infecciosas. Esto representa un problema práctico, ya que la única forma de conseguir una respuesta de CTL es usar agentes vivos que sean en sí mismos patógenos. El problema se salva generalmente usando cepas víricas y bacterianas atenuadas o destruyendo células completas que pueden usarse 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 ADN del huésped y convertirse en una cepa virulenta. Por lo tanto, existe la necesidad de procedimientos que puedan conducir a una respuesta de CTL CD8+ por vacunación con materiales no vivos tales como proteínas de una forma específica.

10 La era de la inmunología tumoral comenzó con los experimentos por Prehn y Main, que demostraron que los antígenos en los sarcomas inducidos por metilcolantreno (MCA) eran específicos de tumor en el sentido de que los ensayos de trasplante no podían detectar estos antígenos en tejido normal de los ratones (Prehn y col., 1957, J. Natl. Cancer Inst. 18: 769-778). Esta idea se confirmó por experimentos adicionales que demostraban que la resistencia específica de tumor contra tumores inducidos por MCA puede generarse en el ratón en el que se originó el tumor (Klein y col., 1960, Cancer Res. 20: 1561-1572).

15 En estudios posteriores, también se encontraron antígenos específicos de tumores en tumores inducidos con otros carcinógenos químicos o físicos, o en tumores espontáneos (Kripke, 1974, J. Natl. Cancer Inst. 53: 1333-1336; Vaage, 1968, cancer Res. 28: 2477-2483; Carswell y col., 1970, J. Natl. Cancer Inst. 44: 1281-1288). Puesto que estos estudios usaban la inmunidad protectora contra el crecimiento de tumores trasplantados como criterio para antígenos específicos de tumor, estos antígenos también se denominan comúnmente "antígenos de trasplante específicos de tumor" o "antígeno de rechazo específico de tumor". Varios factores pueden influir enormemente en la inmunogenicidad del tumor, incluyendo, por ejemplo, el tipo específico de carcinógeno implicado, la inmunocompetencia del huésped y el periodo de latencia (Old y col., 1962, Ann. N.Y. Acad. Sci. 101: 80-106; Bartlett, 1972, J. Natl. Cancer Inst. 49: 493-504).

25 La mayoría, si no todos, los carcinógenos son mutágenos que pueden causar mutación, conduciendo la expresión de antígenos específicos de tumor (Ames, 1979, Science 204: 587-593; Weisburger y col., 1981, Science 214: 401-407). Algunos carcinógenos son inmunosupresores (Malmgren y col., 1952, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79: 484-488). Pruebas experimentales sugieren que existe una correlación inversa constante entre la inmunogenicidad de un tumor y el periodo de latencia (tiempo entre la exposición al carcinógeno y la aparición del tumor) (Old y col., 1962, Ann. N.Y. Acad. Sci. 101: 80-106; y Bartlett, 1972, J. Natl. Cancer Inst. 49: 493-504). Otros estudios han puesto de manifiesto la existencia de antígenos específicos de tumores que no conducen a rechazo pero, no obstante, pueden estimular potencialmente respuestas inmunes específicas (Roitt, I., Brostoff, J. y Male, D., 1993, Immunology, 3ª ed., Mosby, St. Louis, págs. 17. 1-17.12).

2.3. Proteínas de Choque Térmico

35 Las proteínas de choque térmico (hsp) también se denominan indistintamente 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 se han denominado hsp60, hsp70 y hsp90, en las que los números reflejan el peso molecular aproximado de las proteínas de estrés en kilodaltons. Posteriormente se descubrió que muchos miembros de estas familias se inducían en respuesta a otros estímulos estresantes incluyendo privación de nutrientes, alteración metabólica, radicales de oxígeno e infección con patógenos intracelulares. (Véase Welch, mayo 1993, Scientific American 56-64; Young, 1990, Annu. Rev. Immunol. 8: 401-420; Craig, 1993, Science 260: 1902-1903; Gething y col., 1992, Nature 355: 33-45; y Lindquist y col., 1988, Annu. Rev. Genetics 22: 631-677).

45 Las hsp principales puede acumularse a niveles muy altos en células estresadas, pero aparecen a niveles de bajos a moderados en células que no se han estresado. Por ejemplo, la hsp70 de mamífero altamente inducible apenas es detectable a temperaturas normales pero se convierte en una de las proteínas sintetizadas más activamente en la célula tras un choque térmico (Welch y col., 1985, J. Cell. Biol. 101: 1198-1211). Por el contrario, las proteínas hsp90 y hsp60 son abundantes a temperaturas normales en la mayoría, pero no en todas, las células de mamífero, y se inducen adicionalmente por calor (Lai y col., 1984, Mol. Cell. Biol. 4: 2802-2810; van Bergen en Henegouwen y col.; 1987, Genes Dev. 1: 525-531).

50 Las proteínas de choque térmico están entre las proteínas más altamente conservadas en la existencia. Por ejemplo, DnaK, la hsp70 de *E. coli*, tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 50% con proteínas hsp70 de excoiraciones (Bardwell y col., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 848-852). Las familias hsp60 y hsp90 también muestran niveles elevados de forma similar de conservación intrafamiliar (Hickey y col.,

1989, Mol. Cell. Biol. 9: 2615-2626; Jindal, 1989, Mol. Cell. Biol. 9: 2279-2283). Además, se ha descubierto que las familias de hsp60, hsp70 y hsp90 están compuestas por proteínas que están relacionadas con las proteínas de estrés en secuencia, por ejemplo, que tienen una identidad de aminoácidos superior al 35%, pero cuyos niveles de expresión no se alteran por el estrés.

5 Estudios sobre la respuesta celular al choque térmico y otras agresiones fisiológicas pusieron de manifiesto que las hsp están implicadas, no sólo en la protección celular frente a estas condiciones adversas, sino también en procesos inmunológicos y bioquímicos esenciales en las células no estresadas. Las hsp llevan a cabo diferentes clases de funciones de acompañamiento. Por ejemplo, la hsp70, localizada en el citoplasma celular, núcleo, mitocondrias o retículo endoplásmico (Lindquist, S. y col., 1988, Ann. Rev. Genetics 22: 631-677), está
10 implicada en la presentación de antígenos a las células del sistema inmune, y también está implicada en la transferencia, plegamiento y ensamblaje de proteínas en células normales.

15 Varias de las proteínas que se cree que están implicadas en las funciones de acompañamiento residen en la luz del retículo endoplásmico (RE) e incluyen, por ejemplo, la proteína disulfuro isomerasa (PDI; Gething y col., 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 y col., 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 y col., 1990, J. Biol. Chem. 65: 6879-6883; Gething y col., 1986, Cell 46: 939-950). La localización de estas hsp en el RE está 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).
20 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).

25 Generalmente, las proteínas de choque térmico son capaces de unirse a proteínas o péptidos y liberar las proteínas o péptidos unidos en presencia de trifosfato de adenosina (ATP). Se cree que la hidrólisis de ATP se produce durante la participación de las hsp en el transcurso del ensamblaje de proteínas (Flynn y col., 1989, Science, 245: 385-390).

2.4. Inmunogenicidades de Proteínas de Choque Térmico/Estrés hsp70, hsp90 y gp96

30 Srivastava y col. demostraron una respuesta inmune contra sarcomas inducidos por metilcolantreno de ratones endogámicos (1988, Immunol. Today 9: 78-83). En estos estudios, se descubrió que las moléculas responsables de la inmunogenicidad individualmente diferente de estos tumores se identificaron como glicoproteínas de superficie celular de 96 kDa (gp96) y proteínas intracelulares de 84 a 86 kDa (Srivastava, P.K. y col., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3407-3411; Ullrich, S.J. y col., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3121-3125). La inmunización de ratones con gp96 o p84/86 aisladas de un tumor particular hacía a los ratones inmunes para ese tumor particular pero no para tumores antigénicamente diferentes. El aislamiento y la caracterización de genes que codifican gp96 y p84/86 puso de manifiesto una homología significativa entre ellos y demostró que gp96
35 y p84/86 eran, respectivamente, los homólogos citosólico y del retículo endoplásmico de las mismas proteínas de choque térmico (Srivastava, P.K. y col., 1988, Immunogenetics 28: 205-207; Srivastava, P.K. y col., 1991, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 167: 109-123). Además, se demostró que la hsp70 generaba inmunidad contra el tumor del que se aisló pero no contra tumores antigénicamente diferentes. Sin embargo, se descubrió que la hsp70 con un número reducido de péptidos perdía su actividad inmunogénica (Udono, M. y Srivastava, P.K., 1993, J. Exp. Med. 178: 1391-1396). Estas observaciones sugerían que las proteínas de choque térmico no son inmunogénicas de por sí, sino que forman complejos no covalentes con péptidos antigénicos, y los complejos pueden generar en una inmunidad específica contra los péptidos antigénicos (Srivastava, P.K., 1993, Adv. Cancer Res. 62: 153-177; Udono, H. y col., 1994, J. Immunol., 152: 5398-5403; Suto, R. y col., 1995, Science, 269: 1585-1588).

45 El uso de complejos no covalentes de proteína de estrés y péptido, purificados a partir de células cancerosas, para el tratamiento y la prevención del cáncer, se ha descrito en las publicaciones PCT WO 96/10411, con fecha del 11 abril de 1996 y WO 97/10001, con fecha del 20 de marzo de 1997 (véase también el N° de serie de las solicitudes de patente de Estados Unidos en trámite junto con la presente o presentadas el 7 de febrero de 1997 por Srivastava y Chandawarkar, y la de N° de serie 08/796.316 presentada el 7 de febrero de 1997 por Srivastava).

50 También pueden aislarse complejos de proteína de estrés-péptido a partir de células infectadas por patógeno y usarse para el tratamiento y la prevención de una infección causada por el patógeno, tal como virus y otros patógenos intracelulares, incluyendo bacterias, protozoos, hongos y parásitos. Véase la publicación PCT WO 95/24923, con fecha del 21 de septiembre de 1995.

También pueden prepararse complejos inmunogénicos de proteína de estrés-péptido por formación de complejos *in vitro* de proteína de estrés y péptidos antigénicos, y los usos de dichos complejos para el tratamiento y la prevención del cáncer y de enfermedades infecciosas se han descrito en la publicación PCT WO 97/10000, con fecha del 20 de marzo de 1997. El uso de proteína de choque térmico en combinación con un antígeno definido para el tratamiento del cáncer y de enfermedades infecciosas también se ha descrito en la publicación PCT WO97/06821, con fecha del 27 de febrero de 1997.

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

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

La purificación de complejos de proteína de estrés-péptido a partir de lisados celulares se ha descrito anteriormente; véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 95/24923, con fecha de 21 de septiembre de 1995.

Con el fin de preparar una vacuna contra el cáncer, la cantidad de material inmunogénico que puede obtenerse para su 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 agente terapéutico, es ventajoso un suministro constante de grandes cantidades de complejos de hsp-péptido. Por lo tanto, existe una necesidad de una fuente fiable de complejos de hsp-péptido. Los procedimientos de la presente invención pueden usarse para proporcionar complejos de hsp-péptido terapéuticos de una forma rápida y conveniente cuando sólo está disponible una cantidad muy pequeña de tejido de un paciente.

3. SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a procedimientos para preparar una composición inmunogénica para su uso en la prevención y el tratamiento del cáncer o de enfermedades infecciosas.

Las composiciones inmunogénicas preparadas por los procedimientos relacionados con la invención comprenden complejos moleculares asociados no covalentemente de una proteína de choque térmico (hsp) modificada y un péptido antigénico (o inmunogénico). Las proteínas de choque térmico modificadas relacionadas con la invención se secretan por una célula en la que se expresa; carecen de una secuencia de retención en retículo endoplásmico presente en la proteína de choque térmico no modificada; y comprenden una etiqueta peptídica. Para una hsp que se reside de forma natural en el citoplasma, se modifica de modo que se secreta por una célula en la que se expresa; comprende una etiqueta peptídica; 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 antígeno. Cuando las hsp modificadas se expresan en células recombinantes, se secretan y pueden purificarse por la etiqueta peptídica usando cromatografía de afinidad.

Pueden proporcionarse ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican hsp modificadas ("secuencias génicas de hsp modificadas") y vectores de clonación, vectores de expresión y células huésped que contienen dichos ácidos nucleicos. Generalmente, los procedimientos relacionados con la invención comprenden construir una secuencia de nucleótidos 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 ADNc o ADN genómico que codifica una proteína de choque térmico puede obtenerse y modificarse por procedimientos de mutagénesis y clonación de ADN convencionales, por procedimientos de amplificación de ADN o por procedimientos sintéticos. En general, la secuencia que codifica la hsp se inserta en un vector de clonación con fines de modificación y replicación genética antes de la expresión. Las secuencias génicas de hsp modificadas se insertan en un vector de expresión o se integran intracromosómicamente, unidas operativamente a un elemento o elementos reguladores tales como un promotor, con el fin de expresar las hsp modificadas codificadas en células

huésped adecuadas *in vitro* e *in vivo*. Las secuencias génicas de hsp modificadas se introducen en células huésped en las que se expresan por las células huésped, produciendo de este modo intracelularmente complejos no covalentes de hsp modificadas y péptidos (incluyendo aquellos péptidos codificados específicamente por las células cancerosas o el agente infeccioso patógeno).

5 Por consiguiente, la invención se refiere a procedimientos para producir y purificar complejos inmunogénicos no covalentes de hsp 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 y purificar los
10 complejos de hsp modificada-péptido antigénico que se secretan a partir de las células antigénicas recombinantes del sobrenadante de cultivo celular. Los péptidos antigénicos de los complejos son representativos de los péptidos antigénicos que se encuentran en células antigénicas, tales como células cancerosas o células infectadas por patógeno. Dichas células antigénicas recombinantes son útiles como vacuna para fines terapéuticos y profilácticos. Las células huésped recombinantes pueden cultivarse de forma continua o discontinua a gran escala para la producción de grandes cantidades de los complejos inmunogénicos. Las células huésped que contienen las
15 secuencias de hsp modificada pueden almacenarse para un uso futuro (por ejemplo, por liofilización o congelación).

En otra realización, la invención se refiere a procedimientos para producir y purificar hsp 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 y purificar la hsp modificada que se secreta a partir de las células recombinantes del sobrenadante de cultivo celular.
20 Preferentemente, la purificación de las hsp modificadas se facilita por la etiqueta peptídica y cromatografía de afinidad. La invención se refiere además a las hsp modificadas purificadas que se cargan *in vitro* con péptidos antigénicos para formar complejos inmunogénicos no covalentes para usos terapéuticos y profilácticos.

En otro aspecto más de la divulgación, la invención se refiere a procedimientos para producir y purificar complejos inmunogénicos no covalentes, que comprenden la coexpresión de una secuencia génica de hsp modificada y una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido antigénico en células recombinantes, y recuperar y purificar los complejos de hsp modificada-péptido antigénico que se secretan a partir de las células recombinantes del sobrenadante de cultivo celular. Estas células recombinantes también pueden usarse como
25 vacuna para usos terapéuticos y profilácticos.

En diversos aspectos de la divulgación, las hsp modificadas o complejos de hsp modificada-péptido antigénico pueden purificarse por cromatografía de afinidad y usarse como vacuna para la prevención y tratamiento del cáncer o de enfermedades infecciosas.
30

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 procedimientos relacionados, pueden inducir una respuesta inmune en un paciente contra las células cancerosas o el agente infeccioso que sea terapéuticamente o profilácticamente eficaz. Preferentemente, el paciente es el sujeto que proporcionó las células cancerosas para la expresión de una hsp modificada.
35

Como alternativa, las células cancerosas o células infectadas pueden ser de uno o más sujetos diferentes del paciente, pero que tienen 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.
40

Por consiguiente, la invención se refiere a procedimientos de generación de 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 un fragmento del mismo, y/o una célula recombinante que secreta dicho complejo inmunogénico. La invención también se refiere a procedimientos de tratamiento o prevención del cáncer en un individuo que tiene cáncer o en quien se desee la prevención del
45 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 esté secretando dicho complejo inmunogénico. Además, la invención se refiere a procedimientos de tratamiento o prevención de una enfermedad infecciosa en un individuo que tiene una enfermedad infecciosa o en quien se desee 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 esté secretando dicho complejo inmunogénico.
50

Se describen composiciones particulares relacionadas con la invención y sus procedimientos de preparación en las secciones y subsecciones a continuación.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 Figuras 1a-1c. Secreción y caracterización de Gp96-Ig, Figura 1a: ELISA para IgG murina de sobrenadantes de línea de carcinoma pulmonar microcítico nº 7 (SCLC) transfectada y no transfectada con ADNc de gp96-Ig; las células se sembraron en placas a 10^6 /ml y los sobrenadantes se ensayaron el día 3 y el día 6; la IgG de ratón purificada (500 ng/ml) sirvió como patrón. Figura 1b: SDS PAGE de gp96-Ig purificada con proteína A. Carril 1: tinción con azul de Coomassie (1 μ g de proteína), carril 2: transferencia de Western con anti-gp96 monoclonal (anti-Grp94, 9G10) (100 ng de proteína).

10 Figura 1C: Análisis de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) de proteína de fusión de gp96 modificada-Ig (gp96-Ig) purificada en comparación con IgG de ratón (mIgG) y proteína de fusión de CD30-Ig (CD30-Ig), en condiciones reductoras y no reductoras. Se indican a la izquierda los marcadores de peso molecular (en kDa).

15 Figuras 2a-2d: Secreción y localización intracelular de gp96-Ig. Figura 2a: Círculos rellenos: gp96-Ig en el sobrenadante de cultivo, círculos en blanco: gp96-Ig en lisados celulares. Se cuantificó la GP96-Ig por ELISA; se sembraron en placas SCLC-gp96-Ig a 10^6 /ml. Figura 2b: análisis de FACS de SCLC-gp96-Ig permeabilizadas; línea discontinua, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-FITC (control negativo); línea continua, anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-ficoeritrina. Figura 2c. Análisis de FACS de SCLC no permeabilizadas; no transfectadas. Figura 2d: Análisis de FACS de SCLC no permeabilizadas; SCLC transfectadas con gp96-Ig. La línea discontinua en ambos paneles es anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-FITC; línea continua, anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-FITC.

20 Figuras 3a-3b: Oncogenicidad disminuida de E.G7 (Figura 3a) y LLC (Figura 3b) transfectadas con gp96-Ig (círculos rellenos), en comparación con células con transfección simulada (triángulos) y no transfectadas (círculos en blanco). Se usaron grupos de seis ratones por parámetro.

25 Figuras 4a-4d: La gp96-Ig secretora genera una memoria específica de tumor. Se inmunizaron ratones C57BL/6 dos veces a intervalos bisemanales con 10^6 E.G7 transfectadas con gp96-Ig (círculos rellenos en todos los paneles), con 10^6 EG7 irradiadas (triángulos) o no inmunizados (círculos en blanco). Dos semanas después, los ratones se expusieron (seis ratones por grupo) al número de células tumorales que se indican en las Figuras: Figura 4a: E.G7; Figura 4b: EL4; Figura 4C: LLC; Figura 4d: LLC-ova.

30 Figuras 5a-5h: Efecto de la reducción del número de células inmunocompetentes sobre el rechazo de 10^6 E.G7-gp96-Ig. Se muestran las curvas de crecimiento tumoral en ratones individuales. Figuras 5a-5d (paneles superiores): Reducción del número de células inmunocompetentes dos días antes de la inoculación subcutánea del tumor. Figuras 5e-5h (paneles inferiores): Reducción del número de células inmunocompetentes tres días después de la inoculación subcutánea del tumor.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención contempla la aplicación de la tecnología de ADN recombinante para modificar las proteínas de choque térmico que están implicadas en la presentación de antígenos, y para preparar composiciones inmunogénicas que pueden usarse para la prevención y el tratamiento del cáncer y de enfermedades infecciosas.

40 Las "células antigénicas" usadas en la invención pueden ser cualquier célula antigénica incluyendo, pero sin limitación, células cancerosas, células preneoplásicas, células infectadas con un patógeno intracelular o células obtenidas de un sujeto infectado con un agente infeccioso.

45 Los complejos inmunogénicos de hsp-péptido se producen de forma natural en células cancerosas o células infectadas por patógeno. Dichos complejos de hsp-péptido se han usado para generar en un destinatario 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, generalmente dichos complejos inmunogénicos no se secretan por estas células en grandes cantidades. Además, ya 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 que pueden obtenerse a partir de dichas células a veces es muy limitada. Por lo tanto, es deseable encontrar formas de superar el problema de tener un suministro limitado de los complejos inmunogénicos de hsp-péptido. Parte del problema se debe a los procedimientos de purificación

50

de complejos de hsp-péptido que se realizan actualmente, que requieren la lisis de las células. La presente invención se refiere a procedimientos para provocar que los complejos inmunogénicos de hsp-péptido se secreten por células antigénicas al medio de cultivo. Las células antigénicas pueden producirse de forma continua y secretar los complejos inmunogénicos deseados que se recogen convenientemente a partir del medio de cultivo. También se desvelan procedimientos mejorados para purificar dichos complejos inmunogénicos a partir del medio de cultivo. Además, la invención se refiere a procedimientos para aumentar la inmunogenicidad de células cancerosas y células infectadas, de modo que estas células antigénicas puedan administrarse directamente a un sujeto como vacuna para prevenir y tratar el cáncer o enfermedades infecciosas.

En un aspecto de la divulgación, las composiciones inmunogénicas preparadas por los procedimientos relacionados con la invención comprenden complejos moleculares asociados no covalentemente que contienen una proteína de choque térmico (hsp) modificada y un péptido antigénico que está presente, o que es una porción de una proteína que está presente en una célula antigénica. La proteína de choque térmico modificada se secreta por una célula en la que se expresa; carece de una secuencia de retención en retículo endoplásmico presente en la proteína de choque térmico no modificada; y comprende una etiqueta peptídica. Cuando las hsp modificadas se expresan en células recombinantes, se secretan y pueden purificarse mediante la etiqueta peptídica usando cromatografía de afinidad.

En otro aspecto, una proteína de choque térmico modificada se secreta por una célula en la que se expresa; comprende una etiqueta peptídica; y comprende un péptido líder no presente en la proteína de choque térmico no modificada. Para esas hsp que residen de forma natural en el citoplasma, el péptido líder añadido al extremo amino-terminal facilita su translocación al RE.

Las hsp modificadas relacionadas con la invención presentan la misma actividad biológica cualitativa que las hsp de origen natural. Las modificaciones no afectan a las capacidades de la hsp modificada para unirse específicamente y no covalentemente a péptidos antigénicos y presentar dichos péptidos unidos a las células inmunes pertinentes en el transcurso de la presentación de antígeno. Por lo tanto, las hsp modificadas pueden formar complejos inmunogénicos no covalentes con péptidos antigénicos tanto *in vitro* como en células antigénicas. Los complejos de hsp modificada-péptido formados endógenamente en células antigénicas e *in vitro* son ambos capaces de inducir una respuesta inmune específica en un animal contra las células antigénicas de las que proceden los péptidos antigénicos.

En particular, la invención se refiere a las modificaciones de secuencias de nucleótidos que codifican proteínas de choque térmico (hsp) que se retienen de forma natural en el retículo endoplásmico de una célula animal. De acuerdo con la divulgación del presente documento, una secuencia génica de hsp, preferentemente una secuencia de ADNc, se modifica por sustitución o delección de porciones de la secuencia de hsp que codifican una extensión 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 reside en una extensión de péptido que comprende Xaa-Asp-Glu-Leu (XDEL, donde X puede ser cualquier aminoácido) localizada en el extremo carboxilo-terminal. La secuencia génica de hsp se modifica adicionalmente por adición de una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta peptídica a la secuencia de hsp. La secuencia de hsp modificada resultante de la invención codifica una proteína de fusión de hsp modificada que se secreta y no se retiene en el RE.

Para una hsp que reside de forma natural en el citoplasma, su secuencia génica se modifica por adición, no sólo de una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta peptídica, sino también una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido líder. Esta secuencia se une al extremo 5' de la región codificante de la secuencia génica de hsp. Las hsp que llevan dicho péptido líder hidrófobo se importan hacia la luz del RE. El péptido líder se reconoce por una partícula de reconocimiento de señales que dirige el crecimiento de la cadena peptídica de hsp hacia la superficie citosólica de membranas del RE rugoso. Las hsp secretables se translocan completamente a través de la membrana hacia la luz en la que el péptido líder se digiere por proteasas.

Pueden usarse una diversidad de etiquetas peptídicas con diferentes funciones y afinidades en la invención para facilitar la purificación de la hsp modificada o complejos de hsp modificadas-péptidos por cromatografía de afinidad. Una etiqueta peptídica preferida comprende las regiones constantes de una inmunoglobulina. Dependiendo de la etiqueta peptídica fusionada a una hsp, la hsp modificada puede adquirir nuevas propiedades, tales como dimerización, que pueden aprovecharse ventajosamente para mejorar la función de la hsp modificada o complejos de hsp modificada-péptido. Se describen secuencias que codifican etiquetas peptídicas y péptidos líder y procedimientos para unir dichas secuencias a secuencias de hsp en la Sección 5.1.4.

Por consiguiente, la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de

nucleótidos que codifican hsp modificadas (“secuencia génica de hsp modificada”) y vectores de clonación, vectores de expresión y células recombinantes que contienen dichas secuencias. La invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que son complementarias a las secuencias génicas de hsp modificadas. Una secuencia génica de hsp modificada puede clonarse y/o expandirse 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. Pueden construirse construcciones de expresión o vectores de expresión que comprenden una secuencia génica de hsp modificada e introducirse en las células huésped por cualquier procedimiento conocido en la técnica, como se describe en la Sección 5.2.1. Dependiendo de las necesidades, pueden usarse una diversidad de células para la expresión de la hsp modificada, incluyendo células cancerosas, células infectadas por patógeno o células normales.

La construcción génica de expresión relacionada con la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una hsp modificada, preferentemente una secuencia de ADN complementario (ADNc) que codifica una hsp modificada. La secuencia génica de la hsp modificada está asociada operativamente con al menos una región reguladora (por ejemplo, promotor) que controla la expresión de la secuencia de hsp modificada en una célula huésped apropiada. Como alternativa, la secuencia de hsp modificada puede estar flanqueada por regiones que promuevan la recombinación homóloga dentro de la célula huésped, para insertar la secuencia de hsp modificada en una posición intracromosómica de modo que la secuencia de hsp modificada se asocie operativamente con al menos una región reguladora que controle la expresión de la secuencia de la hsp modificada en la célula huésped. Ambos tipos de construcciones génicas de expresión que comprenden una secuencia génica de hsp modificada también se denominan secuencia génica de hsp modificada expresable. Por consiguiente, la invención se refiere a una célula recombinante que contiene una secuencia génica de hsp modificada expresable.

Las secuencias que codifican hsp y secuencias que codifican etiquetas peptídicas y procedimientos para obtener dichas secuencias se describen en detalle en la Sección 5.1.1 y 5.1.4. Se describen procedimientos para modificar la secuencia génica de hsp por adición, delección o sustitución de nucleótidos en la Sección 5.1.2.

En otro aspecto, la invención se refiere a procedimientos para purificar hsp modificadas a partir de cultivos celulares, que comprenden cultivar las células recombinantes para permitir la expresión de la secuencia génica de hsp modificada, y recuperar y purificar la hsp modificada que se secreta a partir de las células recombinantes. Generalmente, la purificación de las hsp modificadas secretadas a partir del sobrenadante de cultivo se facilita por la etiqueta peptídica en la hsp modificada, usando el procedimiento cromatográfico de afinidad apropiado, tal como los descritos en la Sección 5.3. Los procedimientos mejorados no requieren la lisis de las células, que se dejan crecer de forma continua y producen hsp modificadas o complejos de hsp modificada-péptido.

Puesto que las hsp modificadas relacionadas con la invención son capaces de unirse a péptidos como las hsp no modificadas, tras la expresión de la secuencia génica de hsp modificada en una célula antigénica recombinante, se produce la hsp modificada que se asocia con péptidos en el RE para formar complejos no covalentes. Debido a que algunas de las proteínas de las células antigénicas son antigénicas/inmunogénicas, los péptidos/proteínas que forman complejos con las hsp modificadas confieren una inmunidad específica a un huésped contra la célula antigénica en la que están presentes. Dichos complejos inmunogénicos no covalentes se secretan por las células recombinantes y se acumulan en el medio de cultivo.

Por consiguiente, la invención también se refiere a procedimientos para producir, así como purificar complejos inmunogénicos no covalentes de hsp modificadas y péptidos antigénicos en células. En un aspecto, el procedimiento comprende introducir una secuencia génica de hsp modificada en células antigénicas, cultivar las células antigénicas recombinantes para permitir la expresión de la secuencia génica de hsp modificada, y recuperar y purificar a partir del medio de cultivo los complejos de hsp modificada-péptido antigénico que se secretan a partir de las células antigénicas recombinantes. Los péptidos antigénicos de los complejos son representativos de péptidos antigénicos que se encuentran en el interior de las células antigénicas, y no existe la necesidad de aislar y/o caracterizar los antígenos, o incluso de conocer las identidades de estos antígenos, antes de usar el péptido antigénico para vacunar a un sujeto. Los procedimientos aplicables a la purificación de hsp modificadas a partir del medio de cultivo celular, tales como los descritos en la Sección 5.3, también son útiles en la purificación de complejos de hsp modificada-péptido antigénico, con tal de que los procedimientos no alteren las asociaciones no covalentes de las hsp modificadas y los péptidos antigénicos. En un aspecto específico, las células antigénicas recombinantes que comprenden una secuencia génica de hsp modificada expresable pueden usarse en una composición inmunogénica para usos terapéuticos y profilácticos. La inmunogenicidad de dichas composiciones puede ensayarse por procedimientos conocidos en la técnica y descritos en la Sección 5.5 y Sección 6. Con el fin de generar una hsp modificada que se va a usar para generar complejos de hsp-péptido *in vitro*, puede ser deseable usar células huésped que no sean antigénicas de por sí, de modo que la hsp modificada secretada no se

cargue con moléculas antigénicas no deseadas.

5 Cultivando las células recombinantes de forma continua o discontinua a una escala convenientemente grande, pueden producirse hsp modificadas o complejos de hsp modificada-péptido en grandes cantidades. Un complejo inmunogénico deseable que comprende una hsp modificada y proteínas/péptidos antigénicos producidos de forma recombinante puede purificarse a partir del medio de cultivo celular de cultivos continuos o discontinuos a gran escala de las células antigénicas recombinantes. Una línea celular permanente que secreta complejos de hsp modificada-péptido puede proporcionar una fuente uniforme, reproducible y abundante de la composición inmunogénica útil. Dependiendo de las necesidades, las células recombinantes que contienen una secuencia génica de hsp modificada pueden combinarse y/o dividirse en alícuotas; o expandirse; o guardarse por congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido, de modo que los lotes de las células huésped recombinantes pueden recuperarse y usarse muchas veces en el futuro.

10 En otro aspecto en el que se conoce la secuencia codificante de una proteína o péptido antigénico, se contempla que dicha secuencia que codifica la molécula antigénica pueda clonarse en una construcción génica de expresión e introducirse en una célula recombinante que contenga una secuencia de hsp modificada expresable. La clonación de una proteína o péptido antigénico en un vector de expresión puede llevarse a cabo por técnicas convencionales, tales como las descritas para la expresión de la hsp modificada (véase la Sección 5.2). La proteína o péptido antigénico se coexpresa 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 específico de tumor o antígeno asociado a tumor. Los complejos de hsp modificada-péptido antigénico de estas células se secretan en el medio de cultivo y pueden asimismo recuperarse y purificarse por cromatografía de afinidad como se describe en la Sección 5.3. Las células recombinantes que contienen tanto una secuencia de hsp modificada expresable como la construcción génica de expresión que codifica el antígeno también pueden usarse como composición inmunogénica para uso profiláctico y terapéutico.

15 La invención se refiere además a que las hsp modificadas purificadas pueden cargarse 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 purificarse a partir de fuentes celulares, o pueden sintetizarse si se conocen las secuencias de los péptidos, por procedimientos conocidos en la técnica. En un aspecto específico de la divulgación, se incuban péptidos antigénicos con hsp modificadas que se han inmovilizado de forma reversible sobre una fase sólida mediante su etiqueta peptídica, de modo que se formen complejos no covalentes de péptidos antigénicos y hsp modificadas en la fase sólida.

20 Por consiguiente, la invención se refiere a un procedimiento para preparar complejos de una proteína de choque térmico modificada de la invención asociada no covalentemente con un péptido *in vitro* que comprende incubar proteínas de choque térmico modificadas y péptidos durante un tiempo suficiente para la formación de los complejos.

25 Las composiciones inmunogénicas relacionadas con la invención que incluyen tanto complejos de hsp modificada-péptido como células antigénicas recombinantes preparadas mediante los procedimientos reivindicados pueden aumentar la inmunocompetencia de un individuo y generar una inmunidad específica contra tanto células neoplásicas como células infectadas por patógenos. Dichas composiciones inmunogénicas también son capaces de prevenir el desarrollo de tumores e inhibir el crecimiento y la progresión de células tumorales, y prevenir el crecimiento de patógenos o células infectadas con patógenos. Las composiciones inmunogénicas pueden usarse para inducir una reacción inflamatoria en el sitio tumoral y, en última instancia, causar una regresión de la carga tumoral en los pacientes con cáncer tratados.

30 Por consiguiente, la invención se refiere a un procedimiento de generación de una respuesta inmune contra un antígeno en un individuo que comprende administrar al individuo un complejo inmunogénico de una proteína de choque térmico modificada de la invención asociada no covalentemente con el antígeno o un fragmento del mismo. La invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento o prevención del cáncer en un individuo que tiene cáncer o en quien se desee la prevención del cáncer, que comprende administrar al individuo un complejo inmunogénico de una proteína de choque térmico modificada de la invención asociada no covalentemente con el antígeno o un fragmento del mismo. También está relacionado con la invención un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad infecciosa en un individuo que tiene una enfermedad infecciosa o en quien se desee la prevención de una enfermedad infecciosa, que comprende administrar al individuo un complejo inmunogénico de una proteína de choque térmico modificada de la invención asociada no covalentemente con el

antígeno o un fragmento del mismo.

Las composiciones inmunogénicas pueden administrarse de forma autóloga al individuo del que se obtuvieron las células o tejidos cancerosos, o a individuos con un riesgo aumentado de cáncer debido a su historia familiar o a factores de riesgo ambientales. Asimismo, las composiciones inmunogénicas pueden administrarse de forma autóloga al individuo del que se obtuvieron las células infectadas con patógeno o células antigénicas, o a individuos en riesgo de infectarse por el mismo patógeno.

Los procedimientos de tratamiento o prevención del cáncer también son aplicables en general a otros individuos que no proporcionaron las células cancerosas para la expresión de la hsp modificada, siempre que tengan el mismo tipo de cáncer que el que proporcionó las células cancerosas. El mismo principio es aplicable al tratamiento o la prevención de enfermedades infecciosas, en el sentido de que el procedimiento es aplicable a otros individuos siempre 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 HSP Modificadas

En el presente documento se describen procedimientos para la construcción de una construcción génica que codifica una proteína de choque térmico (hsp) modificada que puede expresarse en células procariontas y eucariotas. En concreto, se describe la construcción de una secuencia de nucleótidos 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 célula huésped apropiada para la producción de hsp modificada y complejos de hsp modificada-péptido.

Las proteínas de choque térmico, que se denominan indistintamente en el presente documento proteínas de estrés, útiles en el tratamiento y la prevención del cáncer o de enfermedades infecciosas, pueden seleccionarse de entre cualquier proteína celular que cumpla uno cualquiera de los criterios siguientes. Es una proteína cuya concentración intracelular aumenta cuando una célula se expone a un estímulo estresante, es capaz de unirse a otras proteínas o péptidos, y es capaz de liberar las proteínas o péptidos unidos en presencia de trifosfato de adenosina (ATP) o bajo pH; o es una proteína que muestra una homología de al menos el 35% con cualquier proteína celular que tenga cualquiera de las propiedades anteriores. Las hsp en los complejos que pueden modificarse y prepararse de acuerdo con la divulgación relacionada con la presente invención incluyen, pero sin limitación, hsp70, hsp90, gp96, BiP y proteína disulfuro isomerasa. Preferentemente, las hsp son hsp humanas. Los complejos preferidos comprenden hsp60, hsp70, hsp90, proteína disulfuro isomerasa o BiP humana modificada unida no covalentemente a un antígeno proteico. En una realización específica, el complejo comprende una forma modificada de la gp96 humana que reside normalmente en el retículo endoplásmico de células eucariotas.

Se han identificado hasta la fecha tres familias principales de hsp, en concreto hsp60, hsp70 y hsp90. Además, se incluyen también la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y otras proteínas en el retículo endoplásmico que contienen dominios tipo tiorredoxina, tales como, pero sin limitación, ERp72 y ERp61. Se contempla que miembros de todas estas familias de hsp pueden modificarse y prepararse por la práctica de la presente invención.

Se ha descubierto que las familias de hsp60, hsp70, hsp90 y proteína disulfuro isomerasa están compuestas por proteínas que están relacionadas con las proteínas de estrés en secuencia, por ejemplo, que tienen una identidad de aminoácidos superior al 35%, pero cuyos niveles de expresión no se alteran por el estrés. Por lo tanto, se contempla que la definición de proteína de choque térmico o estrés, como se usa en el presente documento, englobe otras proteínas, muteínas, análogos y variantes de las mismas que tengan una identidad de aminoácidos al menos del 35% al 55%, preferentemente del 55% al 75% y, más preferentemente, del 75% al 85% con miembros de estas familias cuyos niveles de expresión en una célula se aumentan en respuesta a un estímulo estresante.

Los procedimientos descritos en tratados convencionales, por ejemplo, *Methods in Enzymology*, 1987, volumen 154, Academic Press; Sambrook y col., 1989, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Press, Nueva York; y Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, Nueva York, pueden seguirse para llevar a cabo las reacciones de biología molecular de rutina usadas en la construcción y modificación de la construcción génica de hsp. Los procedimientos descritos en detalle a continuación son con fines ilustrativos solamente y no a modo de limitación. También pueden usarse diversos vectores de clonación y sistemas de expresión que están disponibles en el mercado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.1.1. Aislamiento de Secuencias Génicas de Hsp

En diversos aspectos, la invención se refiere a secuencias de aminoácidos de proteínas de choque térmico (hsp) modificadas, y fragmentos y derivados de las mismas, que son funcionalmente activos. Las hsp modificadas "funcionalmente activas", como se usa en el presente documento, se refieren a hsp modificadas que presentan una o más actividades funcionales conocidas asociadas con la hsp no modificada, tales como la unión de péptido antigénico, la liberación de péptido antigénico unido en presencia de trifosfato de adenosina (ATP) o bajo pH, etc. Se proporcionan ácidos nucleicos que codifican las hsp modificadas y fragmentos de las mismas descritos anteriormente, así como ácidos nucleicos complementarios a y capaces de hibridar con dichos ácidos nucleicos.

Las secuencias de ácido nucleico y secuencias de nucleótidos de proteínas de choque térmico de origen natural están disponibles generalmente en bases de datos de secuencias, tales como GenBank. Pueden usarse programas informáticos, tales como Entrez, echar un vistazo a la base de datos y recuperar cualquier dato de secuencia de aminoácidos y secuencia genética de interés mediante el número de acceso. También puede hacerse una búsqueda en estas bases de datos para identificar secuencias con diversos grados de similitudes con una secuencia de consulta usando programas, tales como PASTA y BLAST, que clasifican las secuencias similares por puntuaciones de alineamiento y estadísticas.

Las secuencias de nucleótidos de ejemplos no limitantes de hsp que pueden modificarse y expresarse por procedimientos de la invención están publicadas de la forma siguiente: gp96 humana: N° de Acceso de Genebank X15187; Maki y col., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 5658-5562. gp96 de ratón: N° de Acceso de Genebank M16370; Srivastava y col., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 3807-3811; BiP de ratón: N° de Acceso de Genebank U16277; Haas y col., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 2250-2254, BiP humana: N° de Acceso de Genebank M19645; Ting y col., 1988, DNA 7: 275-286; hsp70 de ratón: N° de Acceso de Genebank M35021, Hunt y col., 1990, Gene, 87:199-204, hsp70 humana, N° de Acceso de Genebank M24743; Hunt y col., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 6455-6489. Debido a la degeneración del código genético, la expresión "secuencia génica de hsp" se refiere no sólo a la secuencia de nucleótidos de origen natural sino que también incluye todas las demás secuencias de ADN degeneradas que codifican la hsp.

Cualquier célula eucariota puede servir potencialmente como fuente de ácido nucleico para obtener la región codificante de un gen de hsp. Pueden aislarse secuencias de ácido nucleico que codifican hsp a partir de vertebrados, mamíferos, así como fuentes de primates, incluyendo seres humanos.

El ADN puede obtenerse por procedimientos convencionales conocidos en la técnica a partir de ADN clonado (por ejemplo, una "genoteca" de ADN) o por amplificación de ADN. Los clones derivados de ADN genómico pueden contener regiones de ADN intrónico y reguladoras además de regiones codificantes; los clones derivados de ADNc contendrán sólo secuencias de exones. Independientemente de la fuente, el gen de hsp debería clonarse molecularmente en un vector adecuado para la propagación del gen.

En la clonación molecular de un gen de hsp a partir de ADN genómico, se generan fragmentos de ADN y se clonan para formar una genoteca genómica. Puesto que algunas de las secuencias que codifican hsp relacionadas están disponibles y pueden purificarse y marcarse, los fragmentos de ADN clonados en la genoteca de ADN genómico pueden explorarse por hibridación de ácido nucleico con la sonda marcada (Benton, W. y Davis, R., 1977, Science 196:180; Grunstein, M. y Hogness, D., 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 3961). Hibridarán aquellos fragmentos de ADN con una homología sustancial con la sonda. También es posible identificar el fragmento apropiado por digestión con enzimas de restricción y comparación de los tamaños de fragmento con los esperados de acuerdo con un mapa de restricción conocido, si tal está disponible.

Las alternativas al aislamiento de ADN genómico de hsp incluyen, pero sin limitación, sintetizar químicamente la propia secuencia génica a partir de una secuencia conocida o generar ADNc para el ARNm que codifica la hsp. Por ejemplo, el ARN para clonar el ADNc del gen de hsp puede aislarse a partir de células que expresen la hsp. Puede generarse una genoteca de ADNc por procedimientos conocidos en la técnica y explorarse por procedimientos tales como los desvelados para explorar una genoteca de ADN genómico. Si está disponible un anticuerpo contra la hsp, la hsp puede identificarse por unión del anticuerpo marcado a los clones que supuestamente sintetizan hsp.

Otros aspectos específicos de la divulgación para la clonación de una secuencia de nucleótidos que codifica una hsp se presentan como ejemplos, pero no a modo de limitación, de la forma siguiente:

En un aspecto específico, pueden identificarse secuencias de nucleótidos que codifican una proteína de choque térmico dentro de una familia y obtenerse por hibridación con una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una hsp en condiciones de rigurosidad de baja a media.

5 A modo de ejemplo, y no como limitación, los procedimientos que usan dichas condiciones de baja rigurosidad son los siguientes (véase también Shilo y Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6789-6792). Los filtros que contienen ADN se tratan previamente durante 6 h a 40°C en una solución que contiene formamida al 35%, SSC 5X, Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 5 mM, PVP al 0,1%, Ficoll al 0,1%, BSA al 1% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 500 µg/ml. Se llevan a cabo hibridaciones en la misma solución con las modificaciones siguientes: PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,2%, ADN de esperma de salmón 100 µg/ml, sulfato de dextrano al 10% (p/vol) y se usan 5-20 x 10⁶ cpm de sonda marcada con ³²P. Se incuban los filtros en mezcla de hibridación durante 18-20 h a 40°C y después se lavan durante 1,5 h a 55°C en una solución que contiene SSC 2X, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), A 5 mM y SDS al 0,1%. La solución de lavado se sustituye con solución recién preparada y se incuban una 1,5 h adicional a 60°C. Los filtros se transfieren en seco y se exponen para autorradiografía. Si es necesario, los filtros se lavan una tercera vez a 65-68°C y se vuelven a exponer a película. Otras condiciones de baja rigurosidad que pueden usarse son bien conocidas en la técnica (por ejemplo, como se emplean para hibridaciones cruzadas entre especies).

20 En otro aspecto, se usa la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la secuencia deseada en un clon de ADN o una genoteca genómica o de ADNc, antes de la selección. Puede llevarse a cabo una PCR, por ejemplo, usando un termociclador y Taq polimerasa (Gene Amp™). El ADN que se amplifica puede incluir ADNc o ADN genómico de cualquier especie. Pueden usarse cebadores oligonucleotídicos que representan secuencias de ácido nucleico conocidas de hsp relacionadas como cebadores en la PCR. En un aspecto preferido, los cebadores oligonucleotídicos representan al menos parte del gen de hsp que está altamente conservado entre hsp de diferentes especies. Se puede optar por sintetizar varios cebadores degenerados diferentes para su uso en las reacciones de PCR. También es posible variar la rigurosidad de las condiciones de hibridación usadas en el cebado de las reacciones de PCR, para permitir mayores o menores grados de similitud de secuencia de nucleótidos entre la secuencia de nucleótidos de la hsp conocida y el homólogo de ácido nucleico que se esté aislando. Para hibridación cruzada entre especies, se prefieren condiciones de baja rigurosidad. Para hibridación en la misma especie, se prefieren condiciones moderadamente rigurosas. Después de una amplificación con éxito, la secuencia que codifica una hsp puede clonarse y secuenciarse. Si el tamaño de la región codificante del gen de hsp que se está amplificando es demasiado grande para amplificarse en una sola PCR, pueden llevarse a cabo varias PCR que abarquen el gen completo, preferentemente con regiones solapantes, y los productos de la PCR ligarse entre sí para formar la secuencia codificante completa. Como alternativa, si se amplifica un segmento de un gen de hsp, ese segmento puede clonarse y utilizarse como sonda para aislar un clon genómico o de ADNc completo.

35 Antes de la modificación, el gen de hsp puede insertarse en un vector de clonación apropiado e introducirse en células huésped de modo que se generen muchas copias de la secuencia génica. Pueden usarse una gran cantidad de sistemas de vector-huésped conocidos en la técnica tales como, pero sin limitación, bacteriófagos tales como derivados de lambda, o plásmidos tales como derivados plasmídicos de pBR322 o pUC, o el vector Bluescript (Stratagene).

40 Los procedimientos anteriores no pretenden limitar los procedimientos por los que pueden obtenerse o propagarse clones de hsp. Las proteínas de choque térmico modificadas de la invención están modificadas de modo que se secretan y pueden purificarse fácilmente a partir del medio de cultivo celular. En particular, una hsp modificada de la invención carece de un segmento del polipéptido que señala la retención de la hsp en el retículo endoplásmico (RE). La señal de retención se inutiliza por delección del péptido o por sustitución con un péptido que no funcione como señal. Además, la hsp modificada comprende una etiqueta peptídica que facilita la recuperación y purificación. La etiqueta peptídica puede fusionarse con cualquier porción de la hsp que no esté implicada en la unión al péptido antigénico, tal como por ejemplo, el carboxilo-terminal. Además, si la hsp reside de forma natural 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 habitualmente se localiza en el extremo carboxilo-terminal se sustituye por una etiqueta peptídica.

50 **5.1.2. Modificación de Genes de Proteínas de Choque Térmico**

Las proteínas de choque térmico modificadas relacionadas con la invención están modificadas de modo que se secretan por las células en las que se expresan y pueden purificarse fácilmente a partir del medio de cultivo celular. En particular, una hsp modificada relacionada con la invención 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 limitación, gp96. La señal de retención se inutiliza por delección del péptido o por sustitución con un péptido que no funcione como señal. Además, la hsp modificada comprende una etiqueta peptídica que facilita la recuperación y purificación. La etiqueta peptídica puede fusionarse con cualquier porción de la hsp que no esté implicada en la unión al péptido antigénico, tal como, por ejemplo, el carboxilo-terminal. En un aspecto preferido, el péptido de retención de una hsp que habitualmente se localiza en el extremo carboxilo-terminal se sustituye por una etiqueta peptídica. Además, si la hsp reside de forma natural 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 relacionadas con la invención pueden producirse por diversos procedimientos conocidos en la técnica. Las manipulaciones que dan como resultado su producción pueden aparecer a nivel de gen o de proteína, preferentemente a nivel de gen. Por ejemplo, la región codificante clonada de una hsp puede modificarse por cualquiera de numerosos procedimientos de ADN recombinante conocidos en la técnica (Sambrook y col., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York; Ausubel y col., en el Capítulo 8 de Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, Nueva York). Será evidente a partir de la discusión siguiente que se introducen o combinan sustituciones, delecciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas hasta llegar a una secuencia de nucleótidos final que codifique una hsp modificada.

Como alternativa, la hsp modificada puede sintetizarse químicamente. Por ejemplo, un péptido correspondiente a una porción de una hsp que comprende las modificaciones deseadas puede sintetizarse mediante el uso de un sintetizador de péptidos.

5.1.3 PÉPTIDO DE RETENCIÓN

El péptido que causa que una hsp permanezca en el retículo endoplásmico (RE) se localiza típicamente en el carboxilo-terminal 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 en el presente documento para referirse a esta secuencia tetrapeptídica, que es KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) en la mayoría de hsp de mamífero. La secuencia peptídica de retención en *Saccharomyces cerevisiae* y en *Schizosaccharomyces pombe* se encuentra que 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 hsp puede inutilizarse por delección del péptido de retención o por destrucción de la señal con sustituciones de aminoácidos en el péptido de retención. Como propuesta general, debería eliminarse cualquier señal presente en la secuencia de hsp modificada que, si está presente, tienda a impedir la secreción de la hsp modificada por la célula. Dependiendo de la hsp individual, dichas señales pueden incluir dominios transmembrana y dominios citoplasmáticos.

Para eliminar el segmento de ADN que codifica la secuencia peptídica de retención u otras señales, la secuencia génica de la hsp puede escindirse en sitios apropiados con una endonucleasa o endonucleasas de restricción si están disponibles dichos sitios, liberando un fragmento de ADN que codifica el péptido de retención. El resto de la región codificante de hsp se aísla después y se liga para formar la secuencia génica de hsp modificada.

Como alternativa, si no están disponibles sitios de restricción convenientes, puede liberarse un fragmento de ADN de mayor tamaño usando sitios de restricción localizados en secuencias que flanquean la región que codifica la secuencia peptídica de retención, y sustituirlo por un fragmento similar de ADN sintético que carezca de la secuencia que codifica el péptido de retención. Debe tenerse cuidado para asegurarse de que se mantiene la fase de lectura de traducción apropiada.

Si es deseable, pueden crearse sitios de restricción en las posiciones apropiadas mediante procedimientos de mutagénesis dirigida y/o procedimientos de amplificación de ADN conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Shankarappa y col., 1992, PCR Method Appl. 1: 277-278. Comúnmente se usa la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para introducir cambios de secuencia deseados en el ADN de interés. Cualquier cambio en la secuencia de cebadores puede incorporarse fácilmente en el producto de ADN de la PCR que facilita la posterior incorporación de los cambios en la secuencia génica. Por ejemplo, se usan oligonucleótidos sintéticos que incorporan el sitio de restricción deseado junto con los cebadores de secuencia flanqueante apropiada para amplificar dos fragmentos de ADN adyacentes. Ambos fragmentos amplificados contendrán el nuevo sitio de restricción en un extremo. Después de la digestión enzimática tanto en el nuevo sitio como en el flanqueante, los fragmentos amplificados se ligan y se subclonan en un vector listo para manipulaciones adicionales. Es fundamental que la introducción de sitios de restricción no altere la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

Cualquier procedimiento para mutagénesis conocido en la técnica puede usarse para modificar nucleótidos individuales en una secuencia de ADN, con el fin de realizar una sustitución o sustituciones de aminoácidos en la secuencia peptídica expresada, o para crear/delecionar sitios de restricción para facilitar manipulaciones adicionales. Dichas técnicas incluyen, pero sin limitación, mutagénesis química, mutagénesis dirigida *in vitro* (Hutchinson, C., y col., 1978, J. Biol. Chem 253: 6551), mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (Smith, 1985, Ann. Rev. Genet. 19: 423-463; Hill y col., 1987, Methods Enzymol. 155: 558-568), extensión solapante basada en PCR (Ho y col., 1989, Gene 77:51-59), mutagénesis con megacebadores basada en PCR (Sarkar y col., 1990, Biotechniques, 8:404-407), etc. Las modificaciones pueden confirmarse mediante secuenciación con didesoxi de ADN bicatenario.

El procedimiento anterior puede aplicarse para sustituir uno o más de los restos aminoacídicos en la secuencia de retención tetrapeptídica, especialmente los restos Asp, Glu y Leu. Los sustitutos para un aminoácido dentro de la secuencia peptídica de retención pueden seleccionarse de miembros de una clase diferente a la que pertenece el aminoácido. Los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las sustituciones que se espera en general que produzcan los mayores cambios en las propiedades bioquímicas serán aquellas en las que (a) un resto hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo sustituye a (o se sustituye por) un resto hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanina, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina sustituye a (o se sustituye por) cualquier otro resto; (c) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo o histidilo sustituye a (o se sustituye 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 se sustituye por) uno que no tenga una cadena lateral, por ejemplo, glicina.

Los procedimientos anteriores no pretenden limitar los procedimientos por los que puede delecionarse o destruirse la secuencia peptídica de retención y/u otra señal en una hsp.

5.1.4 FUSIÓN CON ETIQUETA PEPTÍDICA Y/O PÉPTIDO LÍDER

La hsp modificada relacionada con la invención también es una proteína de fusión que comprende una etiqueta peptídica. En ciertos aspectos de la divulgación, también puede fusionarse un péptido líder con una hsp modificada, facilitando de este modo el transporte de la hsp modificada en el retículo endoplásmico (RE) para su secreción.

En diversos aspectos, dicha proteína de fusión puede generarse por ligación de una secuencia génica de hsp con la secuencia que codifica la etiqueta peptídica o el péptido líder en la fase de lectura apropiada. Si se usan secuencias genómicas, debería tenerse cuidado para asegurarse de que el gen modificado permanezca dentro de la misma fase de lectura de traducción, ininterrumpido por señales de terminación de la traducción y/o señales de corte y empalme de ARN mensajero falsas.

En un aspecto preferido, la etiqueta peptídica se fusiona en su amino-terminal al carboxilo-terminal de la hsp. El sitio exacto en el que se realiza la fusión en el carboxilo-terminal no es crítico. Por ejemplo, la etiqueta peptídica puede adoptar el lugar del péptido de retención. El sitio óptimo puede determinarse mediante una experimentación de rutina. Las inmunogenicidades de la hsp modificada pueden ensayarse por procedimientos descritos en la Sección 5.5.

Pueden usarse una diversidad de etiquetas peptídicas conocidas en la técnica en la modificación de una hsp, tales como, pero sin limitación, las regiones constantes de inmunoglobulina, la secuencia de polihistidina (Petty, 1996, Metal-chelate affinity chromatography, en Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ed. Ausubel y col., Greene Publish. Assoc. y Wiley Interscience), glutatión S-transferasa (GST, Smith, 1993, Methods Mol. Cell Bio. 4: 220-229), la proteína de unión a maltosa de *E. coli* (Guan y col., 1987, Gene 67: 21-30) y diversos dominios de unión a celulosa (Patentes de Estados Unidos N° 5.496.934; 5.202.247; 5.137.819; Tomme y col., 1994, Protein Eng. 7: 117-123), etc. Algunas etiquetas peptídicas pueden proporcionar las nuevas propiedades estructurales de la hsp modificada, tales como la capacidad para formar multímeros. La dimerización de la hsp modificada con un péptido unido puede aumentar la avidéz de la interacción entre la hsp y su compañero en el transcurso de la presentación de antígeno. Estas etiquetas peptídicas proceden habitualmente de proteínas que normalmente existen como homopolímeros. Las etiquetas peptídicas, tales como los dominios extracelulares de CD8 (Shiue y col., 1988, J. Exp. Med. 168: 1993-2005) o CD28 (Lee y col., 1990, J. Immunol. 145: 344-352) o porciones de la molécula de inmunoglobulina que contienen sitios para enlaces disulfuro intercatenarios, podrían conducir a la

5 formación de multímeros. Otras etiquetas peptídicas posibles son secuencias de aminoácidos cortas contra las que están disponibles anticuerpos monoclonales, tales como, pero sin limitación, los siguientes ejemplos bien conocidos, el epítipo FLAG, el epítipo myc en los aminoácidos 408-439, el epítipo de hemaglutinina (HA) de virus influenza. Otras etiquetas peptídicas se reconocen por compañeros de unión específicos y, por lo tanto, facilitan el aislamiento mediante unión por afinidad al compañero de unión, que preferentemente está inmovilizado y/o sobre un soporte sólido. Como se apreciará por el experto en la materia, pueden usarse muchos procedimientos para obtener la región codificante de las etiquetas peptídicas mencionadas anteriormente, incluyendo, pero sin limitación, clonación de ADN, amplificación de ADN y procedimientos sintéticos. Algunas de las etiquetas peptídicas y reactivos para su detección y aislamiento están disponibles en el mercado.

10 Una etiqueta peptídica preferida es una porción no variable de la molécula de inmunoglobulina. Típicamente, dichas porciones comprenden al menos un dominio CH2 y CH3 funcional de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. También se realizan fusiones usando el extremo carboxilo-terminal de la porción Fc de un dominio constante, o una región inmediatamente amino-terminal al CH1 de la cadena ligera o pesada. Pueden obtenerse etiquetas peptídicas basadas en inmunoglobulina adecuadas de los subtipos de IgG-1, 15 2, 3 ó 4, de IgA, IgE, IgD o IgM, pero preferentemente de IgG1. Preferentemente, se usa una inmunoglobulina humana cuando la hsp modificada está destinada a uso *in vivo* para seres humanos. Muchos ADN que codifican regiones constantes de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina se conocen o están disponibles fácilmente de genotecas de ADNc. Véase, por ejemplo, Adams y col., *Biochemistry*, 1980, 19: 2711-2719; Gough y col., 1980, *Biochemistry*, 19: 2702-2710; Dolby y col., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 6027-6031; Rice y col., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 7862-7865; Falkner y col., 1982, *Nature*, 298: 286-288; y Morrison y col., 1984, *Ann. Rev. Immunol.*, 2: 239-256. Debido a que muchos reactivos inmunológicos y sistemas de marcaje están disponibles para la detección de inmunoglobulinas, la proteína de fusión de hsp modificada-Ig ("hsp modificada-Ig") puede detectarse fácilmente y cuantificarse mediante una diversidad de procedimientos inmunológicos conocidos en la técnica, tales como el uso de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoprecipitación, 20 separación de células activadas por fluorescencia (FACS), etc. De forma similar, si la etiqueta peptídica es un epítipo con anticuerpos fácilmente disponibles, dichos reactivos pueden usarse con las técnicas mencionadas anteriormente para detectar, cuantificar y aislar hsp modificadas que contengan la etiqueta peptídica. En muchos casos, no existe la necesidad de desarrollar anticuerpos específicos contra la hsp modificada.

30 Un aspecto particularmente preferido de la divulgación es una fusión de una hsp modificada, que carece del péptido de retención, con los dominios de bisagra, CH2 y CH3 de inmunoglobulina G-1 (IgG-1) murina (Bowen y col., *J. Immunol.* 156: 442-9). Este péptido contiene tres restos de cisteína que están normalmente implicados en la formación de enlaces disulfuro con otras cisteínas en la molécula de Ig. Puesto que ninguna de las cisteínas es necesaria para que el péptido funcione como etiqueta, uno o más de estos restos de cisteína puede sustituirse opcionalmente por otro resto aminoacídico, tal como, por ejemplo, serina. Pueden aplicarse procedimientos tales como los descritos en la Sección 5.1.2 para realizar dichas sustituciones.

35 Pueden usarse diversas secuencias líder conocidas en la técnica para la secreción eficaz de hsp modificadas a partir de células bacterianas y de mamífero (von Heijne, 1985, *J. Mol. Biol.* 184: 99-105). Los péptidos líder se seleccionan basándose en la célula huésped deseada y pueden incluir secuencias bacterianas, de levadura, virales, animales y de mamífero. Por ejemplo, el péptido líder de la glicoproteína D de virus herpes es adecuado para su uso en una diversidad de células de mamífero. Un péptido líder preferido para su uso en células de mamífero puede obtenerse de la región V-J2-C de la cadena kappa de inmunoglobulina de ratón (Bernard y col., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 5812-5816).

45 Las secuencias de ADN que codifican una etiqueta peptídica o péptido líder deseado que se conocen o están disponibles fácilmente de las genotecas o de proveedores comerciales son adecuadas en la práctica de la presente invención. También pueden aplicarse procedimientos para obtener secuencias de hsp descritos en la Sección 5.1.1 para obtener secuencias que codifiquen una etiqueta peptídica o péptido líder.

5.2. Producción de Hsp Modificadas

En diversos aspectos de la divulgación, se insertan secuencias que codifican hsp modificadas en un vector de expresión para su propagación y expresión en células recombinantes.

50 Una construcción de expresión, como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica una hsp modificada asociada operativamente con una o más regiones reguladoras que permite la expresión de la hsp modificada en una célula huésped apropiada. La expresión "asociada operativamente" se refiere a una asociación en la que las regiones reguladoras y la secuencia de hsp modificada a

expresarse y se sitúan de tal modo que permita la transcripción y, en última instancia, la traducción.

Las regiones reguladoras necesarias para la transcripción de la hsp modificada pueden proporcionarse mediante el vector de expresión. También puede proporcionarse un codón de inicio de la traducción (ATG) si se va a expresar la secuencia de hsp modificada que carece de su codón de inicio afín. En un sistema de huésped-construcción compatible, los factores de transcripción celulares, tales como la ARN polimerasa, se unirán a las regiones reguladoras en 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 una célula huésped a otra. Generalmente, es necesario un promotor que sea capaz de unirse a la ARN polimerasa y promover la transcripción de una secuencia de ácido nucleico asociada operativamente. Dichas regiones reguladoras pueden incluir las secuencias no codificantes 5' implicadas en el inicio de la transcripción y de la traducción, tales como la caja TATA, la secuencia de protección terminal, la secuencia CAAT y similares. La región no codificante 3' a la secuencia codificante puede contener secuencias reguladoras de la terminación de la transcripción, tales como terminadores y sitios de poliadenilación.

Ambas regiones reguladoras constitutivas e inducibles pueden usarse para la expresión de la hsp modificada. Puede ser deseable usar promotores inducibles cuando las condiciones óptimas para el cultivo de las células recombinantes y las condiciones para un alto nivel de expresión de la hsp modificada sean diferentes. Se proporcionan ejemplos de regiones reguladoras útiles en la sección siguiente a continuación.

Para unir secuencias de ADN con funciones reguladoras, tales como promotores, a la secuencia génica de la hsp modificada, o para insertar la secuencia génica de la hsp modificada en el sitio de clonación de un vector, pueden ligarse enganches o adaptadores que proporcionen los sitios de restricción compatibles apropiados en los extremos de los ADNc por procedimientos bien conocidos en la técnica (Wu y col., 1987, *Methods in Enzymol* 152: 343-349). La escisión con una enzima de restricción puede venir seguida de modificación para crear extremos romos por digestión hacia atrás o relleno de los extremos terminales de ADN monocatenarios antes de la ligación. Como alternativa, puede introducirse un sitio enzimático de restricción deseado en un fragmento de ADN por amplificación del ADN mediante el uso de PCR con cebadores que contienen el sitio enzimático de restricción deseado.

Una construcción de expresión que comprende una secuencia de hsp modificada asociada operativamente con regiones reguladoras puede introducirse directamente en células huésped apropiadas para la expresión y producción de complejos de hsp modificada-péptido sin una clonación adicional. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.580.859. Las construcciones de expresión también pueden contener secuencias de ADN que faciliten la integración de la secuencia de hsp modificada en el genoma de la célula huésped, por ejemplo, por recombinación homóloga. En este caso, no es necesario emplear un vector de expresión que comprende un origen de replicación adecuado para células huésped apropiadas para propagar y expresar la hsp modificada en las células huésped.

5.2.1. Sistema de huésped-vector

En el presente documento se describen sistemas de vectores y células huésped que pueden usarse para la expresión de hsp modificadas. Pueden usarse una diversidad de vectores de expresión en la presente invención que incluyen, pero sin limitación, plásmidos, cósmidos, fagos, fagémidos o 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 endonucleasa de restricción para la inserción de la secuencia génica de hsp modificada y uno o más marcadores de selección. El vector de expresión debe usarse con una célula huésped compatible que puede proceder de un organismo procarionta o eucariota incluyendo, pero sin limitación, bacterias, levaduras, insectos, mamíferos y seres humanos.

Se introducen construcciones de expresión y vectores en células huésped con el fin de producir una hsp modificada secretada. Puede usarse cualquier tipo celular que pueda producir proteínas de choque térmico y que sea compatible con el vector de expresión, incluyendo los que se han cultivado *in vitro* u obtenido por ingeniería genética. Pueden obtenerse células huésped a partir de sujetos normales o afectados, incluyendo seres humanos sanos, pacientes con cáncer y pacientes con una enfermedad infecciosa, depósitos de laboratorios privados, colecciones de cultivos públicas tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo o de proveedores comerciales.

Las células en las que puede introducirse una secuencia génica de hsp modificada con fines de producción y secreción de complejos de hsp modificada-péptido antigénico *in vivo* pueden incluir, pero sin limitación, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos;

5 células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, como las obtenidas de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc. La elección del tipo celular depende del tipo de tumor o enfermedad infecciosa que se esté tratando o previniendo y puede determinarse por un experto en la materia.

10 Diferentes células huésped tiene mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y la modificación de proteínas. Puede seleccionarse una célula huésped que modifique y procese los productos génicos expresados de una forma específica similar a la forma en el que el destinatario procesa sus hsp. Con el fin de producir grandes cantidades de hsp, es preferible que el tipo de célula huésped usado en la presente invención se haya usado para la expresión de genes heterólogos, y esté razonablemente bien caracterizado y desarrollado para procedimientos de producción a gran escala. En un aspecto específico, las células huésped son del mismo paciente al que posteriormente se administran complejos de hsp modificada-péptido o células recombinantes que secretan complejos de hsp modificada-péptido, es decir, la célula usada para la expresión de hsp modificada y para la administración a un sujeto es autóloga para el sujeto.

15 En un aspecto particular, se introduce una construcción de expresión que comprende una secuencia génica de hsp modificada en una célula antigénica. Como se usa en el presente documento, las células antigénicas pueden incluir células preneoplásicas que estén infectadas con un agente infeccioso causante de cáncer, tal como un virus, pero que todavía no sean neoplásicas; o células antigénicas que se hayan expuesto a un mutágeno o agente causante de cáncer, tal como, por ejemplo, agentes de daño del ADN, radiación, etc. Otras células que pueden usarse son células preneoplásicas que estén en transición desde una forma normal hasta una forma neoplásica, según se caracterizan por su morfología, funciones fisiológicas o bioquímicas.

20 Preferentemente, las células cancerosas y células preneoplásicas usadas en los procedimientos de la invención son de origen de mamífero. Los mamíferos contemplados por este aspecto de la invención incluyen seres humanos, animales de compañía (por ejemplo, perros y gatos), animales de granja (por ejemplo, ovejas, ganado bovino, cabras, cerdos y caballos), animales de laboratorio (por ejemplo, ratones, ratas y conejos) y animales salvajes libres o en cautividad.

25 En diversos aspectos, cualquier célula cancerosa, preferentemente células cancerosas humanas, puede usarse en los presentes procedimientos para producir complejos de hsp modificada-péptido o para su uso como vacuna. Las células cancerosas proporcionan los péptidos antigénicos que se asocian no covalentemente con la hsp modificada expresada. Los cánceres que pueden tratarse o prevenirse con composiciones inmunogénicas preparadas por procedimientos relacionados con la invención incluyen, pero sin limitación, tumores tales como sarcomas y carcinomas. Se enumeran ejemplos de cánceres que son susceptibles a los procedimientos relacionados con la invención en la Sección 5.7. Por consiguiente, cualquier tejido o célula aislada de una lesión preneoplásica, un cáncer, incluyendo un cáncer que ha metastatizado en múltiples sitios remotos, puede usarse en el presente procedimiento. Por ejemplo, pueden usarse células que se encuentren en un tejido que crece de forma anormal, células leucémicas circulantes, lesiones metastásicas, así como tejido tumoral sólido.

30 En otro aspecto, también pueden usarse líneas celulares derivadas de una lesión preneoplásica, tejidos cancerosos o células cancerosas, con tal de que las células de la línea celular tengan al menos uno o más determinantes antigénicos en común con los antígenos en las células cancerosas diana. Se prefieren tejidos cancerosos, células cancerosas, células infectadas con un agente causante de cáncer, otras células preneoplásicas y líneas celulares de origen humano. Preferentemente, se usan células cancerosas que se escinden del paciente al que se le van a administrar en última instancia los complejos, es decir, la realización autóloga de la invención, aunque éste pueda no ser el caso (por ejemplo, las células cancerosas pueden ser de uno o más individuos diferentes).

35 Pueden identificarse células cancerosas y preneoplásicas mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden identificarse células cancerosas por su morfología, ensayos enzimáticos, ensayos de proliferación, caracterización citogenética, mapeo de ADN, secuenciación de ADN, la presencia de virus causantes de cáncer o una historia de exposición a un mutágeno o agente causante de cáncer, formación de imágenes, etc. Como otro ejemplo, pueden obtenerse células cancerosas mediante cirugía, endoscopia u otras técnicas de biopsia. Si se conocen algunas características distintivas de las células cancerosas, también pueden obtenerse o purificarse mediante cualquier procedimiento bioquímico o inmunológico conocido en la técnica, tal como, pero sin limitación, cromatografía de afinidad y separación de células activadas por fluorescencia (por ejemplo, con un anticuerpo marcado fluorescentemente contra un antígeno expresado por las células cancerosas).

No es necesario usar una población clonal u homogénea o purificada de células cancerosas. Pueden obtenerse tejidos cancerosos, células o líneas celulares cancerosas a partir de un solo individuo o combinarse a partir de varios individuos. No es esencial usar células de la diana final *in vivo* (por ejemplo, células del tumor del destinatario deseado), siempre que al menos uno o más determinantes antigénicos en las células cancerosas diana esté presente en las células usadas para la expresión de una hsp modificada. Además, pueden usarse células derivadas de metástasis distantes para preparar una composición inmunogénica contra el cáncer primario. Puede usarse una mezcla de células con tal de que un número sustancial de las células en la mezcla sean células cancerosas y compartan al menos un determinante antigénico con la célula cancerosa diana. En un aspecto específico, las células cancerosas a usar en la expresión de una hsp modificada están purificadas.

Los vectores basados en *E. coli* son los sistemas más populares y versátiles para un alto nivel de expresión de proteínas extrañas (Makrides, 1996, *Microbiol Rev*, 60: 512-538). Los ejemplos no limitantes de regiones reguladoras que pueden usarse para la expresión en *E. coli* pueden incluir, pero sin limitación, *lac*, *trp*, *1pp*, *phoA*, *recA*, *tac*, T3, T7 y λ PL (Makrides, 1996, *Microbiol Rev*, 60: 512-538). Los ejemplos no limitantes de vectores de expresión procariotas pueden incluir la serie de vectores λ gt tales como λ gt11 (Huynh y col., 1984 en "DNA Cloning Techniques", Vol. I: A Practical Approach (D. Glover, ed.), págs. 49-78, IRL Press, Oxford) y la serie de vectores pET (Studier y col., 1990, *Methods Enzymol.*, 185: 60-89). Sin embargo, un inconveniente potencial de un sistema de huésped-vector procariota es la incapacidad para realizar muchos de los procesamientos postraduccionales de células de mamífero. Por lo tanto, se prefiere un sistema de huésped-vector eucariota, se prefiere más un sistema de huésped-vector de mamífero y el más preferido es un sistema de huésped-vector humano.

Para la expresión de hsp modificadas en células huésped de mamífero, pueden usarse una diversidad de regiones reguladoras, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) y el promotor de la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (RSV-LTR). Los promotores inducibles que pueden ser útiles en células de mamífero incluyen, pero sin limitación, los asociados con el gen de metalotioneína II, las repeticiones terminales largas sensibles a glucocorticoides del virus del tumor mamario de ratón (KRW-LTR), el gen de interferón β y el gen de hsp70 (Williams y col., 1989, *Cancer Res.* 49: 2735-42; Taylor y col., 1990, *Mol. Cell Biol.*, 10: 165-75). Puede ser ventajoso usar promotores de choque térmico o promotores de estrés para dirigir la expresión de la hsp modificada en células huésped recombinantes.

Las siguientes regiones reguladoras animales, que presentan especificidad de tejido y que se han utilizado en animales transgénicos, también pueden usarse en células tumorales de un tipo tisular particular: la región de control del gen de elastasa I, que es activa en células acinares pancreáticas (Swift y col., 1984, *Cell* 38: 639-646; Ornitz y col., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50: 399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7: 425-515); la región de control del gen de la insulina, que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315: 115-122), la región de control del gen de inmunoglobulina, que es activa en células linfoides (Grosschedl y col., 1984, *Cell* 38: 647-658; Adames y col., 1985, *Nature* 318: 533-538; Alexander y col., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7: 1436-1444), la región de control del virus del tumor mamario de ratón, que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder y col., 1986, *Cell* 45: 485-495), la región de control del gen de albúmina, que es activa en hígado (Pinkert y col., 1987, *Genes y Devel.* 1: 268-276), la región de control del gen de la alfa-fetoproteína, que es activa en hígado (Krumlauf y col., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5: 1639-1648; Hammer y col., 1987, *Science* 235: 53-58); la región de control del gen de alfa 1-antitripsina, que es activa en el hígado (Kelsey y col., 1987, *Genes y Devel.* 1: 161-171), la región de control del gen de beta-globina que es activa en células mieloides (Mogram y col., 1985, *Nature* 315: 338-340; Kollias y col., 1986, *Cell* 46: 89-94); la región de control del gen de la proteína básica de mielina, que es activa en células oligodendrocíticas en el cerebro (Readhead y col., 1987, *Cell* 48: 703-712); la región de control del gen de la cadena ligera de miosina 2, que es activa en músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314: 283-286) y la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropinas, que es activa en el hipotálamo (Mason y col., 1986, *Science* 234: 1372-1378).

La eficacia de la expresión de la hsp modificada en una célula huésped puede aumentarse por inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados en el vector de expresión, tales como los encontrados en virus SV40, virus de la hepatitis B, citomegalovirus, genes de inmunoglobulina, metalotioneína, β -actina (véase, Bittner y col., 1987, *Methods in Enzymol.* 153: 516-544; Gorman, 1990, *Curr. Op. in Biotechnol.* 1: 36-47).

El vector de expresión también puede 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. Dichas secuencias pueden incluir, pero sin limitación, orígenes de replicación, secuencias de replicación autónoma (ARS), ADN centromérico y ADN telomérico. También puede ser ventajoso usar vectores lanzadera que pueden replicarse y mantenerse en al menos dos tipos de células huésped.

Además, el vector de expresión puede contener genes marcadores que pueden seleccionarse o explorarse para inicialmente aislar, identificar o realizar un seguimiento de las células huésped que contengan el ADN que codifica una hsp modificada. Para producción de alto rendimiento a largo plazo de complejos de hsp modificada-péptido, se prefiere la expresión estable en células de mamífero. Pueden usarse varios sistemas de selección para células de mamífero, incluyendo, pero sin limitación, genes de timidina quinasa de virus herpes simple (Wigler y col., 1977, Cell 11: 223), de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalski y Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy y col., 1980, Cell 22: 817) en células tk⁻, hgprt⁻ o aprt⁻, respectivamente. Además, puede usarse la resistencia a antimetabolitos como base de selección para dihidrofolato reductasa (dhfr), que confiere resistencia a metotrexato (Wigler y col., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567; O'Hare y col., 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 aminoglucósido G-418 (Colberre-Garapin y col., 1981, J. Mol. Biol. 150: 1); e higromicina fosfotransferasa (hyg), que confiere resistencia a higromicina (Santerre y col., 1984, Gene 30: 147). También pueden usarse otros marcadores de selección, tales como, pero sin limitación, histidinol y Zeocin™.

Las células huésped de mamífero preferidas incluyen, pero sin limitación, las derivadas de seres humanos, monos y roedores, (véase, por ejemplo, Kriegler M. en "Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual", Nueva York, Freeman y Co. 1990), tales como la línea celular de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293, 293-EBNA o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen. Virol., 36: 59, 1977); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin. Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 4216, 1980); células de sertoli de ratón (Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251, 1980); células fibroblásticas de ratón (NIH-3T3), células de riñón de mono (CVI ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas 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 CCL51). Se proporcionan tipos celulares de cáncer ejemplares usados para demostrar la utilidad de células recombinantes (que producen complejos de hsp modificada-péptido) como vacuna contra el cáncer de la forma siguiente: línea celular de fibroblastos de ratón, NIH3T3, línea celular de carcinoma pulmonar de Lewis de ratón, LLC, línea celular de mastocitoma de ratón, PB15, línea celular de linfoma de ratón, EL4, y su transfectante con ovoalbúmina B.G7, línea celular de melanoma de ratón, B16F10, línea celular de fibrosarcoma de ratón, MC57, y líneas celulares de carcinoma pulmonar microcítico humano, SCLC#2 y SCLC#7.

También pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus con células de mamífero para producir hsp modificadas. Se han obtenido vectores usando cadenas principales de virus de ADN a partir del virus de los simios 40 (SV40) (Hamer y col., 1979, Cell 17: 725), adenovirus (Van Doren y col., 1984, Mol Cell Biol 4: 1653), virus adenoasociados (McLaughlin y col., 1988, J Virol 62: 1963) y papilomavirus bovino (Zinn y col., 1982, Proc Natl Acad Sci 79: 4897). En casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, las secuencias de ADN del donante pueden ligarse 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 insertarse después en el genoma de adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar productos heterólogos en huéspedes de infectados (véase, por ejemplo, Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81: 3655-3659).

El papilomavirus bovino (BPV) puede infectar a muchos vertebrados superiores, incluyendo seres humanos, y su ADN se replica como un episoma. Se han desarrollado varios vectores lanzadera para la expresión génica recombinante que existe como elementos extracromosómicos multicopia (20-300 copias/célula) estables en células de mamífero. Típicamente, estos vectores contienen un segmento de ADN de BPV (el genoma completo o un fragmento transformante del 69%) un promotor con una amplia variedad de huésped, una señal de poliadenilación, señales de corte y empalme, un marcador de selección y secuencias plasmídicas "inocuas" que permiten que el vector se propague en *E. coli*. Después de la construcción y de la amplificación en bacterias, la construcción génica de expresión se transfecta en células de mamífero cultivadas, por ejemplo, mediante la técnica de coprecipitación con fosfato de calcio. Para esas células huésped que no manifiestan un fenotipo transformado, la selección de transformantes se consigue usando un marcador de selección dominante, tal como resistencia a G418 e histidinol. Como se describe en la Sección 6, se insertó una secuencia génica de hsp modificada en dos vectores de BPV, pBCMGSNeo y pBCMGHs (Karasuyama y col., Bur. J. Immunol. 18: 97-104; Ohe y col., Human Gene Therapy, 6: 325-33), que después se usaron para transfectar una variedad diversa de tipos celulares para la expresión de la hsp modificada.

5 Como alternativa, puede usarse el promotor de 7,5 K de vaccinia (véase, por ejemplo, Mackett y col., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 7415-7419; Mackett y col., 1984, J. Virol. 49: 857-964; Panicali y col., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 4927-4931). En casos en los que se usa una célula huésped humana, pueden usarse vectores basados en el origen (OriP) del virus de Epstein-Barr (EBV) y el antígeno nuclear de EBV 1 (EDNA-1; un factor de replicación que actúa en trans). Dichos vectores pueden usarse con una amplia variedad de células huésped humanas, por ejemplo, EBO-pCD (Spickofsky y col., 1990, DNA Prot Eng Tech 2: 14-18); pDR2 y λDR2 (disponible en Clontech Laboratories).

10 Las hsp modificadas también pueden generarse con un sistema de expresión basado en retrovirus. Pueden usarse retrovirus, tales como el virus de la leucemia murina de Moloney, puesto que la mayor parte de la secuencia génica viral puede eliminarse y sustituirse con la secuencia génica de la hsp modificada mientras que las funciones virales ausentes pueden suministrarse en trans. Al contrario que la transfección, los retrovirus pueden infectar eficazmente y transferir genes a una amplia variedad de tipos celulares incluyendo, por ejemplo, células hematopoyéticas primarias. Además, la variedad de huésped para la infección por un vector retroviral puede manipularse mediante la elección de la envuelta usada para el empaquetamiento del vector.

15 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 de selección. El ADN de la hsp modificada se inserta en una posición entre la LTR 5' y la LTR 3', de modo que la transcripción desde el promotor de la LTR 5' transcribe el ADN clonado. La LTR 5' comprende un promotor, incluyendo, pero sin limitación, un promotor de LTR, una región R, una región U5 y un sitio de unión a cebador, en ese orden. Son bien conocidas en la técnica secuencias de nucleótidos de estos elementos de LTR. Un promotor heterólogo, así como marcadores de selección farmacológica múltiple, pueden incluirse también en el vector de expresión para facilitar la selección de células infectadas. Véase, McLauchlin y col., 1990, Prog Nucleic Acid Res and Molec Biol 38: 91-135; Morgenstern y col., 1990, Nucleic Acid Res 18:3587-3596; Choulika y col., 1996, J Virol 70: 1792-1798; Boesen y col., 1994, Biotherapy 6:291-302; Salmons y Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4: 129-141; y Grossman y Wilson, 1993, Curr. Opin. en Genetics y Devel. 3: 110-114.

20 Otro sistema de huésped-vector eucariota útil puede incluir sistemas de levaduras e insectos. En levaduras, pueden usarse varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles con *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería), *Schizosaccharomyces pombe* (levadura de fisión), *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* (levaduras metilotróficas). Para una revisión véase, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, 1988, Ed. Ausubel y col., Greene Publish. Assoc. y Wiley Interscience, Cáp. 13; Grant y col., 1987, Expression and Secretion Vectors for Yeast, en Methods in Enzymology, Eds. Wu & Grossman, 1987, Acad. Press, N.Y., Vol. 153, págs. 516-544; Glover, 1986, DNA Cloning, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Cáp. 3; y Bitter, 1987, Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology, Bds. Berger y Kimmel, Acad. Press, N.Y., Vol. 152, págs. 673-684; y The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, 1982, Eds. Strathern y col., Cold Spring Harbor Press, Vols. I y II.

30 En un sistema de insecto, puede usarse el virus de la polihidrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), un baculovirus, como vector para expresar la hsp modificada en células de *Spodoptera frugiperda*. Las secuencias génicas de hsp modificada pueden clonarse en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y ponerse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina). Estos virus recombinantes se usan después para infectar células huésped en las que se expresa el ADN insertado. (Véase, por ejemplo, Smith y col., 1983, J Virol 46: 584; Smith, Patente de Estados Unidos N° 4.215.051.).

45 Cualquiera de los vectores de clonación y expresión descritos en el presente documento puede sintetizarse y ensamblarse a partir de secuencias de ADN conocidas mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Las regiones reguladoras y elementos potenciadores pueden ser de una diversidad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. Algunos vectores y células huésped pueden obtenerse en el mercado. Se describen ejemplos no limitantes de vectores útiles en el Apéndice 5 de Current Protocols in Molecular Biology, 1988, ed. Ausubel y col., Greene Publish. Assoc. y Wiley Interscience, que se incorporan en el presente documento por referencia; y los catálogos de proveedores comerciales, tales como Clontech Laboratories, Stratagene Inc., y Invitrogen, Inc.

5.2.2. Expresión de Hsp Modificadas

50 Pueden introducirse construcciones de expresión que contienen secuencias de nucleótidos clonadas que codifican hsp modificadas en la célula huésped mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, células procariontas, transformación bacteriana (Hanahan, 1985, en DNA Cloning, A Practical Approach, 1: 109-136), y para células eucariotas, transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler y col.,

1977, Cell 11: 223-232), transfección mediada por liposomas (Schaefer-Ridder y col., 1982, Science 215: 166-166), electroporación (Wolff y col., 1987, Proc Natl Acad Sci 84: 3344) y microinyección (Capechi, 1980, Cell 22: 479-488). La coexpresión de una hsp modificada y un antígeno en la misma célula huésped puede conseguirse mediante esencialmente los mismos procedimientos.

5 Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de hsp modificada procesada apropiadamente o complejos de hsp modificada-péptido, se prefiere la expresión estable en células de mamífero. Pueden obtenerse por ingeniería genética líneas celulares que expresan de forma estable hsp modificada o complejos de hsp modificada-péptido usando un vector que contenga un marcador de selección. A modo de ejemplo, pero sin limitación, después de la introducción de las construcciones de expresión, puede permitirse que las células
10 modificadas por ingeniería genética crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido y después se cambian a un medio selectivo. El marcador de selección en la construcción de expresión confiere resistencia a la selección y permite de forma óptima que las células integren de forma estable la construcción de expresión en sus cromosomas y crezcan en cultivo y se expandan en líneas celulares. Dichas células pueden cultivarse durante un periodo de tiempo prolongado mientras que la hsp modificada se expresa de forma continua.

15 Las células recombinantes pueden cultivarse en condiciones convencionales de temperatura, tiempo de incubación, densidad óptica y composición de medio. Como alternativa, pueden cultivarse células antigénicas recombinantes en condiciones que emulen los requisitos nutricionales y fisiológicos de la célula cancerosa o célula infectada. Sin embargo, las condiciones para el cultivo de células recombinantes pueden ser diferentes de aquellas para la expresión de hsp modificadas y proteínas antigénicas. También pueden usarse condiciones de cultivo y
20 medios modificados para aumentar la producción de complejos de hsp-péptido.

Por ejemplo, las células recombinantes que contienen hsp modificadas con sus promotores afines pueden exponerse a calor u otras agresiones ambientales, o a agresiones químicas. Cualquier procedimiento conocido en la técnica puede aplicarse para establecer las condiciones óptimas para producir hsp modificadas o complejos de hsp modificada-péptido.

25 En un aspecto de invención en el que las células recombinantes que expresan la hsp modificada se usan como vacuna, la secuencia génica de hsp modificada se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede llevarse a cabo por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo la técnica de terapia génica, tal como, pero sin limitación, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago que contiene las secuencias génicas de hsp modificadas, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por
30 microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Se conocen en la técnica numerosos procedimientos para la introducción de genes extraños en células (véase, por ejemplo, Loeffler y Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217: 599-618; Cohen y col., 1993, Meth. Enzymol. 217: 618-644; Cline, 1985, Pharmac, Ther. 29: 69-92) que pueden usarse de acuerdo con la presente invención, con tal de que no se alteren las funciones fisiológicas y de desarrollo necesarias de las células destinatarias. La técnica debería proporcionar la transferencia estable de la secuencia génica de hsp modificada a la célula, de modo que la secuencia pueda expresarse por la célula y preferentemente heredarse y expresarse por su progenie celular.

35 Las células recombinantes resultantes pueden administrarse a un paciente por diversos procedimientos conocidos en la técnica. En una realización preferida, se inyectan células epiteliales, por ejemplo, por vía subcutánea. En otro aspecto, pueden aplicarse células cutáneas recombinantes como un injerto cutáneo en el paciente. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas) se administran preferentemente por vía intravenosa. La cantidad de células prevista para usar depende del efecto deseado, del estado del paciente, etc., y puede determinarse por un experto en la materia.

5.2.3. Coexpresión de Hsp Modificadas y Antígenos

45 En un aspecto alternativo, una forma expresable de una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno proteico o porciones del mismo puede introducirse en una célula recombinante que contiene una secuencia génica de hsp modificada expresable de modo que el antígeno se coexpresa con una hsp modificada. Se describen procedimientos para obtener la secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno en la Sección 5.4.5. Puede usarse cualquier técnica para la introducción de la forma expresable de la secuencia génica del antígeno, tal como
50 sin limitarse a las descritas en la Sección 5.2.2. El antígeno proteico o porciones del mismo se asocia no covalentemente con la hsp modificada en el RE de la célula recombinante y el complejo de hsp modificada-péptido antigénico resultante se secreta. Dicho complejo puede purificarse a partir del medio de cultivo celular por cualquiera de los procedimientos descritos en la Sección 5.3 y otros procedimientos conocidos en la técnica. El

complejo de hsp modificada-antígeno purificado puede usarse como 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.

5 Además, las células recombinantes que contienen formas expresables de tanto una secuencia génica de hsp modificada como una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína antigénica pueden usarse directamente como vacuna para su inyección a un sujeto. Como se ha descrito anteriormente, dichas células secretan 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.

10 Los usos de dicho complejo de hsp modificada-péptido y 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 se describen en las Secciones 5.7 y 5.8.

5.3. Purificación de Complejos de Hsp Modificada-Péptido

15 Generalmente, la hsp modificada relacionada con la invención puede recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes por procedimientos conocidos, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía de hidroxiapatita y cromatografía de lectina.

20 La purificación de complejos de hsp70-péptido a partir de lisados celulares se ha descrito anteriormente, véase, por ejemplo, Udono y col., 1993, J. Exp. Med. 178: 1391-1396. La purificación de complejos de hsp90-péptido y de complejos de gp96-péptido a partir de lisados celulares se ha descrito, por ejemplo, en el documento WO 95/24923, con fecha del 21 de septiembre de 1995 y el documento WO 97/10000, con fecha del 20 de marzo de 1997. Estos procedimientos pueden usarse para purificar la hsp modificada o los complejos de hsp modificada-péptido de la invención a partir de las células recombinantes, y con modificaciones minoritarias conocidas en la técnica, la hsp modificada o complejos de hsp modificada-péptido a partir del cultivo celular.

25 Sin embargo, la invención se refiere a procedimientos mejorados para la purificación de las hsp modificadas que se basan en las propiedades de la etiqueta peptídica presente en la hsp modificada. Una estrategia se basa en interacciones moleculares específicas entre una etiqueta y su compañero de unión. La otra estrategia depende de la unión inespecífica de un anticuerpo a un epítipo presente en la etiqueta. El principio de cromatografía de afinidad bien conocido la técnica es generalmente aplicable a ambas estrategias.

30 A continuación se describen varios procedimientos basados en interacciones moleculares específicas de una etiqueta y su compañero de unión.

35 Un procedimiento que es generalmente aplicable a la purificación de hsp modificadas que están fusionadas a las regiones constantes de inmunoglobulina es la cromatografía de afinidad de proteína A, un procedimiento que es bien conocido en la técnica. La proteína A estafilocócica es un polipéptido de 42 kD que se une específicamente a una región localizada entre la segunda y tercera regiones constantes de inmunoglobulinas de cadena pesada. Debido a los dominios Fc de diferentes clases, subclases y especies de inmunoglobulinas, la afinidad de la proteína A por las regiones Fc humanas es fuerte, pero puede variar con otras especies. Las subclases que se prefieren menos incluyen la IgG-3 humana y la mayoría de subclases de rata. Para ciertas subclases, la proteína G (de *Streptococcus*) puede usarse en lugar de la proteína A en la purificación. La proteína-A sepharose (Pharmacia o Biorad) es una fase sólida usada comúnmente para la purificación por afinidad de anticuerpos y puede usarse esencialmente de la misma forma para la purificación de una hsp modificada fusionada a un fragmento Fc de inmunoglobulina. La hsp modificada secretada presente en el sobrenadante celular se une específicamente a la proteína A en la fase sólida, mientras que los contaminantes se eliminan por lavado. La hsp modificada unida puede eluirse mediante diversos sistemas de tampón conocidos en la técnica, incluyendo una sucesión de tampones de citrato, acetato y glicina-HCl que disminuyen gradualmente el pH. Este procedimiento se prefiere menos si las células recombinantes también producen anticuerpos que se copurificarán con la hsp modificada. Véase, por ejemplo, Langone, 1982, J. Immunol. meth. 51: 3; Wilchek y col., 1982, Biochem. Intl. 4: 629; Sjobring y col., 1991, J. Biol. Chem. 26: 399; páginas 617-618, en *Antibodies A Laboratory Manual*, editado por Harlow y Lane, Cold Spring Harbor laboratory, 1988.

50 Como alternativa, puede usarse una etiqueta de polihistidina, en cuyo caso la hsp modificada puede purificarse mediante cromatografía de quelatos metálicos. La etiqueta de polihistidina, habitualmente una secuencia de seis histidinas, tiene una alta afinidad por iones metálicos divalentes, tales como iones de níquel (Ni²⁺), que pueden inmovilizarse en una fase sólida, tal como matrices de ácido nitrilotriacético. La polihistidina tiene una

afinidad bien caracterizada por la Ni²⁺-NTA-agarosa y puede eluirse con cualquiera de dos tratamientos suaves: el imidazol (0,1-0,2 M) competirá eficazmente con la resina por los sitios de unión; o la disminución del pH justo por debajo de 6,0 protonará las cadenas laterales de histidina y alterará la unión. El procedimiento de purificación comprende cargar el sobrenadante de cultivo celular sobre la columna de Ni²⁺-NTA-agarosa, lavar los contaminantes a través de la columna y eluir la hsp modificada con imidazol o ácido débil. La Ni²⁺-NTA-agarosa puede obtenerse a partir de proveedores comerciales tales como Sigma (St. Louis) y Qiagen. También están disponibles anticuerpos que reconocen la etiqueta de polihistidina, que pueden usarse para detectar y cuantificar la hsp modificada.

Otra etiqueta peptídica ejemplar que puede usarse es la secuencia de glutatión-S-transferasa (GST), clonada originalmente a partir del helmineto *Schistosoma japonicum*. En general, una fusión de hsp modificada-GST expresada en una célula huésped procarionta, tal como *E. coli*, puede purificarse a partir del sobrenadante de cultivo celular por absorción con perlas de agarosa con glutatión, seguida de elución en presencia de glutatión reducido libre a pH neutro. No son necesarias condiciones desnaturizantes en ninguna fase durante la purificación y, por lo tanto, puede ser deseable su uso en la carga de hsp modificada inmovilizada con péptidos antigénicos. Además, puesto que se sabe que la GST forma dímeros en determinadas condiciones, puede obtenerse hsp modificada dimérica. Véase, Smith, 1993, *Methods Mol. Cell Bio.* 4: 220-229.

Otra etiqueta peptídica útil que puede usarse es la proteína de unión a maltosa (MBP) de *E. coli*, que está codificada por el gen *malE*. La hsp modificada-MBP secretada presente en el sobrenadante celular se une a la resina de amilosa mientras que los contaminantes se eliminan por lavado. La hsp modificada-MBP unida se eluye de la resina de amilosa mediante maltosa. Véase, por ejemplo, Guan y col., 1987, *Gene* 67: 21-30.

La segunda estrategia para purificar la hsp modificada es aplicable a etiquetas peptídicas que contienen un epítipo para el que están disponibles anticuerpos policlonales o monoclonales. Pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para la purificación de proteínas por unión inmuno-específica, tales como cromatografía de inmunoafinidad e inmunoprecipitación. Véase, por ejemplo, el Capítulo 13 en *Antibodies A Laboratory Manual*, editado por Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; y el Capítulo 8, Secciones I y II, en *Current Protocols in immunology*, ed. por Coligan y col., John Wiley, 1991.

Los aspectos descritos anteriormente pueden usarse para recuperar y purificar complejos de hsp modificada-péptido secretados a partir del medio de cultivo de células de mamífero, tales como células humanas, que expresan una hsp modificada de la invención. Los procedimientos pueden adaptarse para realizar una purificación a media y gran escala de hsp modificada y/o un complejo de hsp modificada-péptido. Se prefieren más procedimientos que no requieren una disminución del pH o condiciones desnaturizantes para la purificación de complejos de hsp modificada-péptido. Aunque se describen para células tumorales en los Ejemplos, los procedimientos descritos pueden usarse para aislar hsp a partir de cualquier célula eucariota, por ejemplo, tejidos, células aisladas o líneas celulares eucariotas 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 el que no se emplean complejos de hsp modificadas y los péptidos con los que están asociadas endógenamente en las células recombinantes, se producen complejos de hsp modificadas con moléculas antigénicas *in vitro*. Como apreciarán los expertos en la materia, los péptidos antigénicos aislados por los procedimientos descritos a continuación, o sintetizados químicamente o producidos de forma recombinante pueden reconstituirse con una diversidad de proteínas de choque térmico modificadas *in vitro* para generar complejos inmunogénicos no covalentes de hsp modificadas-péptidos. Dichos complejos pueden usarse para las vacunas inmunoterapéuticas o profilácticas de la invención. Los procedimientos de producción *in vitro* de complejo de hsp modificada-péptido pueden adaptarse para llevarse a cabo a media escala o a 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 seleccionarse para su uso como péptidos antigénicos, para formar complejos con hsp modificadas, de entre los conocidos en la técnica o determinados por inmunoensayo que son capaces de unirse a anticuerpos o moléculas de MHC (antigenicidad) o generar respuestas inmunes (inmunogenicidad).

5.4.1. Moléculas Antigénicas Exógenas

Para determinar la inmunogenicidad o antigenicidad de un supuesto antígeno detectando la unión a

- 5 anticuerpo, pueden usarse diversos inmunoensayos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos tipo "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in vivo* (usando oro coloidal, marcadores enzimáticos o radioisotópicos, por ejemplo), transferencias de western, reacciones de inmunoprecipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, etc. En un aspecto, la unión a anticuerpos se detecta por detección de un marcador en el anticuerpo primario. En otro aspecto, el anticuerpo primario se detecta por detección de la unión de un anticuerpo secundario o reactivo contra el anticuerpo primario. En un aspecto adicional, el anticuerpo secundario está marcado. Se conocen muchos medios en la técnica para detectar la unión en un inmunoensayo y se prevé su uso. En un aspecto para detectar la inmunogenicidad, pueden ensayarse respuestas mediadas por células T mediante procedimientos convencionales, por ejemplo, ensayos de citotoxicidad *in vitro* o ensayos de hipersensibilidad de tipo retardado *in vivo*.
- 10
- 15 También pueden identificarse antígenos potencialmente útiles o derivados de los mismos para su uso como moléculas antigénicas mediante diversos criterios, tales como la implicación del antígeno en la neutralización de la infectividad de un patógeno (en la que se desea tratar o prevenir la infección por dicho patógeno) (Norrby, 1985, resumen, en Vaccines 85, Lerner, y col. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, págs. 388-389), la especificidad de tipo o grupo, el reconocimiento por antisueros o células inmunes de los pacientes y/o la demostración de los efectos protectores de antisueros o células inmunes específicas para el antígeno. Además, cuando se desee tratar o prevenir una enfermedad causada por un patógeno, el epítipo codificado del antígeno debería presentar preferentemente un grado pequeño o ningún grado de variación antigénica en el tiempo o entre aislados diferentes del mismo patógeno.
- 20
- 25 Preferentemente, cuando se desee tratar o prevenir el cáncer, se usan antígenos específicos de tumores conocidos o fragmentos o derivados de los mismos. Por ejemplo, dichos antígenos específicos de tumores o asociados a tumores incluyen, pero sin limitación, el pan-antígeno de carcinoma KS 1/4 (Perez y Walker, 1990, J. Immunol. 142: 3662-3667; Bumal, 1988, Hybridoma 7(4): 407-415); el antígeno de carcinoma ovárico (CA125) (Yu, y col., 1991, Cancer Res. 51(2): 468-475); fosfato ácido prostático (Tailer, y col., 1990, Nucl. Acids Res. 18(16): 4928); antígeno específico de próstata (Henttu y Vihko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 160(2): 903-910; Israeli, y col., 1993, Cancer Res. 53: 227-230); antígeno asociado a melanoma p97 (Estin, y col., 1989, J. Natl. Cancer Inst. 81(6): 445-446); antígeno de melanoma gp75 (Vijayasardahl, y col., 1990, J. Exp. Med. 171 (4): 1375-1380); antígeno de melanoma de alto peso molecular (Natali, y col., 1987, Cancer 59: 55-63) y antígeno de membrana específico de próstata.
- 30
- 35 En un aspecto específico de la divulgación, se selecciona un antígeno o fragmento o derivado del mismo, específico para un cierto tumor para formar complejo con una hsp modificada y su posterior administración a un paciente que tenga ese tumor.
- 40 Preferentemente, cuando se desee tratar o prevenir enfermedades virales, se usan moléculas que comprenden epítomos de virus conocidos. Por ejemplo, dichos epítomos antigénicos pueden prepararse a partir de virus que incluyen, pero sin limitación, hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, influenza, varicela, adenovirus, herpes simple tipo I (HSV-I), herpes simple tipo II (HSV-II), peste bovina, rinovirus, echovirus, rotavirus, virus respiratorio sincitial, papilomavirus, papovavirus, citomegalovirus, echinovirus, arbovirus, huntavirus, virus coxsackie, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la polio, virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I) y virus de la inmunodeficiencia humana tipo II (VIH-II).
- 45 Preferentemente, cuando se desee tratar o prevenir infecciones bacterianas, se usan moléculas que comprenden epítomos de bacterias conocidas. Por ejemplo, dichos epítomos antigénicos pueden prepararse a partir de bacterias que incluyen, pero sin limitación, micobacterias, rickettsias, micoplasmas, neisseria y legionella.
- 50 Preferentemente, cuando se desee tratar o prevenir infecciones protozoarias, se usan moléculas que comprenden epítomos de protozoos conocidos. Por ejemplo, dichos epítomos antigénicos pueden prepararse a partir de protozoos que incluyen, pero sin limitación, leishmania, kokzidioa y trypanosoma.
- 50 Preferentemente, cuando se desea tratar o prevenir infecciones parasitarias, se usan moléculas que comprenden epítomos de parásitos conocidos. Por ejemplo, dichos epítomos antigénicos pueden ser de parásitos que incluyen, pero sin limitación, chlamydia y rickettsia.

5.4.2. Péptidos de Complejos de Hsp-Péptido

También pueden obtenerse péptidos antigénicos para formar complejos *in vitro* con una hsp modificada relacionada con la invención a partir de complejos endógenos de péptidos y hsp. Pueden usarse dos procedimientos para eluir el péptido de un complejo de hsp-péptido. Una estrategia implica incubar el complejo de hsp-péptido en presencia de ATP. La otra estrategia implica incubar los complejos en un tampón de bajo pH.

En resumen, el complejo de interés se centrifuga a través de un ensamblaje Centricon 10 (Millipore) para eliminar cualquier material de bajo peso molecular que no esté estrechamente asociado con el complejo. La fracción de alto peso molecular puede eliminarse y analizarse mediante SDS-PAGE, mientras que la de bajo peso molecular puede analizarse mediante HPLC como se describe a continuación. En el protocolo de incubación de ATP, el complejo de hsp-péptido en la fracción de alto peso molecular se incuba con ATP 10 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente. En el protocolo de bajo pH, se añade ácido acético o ácido trifluoroacético (TFA) al complejo de hsp-péptido para dar una concentración final del 10% (vol/vol) y la mezcla se incuba a temperatura ambiente o en un baño de agua en ebullición, o a cualquier temperatura entre medias durante 10 minutos (véase, Van Bleek, y col., 1990, Nature 348: 213-216; y Li, y col., 1993, EMBO Journal 12: 3143-3151).

Las muestras resultantes se centrifugan a través de un ensamblaje Centricon 10 como se ha mencionado anteriormente. Las fracciones de alto y bajo peso molecular se recuperan. Los complejos de hsp-péptido de alto peso molecular restantes pueden reincubarse con ATP o bajo pH para eliminar cualquier péptido restante.

Las fracciones de menor peso molecular resultantes se combinan, se concentran por evaporación y se disuelven en TFA al 0,1%. El material disuelto se fracciona después mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase inversa usando, por ejemplo, una columna de fase inversa VYDCA C18 equilibrada con TFA al 0,1%. El material unido se eluye después a un caudal de aproximadamente 0,8 ml/min por revelado de la columna con un gradiente lineal de acetonitrilo del 0 al 80% en TFA al 0,1%. La elución de los péptidos puede controlarse mediante DO_{210} y las fracciones que contienen los péptidos pueden recogerse.

5.4.3. Péptidos a partir de Complejos de MHC-péptido

También pueden usarse péptidos unidos a moléculas de MHC para formar complejos con hsp modificadas de la invención *in vitro*. El aislamiento de péptidos potencialmente inmunogénicos a partir de moléculas de MHC es bien conocido en la técnica y, por lo tanto, no se describe en detalle en el presente documento (véase, Palk, y col., 1990, Nature 348: 246-251; Rotzsche, y col., 1990, Nature 348: 252-254; Elliott, y col., 1990, Nature 348: 191-197; Falk, y col., 1991, Nature 351: 290-296; Demotz, y col., 1989, Nature 343: 682-684; Rotzsche, y col., 1990, Science 249: 283-287).

En resumen, pueden aislarse complejos de MHC-péptido mediante un procedimiento de inmunoafinidad convencional. Los péptidos pueden eluirse después del complejo de MHC-péptido por incubación de los complejos en presencia de TFA a aproximadamente el 0,1% en acetonitrilo. Los péptidos eluidos pueden fraccionarse y purificarse mediante HPLC de fase inversa, como anteriormente.

5.4.4. Péptidos Sintéticos

Las secuencias de aminoácidos de los péptidos eluidos a partir de las moléculas de MHC o hsp pueden determinarse por procedimientos de secuenciación de aminoácidos manuales o automáticos bien conocidos en la técnica. Una vez que se ha determinado la secuencia de aminoácidos de un péptido potencialmente protector, el péptido puede sintetizarse en cualquier cantidad deseada usando síntesis de péptidos convencional u otros protocolos bien conocidos en la técnica.

Pueden sintetizarse péptidos que tienen la misma secuencia de aminoácidos que los aislados anteriormente mediante síntesis de péptidos en fase sólida usando procedimientos similares a los descritos por Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149. Durante la síntesis, se añaden por etapas aminoácidos N- α -protegidos que tienen cadenas laterales protegidas a una cadena polipeptídica en crecimiento unida por su C-terminal y a un soporte polimérico insoluble, es decir, perlas de poliestireno. Los péptidos se sintetizan por unión de un grupo amino de un aminoácido N- α -desprotegido a un grupo α -carboxilo de un aminoácido N- α -protegido que se ha activado haciéndolo reaccionar con un reactivo tal como dicitclohexilcarbodiimida. La unión de un grupo amino libre al carboxilo activado conduce a la formación de un enlace peptídico. Los grupos N- α -protectores usados más comúnmente incluyen Boc, que es sensible a ácidos, y Fmoc, que es sensible a bases. Se conocen bien en la técnica detalles de químicas, resinas, grupos protectores, aminoácidos protegidos y reactivos apropiados y, por lo tanto, no se analizan en detalle en el presente documento (véase, Atherton, y col., 1989, Solid Phase Peptide

Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, y Bodanszky, 1993, Peptide Chemistry, A Practical Textbook, 2ª Ed., Springer-Verlag).

5 La purificación de los péptidos resultantes se logra usando procedimientos convencionales, tales como HPLC preparativa usando cromatografía de exclusión molecular, reparto y/o intercambio iónico. La elección de matrices y tampones apropiados es bien conocida en la técnica y por lo tanto no se describe en detalle en el presente documento.

5.4.5. Antígenos Codificantes de Secuencias Genéticas

10 En un aspecto particular de la divulgación relacionada con la invención, una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno proteico o porciones del mismo puede introducirse en una célula huésped para la producción del antígeno. La secuencia de nucleótidos que codifica cualquier proteína antigénica puede obtenerse y clonarse en un vector de expresión para la expresión esencialmente por los mismos procedimientos descritos para la clonación y expresión de una secuencia génica de hsp. Los procedimientos se describen en las Secciones 5.1-5.1.1 y 5.2-5.2.2 y son bien conocidas en la técnica. La proteína antigénica recombinante o porciones de la misma pueden purificarse por cualquier procedimiento apropiado para la proteína y después usarse para formar complejos con hsp modificadas *in vitro*, como se describe en la Sección 5.4.6. Dicho complejo de hsp modificada-antígeno puede usarse como 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.

5.4.6 Formación de Complejos de Hsp Modificada-Péptido *in vitro*

20 Un protocolo ejemplar preferido para formar complejos no covalentemente de una hsp modificada y una molécula antigénica *in vitro* se proporciona a continuación. Puede ser ventajoso usar hsp modificadas que se unan de forma reversible a una fase sólida por su etiqueta peptídica para facilitar el intercambio de tampón, los lavados y el aislamiento de los complejos antes o después de la reacción de formación de complejos.

25 Antes de la formación de complejos, las hsp modificadas se tratan previamente con ATP o bajo pH para eliminar cualquier péptido que pueda estar asociado con la hsp de interés. Cuando se usa el procedimiento de ATP, se elimina el exceso de ATP de la preparación por adición de apiranas, como se describe por Levy y col., 1991, Cell 67: 265-274. Cuando se usa el procedimiento de bajo pH, el tampón se reajusta a pH neutro por adición de reactivos modificadores del pH.

30 Las moléculas antigénicas (1 µg) y la hsp modificada pretratada (9 µg) se mezclan para dar una proporción molar de aproximadamente 5 moléculas antigénicas:1 hsp. Después, la mezcla se incuba durante de 15 minutos a 3 horas a de 4°C a 45°C en un tampón de unión adecuado, tal como uno que contiene fosfato sódico 20 mM, pH 7,2, NaCl 350 mM, MgCl₂ 3 mM y fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM: las preparaciones se centrifugan a través de un ensamble Centricon 10 (Millipore) para eliminar cualquier péptido no unido. Si la hsp modificada está unida a una fase sólida, los complejos de hsp modificada-péptido formados pueden liberarse por lavado del péptido no unido antes de la elución del complejo de hsp modificada-péptido de la fase sólida. La asociación de los péptidos con la hsp modificada puede ensayarse mediante SDS-PAGE. Éste es el procedimiento preferido para la formación de complejos *in vitro* de péptidos aislados a partir de complejos de MHC-péptido de péptidos disociados de complejos de hsp endógena-péptido.

40 En un aspecto alternativo de la divulgación preferida para la producción de 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 fosfato sódico 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,5M, MgCl₂ 3 mM y ADP 1 mM en un volumen de 100 microlitros a 37°C durante 1 h. Esta mezcla de incubación se diluye adicionalmente hasta 1 ml en solución salina tamponada con fosfato.

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

Después de la formación de complejos, los complejos inmunogénicos de hsp-molécula antigénica pueden ensayarse opcionalmente *in vitro* usando, por ejemplo, el ensayo celular mixto de linfocitos diana (MLTC) descrito a continuación. Una vez que se han aislado los complejos inmunogénicos, pueden caracterizarse opcionalmente además en modelos animales usando los protocolos de administración preferidos y los excipientes analizados a continuación.

5

5.5. Determinación de la Inmunogenicidad de los Complejos de Hsp-Péptido

En un procedimiento opcional, los complejos de hsp modificada-péptido purificados pueden ensayarse para determinar su inmunogenicidad usando el ensayo de cultivo mixto de linfocitos diana (MLTC) bien conocido en la técnica.

10

A modo de ejemplo, pero sin limitación, puede usarse el procedimiento siguiente. En resumen, se inyecta a ratones por vía subcutánea los complejos de hsp modificada-péptido candidatos. A otros ratones se les inyectan otros complejos de hsp-péptido de células normales no recombinantes o células infectadas completas que actúan como controles positivos para el ensayo. Los ratones reciben dos inyecciones, separadas por 7-10 días. Diez días después de la última inmunización, los bazo se extirparon y se liberaron los linfocitos. Los linfocitos liberados pueden volver a estimularse posteriormente *in vitro* por adición de células muertas que expresaban el complejo de interés.

15

Por ejemplo, pueden estimularse 8×10^6 esplenocitos inmunes con 4×10^4 células infectadas con patógeno tratadas con mitomicina C o γ -irradiadas (5-10.000 rads) (o células afectadas con un gen que codifique un antígeno del agente infeccioso, según sea el caso) o células tumorales en 3 ml de medio RPMI que contienen suero fetal de ternera al 10%. En ciertos casos, puede incluirse el 33% sobrenadante de cultivo mixto de linfocitos secundario o interleucina 2 (IL-2) en el medio de cultivo como fuente de factores de crecimiento de células T (véase, Glasebrook y col., 1980, J. Exp. Med. 151: 876). Para ensayar la respuesta primaria de células T citotóxicas después de la inmunización, los esplenocitos pueden cultivarse sin estimulación. En algunos experimentos, los esplenocitos de los ratones inmunizados también pueden reestimularse con células antigénicamente diferentes para determinar la especificidad de la respuesta de células T citotóxicas.

20

25

Seis días después los cultivos se ensayan para determinar su citotoxicidad en un ensayo de liberación de ^{51}Cr de 4 horas (véase, Palladino y col., 1987, Cancer Res. 47: 5074-5079 y Blachere, y col., 1993, J. Immunotherapy 14: 352-356). En este ensayo, el cultivo mixto de linfocitos se añade a una suspensión de células diana para dar proporciones de efector:diana (E:T) diferentes (habitualmente de 1:1 a 40:1). Las células diana se marcan previamente por incubación de 1×10^6 células diana en medio de cultivo que contiene 200 mCi de ^{51}Cr /ml durante una hora a 37°C. Las células se lavan tres veces después del marcaje. Cada punto de ensayo (proporción E:T) se realiza por triplicado y los controles apropiados se incorporan para medir la liberación espontánea de ^{51}Cr (no se añaden linfocitos al ensayo) y la liberación del 100% (células lisadas con detergente). Después de incubar las mezclas de células durante 4 horas, las células se sedimentan por centrifugación a 200 g durante 5 minutos. La cantidad de ^{51}Cr liberado en el sobrenadante se mide mediante un contador gamma. El porcentaje de citotoxicidad se mide como los cpm en la muestra de ensayo menos los cpm liberados espontáneamente dividido por los cpm liberados por detergente totales menos los cpm liberados espontáneamente.

30

35

Para bloquear la cascada de MHC clase I se añade un sobrenadante de hibridoma concentrado obtenido de células de hibridoma K-44 (un hibridoma anti-MHC clase I) a las muestras de ensayo a una concentración final del 12,5% (Heike y col., 1994, J. Immunotherapy 15: 165-174).

40

Una alternativa al ensayo de liberación de cromo es el ensayo de ELISPOT que mide la liberación de citocina por células T citotóxicas *in vitro* después de la estimulación con antígeno específico. Se detecta la liberación de citocina mediante anticuerpos que son específicos para una citocina particular, tal como interleucina 2, factor de necrosis tumoral α o interferón- γ (por ejemplo, véase Scheibenbogen y col., 1997, Int. J. Cancer, 71: 932-936). El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación que se ha revestido previamente con un anticuerpo específico para una citocina de interés que captura la citocina secretada por las células T. Después de la incubación de células T durante 24-48 horas en los pocillos revestidos, las células T citotóxicas se eliminan y sustituyen con un segundo anticuerpo marcado que reconoce un epítipo diferente en la citocina. Después de un lavado exhaustivo para eliminar el anticuerpo no unido, se añade un sustrato enzimático que produce un producto de reacción coloreado a la placa. El número de células productoras de citocinas se cuenta bajo un microscopio. Este procedimiento tiene las ventajas de un tiempo de ensayo corto y sensibilidad sin la necesidad de un gran número de células T citotóxicas.

45

50

5.6. Formulación

Los complejos no covalentes de hsp modificadas y proteínas o péptidos antigénicos purificados por los procedimientos relacionados con la invención pueden formularse en preparaciones farmacéuticas para su 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 considerarse cuando se elige la vía de administración de un agente terapéutico. Los complejos de hsp modificada-molécula antigénica relacionados con la invención pueden administrarse usando cualquier vía de administración deseada, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa o intramuscular, aunque se prefiere por vía intradérmica o mucosa. Las ventajas de la administración intradérmica o mucosa incluyen el uso de menores dosis y la absorción rápida, respectivamente. Las vías de administración mucosa incluyen, pero sin limitación, la administración oral, rectal y nasal. Las preparaciones para administraciones mucosas son adecuadas en diversas formulaciones como se describen a continuación. La vía de administración puede variarse durante un ciclo de tratamiento. Se describen dosificaciones, vías de administración y regímenes terapéuticos preferidos para complejos de péptidos y hsp de origen natural en las solicitudes de patentes internacional PCT publicadas como documentos WO 96/10411 y WO 97/10001.

En aspectos preferidos, se administra una cantidad de complejo de gp96 modificada-péptido a un ser humano que está en el intervalo de aproximadamente 10 a 600 µg, preferentemente de 10 a 100 µg, más preferentemente de aproximadamente 25 µg, administrada una vez por semana durante aproximadamente 4-6 semanas, por vía intradérmica, variándose secuencialmente el sitio de administración.

Las composiciones que comprenden complejos no covalentes formulados en un vehículo farmacéutico compatible pueden prepararse, envasarse y etiquetarse para el tratamiento del tumor indicado, tal como sarcomas y carcinomas humanos, por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomas, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, 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 conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leucemias, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia); leucemia crónica (leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica); y policitemia verdadera, linfoma (enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström y enfermedad de las cadenas pesadas, etc.

Si el complejo es soluble en agua, entonces puede formularse en un tampón apropiado, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato u otras soluciones fisiológicamente compatibles.

Como alternativa, si el complejo resultante tiene una escasa solubilidad en disolventes acuosos, entonces puede formularse con un tensioactivo no iónico tal como Tween o polietilenglicol.

Por lo tanto, los complejos no covalentes y sus solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para su administración por inhalación o insuflación (a través de la boca o de la nariz) o administración oral, bucal, parenteral, rectal o, en el caso de tumores, por inyección directamente en un tumor sólido.

Para su administración oral, la preparación farmacéutica puede estar en forma líquida, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o puede presentarse como un producto farmacológico para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sódico). Las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxilpropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplos, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato cálcico); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice);

disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón glicolato sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico). Los comprimidos pueden revestirse por procedimientos bien conocidos en la técnica.

5 Las preparaciones para administración oral pueden formularse convenientemente para proporcionar la liberación controlada de los complejos. Dichas composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o grageas formuladas de forma convencional.

10 Para su administración por inhalación, los complejos pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de envases presurizados o de un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse para que contengan una mezcla en polvo de los complejos y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

15 Los complejos pueden formularse para su administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con un conservante añadido. Las composiciones pueden adaptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos u oleosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril, antes del uso.

20 Los complejos también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

25 Además de las formulaciones descritas anteriormente, los complejos también pueden formularse como una preparación de liberación prolongada. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, los complejos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (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 emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos o excipientes de administración para fármacos hidrófilos.

30 Los complejos pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen los complejos no covalentes. El envase puede comprender, por ejemplo, papel metálico o plástico, tal como un envase tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador puede acompañarse de instrucciones para su administración.

35 La invención también se refiere a kits para llevar a cabo los regímenes terapéuticos de la invención. Dichos kits comprenden en uno o más recipientes cantidades terapéuticamente o profilácticamente eficaces de los complejos no covalentes de hsp modificada-péptido en forma farmacéuticamente aceptable. Los complejos de hsp modificada-péptido en un vial de un kit de la invención pueden estar en forma de una solución farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, en combinación con solución salina estéril, solución de dextrosa o solución tamponada u otro líquido estéril farmacéuticamente aceptable. Como alternativa, el complejo puede liofilizarse o desecarse; en este caso, el kit comprende opcionalmente además en un recipiente una solución farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, solución salina, solución de dextrosa, etc.), preferentemente estéril para reconstituir el complejo para formar una solución con fines de inyección.

45 En otro aspecto, un kit de la invención comprende además una aguja o jeringa, preferentemente envasada en forma estéril, para la inyección del complejo y/o una almohadilla con alcohol envasada. Opcionalmente se incluyen instrucciones para la administración de los complejos de hsp modificada-péptido por un médico o por el paciente.

5.7. Prevención y Tratamiento del Cáncer

50 Existen muchas razones por las que se desea una inmunoterapia como se proporciona por los complejos no covalentes de hsp modificada-péptido o células recombinantes que expresan hsp modificadas preparadas por la presente invención para su uso en pacientes con cáncer. En primer lugar, si los pacientes con cáncer están inmunodeprimidos y la cirugía con anestesia y la posterior quimioterapia pueden empeorar la inmunosupresión,

entonces con una inmunoterapia apropiada en el periodo preoperatorio puede prevenirse o revertirse esta inmunosupresión. Esto podría conducir a menores complicaciones infecciosas y a una cicatrización de heridas acelerada. En segundo lugar, el volumen tumoral es mínimo después de la cirugía y la inmunoterapia es más probable que sea eficaz en esta situación. Una tercera razón es la posibilidad de que las células tumorales se desprendan hacia la circulación en la cirugía y una inmunoterapia eficaz aplicada en ese momento puede eliminar estas células.

En un aspecto específico, la utilidad preventiva y terapéutica de la divulgación relacionada con la invención se refiere a aumentar la inmunocompetencia del paciente con cáncer antes de la cirugía, en el momento de o después de la cirugía, y a inducir una inmunidad específica de tumor contra células cancerosas, siendo el objetivo inhibir el cáncer y siendo el objetivo clínico final la regresión y erradicación total del cáncer.

Por consiguiente, los procedimientos preferidos de tratamiento o prevención del cáncer comprenden aislar células cancerosas de uno o más individuos, preferentemente el individuo que necesita tratamiento, e introducir en dichas células una secuencia génica de hsp modificada expresable, preferentemente como una construcción génica de expresión. La secuencia génica de hsp modificada se manipula por procedimientos descritos anteriormente en la Sección 5.1, de modo que la secuencia génica de hsp modificada en forma de una construcción de expresión o integrada intracromosómicamente sea adecuada para la expresión de la hsp modificada en las células recombinantes. Las células recombinantes que contienen las construcciones génicas de expresión se cultivan en condiciones tales que las hsp modificadas codificadas por la construcción génica de expresión se expresan por las células huésped recombinantes. Se secretan complejos de proteínas de choque térmico modificadas asociadas no covalentemente con péptidos de la célula cancerosa y, preferentemente, se purifican a partir del medio cultivo por los procedimientos descritos en la Sección 5.2. Dependiendo de la vía de administración, los complejos de hsp modificada-péptido se formulan por lo tanto como se describe en la Sección 5.4, y se administran al individuo de forma autóloga (por ejemplo, para tratar el cáncer primario o metástasis del mismo), o a otros individuos que necesiten tratamiento para un cáncer de un tipo tisular similar o a individuos con un riesgo aumentado de cáncer debido a una historia familiar o a factores de riesgo ambientales. También se han descrito procedimientos ejemplares de usos terapéuticos y profilácticos de complejos de hsp-péptido en las Publicaciones PCT WO 96/10411, con fecha del 11 de abril de 1996 y WO 97/10001 con fecha del 20 de marzo de 1997.

Por ejemplo, el tratamiento con complejos de hsp modificada-péptido preparados como se ha descrito anteriormente puede comenzar en cualquier momento después de la cirugía. Sin embargo, si el paciente ha recibido quimioterapia, los complejos de hsp-antígeno se administran habitualmente después de un intervalo de cuatro semanas o más para permitir que se recupere el sistema inmune. El régimen terapéutico puede incluir inyecciones semanales del complejo de hsp modificada-antígeno, disuelto en solución salina u otra solución fisiológicamente compatible. La vía y sitio de inyección varía cada vez, por ejemplo, la primera inyección se administra por vía subcutánea 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 se repite después de un espacio de una o más inyecciones. Además, las inyecciones se dividen y cada mitad de la dosis se administra en un sitio diferente el mismo día. En su conjunto, las primeras cuatro a seis inyecciones se administran a intervalos semanales. Posteriormente, se administran dos inyecciones a intervalos de dos semanas seguidas de un régimen de inyecciones a intervalos mensuales.

Como alternativa, pueden usarse células tumorales recombinantes que secretan complejos de hsp modificada-péptido como vacuna para su inyección a un paciente para estimular una respuesta inmune contra las células tumorales o células que lleven antígenos tumorales. Se prefieren células tumorales recombinantes autólogas que expresen de forma estable y secreten complejos de hsp modificada-péptido. Para determinar la dosis apropiada, la cantidad de complejos de hsp modificada-péptido secretada por las células recombinantes se cuantifica y el número de células recombinantes usadas para la vacunación se ajusta por consiguiente para asegurar un nivel de secreción *in vivo* uniforme. Una dosis preferida es el número de células recombinantes que pueden secretar aproximadamente 100 ng de gp96 modificada por 24 horas. Para la seguridad del paciente, las células tumorales recombinantes pueden irradiarse (12000 rad) inmediatamente antes de su inyección a un paciente. Las células irradiadas no proliferan y pueden continuar secretando complejos de hsp modificada-péptido durante aproximadamente 7-10 días, que es suficiente para inducir una respuesta inmune.

Los cánceres que pueden tratarse o prevenirse usando complejos no covalentes de hsp-péptido preparados por los procedimientos de la presente invención, incluyen, pero sin limitación, sarcomas y carcinomas humanos, por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de

5 Ewing, leiomiomas, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, 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 conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leucemias, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia); leucemia crónica (leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica); y policitemia verdadera, linfoma (enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström y enfermedad de las cadenas pesadas. Se describen ejemplos específicos de dichos cánceres en las secciones a continuación.

15 En un aspecto específico de la divulgación, el cáncer es metastásico. En otro aspecto específico, el paciente que tiene un cáncer está inmunodeprimido con motivo de haber experimentado una terapia anticancerosa (por ejemplo, quimioterapia, radiación) antes de la administración de los complejos de hsp-molécula peptídica de la invención. En otro aspecto específico, el cáncer es un tumor.

20 El efecto de la inmunoterapia con complejos de hsp modificada-peptidos sobre la progresión de enfermedades neoplásicas puede controlarse por cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia, incluyendo, pero sin limitación, medir: (a) la hipersensibilidad retardada como una evaluación de la inmunidad celular; (b) la actividad de linfocitos T citolíticos *in vitro*; (c) los niveles de antígenos específicos de tumor, por ejemplo, antígenos carcinoembrionarios (CEA); (d) los cambios en la morfología de tumores usando técnicas tales como exploración por tomografía computarizada (TC); (e) los cambios en los niveles de supuestos biomarcadores de riesgo para un cáncer particular en individuos de alto riesgo y (f) los cambios en la morfología de tumores usando un sonograma. Otras técnicas que también pueden usarse incluyen escintigrafía y endoscopia.

25 El efecto preventivo de la inmunoterapia usando complejos de hsp modificada-peptido también puede estimarse por determinación de los niveles de un supuesto biomarcador para determinar el riesgo de un cáncer específico. Por ejemplo, en individuos con riesgo aumentado para cáncer de próstata, se mide el antígeno específico de próstata (PSA) en suero mediante el procedimiento descrito por Brawer y col., 1992, J. Urol. 147: 841-845 y Catalona y col., 1993, JAMA 270: 948-958; o en individuos con riesgo de cáncer colorrectal, se mide el CEA por procedimientos conocidos en la técnica; y en individuos con un riesgo aumentado de cáncer de mama, se mide la 16- α -hidroxilación del estradiol por el procedimiento descrito por Schneider y col., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3047-3051.

30 **5.8. Prevención y Tratamiento de Enfermedades Infecciosas**

35 Se ha descubierto también que los complejos de hsp modificada-peptido de la invención pueden prepararse a partir de células infectadas con un patógeno intracelular, así como células que se han transformado mediante un patógeno intracelular. Por ejemplo, pueden aislarse complejos inmunogénicos de hsp-peptido a partir de células eucariotas transformadas con un virus transformante tal como SV40.

40 En un aspecto preferido de la divulgación, las vacunas de hsp modificada-peptido purificadas pueden tener una utilidad particular en el tratamiento de enfermedades humanas causadas por patógenos intracelulares. Se aprecia, sin embargo, que las vacunas desarrolladas usando los principios descritos en el presente documento serán útiles en el tratamiento de enfermedades de otros mamíferos, por ejemplo, animales de granja incluyendo: ganado bovino, caballos; ovejas; cabras; y cerdos y animales domésticos incluyendo: gatos; y perros, que de forma similar estén causadas por patógenos intracelulares.

45 De acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento, pueden prepararse vacunas que estimulen una respuesta inmune, en particular una respuesta de células T citotóxicas, contra células infectadas con virus incluyendo, pero sin limitación, hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, influenza, varicela, adenovirus, HSV-I, HSV-II, peste bovina, rinovirus, echovirus, rotavirus, virus respiratorio sincitial, papilomavirus, papovavirus, citomegalovirus, echinovirus, arbovirus, huntavirus, virus coxsackie, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la polio, VIH-1 y VIH-II. De forma similar, también pueden prepararse vacunas que estimulen respuestas de células T citotóxicas contra células infectadas con bacterias intracelulares, incluyendo, pero sin limitación, *Mycobacteria*, *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Neisseria* y *Legionella*. Además, también pueden prepararse vacunas que estimulen respuestas de células T citotóxicas contra células infectadas con protozoos intracelulares,

incluyendo, pero sin limitación, *Leishmania*, *Kokzidioa* y *Trypanosoma*. Además, pueden prepararse vacunas que estimulen respuestas de células T citotóxicas contra células infectadas con parásitos intracelulares incluyendo, pero sin limitación *Chlamydia* y *Rickettsia*.

5 Como se apreciará por los expertos en la materia, los protocolos descritos en el presente documento pueden usarse para aislar complejos de hsp-péptido a partir de cualquier célula manipulada genéticamente para expresar una hsp modificada, por ejemplo, tejidos, células aisladas o líneas celulares eucariotas inmortalizadas infectadas con un patógeno intracelular. Cuando se usan líneas celulares animales inmortalizadas como fuente del complejo de hsp modificada-péptido, es importante usar líneas celulares que pueden infectarse con el patógeno de interés. Además, es preferible usar células que procedan de la misma especie que el destinatario deseado de la vacuna. Se han descrito anteriormente en la Sección 5.2.2 técnicas para introducir una forma expresable de las secuencias génicas de hsp modificada en estas líneas celulares.

10 Si se espera que un patógeno cause la lisis de las células huésped, se prefiere introducir la secuencia génica de hsp modificada expresable en la célula huésped antes de infectar las células con el patógeno. Por ejemplo, para preparar un complejo de hsp-péptido para su administración a seres humanos que pueda ser eficaz contra VIH-I, el virus puede propagarse en células humanas que incluyen, pero sin limitación, células T CD4+ humanas, células HepG2, y células promonocíticas U937, que ya se han transfectado con una secuencia génica de hsp modificada expresable. De forma similar, los virus influenza pueden propagarse, por ejemplo, en células MDCK y líneas celulares fibroblásticas humanas transfectadas, y las micobacterias pueden cultivarse, por ejemplo, en células de Schwann humanas transfectadas.

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

20 En otro aspecto de la divulgación, si se ha identificado el gen que codifica un determinante antigénico particular de un patógeno, el gen que codifica el antígeno puede transfectarse y coexpresarse en una línea celular humana o de mamífero junto con una secuencia génica de hsp modificada usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Dichas células antigénicas recombinantes que secretan complejos de hsp modificada-péptido pueden usarse como vacuna para su inyección a un paciente para estimular una respuesta inmune contra una célula infectada o células que lleven el antígeno. Se prefieren células antigénicas recombinantes autólogas que expresen de forma estable y secreten complejos de hsp modificada-péptido.

25 El efecto de la inmunoterapia con complejos de hsp modificada-péptido sobre la progresión de enfermedades infecciosas puede controlarse mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia.

30 **6. EJEMPLO: Producción de gp96 modificada-Ig en Células de Mamífero**

35 Una hsp modificada, gp96-Ig, se produjo construyendo una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que comprende una gp96 sin el péptido de retención (KDEL) y las regiones constantes de la IgG1 murina, clonando la secuencia génica de la gp96 modificada en una construcción de expresión y usando la construcción génica de expresión para transfectar una diversidad de células de mamífero. Se describen en las secciones siguientes procedimientos para construir la secuencia génica de la hsp modificada, generar las células recombinantes y purificar la gp96 modificada.

40 **6.1. Construcción de una Secuencia Génica de gp96 Modificada-Ig**

45 La región codificante de la gp96 humana tiene una longitud de 2.412 bases, que codifican un péptido señal en el extremo amino-terminal (21 restos aminoacídicos), una región transmembrana potencial rica en restos hidrófobos y la secuencia peptídica de retención en el retículo endoplásmico (RE) (KDEL) en el extremo carboxilo-terminal. La proteína tiene 804 aminoácidos y un peso molecular estimado de aproximadamente 96 kD. Esta región codificante se amplificó sin las secuencias que codifican el tetrapéptido KDEL, aunque se incluyó una secuencia que codifica los dominios de bisagra, CH2 y CH3 de la IgG1 murina. La etiqueta basada en inmunoglobulina facilita la detección por ELISA, la purificación por cromatografía de afinidad en columna de proteína A-Sepharose y el análisis mediante análisis de separación de células activadas por fluorescencia. Se produce una forma secretora de una gp96 modificada por células transfectadas con la secuencia génica de la hsp modificada, y la gp96 modificada contiene péptidos unidos.

50 Para construir una secuencia génica de gp96 modificada, se extrajo el ARN total con extracción con isotiocianato de guanidinio ácido-fenol-cloroformo a partir de células Jurkat (una línea celular humana). Se preparó

el ADNc bicatenario a partir del ARN usando el Kit de PCR de ARN GeneAmp (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT), y la región codificante de la gp96 humana se amplificó mediante PCR usando la polimerasa Taq y Pwo del Sistema de PCR de Molde Largo Expand™ (Boeheringer Mannheim, Indianapolis, IN). Las condiciones de ciclado de la PCR eran: desnaturalización del ADN de molde a 94°C durante 2 min; después 10 ciclos a 94°C durante 10 s, 55°C durante 30 s y 68°C durante 2 min; y después 25 ciclos a 94°C durante 10 s, 55°C durante 30 s y 68°C durante 2 min con una elongación de ciclo de 20 s para cada ciclo y con una etapa de elongación final a 68°C durante 7 min. Los cebadores de PCR usados eran 5'-ATTACTCGAGGGCCGCACGCCATGAGGG-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 amplificación, que es un fragmento de 2,4 kb, se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa, se clonó en el vector pCRII mediante clonación TA (Invitrogen, San Diego, CA) y después se volvió a clonar en el fagémido Bluescript II SK (+/-).

La secuencia que codifica los dominios de bisagra, CH2 y CH3 de la IgG1 murina (la etiqueta de Ig) se obtuvo mediante PCR usando un ADNc de IgG1 murina de molde, o el plásmido, IgG1 murina-pCRII. Los tres restos de cisteína en la porción de la bisagra de IgG1 se habían mutado a restos de serina mediante técnicas convencionales. Las condiciones de ciclado de la PCR eran: desnaturalización a 95°C durante 2 min; después 30 ciclos a 95°C durante 1 min, 50°C durante 1 min y 72°C durante 2 min, y una etapa de elongación final a 72°C durante 10 min. Los cebadores de PCR eran 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 se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa, se clonó en pCRII por clonación TA y se insertó en el fagémido Bluescript II SK (+/-).

Para unir la gp96 modificada clonada con la etiqueta de Ig clonada, la secuencia que codifica la gp96 se insertó en los sitios XhoI y BamHI de pBluescript, mientras que la etiqueta de Ig se insertó en los sitios BamHI y NotI de pBluescript. La expresión de la proteína de fusión, gp96-Ig, se confirmó mediante transcripción/traducción acopladas *in vitro* (Promega, Madison). Después, la secuencia que codifica la fusión de gp96 modificada-Ig se sacó por corte con XhoI y NotI y se insertó en los vectores de expresión eucariotas pBCMGSNeo y pBCMGHIS, que expresan la gp96-Ig bajo el promotor de CMV, y pBMGHIS, que expresa la gp96-Ig bajo el promotor de la metalotioneína. El tamaño de la secuencia de gp96 modificada-Ig era de 3,08 kB y el peso molecular de la gp96 química secretada se estimó que era de aproximadamente 121 kD.

6.2. Producción de gp96 Modificada-Ig en Células de Mamífero

La línea celular fibroblástica de ratón, NIH3T3, la línea celular de carcinoma pulmonar de Lewis de ratón, LLC, la línea celular de mastocitoma de ratón, P815, la línea celular de linfoma de ratón, EL4 y su transfectante con ovoalbúmina, E.G7, la línea celular de melanoma de ratón, B16F10, la línea celular de fibrosarcoma de ratón, MC57, y las líneas celulares de carcinoma pulmonar microcítico humano, SCLC#2 y SCLC#7, se usaron para la expresión de la secuencia génica de gp96 modificada-Ig. Se usaron técnicas convencionales para introducir las construcciones génicas de expresión en estas células. Los vectores de expresión basados en papilomavirus bovino (BPV) mantenidos episomalmente, pBCMGSNeo o pBCMGHIS, que contienen la secuencia modificada (gp96-Ig-pBCMGSNeo y gp96-Ig-pBCMGHIS) se usaron para transfectar células LLC, B16F10, MC57, SCLC#2 y SCLC#7 mediante Lipofectin (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), células NIH3T3 mediante fosfato de calcio y células EL4, E.G7 y BP15 mediante electroporación. Se cultivaron las NIH3T3 en medio IMDM (GIBCO BRL, Grand Island, NY) complementado con suero de ternera inactivado por calor al 10% (GIBCO BRL). Se cultivaron E.G7 y E14 en medio IMDM complementado con FCS inactivado por calor al 10% (GIBCO BRL) y β-mercaptoetanol 50 μM (Bio-Rad, CA). Las demás líneas celulares se cultivaron en medio IMDM complementado con FCS inactivado por calor al 10%. Las NIH3T3, MC57, SCLC#2 y SCLC#7 se mantuvieron como cultivos en monocapa y se pasaron por tratamiento rápido con tripsina, siendo necesaria tripsina al 0,05% más BDTA (GIBCO BRL). Las células transfectadas se seleccionaron con 1 mg/ml de G418 (GIBCO) o 2,5 mM de L-Histidinol (Sigma, St.Louis, MO) durante 2 semanas y se expandieron en número por dilución y cultivo adicional. Los clones que producen grandes cantidades de la proteína de fusión de gp96-Ig secretada se prepararon por dilución limitante.

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

Las células se sembraron en placas a 10⁶/ml en AIMV o IMDM con FCS al 10% y los sobrenadantes de cultivo se recogieron a diferentes puntos temporales. Para el análisis de la expresión intracelular de gp96-Ig, las células se sembraron en placas de forma similar, se recogieron, se lavaron en PBS y se lisaron mediante tres ciclos de congelación-descongelación. Los lisados se centrifugaron a 600 g durante 10 min y los sobrenadantes se

centrifugaron de nuevo a 13.000 g durante 60 min. El sobrenadante final se usó para cuantificar la expresión intracelular de gp96-Ig.

5 La concentración de gp96-Ig en los medios de cultivo celular se determinó mediante ELISA usando la etiqueta de Ig como antígeno. La etiqueta de Ig se detectó mediante un anticuerpo anti-ratón marcado. Para el ELISA, se revistieron placas de 96 pocillos de fondo plano (Becton Dickinson Labware, Oxnard, CA) con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (5 µg/ml) a 4°C durante una noche y se bloquearon con gelatina al 1% en PBS a 37°C durante 1 h. Los pocillos se incubaron con sobrenadantes de cultivo o IgG murina (ICN, Costa Mesa, CA) como control a 37°C durante 1 h y se revelaron con fragmento Affinipure F(ab')₂ de cabra conjugado con peroxidasa anti-IgG de ratón (H+L) a 37°C durante 1 h, seguido de incubación con ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (Sigma). La absorbancia se determinó con un Immunoreader SLT-Labinstruments EAR 400AT (Austria) a una longitud de onda de 405 nm. La concentración de Gp96-Ig se determinó por comparación de su absorbancia con la del patrón de IgG murina.

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

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 ^a
MC57	3.300 ng
^a Promotor de metalotioneína	

15 Todas las líneas celulares murinas y humanas transfectadas con gp96-Ig en los vectores de expresión episomales basados en papilomavirus secretaban la proteína de fusión (Figura 1a y Tabla 1). Las células con transfección simulada no secretaban gp96-Ig. En condiciones normalizadas, los niveles de proteína de fusión secretada variaban dependiendo del transfectante de 5 ng/ml a 3300 ng/ml.

20 La secreción de gp96-Ig dio como resultado su acumulación lineal dependiente del tiempo en el sobrenadante (Fig. 2). Se detectó la gp96-Ig intracelular a un nivel en estado estacionario bajo y constante en lisados de células transfectadas, indicando que no se acumula en la célula.

6.3 Secreción de gp96-Ig por Células de Mamífero

25 Para teñir la membrana de células SCLC transfectadas con gp96-Ig, se usó anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-FITC o anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-FITC como control para tinción durante 15 min a 4°C y se analizaron mediante un citómetro de flujo Becton Dickinson FACScan. Para tinción intracelular, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con saponina al 1%, seguido de tinción con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-FITC (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-PE (Southern Biotechnology, Birmingham, AL), anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-FITC o anticuerpo de cabra anti-IgG de hámster sirio-FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) durante 15 min a 4°C y se analizaron mediante un citómetro de flujo.

30 El análisis de FACS de células tumorales transfectadas de membrana intacta puso de manifiesto la ausencia de tinción con anti-IgG de ratón por encima del fondo, indicando que el resto de Ig de la proteína de fusión

no se presenta en la hoja externa de la membrana plasmática. Por el contrario, tras la permeabilización de la membrana, se detecta la gp96-Ig intracelularmente con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón, pero no mediante anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo de control. El dominio transmembrana de gp96 no interfiere con la secreción de gp96-Ig y no conduce a la acumulación intracelular. Estos datos concuerdan con informes previos que sugieren que el dominio transmembrana no se usa para el anclaje de la gp96 en la membrana y que la gp96 no es una proteína integral de membrana.

6.4. Purificación de gp96 Modificada-Ig

La gp96-Ig se purificó mediante cromatografía de afinidad en una columna de Proteína A (Bio-Rad, Hércules, CA). Se usó medio de cultivo sin suero agotado de SCLC#7 transfectadas con gp96-Ig (SCLC#7-gp96-Ig) como fuente para la purificación de la proteína de fusión con Ig. Las células NIH-3T3 transfectadas con gp96-Ig se sembraron en placas a 10^6 /ml en AIMV y los sobrenadantes de cultivo se recogieron después de 6-8 días. Después de la eliminación de los residuos celulares por centrifugación y filtración, se concentró la proteína completa del sobrenadante mediante precipitación con sulfato de amonio (saturación del 55%) y se dializó contra PBS. Las muestras se diluyeron 1:2 con NaCl 3,5 M, glicina 1,6 M, pH 9,0 (tampón de unión) y se aplicaron a la columna de Proteína A. La columna se lavó minuciosamente con tampón de unión y la proteína unida se eluyó con ácido cítrico 0,1 M, pH 6,5. Las fracciones que contenían proteína se combinaron y dializaron contra PBS. La concentración de gp96-Ig se determinó mediante el Kit Reactivo de Ensayo de Proteína Micro BCA (Pierce, Rockford II).

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en geles de Tris-Glicina al 4-15% (Bio-Rad) y se tiñeron con Azul de Coomassie. Para la transferencia de Western, las proteínas en SDS-PAGE se transfirieron a nitrocelulosa y se sondaron con un anticuerpo monoclonal de rata específico para Grp94 (9G10; StressGen, Victoria, Canadá) seguido de fragmento Affinipure F(ab')₂ de cabra conjugado con peroxidasa anti-IgG de rata (H+L) (Jackson ImmunoResearch, PA).

Cuando la gp96-Ig purificada por cromatografía de proteína A se analizó mediante SDS-PAGE, el material migró como una banda principal del peso molecular esperado de 120 kD y dos bandas moleculares de mayor peso molecular minoritarias, previamente descritas también para la gp96 no modificada (Fig. 1b). La transferencia de Western con un anticuerpo monoclonal específico para gp96 confirmó la identidad de la proteína de fusión. Sólo la banda principal se teñía, sugiriendo que las bandas minoritarias son variantes de glicosilación de gp96 no reconocidas por el anticuerpo.

Las moléculas de gp96 modificada-Ig secretadas también se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras. La Figura 1C muestra una comparación de moléculas de gp96-Ig purificadas secretadas por SCLC#2, IgG murina, y una proteína de fusión de CD30 y la etiqueta peptídica de Ig. La proteína de fusión de gp96-Ig que comprende gp96 (96 kD) y la etiqueta de Ig (25 kD) aparece en el intervalo de tamaño apropiado. Los tripletes que representan la gp96 modificada-Ig tanto en las fracciones reducidas como no reducidas se habían descrito anteriormente para la gp96.

7. EJEMPLO: Oncogenicidad de Células Tumorales que Producen gp96 Modificada-Ig

De acuerdo con la invención, las células tumorales recombinantes que secretan complejos de hsp modificada-peptido son útiles como vacuna. La inmunogenicidad *in vivo* de dichas células recombinantes se ensayó evaluando su oncogenicidad en animales que no tenían ningún tumor preexistente.

Se inyectaron células tumorales recombinantes en ratones para determinar si la oncogenicidad de dichas células recombinantes se había reducido respecto a 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 la formación de tumores en los animales de ensayo. Sugieren que el sistema inmune de estos animales ha montado 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 animales de ensayo originariamente inyectados con células tumorales recombinantes se aislaron y se devolvieron al cultivo. 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 los mecanismos efectores inmunes no se dirigían eficazmente a las mismas.

7.1. Comparación de la oncogenicidad relativa de E.G7 y E.G7-gp96-Ig

Dos grupos de ratones C57BL/6 recibieron inyecciones subcutáneas respectivamente con el número indicado de células tumorales vivas E.G7 y E.G7-gp96-Ig. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Nº de células usadas para inyección	Ratones con tumor	
	E.G7	E.G7-gp96-Ig
1×10^7	2/2	1/7
1×10^6	20/23	1/5

Nº de células usadas para inyección	Ratones con tumor	
	E.G7	E.G7-gp96-Ig
1×10^5	4/10	0/2

5 Casi todos los ratones en los que se inyectaron E.G7 tenían tumores en desarrollo. Sin embargo, los tumores de E.G7-gp96-Ig se rechazaron en la mayoría de los ratones. Esto sugiere que la gp96 modificada secretada a partir de E.G7-gp96-Ig contiene a los péptidos tumorales de E.G7 y puede inducir inmunidad tumoral contra E.G7. Se escindieron tumores de 2 ratones con tumores de E.G7-gp96-Ig y se devolvieron al medio de cultivo. Estas células tumorales no secretaban gp-96 modificada-Ig en cultivo. Se cree que estas variantes tumorales que habían perdido la capacidad de secretar la gp96 modificada-Ig se seleccionaron *in vivo*.

7.2. Comparación de oncogenicidad relativa de EL4 y EL4-gp96-Ig

10 Dos grupos de ratones C57BL/6 recibieron inyecciones subcutáneas respectivamente con el número indicado de células tumorales vivas EL4 y EL4-gp96-Ig. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Nº de células usadas para inyección	Ratones con tumor	
	EL4	EL4-gp96-Ig
1×10^6	2/2	3/5
1×10^5	7/7	2/5
1×10^4	9/10	2/5

15 Casi todos los ratones a los que se les inyectó EL4 tenían tumores en desarrollo. Sin embargo, los tumores de EL4-gp96-Ig se rechazaron en casi el 50% de los ratones inyectados. Esta observación sugiere que la gp96 secretada a partir de EL4-gp96-Ig contiene los péptidos tumorales de EL4 y puede inducir inmunidad tumoral contra células EL4. Se escindieron tumores de 3 ratones con tumores de EL4-gp96-Ig y se devolvieron al medio de cultivo. De forma similar, estas variantes tumorales dejaban de secretar gp96 modificada-Ig sugiriendo que habían escapado a los mecanismos efectores inmunes *in vivo*.

20 7.3. Comparación de la oncogenicidad relativa de MC57 y MC57-gp96-Ig

25 Ratones C57BL/6 recibieron inyecciones por vía subcutánea con el número indicado de células tumorales vivas. Todos los ratones en los que se inyectaron MC57 sobrevivieron sin tumor. Sin embargo, un ratón en el que se inyectaron células MC57-gp96-Ig tenía tumores en desarrollo. El tumor se escindió y se devolvió al medio de cultivo. El nivel de moléculas de gp96 modificada-Ig en el sobrenadante de cultivo del tumor escindido había disminuido hasta 100 µg/ml.

Tabla 4

Nº de células usadas para inyección	Ratones con tumor	
	MC57	MC57-gp96-Ig
1×10^7	0/4	1/2
3×10^6	0/2	0/2
1×10^6	0/2	0/2

7.4. Comparación de la oncogenicidad relativa de B16F10 y B16F10-gp96-Ig

5 Dos grupos de ratones C57BL/6 recibieron inyecciones subcutáneas respectivamente con el número indicado de células tumorales vivas B16F10 y B16F10-gp96-Ig. Ninguno de los ratones en los que se inyectaron células B16F10-gp96-Ig rechazó el tumor. Dos ratones a los que se les inyectó 1×10^4 células B16F10 rechazaron el tumor.

Tabla 5

Nº de células usadas para la exposición	Ratones con tumor	
	B16F10	B16F10-gp96-Ig
1×10^6	2/2	2/2
1×10^5	2/2	2/2
1×10^4	0/2	2/2

7.5. Oncogenicidad de E.G7-gp96-Ig e LLC-gp96-Ig

10 Se seleccionaron dos líneas celulares para su estudio adicional *in vivo*. La E.G7 es un transfectante con ovoalbúmina del linfoma EL4. La E.G7 forma tumores letales en ratones C57BL/6 a pesar de su inmunogenicidad relativa. La transfección con gp-96-Ig de E.G7 permite la determinación de si la inmunización con E.G7-gp96-Ig inmuniza contra cualquiera o ambos antígenos asociados a EL4 y el antígeno sustituto de ovoalbúmina. El segundo tumor, LLC transfectado con secuencias que codifican gp96-Ig u ovoalbúmina se usó porque, al contrario que E.G7, es un tumor no hematopoyético poco inmunogénico. Ambas líneas celulares secretan cantidades comparables de gp96-Ig (Véase la Tabla 1).

15 Se determinó la oncogenicidad *in vivo* mediante inyección subcutánea de células tumorales vivas en 200 μ l de PBS en los flancos de ratones. El tamaño de los tumores se midió en dos dimensiones dos veces por semana durante al menos 2 meses. Cuando el crecimiento tumoral medio superó los 10 mm de diámetro después de 3 semanas, los ratones se clasificaron como positivos para el tumor y se sacrificaron. Se inmunizaron ratones por inyección subcutánea de 10^6 E.G7-gp96-Ig vivas o E.G7 irradiadas como control (en 200 μ l de PBS), administradas en el flanco derecho. Se administraron dos inmunizaciones a intervalos de 2 semanas.

20 La secreción de gp96-Ig disminuye la oncogenicidad de E.G7 en ratones C57BL/6 más de cien veces en comparación con E.G7 con transfección simulada o no transfectadas. La inoculación subcutánea de diez millones de células tumorales secretoras de proteína de choque térmico causaba tumores sólo en el 10% de los ratones inoculados (Fig. 3). Una reducción similar de la oncogenicidad por secreción de gp96-Ig se observó con EL4. La secreción de gp96-Ig por LLC dio como resultado una disminución más moderada de aproximadamente cinco veces de la oncogenicidad (Fig. 3). Estos resultados sugieren que la gp96-Ig secretora disminuía la oncogenicidad de tumores posiblemente por aumento de su inmunogenicidad.

30 8. EJEMPLO: Efecto Protector de la Vacunación con Células que Expresan gp96 Modificada-Ig

Para demostrar la capacidad de células tumorales recombinantes que están produciendo gp96 modificada-Ig para estimular una respuesta inmune protectora, los ratones se vacunaron primero con células tumorales

recombinantes y después se expusieron a una inyección de células tumorales que no contenían la construcción génica de gp96 modificada-Ig.

5 Se inmunizaron grupos de ratones por inyección subcutánea de 1×10^6 E.G7-gp96-Ig vivas, administradas en el flanco derecho. Se administraron dos inmunizaciones a intervalos de 2 semanas. Después, los ratones se expusieron mediante inyecciones subcutáneas en el flanco izquierdo del número indicado de células vivas E.G7 o EL4, 2 semanas después de la última inmunización. Las células E.G7 son células EL4 transfectadas con una construcción génica de ovoalbúmina.

Tabla 6

Nº de células usadas para la exposición	Ratones con tumor	
	E.G7-gp96-Ig	No vacunados
E.G7		
3×10^6	5/5	ND
1×10^6	2/6	20/23
8×10^5	0/4	3/3
EL4		
1×10^5	4/5	7/7
3×10^4	3/4	2/2
1×10^4	1/5	9/10
3×10^3	0/5	3/5

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

8.1. Efecto Protector de E.G7-gp96-Ig contra células tumorales E.G7 y LLC

15 Las líneas celulares E.G7 y LLC se seleccionaron para estudios adicionales *in vivo*. Como se ha descrito anteriormente, los ratones se inmunizaron mediante inyección subcutánea en el flanco derecho de células E.G7 no irradiadas que secretaban gp96-Ig. Se administraron dos inmunizaciones en intervalos de 2 semanas. Posteriormente, se expusieron a E.G7 no transfectadas o con transfección simulada, a EL4, a LLC no transfectadas y a LLC-ova. Para preparar LLC-ova, se usó el gen de ovoalbúmina de pollo clonado en el vector de expresión pAc-NEO-OVA para transfectar LLC mediante Lipofectin (GIBCO BRL). Se seleccionaron las células transfectadas con 1 mg/ml de G418 (GIBCO BRL) durante al menos 2 semanas y se ensayaron sus niveles de secreción mediante ELISA. Los ratones inmunizados con E.G7 irradiadas y ratones no vacunados sirvieron como controles de vacunación.

25 Los resultados se muestran en la Figura 4. Los ratones inmunizados con E.G7-gp96-Ig estaban protegidos frente a una dosis de exposición diez veces superior con E.G7 que los ratones no inmunizados o ratones vacunados con células irradiadas. El efecto de la inmunización era incluso más pronunciado cuando se expusieron a EL4, permitiendo un aumento de dosis de cincuenta veces de la exposición en comparación con los controles. Como se esperaba, la inmunización con EG7-gp96-Ig no ofrecía protección frente a la exposición a LLC no transfectadas o transfectadas con vector, mientras que se observó un aumento moderado de aproximadamente tres veces en la protección cuando se usaron LLC transfectadas con ovoalbúmina. La fuerte protección de los ratones inmunizados con EG7-gp96-Ig frente a la exposición a EL4 puede deberse a múltiples antígenos tumorales compartidos por EG7 y EL4. Por el contrario, la débil protección obtenida con LLC-ova depende de células T que reconocen uno solo o un número limitado de epítomos derivados de ovoalbúmina y presentados por moléculas H2^b.

30

9. EJEMPLO: Reducción del Número o Inactivación *in vivo* de Células Inmunes Competentes en Animales Inoculados

La implicación de los mecanismos inmunes en el rechazo de EG7-gp96-Ig se examinó adicionalmente mediante la reducción del número o la inactivación *in vivo* de células inmunes competentes.

5 Los anticuerpos monoclonales usados para la reducción *in vivo* de los subconjuntos de células CD4⁻ y CD8⁻ eran GK1.5 y 2.43, respectivamente. Se purificaron a partir de sobrenadantes de hibridoma seguido de cromatografía de afinidad de Proteína G. Se administraron 100 µg de GK1.5 o 2.43 en 200 µl de PBS mediante inyección intraperitoneal, 2 días antes de o 3 días después de la inoculación subcutánea de 10⁶ E.G7-gp96-Ig vivas (en 200 µl de PBS). La reducción del número de células CD4 y CD8 se verificó mediante análisis de FACS. Para la inhibición funcional de macrófagos, se administró 1 mg de carragenina (tipo II; Sigma) en 200 µl de PBS mediante inyección intraperitoneal.

10 Se inocularon un millón de células tumorales que secretaban gp96-Ig en un animal, una dosis suficiente para establecer tumores que crecen hasta una media de aproximadamente 8 mm de diámetro, y posteriormente se encogen y se rechazan. El rechazo de tumores se bloquea en ratones tratados con el anticuerpo anti-CD8 2.43, dos días antes o tres días después de la inoculación del tumor (Fig. 5). El anticuerpo anti-CD4 GK1.5 no tenía efecto sobre el rechazo de tumores independientemente del momento de la inyección, aún cuando reducía completamente el número de células CD4 durante más de 14 días. De forma similar, la carragenina, que se sabe que inactiva a los macrófagos *in vivo*, no tenía efecto sobre el rechazo de tumores.

15 Estos datos concuerdan con la explicación de que los péptidos asociados con gp96-Ig secretadas se presentan mediante el MHC de clase I y estimulan una respuesta de CTL CD8⁺ específicos de tumor que conduce al rechazo del tumor. Esta respuesta parece ser independiente de la ayuda de CD4 y no requiere macrófagos. En el sistema de modelo de los inventores, la gp96-Ig se secreta por células tumorales vivas y sirve para inmunizar a los ratones, dando como resultado el rechazo posterior del tumor. El crecimiento del tumor comenzó a ralentizarse del día 6 al 8, indicando que se había iniciado la inmunidad antitumoral, y los tumores se rechazaron dentro de la semana posterior. No eran necesarias células CD4 y macrófagos para el rechazo de tumores, independientemente del momento de su reducción, dos días antes o tres días después de la inoculación de tumores. Esto indica que las células CD4 y los macrófagos no son esenciales para la inducción de inmunidad ni son necesarios en la fase efectora en este sistema tumoral. Las células CD8, por otro lado, son críticamente importantes en todas las fases de la respuesta a gp96-Ig secretora.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula cancerosa humana recombinante transfectada con una construcción que expresa una proteína de choque térmico modificada en la célula, en la que la proteína de choque térmico modificada (i) se secreta por una célula en la que se expresa y se asocia no covalentemente con un péptido antigénico; (ii) carece de una secuencia de retención en retículo endoplásmico presente en la proteína de choque térmico no modificada; y (iii) comprende una etiqueta peptídica.
2. Una célula cancerosa humana recombinante transfectada con una construcción que expresa una proteína de choque térmico modificada en la célula, en la que la proteína de choque térmico modificada (i) se secreta por una célula en la que se expresa y se asocia no covalentemente con un péptido antigénico; (ii) comprende una etiqueta peptídica; y (iii) comprende un péptido líder no presente en la proteína de choque térmico no modificada.
- 10 3. Una célula cancerosa humana recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la proteína de choque térmico modificada se expresa mediante un vector basado en papilomavirus bovino.
4. Una célula cancerosa humana recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la célula cancerosa humana recombinante es una célula de carcinoma pulmonar o carcinoma pulmonar microcítico.
- 15 5. Una célula cancerosa humana recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la proteína de choque térmico no modificada es la gp96 humana.
6. Una célula cancerosa humana recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la etiqueta peptídica son las regiones constantes de inmunoglobulina G1 o G2 humana.
- 20 7. Una célula cancerosa humana recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que administrar dicha célula cancerosa humana recombinante a un individuo induce una respuesta inmune en el individuo contra un antígeno tumoral de la célula cancerosa humana.
8. Una composición farmacéutica que comprende una célula cancerosa humana recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 9. Una célula cancerosa humana recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, para su uso como un medicamento.
10. Una célula cancerosa humana recombinante o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicho medicamento es para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer.
11. Una célula cancerosa humana recombinante o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el cáncer es carcinoma pulmonar o carcinoma pulmonar microcítico.
- 30 12. Una célula cancerosa humana recombinante o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que la célula cancerosa humana se proporciona por otro individuo distinto de aquel al que se le administra la célula cancerosa humana recombinante o composición farmacéutica.
- 35 13. Un procedimiento *in vitro* de generación de una célula cancerosa humana recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 o reivindicaciones 3 a 6, que comprende transfectar una construcción que expresa una proteína de choque térmico modificada en una célula cancerosa humana, en el que la proteína de choque térmico modificada (i) se secreta por una célula en la que se expresa y se asocia no covalentemente con un péptido antigénico; (ii) carece de una secuencia de retención en retículo endoplásmico presente en la proteína de choque térmico no modificada; y (iii) comprende una etiqueta peptídica.
- 40 14. Un procedimiento *in vitro* de generación de una célula cancerosa humana recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, que comprende transfectar una construcción que expresa una proteína de choque térmico modificada en una célula cancerosa humana, en el que la proteína de choque térmico modificada (i) se secreta por una célula en la que se expresa y se asocia no covalentemente con un péptido antigénico; (ii) comprende una etiqueta peptídica; y (iii) comprende un péptido líder no presente en la proteína de choque térmico no modificada.

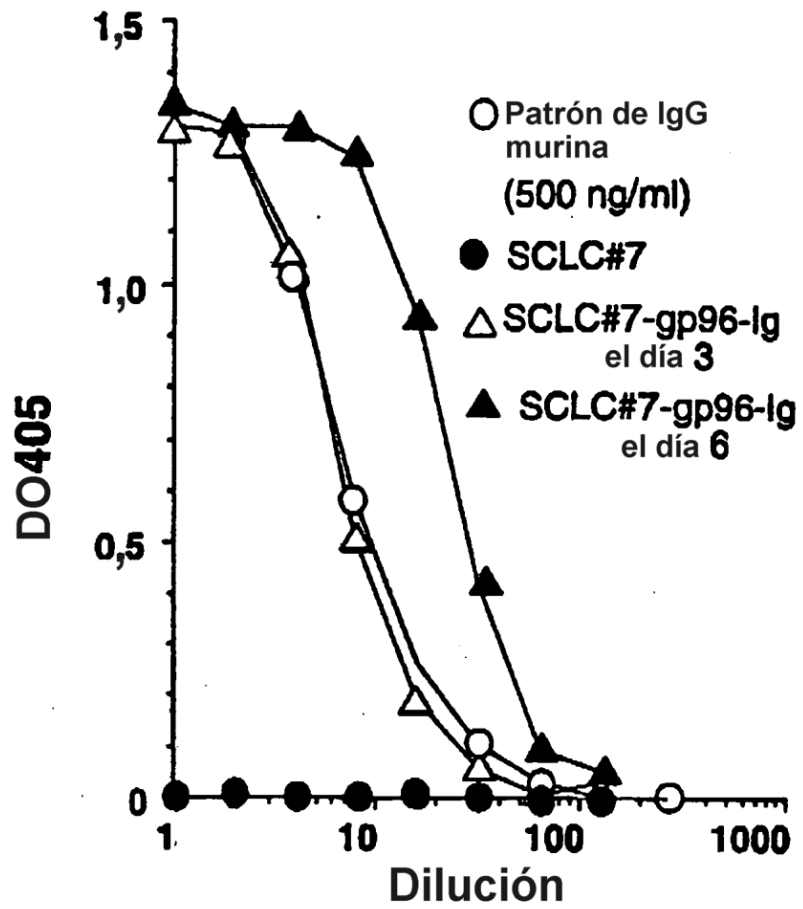


FIG. 1A

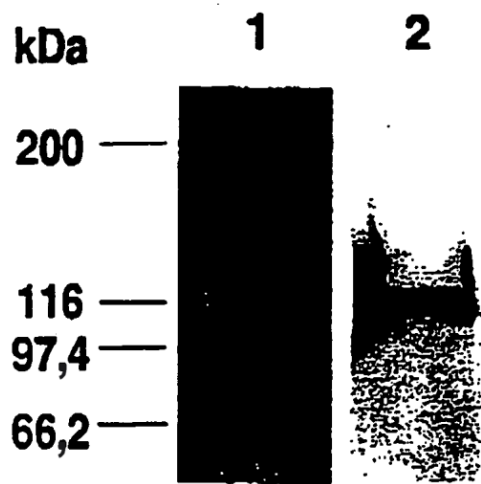


FIG. 1B

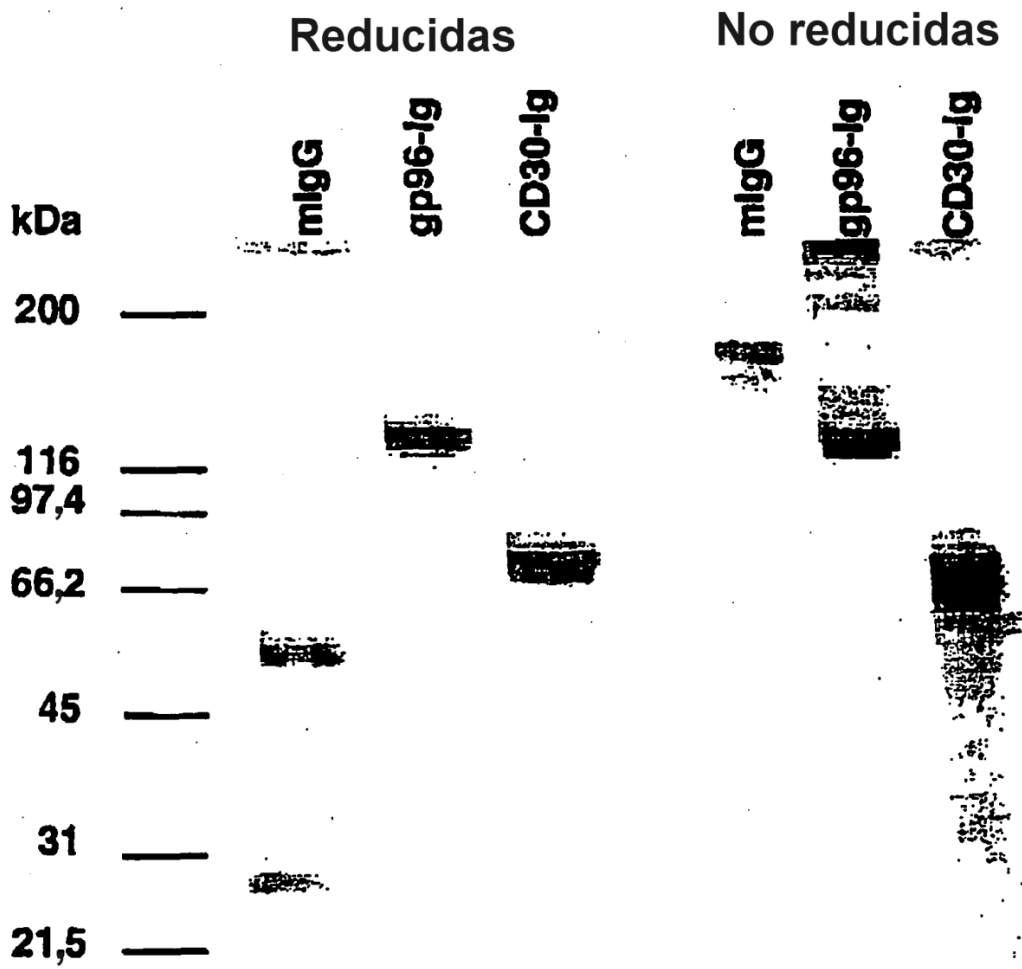


FIG.1C

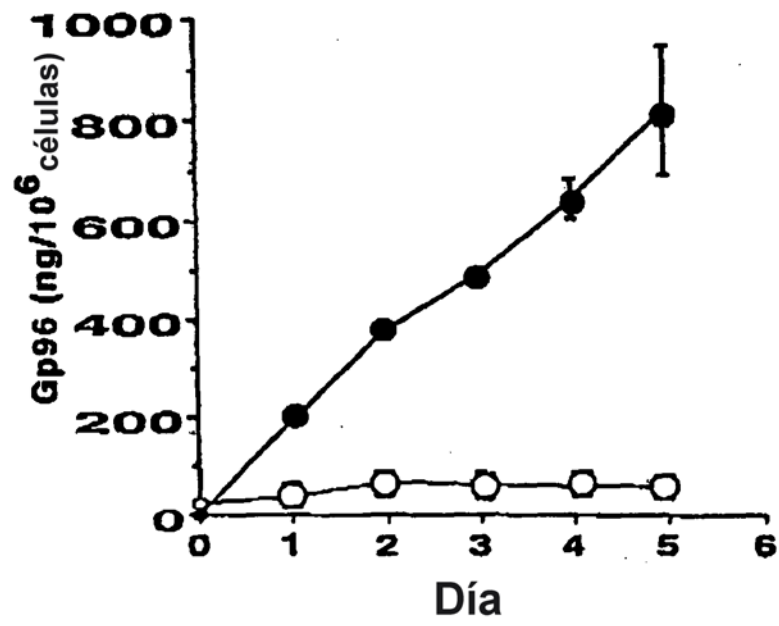


FIG.2A

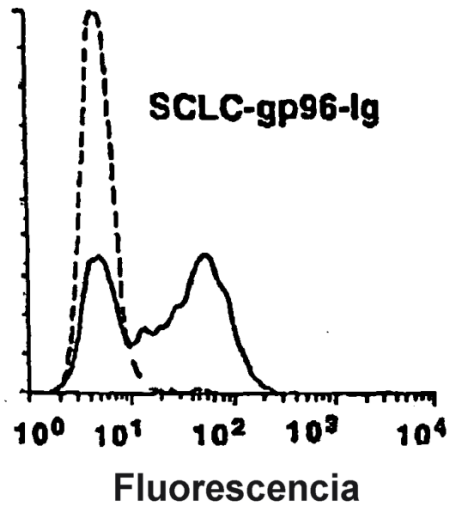


FIG.2B

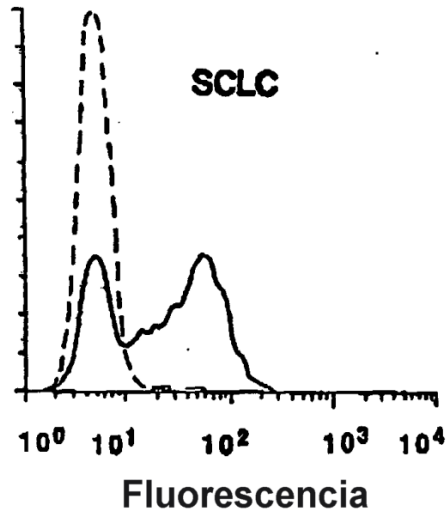


FIG.2C

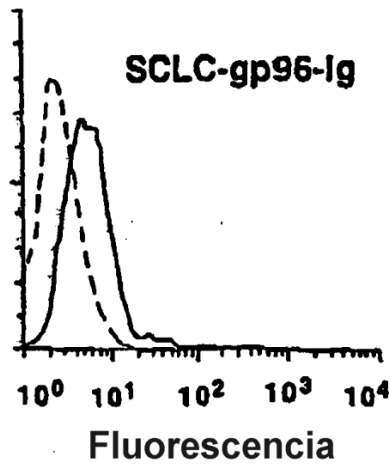


FIG.2D

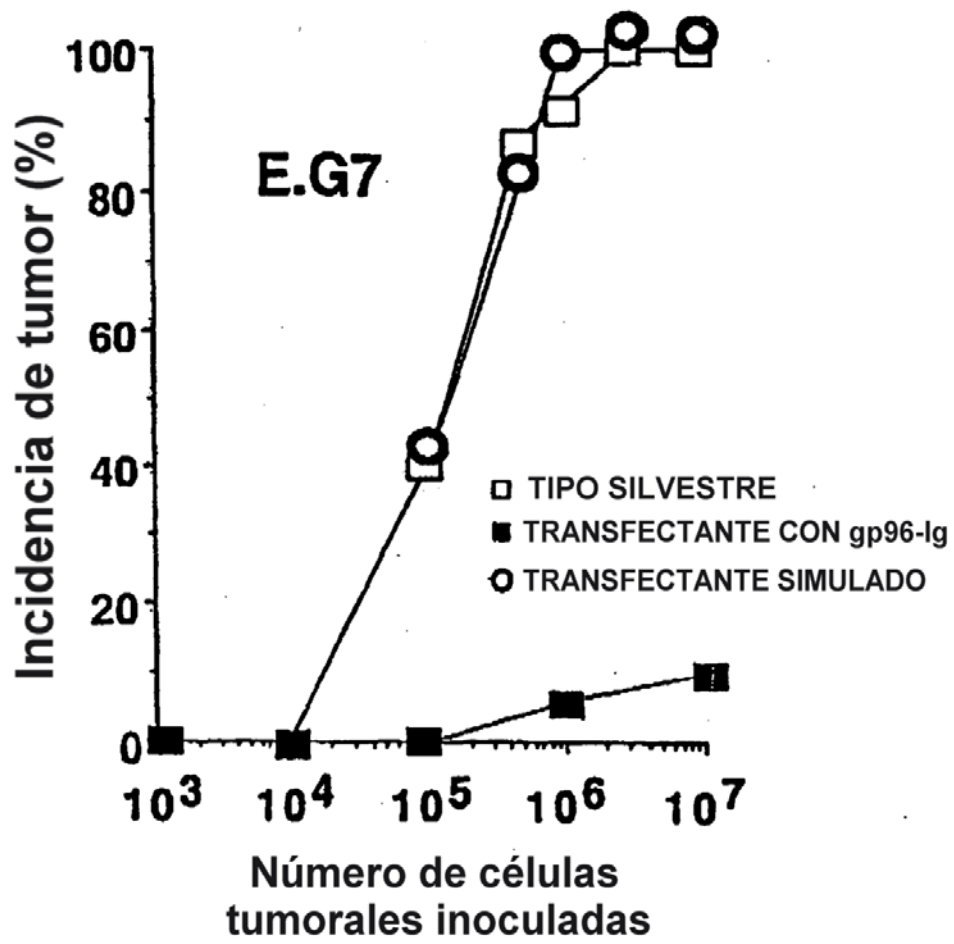


FIG.3A

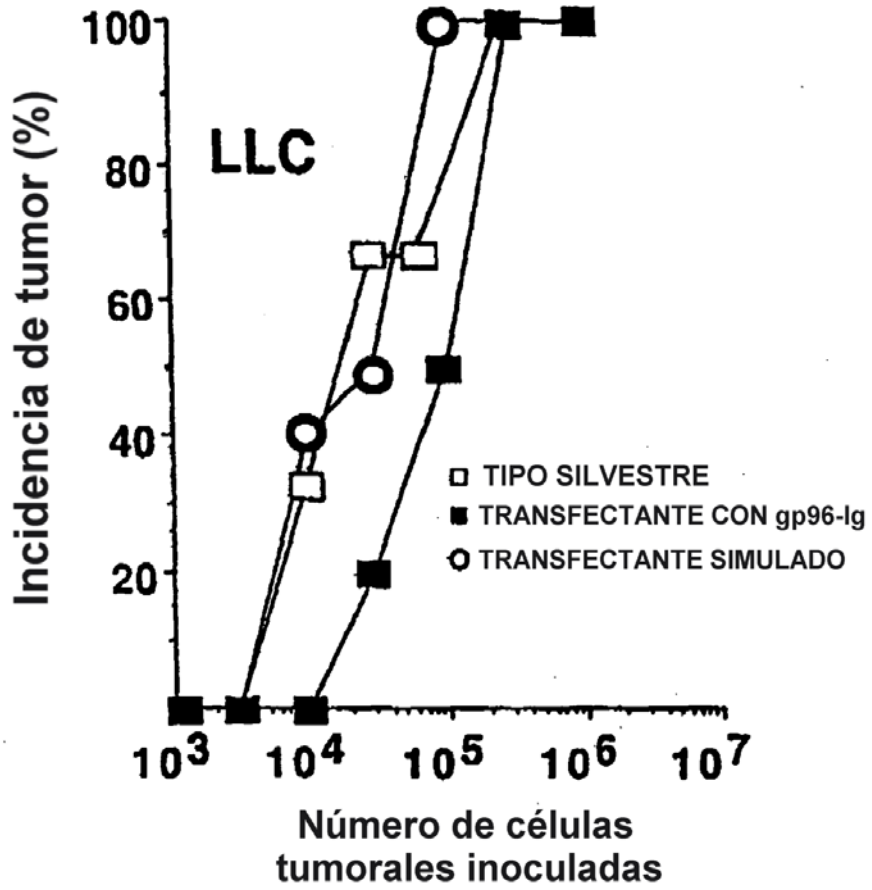


FIG.3B

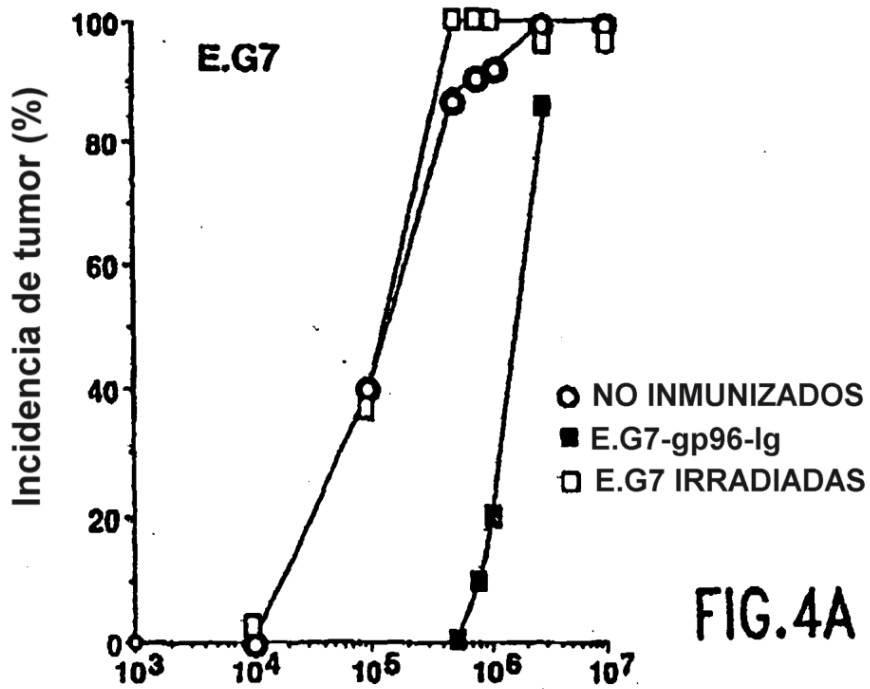


FIG.4A

Número de Células Usadas para la Exposición

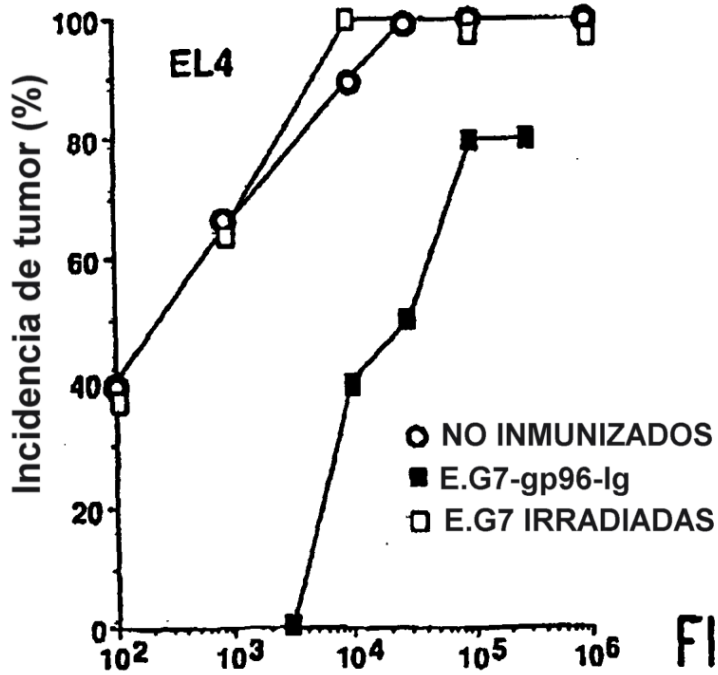
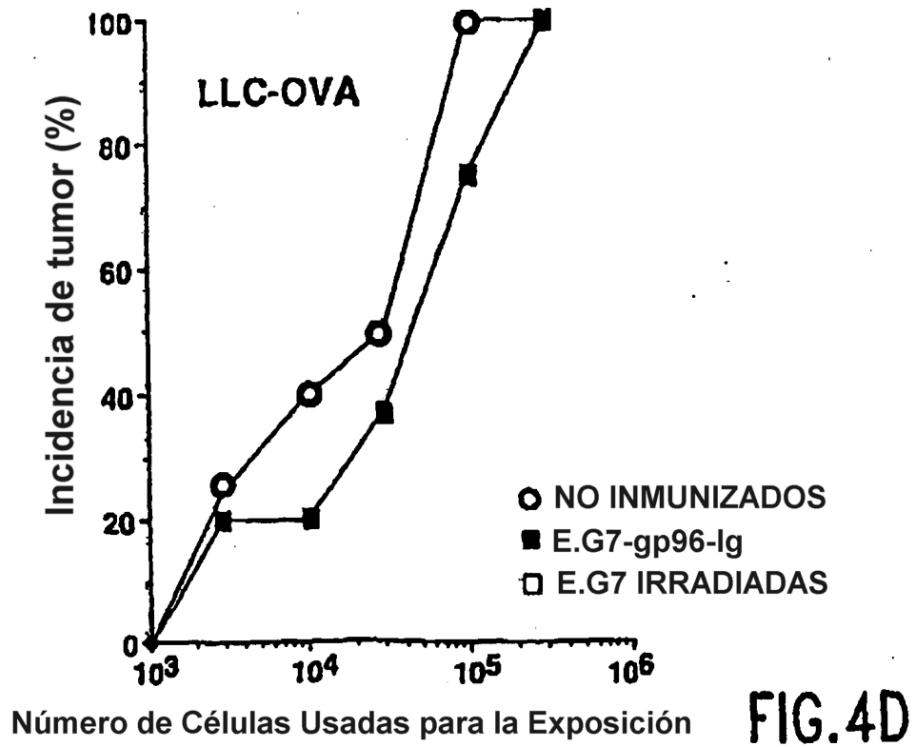
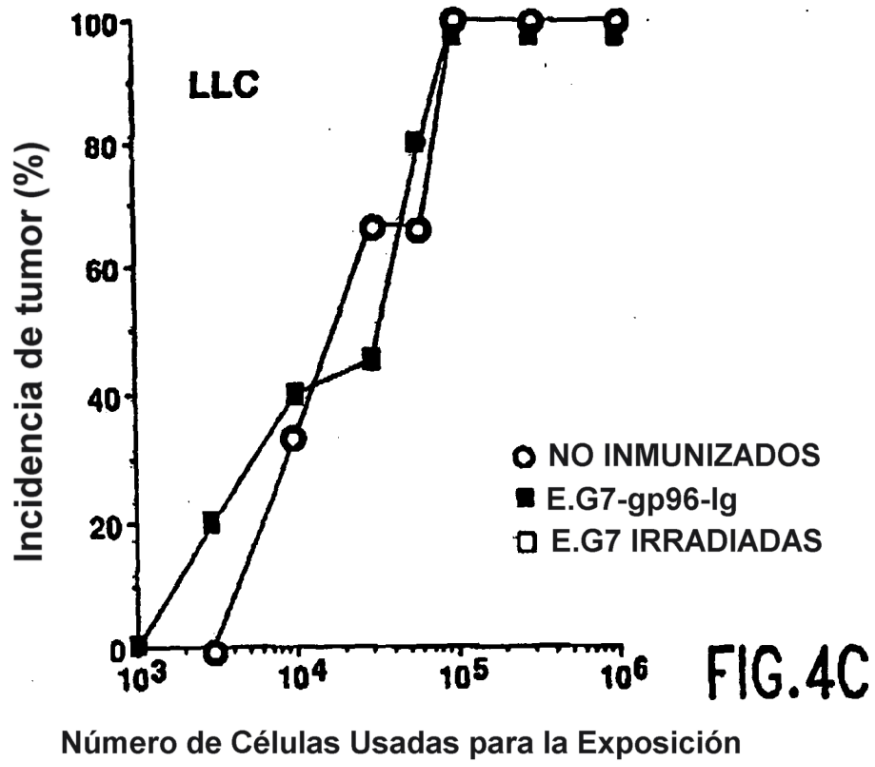


FIG.4B

Número de Células Usadas para la Exposición



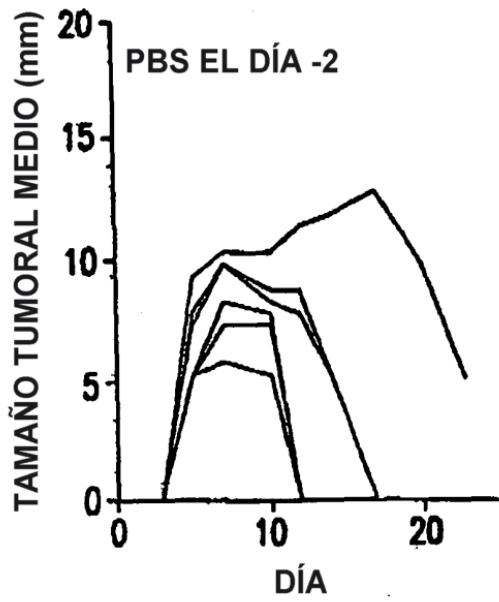


FIG.5A

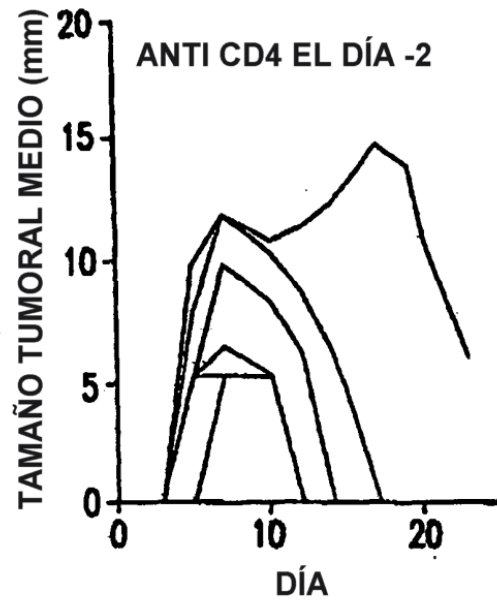


FIG.5B

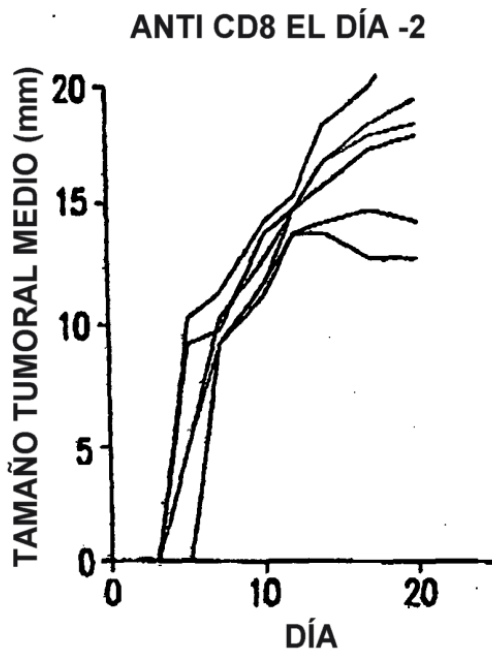


FIG.5C

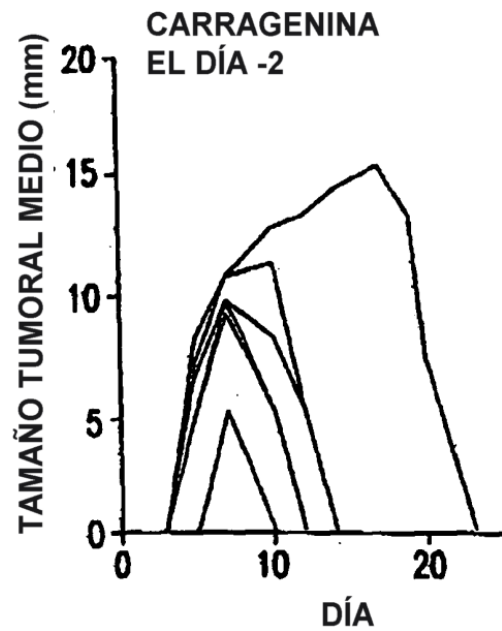


FIG.5D

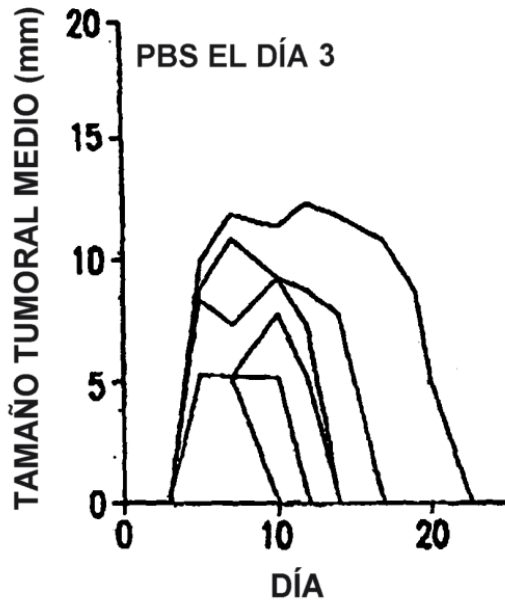


FIG.5E

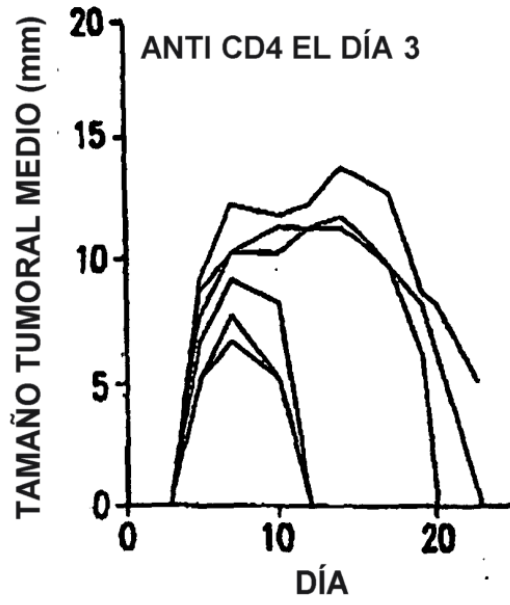


FIG.5F

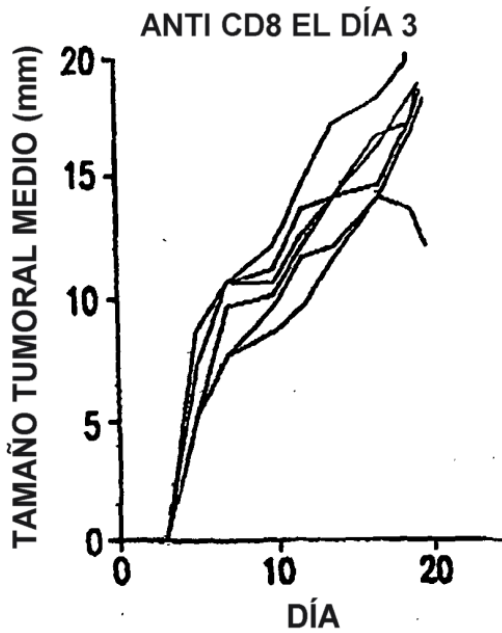


FIG.5G

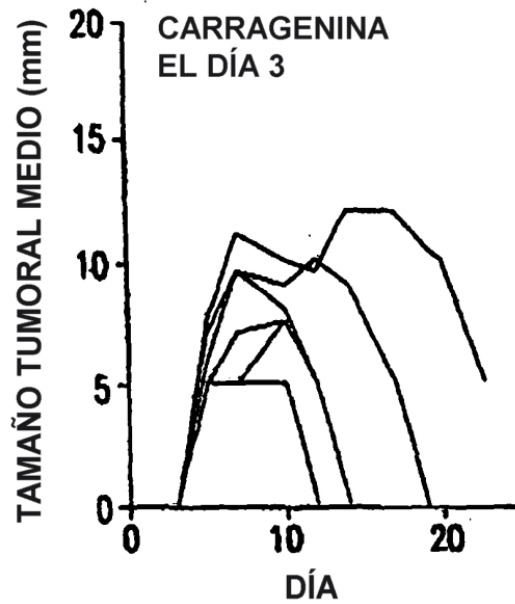


FIG.5H