



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 986**

51 Int. Cl.:

C07K 1/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99960422 .6**

96 Fecha de presentación : **17.11.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1133517**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2001**

54 Título: **Liberación intranuclear de compuestos dirigida por la proteína de choque térmico de 70 kD.**

30 Prioridad: **24.11.1998 US 109872 P**

73 Titular/es: **Bristol-Myers Squibb Company**
P.O. Box 4000
Princeton, New Jersey 08543-4000, US

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.11.2009

72 Inventor/es: **Fujihara, Sheri, M. y**
Nadler, Steven, G.

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.11.2009

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 327 986 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

Liberación intranuclear de compuestos dirigida por la proteína de choque térmico de 70 kD.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la liberación intracelular, preferiblemente la liberación intranuclear, de compuestos usando la proteína de choque térmico Hsp70

10 **Antecedentes de la invención**

Las proteínas de choque térmico ("Hsp") son una familia de proteínas moleculares de la chaperona de las que se sabe desde hace mucho tiempo que juegan papeles esenciales en una multitud de procesos intra e intercelulares, que incluyen la síntesis y plegamiento de las proteínas, el tráfico vesicular, y el procesamiento y presentación de antígenos. Las Hsp están entre las proteínas más conservadas conocidas, y transportan muchas de sus actividades reguladoras mediante las interacciones proteína-proteína. Hsp70 es un miembro de la familia de las proteínas de choque térmico (Milner, C.M. y Campbell, R.D. Immunogenetics 32: 242-251 (1990); N° de Acceso del Genbank M59828). Una de las funciones mejor caracterizadas de Hsp70 es ayudar en las translocaciones de las proteínas a través de las membranas intracelulares en diferentes compartimentos de la célula.

Se ha informado de la actividad de transporte intracelular de las proteínas víricas tales como la proteína estructural VP22 de VHS-1 (Elliott, y col., (1997) Cell 88: 223-233) y la proteína Tat de VIH (Vives, y col., (1997) J. Biol. Chem. 272: 16010-16017), así como de las secuencias de péptidos derivadas del factor de crecimiento de los fibroblastos del homeodominio de Antennapedia (Hawiger, (1997) Curr. Opin. Immun. 9: 189-194), y más recientemente del neuropéptido galanina (Pooga, y col., (1998) FASEB J. 12: 67-77). Se ha demostrado también la liberación de los sustratos de las proteínas de alguno de estos péptidos de transporte (Phelan, y col., (1998) Nature Biotechnology 16: 440-443; Fawell, y col., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 664-668; Rojas, y col., (1998) Nature Biotechnology 16: 370-375).

Las Hsp sirven también numerosas funciones clave en la respuesta inmune, y en los últimos años ha aumentado el interés en la caracterización de la naturaleza de las Hsp en la generación de la inmunidad protectora. Una serie de estudios recientes (Roman, y col., (1996) Immunology 88: 487-492; Suzue, y col., (1996) J. Immunol. 156: 873-879) demostró que la Hsp70 podría actuar como una proteína vehículo para permitir la unión al péptido o al sustrato de la proteína para entrar en el compartimiento endosómico y acceder posteriormente a la ruta de procesamiento de MHC de tipo II por los antígenos exógenos. Dicho tratamiento con los complejos Hsp70-péptido o las proteínas de fusión Hsp 70 podría estimular las respuestas de las células T proliferativas cargo-específicas. Sin embargo, otros experimentos que usaron Hsp70 derivada de células cancerosas dieron como resultado respuestas CTL antitumorales específicas (Udono, y col., (1993) J. Exp. Med. 178: 1391-1396) sugirieron que las Hsp usaron la ruta de procesamiento de MHC de tipo I. Estos datos implican que Hsp70 era capaz de cruzar la membrana plasmática y entrar en el compartimiento citoplásmico de las células intactas. Estudios anteriores (Hightower, y col. (1989) J. Cell Physiol. 138: 257-266) informaron de la liberación de Hsp de las células axonales mediante un mecanismo no dependiente de choque térmico, lo que apoya la observación de que algunos miembros de la familia Hsp pueden cruzar las membranas plasmáticas de algunas células.

Aunque los anteriores estudios implican una capacidad de translocación de la membrana plasmática para Hsp70, dicha actividad no se ha demostrado directamente. No se ha demostrado si Hsp70 podría utilizarse o no para liberar las proteínas a través de las membranas plasmáticas y nucleares. Hay una necesidad de liberar compuestos, tales como proteínas o ADN, en los núcleos celulares para modular la actividad celular.

Los solicitantes han demostrado que la proteína de choque térmico de 70 KD humana puede translocarse a través de las membranas celulares para alcanzar rápidamente la entrada citoplásmica y nuclear. Además, las proteínas quiméricas compuestas por péptidos Hsp70 fusionados con los aminoácidos 37-409 de la subunidad p50 de NF- κ B (Meyer, R., y col., PNAS 88: 966-970 (1991), N° de Acceso del Genbank M58603) presentan también esta propiedad de translocación. Aunque se ha informado de la actividad celular importante de diversos péptidos, el transporte intranuclear requiere generalmente la presencia de secuencias de localización nuclear específicas ("NLS"). Aunque se sabe que el choque térmico induce un aumento de la síntesis y la translocación nuclear de la proteína de choque térmico endógena tras la activación del factor de choque térmico, los solicitantes demuestran que la localización nuclear de la proteína de choque térmico exógena puede aparecer sin choque térmico previo. Los solicitantes han demostrado también que las propiedades de transporte y localización nuclear de Hsp70 están retenidas en el interior de un fragmento C terminal de 90 aminoácidos, se ha demostrado el transporte intranuclear satisfactorio utilizando un fragmento C terminal así como fragmentos mayores que abarcan más de una región de unión con el péptido. El presente documento es la primera evidencia que establece la capacidad de las proteínas de fusión Hsp70 exógenas para cruzar la membrana celular, alcanzar la entrada nuclear y ejercer una función biológica.

Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un vehículo para la liberación de moléculas con función biológica en los compartimentos celular y nuclear. Una realización preferida de la presente invención utiliza Hsp70, o un fragmento de Hsp70 tal como se describe en el presente documento, como vehículo para dirigir la liberación de moléculas no invasivas, tales como proteínas o ADN, que pueden modular la expresión génica.

Resumen de la invención

La proteína de choque térmico de 70 KDF (Hsp70) es una proteína ubicua muy conservada implicada en el chaperonado de las proteínas en diversos orgánulos celulares. Los solicitantes demuestran en el presente documento que cuando se añade exógenamente a las células, Hsp70 se importa fácilmente al interior de ambos compartimentos citoplásmico y nuclear. Los solicitantes han demostrado Hsp70 se puede usar para chaperonar compuestos al interior de una célula o células. Hsp70 se usó para liberar NF- κ B, un regulador transcripcional clave de las respuestas inflamatorias, al compartimiento nuclear. Los solicitantes demuestran en el presente documento que una proteína de fusión compuesta por un péptido C terminal de Hsp70 y los aminoácidos 37-409 de la subunidad p50 de NF- κ B dirigida al núcleo de células, se uniría al ADN específicamente, y activaría la expresión de la Ig kappa y la producción de TNF α . La invención de los solicitantes abarca el uso de Hsp70 como vehículo para la liberación intracitoplásmica e intranuclear de proteínas o ADN para modular la expresión génica y controlar de esta manera las respuestas inmunes.

Descripción de las figuras

la fig. 1 muestra diversos tipos de células que presentan actividad de recaptación de Hsp70 diferencial. Se trataron diversas células con 10 μ g/ml de Hsp70-FITC añadidos a los medios de cultivo. Se tiñeron células de la sangre periférica humana con anti-CD 14-PE a 37° como marcador de células monocíticas, anti-CD19-PE de células B, o anti-CD3-PE de células T. Tras una hora de incubación a 37°C, se lavaron las células en PBS, se fijaron en paraformaldehído al 2%, se lavaron de nuevo y se volvieron a suspender en PBS para la visualización por microscopía de barrido de láser confocal. Se usaron cantidades equimoleculares de BSA-FITC en experimentos paralelos como control. La fig. 1A muestra células 70Z/3 + Hsp70-FITC, la fig. 1B muestra células 70z73 + BSA-FITC; la fig. 1C muestra las PBL teñidas con anti-CD14-PE + Hsp70-FITC, la figura 1D muestra las PBL teñidas con anti-CD14-PE + BSA-FITC; la fig. 1E muestra las PBL teñidas con anti-CD 19-PE + Hsp70-FITC; y las fig. 1F muestra las células T de la sangre periférica teñidas con anti-CD3-PE + Hsp70;

la fig. 2 muestra la cinética de la recaptación de Hsp70. La fig. 2a muestra la cinética de recaptación de Hsp70-FITC por las células 70Z/3. Las células se incubaron a 37°C varias veces con Hsp70-FITC 1 μ M en RPMI completo. Las células se lavaron una vez en PBS para separar la Hsp70-FITC libre, a continuación se volvieron a suspender en PBS y se analizaron mediante fluorímetro. Los puntos fueron experimentales y la curva se ajustó mediante un programa de regresión modificado (XILfit). La fig. 2B muestra la dosis efecto en la recaptación de Hsp70 por las células 70Z/3. Se incubaron las células durante una hora a 37°C con diversas concentraciones de Hsp70-FITC, a continuación se lavaron y analizaron como en (A);

la fig. 3 muestra que la recaptación de Hsp70-FITC no se vio afectada por azida pero se inhibió a 4°C. Las células 70Z/3 fueron tanto no tratadas (figura 3A) como pretratadas durante 30 minutos con azida de sodio al 0,05% (figura 3B) antes de la incubación con Hsp70-FITC a 37°C, o se preincubaron a 4°C durante 30 minutos antes de la adición de Hsp70-FITC y una hora más de incubación a 4°C (figura 3C). Se añadió BSA-FITC a las células durante 1 hora a 37°C como control (figura 3D). La Hsp70-FITC internalizada no se localiza simultáneamente con transferrinas. Se trataron las células con Hsp70-FITC y transferrina conjugada con Rojo Texas, durante una hora a 37°C (figura 3E);

la fig. 4 muestra el transporte de las proteínas de fusión en el citoplasma y el núcleo. Las proteínas de fusión marcadas con FITC están constituidas por cualquiera de los aminoácidos C terminales 244 (Hsp 70/28-p50) ó 92 (Hsp70/10-p50) de Hsp70, fusionados con los aminoácidos 37-409 de la subunidad p50 de NF- κ B, se transportaron en las células 70Z/3. Las células 70Z/3 se trataron con Hsp70-FITC (figura 4A), Hsp70/28-p50-FITC (figura 4B), Hsp70/10-p50-FITC (figura 4C) de longitud completa o BSA-FITC como control (figura 4D) durante 1 hora a 37°C según se describe. Se visualizó la localización intracelular de las proteínas de fusión mediante microscopía de barrido de láser confocal.

la fig. 5. demuestra que la Hsp70 o la Hsp70-p50 intracelular internalizada permanecieron estables durante hasta 24 horas. Las células se trataron con cualquiera de Hsp70-FITC (figura 5A) o Hsp70/28-p50-FITC (figura 5B) de longitud completa, durante una hora antes el lavado y la incubación adicional a 37°C en tiempos crecientes. Se cosecharon las células en los puntos temporales indicados, se lisaron en tampón de muestra Laemmli, y las proteínas del lisado celular completo se separaron mediante SDS-PAGE. Se sometieron los geles a análisis con fluorímetro. Hilera 1: células no tratadas; hilera 2: sin rastreo; hilera 3. 1 hora de rastreo; hilera 4: 2 horas de rastreo; hilera 5: 6 horas de rastreo; hilera 6: 24 horas de rastreo; hilera 7: 4 días de rastreo.

la fig. 6. muestra que las proteínas de fusión Hsp70-p50 internalizadas presentaron actividad de unión con el ADN. Se trataron células 70Z/3 tal como se ha indicado durante una hora antes de la lisis y la generación de extractos nucleares. Se llevó a cabo el EMSA y se identificaron los complejos de unión con el ADN específicos mediante el ensayo de superdesplazamiento con los anticuerpos indicados. Fig. 6A, hilera 1: células control no estimuladas; hilera 2: tratadas con LPS; hilera 3: tratadas con Hsp70-p50; hilera 4: extractos tratados con Hsp70-p50 competidos con oligo NF- κ B sin marcar, hilera 5, lo mismo que la hilera 4 pero competido con oligooctámero sin marcar. Fig. 6B, hilera 1; tratadas con LPS; hilera 2 tratadas con LPS y superdesplazadas con anti-p50; hilera 3: anti-p65; hilera 4: anti-c-rel; hilera 5: anti-Hsp70; Hilera 6-10, lo mismo que en las hilera 1-5 pero usando extractos tratados con Hsp70-p50.

la fig. 7 muestra que las células tratadas con Hsp70 quedaron activadas para expresar la Ig kappa superficial y producir TNF α . (Figura 7A) se trataron células 70Z/3 con 10 ng/ml de LPS o 30 μ g/ml de Hsp70/10-p50 durante la noche antes de lavar y teñir con anti-kappa-FITC y análisis FACS. (Fig. 7B) linfocitos de sangre periférica humana se trataron con 5 ng/ml de LPS o 40 μ g/ml de Hsp70/10-p-50 o Hsp70/28-p50 durante 6 horas, y los sobrenadantes se cosecharon y analizaron para los niveles de TNF α mediante ELISA.

Descripción detallada de la invención

La presente invención desvela un procedimiento *in vitro* para liberar un compuesto seleccionado entre el grupo constituido por una proteína, un péptido, un polinucleótido o un agente terapéutico en el interior del núcleo de una célula o células, comprendiendo dicho procedimiento unir dicho compuesto con Hsp70, o un fragmento de Hsp70 que comprende una secuencia de aminoácidos según se muestra en la SEC DE ID N°: 2 o la SEC DE ID N°: 3 para formar un complejo Hsp70, y proporcionar de manera exógena dicho complejo Hsp70 a dicha célula o al entorno que rodea dicha célula de tal manera que el complejo Hsp70 se importa al núcleo de dicha célula o células.

Se desvela el uso de un complejo Hsp70 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del rechazo al trasplante, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, cáncer, o una enfermedad vascular en un paciente, en el que un compuesto se une covalentemente con Hsp70, o un fragmento de Hsp70 que comprende una secuencia de aminoácidos según se muestra en la SEC DE ID N°: 2 o la SEC DE ID N°: 3, para formar el complejo Hsp70 y en el que dicho complejo se va a importar en el núcleo de una célula o células.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un complejo Hsp70, comprendiendo dicho complejo Hsp70 una primera porción y una segunda porción, comprendiendo dicha primera porción la proteína Hsp70, o un fragmento de Hsp70 que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC DE ID N°: 2 o la SEC DE ID N°: 3; y comprendiendo dicha segunda porción una proteína nuclear, péptido nuclear, o polinucleótido.

La presente invención demuestra que la proteína de choque térmico Hsp70 es internalizada por las células en el citoplasma y el núcleo de una manera específica del tipo celular. Aunque el mecanismo de recaptación es desconocido, los datos sugieren que la unión y la internalización de Hsp70 son dependientes de la energía e implica un receptor de alta capacidad.

La observación de que existen formas de Hsp70 asociadas a la superficie celular y segregadas (Multhoff, y col., (1996) Cell Stress & Chaperones 1: 167-176) sugiere que esta proteína puede funcionar en la comunicación célula-célula, quizás como un medio de transferir una protección celular a los estresores ambientales regulando la transcripción. De hecho, algunos informes recientes han descrito una interacción física de Hsp70 con los dominios de transactivación de varios factores de transcripción en el interior del núcleo. Por ejemplo, la Hsp70 se puede unir directamente a los dominios de transactivación de ambas HSF (factor de choque térmico) (Shi, y col., (1998) Genes Dev. 12: 654-666), dando como resultado la inhibición de la transcripción génica, y el supresor del tumor de Wilm (Maheswaran, y col., (1998) Genes Dev. 12: 1108-1120), que da como resultado la supresión de la proliferación celular. Estos datos y otros implican un papel de Hsp70 en la regulación de los factores de transcripción y posiblemente de otras proteínas nucleares. Estos datos complementan otros que han demostrado que Hsp70 como chaperona citoplásmica puede interactuar con factores de transcripción tales como el propio NF κ B así como una miríada de cofactores tales como Hip, Hop, Hsp40, Hsp90, BAG-1 y otros (Demand, y col., (1998) Mol. Cell. Biol. 18: 2023-2028). Así, se ha informado de la liberación y transferencia intercelular de la Hsp70 exportada en células gliales y axonales (Hightower, y col., (1989) J. Cell Physiol. 138: 257-266); y se ha demostrado la acumulación de Hsp70 en una variedad de líneas celulares humanas tanto mediante choque térmico como mediante transferencia de liposomas para aumentar la supervivencia celular y proteger de muerte celular apoptótica (Lasunskaja, y col., (1997) Apoptosis 2: 156-163). La liberación de proteínas de choque térmico de las células bajo condiciones duras o de daño puede ser un mecanismo homeostático para la transferencia de una respuesta protectora frente al estrés a las células vecinas que sean incapaces de establecer dicha respuesta. Además, informes recientes que describen la capacidad de las moléculas de Hsp70 unidas a péptidos de inducir actividad antitumoral o antivírica así como el desarrollo de memoria de los CTL apoyan la noción de que estas proteínas pueden funcionar para transportar una respuesta inmune protectora proporcionando una función de presentación del antígeno (Blachere, y col., (1997) J. Exp. Med. 186: 1315-1322; Ciupitu, y coll., (1998) J. Exp. Med. 187: 685-691). Los solicitantes sugieren que la(s) Hsp70 endógena(s) (y asociada(s) a péptidos o proteínas) se libera(n) al entorno mediante células infectadas o apoptóticas. Estos complejos de proteínas Hsp70 quedarían disponibles posteriormente para las células adyacentes que pueden tener comprometida su capacidad inmune, y actúan como un estímulo para espolear o reforzar la respuesta inmune.

Los solicitantes han demostrado la recaptación celular y nuclear eficaz así como la estabilidad intracelular a largo plazo de las proteínas de fusión Hsp70 suministradas de manera exógena por una variedad de tipos celulares. Esta actividad de transporte rápida y estable tiene implicaciones importantes para la utilidad de los péptidos derivados de Hsp70 como vehículos de liberación de agentes terapéuticos en el citoplasma y el núcleo en los que pueden permanecer localizados durante largos períodos de tiempo. Como la manipulación del proceso de importación en particular se vuelve un objetivo cada vez más interesante para el control regulado de la expresión génica (Fujihara, y col., (1998) Biochem. Pharm. 56: 157-161), se cree que el énfasis futuro se situará en el desarrollo de medios más potentes de liberación intracelular dirigida. El uso de Hsp70 como sistema de liberación tiene numerosas ventajas sobre otras proteínas candidatas anteriormente descritas, que incluyen el hecho de que la proteína es de origen humano y por tanto

no contiene material extraño (es decir, vírico o de insectos) y potencialmente inmunogénico. El uso de fragmentos solubles de Hsp70 reducirá potencialmente la inmunogenicidad todavía más. Ya que Hsp70 es una proteína abundante muy expresada, sería probablemente bien tolerada en los seres humanos, y de hecho, juega ya un papel en la respuesta inmune. Además, se observó que la especificidad por el tipo celular permitiría el direccionamiento de los compuestos a células específicas del sistema inmune para un control regulador más efectivo. Y finalmente, la liberación nuclear dirigida de larga vida y preferente de los sustratos de las proteínas puede proporcionar protección de la proteólisis citoplásmica, los datos de los inventores apoyan el uso potencial de las secuencias de Hsp70 como herramientas novedosas para liberar moléculas que modulan la expresión génica y proporcionar posteriormente control inmunosupresor o inmunoestimulador.

Los solicitantes desvelan en una realización de la presente invención una proteína de fusión que comprende un fragmento de Hsp70 unido a los aminoácidos 37-409 de las subunidad p50 de NF- κ B (las proteínas de fusión se denominan en el presente documento como Hsp70-p50, Hsp70/28-p50, o Hsp70-10-p50). Aunque se cree normalmente que los homodímeros p50 de NF- κ B actúan como represores transcripcionales de NF- κ B en la mayor parte de tipos de células debido a la ausencia de un dominio de activación C terminal, los solicitantes observaron que los episodios biológicos adelantados no reflejan un efecto dominante negativo de la proteína de fusión sobre la activación transcripcional. Existen numerosas explicaciones posibles para la transactivación inducida por Hsp70-p50 observada. En primer lugar, la secuencia de la proteína de choque térmico, específicamente el dominio EEVD, puede contener por sí mismo la actividad de transactivación. Se sabe que Hsp70 se une al factor de choque térmico en el núcleo e interfiere con su actividad de transactivación mediante el dominio EEVD. Puesto que la secuencia de Hsp70 en los ejemplos siguientes se clonó respecto de los aminoácidos C terminales 37-409 de la secuencia p50 de NF- κ B (SEC DE ID N°: 1, el dominio EEVD está potencialmente disponible para proporcionar la transactivación, o incluso para interactuar con otros cofactores celulares o nucleares. El análisis más estrecho del complejo nuclear puede dar como resultado indicaciones de otros posibles componentes con actividades transcripcionales. En segundo lugar, los homodímeros p50 pueden simplemente presentar actividad de transactivación en circunstancias concretas. Fujita, y col. ((1992) Genes Dev. 6: 775-787) ensayaron diversos homo y heterodímeros de subunidades NF- κ B para la activación transcripcional *in vitro* y determinaron que la adición de p50 solo en algunas mezclas de transcripción dio como resultado una estimulación transcripcional significativa. Atribuyen esta activación a las diferencias en la estructura fina de la secuencia de nucleótidos en el interior de los motivos κ B. de manera interesante, este grupo observó una estimulación de la transcripción por los homodímeros p50 cuatro veces mayor que la del control usando el motivo de la secuencia Ig κ . Estos datos corresponderían a la activación que los autores observaron en estudios que analizaban la expresión de la Ig kappa superficial. En tercer lugar las subunidades Hsp70-p50 pueden reclutar otros factores de transactivación en el complejo de unión con el ADN que no se detectaron aún.

Por tanto, la presente invención abarca el uso de Hsp70, o un fragmento de Hsp70 que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC DE ID N° 2 o la SEC DE ID N° 3; para modular la actividad celular, preferiblemente, modular la actividad nuclear en una célula o células, por ejemplo, la actividad de los factores de transcripción. El término “actividad nuclear” abarca la transcripción de moléculas de ácido nucleico en la célula. El término “modular” abarca la potenciación, disminución, activación o inactivación de la actividad celular. La proteína Hsp70 o un fragmento de la misma como se define anteriormente se puede usar sola para modular la actividad celular mediante la transferencia en el citoplasma y/o el núcleo de una célula, para tratar los trastornos asociados con Hsp70. Los “trastornos asociados con Hsp70” se refieren a cualquier trastorno o estado de enfermedad en el que Hsp70 juega un papel regulador en la ruta metabólica de este trastorno o enfermedad. Según se usa en el presente documento, el término “tratamiento” se refiere al alivio de los síntomas de un trastorno concreto en un paciente, la mejora de una medida verificable asociada con un trastorno concreto, o la prevención de una respuesta inmune concreta (tal como el rechazo al trasplante). El término “paciente” se refiere a un mamífero, preferiblemente un ser humano.

Adicionalmente, la presente invención abarca el uso de Hsp70, o un fragmento de Hsp70 según se define anteriormente, como una chaperona para transportar uno o más compuestos al interior de una célula. Hsp70 o un fragmento de la misma se une a un compuesto para formar un complejo (denominado en el presente documento como “complejo Hsp70” que incluye Hsp70 o el fragmento de la misma según se define anteriormente, o cualquier compuesto asociado con o unido con la proteína o fragmento de Hsp70 según la definición anterior de la misma). El complejo Hsp70 se proporciona a continuación a una célula o células o al entorno que rodea una célula o células, de tal manera que el complejo Hsp70 se transporta al interior del citoplasma y/o al núcleo de la célula o células. Los compuestos que se pueden unir con la proteína o un fragmento de Hsp70 según se define anteriormente incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, y pequeñas moléculas. “Ácidos nucleicos” o “polinucleótidos” incluyen nucleótidos individuales así como secuencias de ADN y ARB o fragmentos de las mismas.

Los estados de enfermedad que se pueden tratar mediante los fragmentos de Hsp70 según la definición anterior de la misma, y/o los complejos Hsp70 de la presente invención incluyen el rechazo al trasplante y las enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes juvenil, asma, y enfermedad inflamatoria del intestino, así como las enfermedades inflamatorias, cáncer, enfermedades de replicación vírica y enfermedades vasculares.

Por ejemplo, los complejos Hsp70 y las composiciones farmacéuticas de la presente invención son útiles en el tratamiento del rechazo al trasplante (por ejemplo, riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas (células de islotes), médula ósea, córnea, intestino delgado e injertos de piel, y xenoinjertos de válvulas cardíacas) y enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes juvenil, asma, enfermedad inflamatoria del intestino

(enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), lupus, diabetes, miastenia grave, psoriasis, dermatitis, eczema, seborrea, inflamación pulmonar, uveítis de los ojos, hepatitis, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, síndrome de Behcet o Sjorgen (ojos /boca secos), anemia perniciosa o inmunohemolítica, insuficiencia adrenal idiopática, síndrome autoinmune poliglandular, glomerulonefritis, escleroderma, líquen plano, vitéligo (despigmentación de la piel), tiroiditis autoinmune, y alveolitis, enfermedades inflamatorias tales como osteoartritis, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, asma, síndrome de estrés respiratorio en adultos, así como en el tratamiento de cáncer y tumores, tales como tumores sólidos, linfomas y leucemia, y enfermedades vasculares tales como restenosis, estenosis y arterosclerosis.

También, comprendidas dentro del alcance de la presente invención están comprendidas las composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un complejo Hsp70 que comprende un compuesto que se va a liberar en el citoplasma y o el núcleo de una célula o células. El complejo Hsp70 se puede administrar sólo o con al menos un compuesto activo adicional, y cualquier vehículo, adyuvante o medio. Los “compuestos activos adicionales” abarcan un agente o agentes seleccionados entre el grupo constituido por un inmunosupresor, un agente anticanceroso, un agente antivírico, un agente antiinflamatorio, un agente antifúngico, un antibiótico, o un compuesto de hiperproliferación antivascolar.

El término “vehículo, adyuvante o medio farmacéuticamente aceptable” se refiere a un vehículo, adyuvante o medio que se puede administrar a un sujeto, conjuntamente con un complejo Hsp70 de la presente invención, y que no destruye la actividad farmacológica de la misma. Los vehículos, adyuvantes y medios farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen los siguientes; intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas de liberación de fármacos autoemulsionantes (“SEEDS”) tales como succinato de α -tocopherol polietilenglicol 1000, tensioactivos usados en las formas de dosificación farmacéuticas tales como Tween® u otras matrices de liberación polimérica similares, proteínas de suero tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de sodio, hidrogeno fosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana. Ciclodextrinas tales como α , β y γ -ciclodextrina, o derivados químicamente modificados tales como hidroxialquilciclodextrinas, que incluyen 2 y 3-hidroxipropil- β -ciclodextrinas, u otros derivados solubilizados se pueden usar para potenciar la liberación de los compuestos de la presente invención.

Las composiciones de la presente invención pueden contener otros agentes terapéuticos según se describe a continuación, y pueden formularse, por ejemplo, empleando vehículos o diluyentes sólidos o líquidos adicionales, así como aditivos farmacéuticos de un tipo apropiado para el modo de administración deseado (por ejemplo, excipientes, ligantes, conservantes, estabilizantes, aromas, etc.) según técnicas tales como las bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica.

Se pueden administrar las composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un complejo Hsp70 de la presente invención mediante cualquier medio adecuado, tal como en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos o polvos; por vía sublingual, bucal, parenteral, tal como mediante inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal o técnicas de infusión (por ejemplo, tal como disoluciones o suspensiones acuosas o no acuosas inyectables estériles) por vía nasal tal como mediante inhalación por pulverización, por vía tópica, tal como en forma de crema o pomada, o por vía rectal tal como en forma de supositorios, en formulaciones de dosificación unitarias que contienen vehículos o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden, por ejemplo, administrarse en una forma adecuada para la liberación inmediata o la liberación mantenida. Se puede conseguir la liberación inmediata o la liberación mantenida mediante el uso de composiciones farmacéuticas adecuadas que comprenden los presentes compuestos, o, particularmente en el caso de la liberación mantenida, mediante el uso de dispositivos tales como implantes subcutáneos o bombas osmóticas. Los presentes compuestos Hsp70 se pueden administrar también liposómicamente.

Las composiciones a modo de ejemplo para la administración oral incluyen suspensiones que pueden contener, por ejemplo, celulosa microcristalina para impartir volumen, ácido algínico o alginato de sodio como agente suspensor, metilcelulosa como potenciador de la viscosidad, y agentes endulzantes o aromatizantes tales como los conocidos en la técnica, y comprimidos de liberación inmediata que pueden contener, por ejemplo, celulosa microcristalina, fosfato dicálcico, almidón, estearato de magnesio y/o lactosa y/u otros excipientes, ligantes, extensores, desintegrantes, diluyentes y lubricantes tales como los conocidos en la técnica. Los presentes compuestos se pueden liberar también a través de la cavidad oral mediante administración sublingual y/o bucal. Comprimidos moldeados, comprimidos comprimidos o comprimidos criongelados son las formas a modo de ejemplo que se pueden usar. Las composiciones a modo de ejemplo incluyen aquellas que formulan los presentes complejos de Hsp70 con disolventes que se disuelven rápidamente tales como manitol, lactosa, sacarosa y/o ciclodextrinas. Incluidos también en dichas formulaciones pueden estar excipientes de elevado peso molecular tales como celulosa (Avicel®) o polietilenglicoles (PEG). Dichas formulaciones pueden incluir también un excipiente para ayudar a la adhesión mucosal tal como hidroxipropilcelulosa (HPC) hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), carboximetilcelulosa de sodio (SCMC), copolímero de anhídrido maleico (por ejemplo, Gantrez®), y agentes para controlar la liberación, tales como copolímero poliacrílico (por ejemplo, Carbopol® 934). Se pueden añadir también agentes lubricantes, de deslizamiento, aromatizantes y estabilizantes para facilitar la fabricación y el uso.

Las composiciones a modo de ejemplo para la administración en aerosol o inhalación nasal incluyen disoluciones en disolución salina que pueden contener, por ejemplo, alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes tales como los conocidos en la técnica.

Las composiciones a modo de ejemplo para la administración parenteral incluyen disoluciones o suspensiones inyectables que pueden contener, por ejemplo, diluyentes o disolventes no tóxicos parenteralmente aceptables, tales como manitol, 1,3-butanodiol, agua, disolución de Ringer, una disolución de cloruro de sodio isotónica, u otros agentes dispersantes o humectantes y suspensores adecuados, que incluyen mono o diglicéridos, y ácidos grasos, que incluyen ácido oleico. El término "parenteral" según se usa en el presente documento incluye inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracranial o técnicas de infusión.

Las composiciones a modo de ejemplo para la administración rectal incluyen supositorios que pueden contener, por ejemplo, un excipiente no irritante adecuado, tal como manteca de cacao, ésteres de glicérido o polietilenglicoles sintéticos, que son sólidos a temperaturas ordinarias, pero licuan y o se disuelven en la cavidad rectal para liberar el fármaco.

Las composiciones a modo de ejemplo para la administración tópica incluyen un vehículo tópico tal como PlastibaseTM (aceite mineral gelificado con polietileno).

Una persona normalmente experta en la técnica puede determinar una cantidad "terapéuticamente eficaz" de un complejo Hsp70 de la presente invención, e incluye a modo de ejemplo cantidades de dosificación para un adulto humano de entre aproximadamente 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal de compuesto activo por día, que se puede administrar en una dosis única o en forma de dosis divididas individualmente, tales como entre 1 a 3 veces por día. Se entenderá que se puede variar el nivel de dosis y frecuencia específicos de dosificación para cualquier sujeto concreto y dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la longitud de la acción de este compuesto, la especie, edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto, el modo y tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación del fármaco y la gravedad de la dolencia concreta. Los sujetos que se van a tratar pueden incluir especies de animales, o mamíferos tales como los seres humanos.

Por "terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad necesaria para conseguir un resultado deseado, por ejemplo, el alivio de los síntomas de un trastorno concreto en un paciente, la mejora de una medida verificable asociada con un trastorno concreto, o la prevención de una respuesta inmune concreta. Se entenderá que se puede variar el nivel de dosis y la frecuencia de la dosificación específicos para cualquier sujeto concreto y dependerán de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la longitud de la acción de este compuesto, la especie, edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto, el modo y tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación del fármaco, y la gravedad de la dolencia concreta. Los sujetos que se van a tratar pueden incluir especies animales, o mamíferos tales como los seres humanos.

Los complejos Hsp70 de la presente invención se pueden emplear solos o en combinación entre sí y/u otros agentes terapéuticos adecuados, tales como agentes antiinflamatorios, antiproliferativos, quimioterapéuticos, e inmunosupresores.

Se entiende que los siguientes ejemplos son ilustrativos de una forma de realización de la presente invención y no limitan el alcance de la invención en ningún modo.

Fabricación de Hsp70 recombinante

Se usó el siguiente procedimiento para preparar Hsp70 recombinante. Se generaron las proteínas de fusión Hsp70 por amplificación mediante la PCR de las secuencias de ADN de Hsp70 usando cebadores que correspondían a la secuencia publicada y que incluían los emplazamientos de la endonucleasa de restricción para permitir la clonación dirigida en un vector de expresión procariota, (Life Technologies, Inc.). Se generaron las secuencias p50 de NF- κ B de la misma manera, usando cebadores que correspondían a la secuencia p50 publicada y se clonaron en la dirección 5' (de 5' a) de las secuencias Hsp70 en el mismo vector de expresión. El vector de clonación incluyó una etiqueta His 6x para uso en la purificación de la proteína expresada sobre una columna de metal. Se transformó el ADN en un huésped bacteriano y se indujo la expresión de la proteína usando IPTG. Se purificó la proteína soluble expresada usando las técnicas de purificación por afinidad convencionales y se usó posteriormente en los siguientes experimentos.

Ejemplo 1

El transporte mediando por Hsp70 es específico del tipo celular

Para investigar la localización intracelular de Hsp70 añadida de manera exógena, los inventores marcaron con fluorescencia la proteína Hsp70 de longitud completa y ensayaron su capacidad para quedar internalizada en diversos tipos de células. Se trataron las células con una concentración final de 10 μ g/ml de Hsp70-FITC (o BSA-FITC como

control) durante 1 hora, a continuación se lavaron y fijaron antes del microscopía de barrido de láser confocal. El volumen de Hsp70-FITC intracelular se localizó uniformemente en el núcleo y el citoplasma de células pre-B 70Z/3 de murino, mientras que la importación de BSA-FITC fue despreciable (fig. 1A y 1B). Los inventores observaron recaptación significativa de Hsp70-FITC por los monocitos de la sangre periférica humana, pero no por las células T (figs 1C-1F). De manera interesante, mientras que el modelo de tinción en monocitos de sangre periférica fue a menudo uniforme a través del citoplasma y el núcleo, los inventores señalaron que esto se caracterizó algunas veces mediante tinción puntuada, implicando localización vesicular en el interior del citoplasma. Los solicitantes encontraron que el modelo de tinción específico de los PBL varió según el donante, sugiriendo que el estado de activación celular puede jugar un papel en la eficiencia de la recaptación o la localización intracelular de la Hsp70 exógena. Consistente con esta hipótesis, los inventores encontraron que mientras las células B de la sangre periférica que quedaban eran resistentes a la recaptación, se podrían inducir para transportar la proteína después de 48 horas de activación *in vitro* con anticuerpos anti-CD40 más anti-Ig. Se sabe que este procedimiento de activación de las células B da como resultado la expresión de diversos genes asociados con la diferenciación y proliferación. Por el contrario, la activación de las células T de la sangre periférica por anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 no afecta al transporte de Hsp70. No se observó recaptación intracelular por la línea de células T de Jurkat o la línea celular de fibroblastos HeLa, pero los inventores observaron recaptación eficaz por dos líneas de células B maduras, RAJI y BJAB. Además, los inventores observaron recaptación citoplásmica limitada por dos líneas de células monocíticas, THP-1 y U937, pero sólo después de incubación extendida (6 a 24 horas) con elevadas concentraciones (100 µg/ml) de Hsp70-FITC. Los inventores describen que la actividad de transporte de Hsp70 específica de células B y monocitos es consistente con los informes que proponen un papel para los miembros de la familia de choque térmico Hsp70 en la presentación del antígeno (Manara, y col., (1993) Blood 82: 2865-2871; Vanbuskirk, y col., (1989) J. Exp. Med. 170: 1799-1809) puesto que se considera generalmente que estas células funcionan como células presentadoras de antígenos. La especificidad y la inducibilidad del tipo celular de la recaptación celular de Hsp70 pueden reflejar la expresión diferencial de una superficie requerida o receptor nuclear para la proteína Hsp70. Están actualmente en progreso estudios para investigar las proteínas superficiales que pueden estar implicadas en la unión e internalización de la Hsp70 extracelular.

Ejemplo 2

Cinética de la recaptación celular de Hsp70

Los inventores investigaron a continuación el curso temporal y el efecto de la dosis de la recaptación de Hsp70 por las células 70Z/3. Se incubaron 5×10^5 células a 37°C con 1 µg/ml de Hsp70-FITC durante periodos crecientes de tiempo entre 10 minutos y 48 horas. Una vez que la Hsp70-FITC no incorporada fue eliminada por lavado con PBS, se cuantificó la fluorescencia intracelular y asociada a célula mediante análisis fluorimétrico. A partir de estos estudios los inventores determinaron que el proceso de internalización parece ser lento, puesto que no se consigue la internalización máxima hasta entre 6-8 horas (figura 2A), tras dicho tiempo la velocidad de recaptación parece caer ligeramente y permanecer constante durante hasta 2 días de incubación.

Para el estudio del intervalo de dosis los investigadores seleccionaron un tiempo de incubación de una hora y se trataron las células con cantidades variables de Hsp70-FITC. El análisis de los inventores demostró que la intensidad de fluorescencia intracelular aumentó con el aumento de las concentraciones de Hsp70 extracelular, hasta 100 µg/ml (1,4 µM), y fue detectable incluso cuando se trataron las células con niveles tan bajos como 0,1 µg/ml (1,4 µM, fig. 2B). Los inventores determinaron que el tratamiento de las células con una concentración extracelular de 1 µM de Hsp70-FITC dio como resultado tras una hora de incubación una concentración intracelular de 700 nM, que suponía un volumen de 1 pL/célula. Esta eficiencia de recaptación es comparable a la informada para otras secuencias de péptidos (Phelan, y col., (1998) Nature Biotechnology 16: 440-443). La recaptación de Hsp70-FITC no fue saturable en el intervalo de concentraciones que usaron los inventores (35 nM-1 µM), indicativo de una alta capacidad del mecanismo de recaptación mediando por el receptor. Además, la internalización podría no bloquearse mediante preincubación con un exceso de 10 veces de Hsp70 no marcada

Ejemplo 3

Mecanismo de transporte intracelular mediado por Hsp70

Para investigar el mecanismo de transporte, los inventores examinaron la importación de Hsp70 bajo diferentes condiciones. Aunque la proteína Hsp70 de longitud completa fue transportada por los PBL en presencia de azida de sodio al 0,05%, esta actividad de transporte fue completamente erradicada cuando las células se incubaron a 4°C (fig. 3A-3D), sugiriendo que se trataba de un componente dependiente de la energía del transporte mediado por Hsp70. Estos datos se acoplaron con los estudios de internalización simultánea usando transferrina, que revelaron que la acumulación de transferrina y Hsp70 se producían en compartimientos intracelulares diferenciados tanto en células 70Z/3 (fig. 3E) como en PBL humanos, sugiriendo que este mecanismo no implica la clásica endocitosis.

Ejemplo 4

Una proteína de fusión exógena NF-κB-C terminal Hsp70 se puede dirigir al núcleo

Se generaron dos proteínas de fusión diferentes compuestas bien de un polipéptido Hsp70 C-terminal de 244 (SEC DE ID N°:2) o 92 (SEC DE ID N°:3) aminoácidos con la subunidad p50 del factor de transcripción NF-κB para

examinar la capacidad de la secuencia del péptido Hsp70 para dirigir otros sustratos de proteína al interior de la célula. El polipéptido de 244 aminoácidos tiene la siguiente secuencia:

PLSLGLETAG GVM TALIKRN STIPTKQTQI FTTYSDNQPG VLIQVYEGER
AMTKDNNLLG RFELSGIPPA PRGVPQIEVT FDIDANGILN VTATDKSTGK
ANKITITNDK GRLSKEEIER MVQEAKEYKA EDEVQRERVS AKNALESYAF
NMKSAVEDEG LKGKISEADK KKVLDKCQEV ISWLDANTLA EKDEFEHKRRK
ELEQVCNPII SGLYQGAGGP GPGGFGAQQP KGGSGSGPTI EEVD

El polipéptido de 92 aminoácidos tiene la siguiente secuencia:

KSAVEDEGLK GKISEADKKK VLDKCQEVIS WLDANTLAEK DEFEBKRRKEL
EQVCNPIISG LYQGAGGPGP GGFGAQQPKG GSGSGPTIEE VD

Cuando se añaden exógenamente a las células, ambas proteínas de fusión conjugadas con FITC penetraron en el citoplasma y núcleos de las células 70Z/3 (fig. 4) y PBL (datos no mostrados) con cinética y especificidad similar a la del péptido Hsp70 solo. Este transporte fue estable, no saturable y se produjo sin degradación proteica significativa. La recaptación máxima de FITC-Hsp70 permaneció estable tras un pulso de 30 minutos durante 24 horas las la eliminación por lavado de la proteína no incorporada e incubación a 37°C, según se determinó mediante microscopía confocal y análisis SDS-PAGE. Para evaluar la estabilidad de las proteínas, las células se pulsaron bien con 10 µg/ml de Hsp70 de longitud completa conjugada con FITC o Hsp70/28-p50 durante 1 hora antes de lavado y rastreo a 37°C durante hasta 96 horas. Se generaron extractos completos por lisis en tampón de muestra de Laemmli, y las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE. Los geles se sometieron a análisis mediante fluorimager, y los resultados demostraron la presencia tanto de la proteína de fusión de ~75 kD como el propio Hsp70 de longitud completa (distinguible del Hsp70 endógeno por su marca fluorescente) en extractos de células completas tras hasta 24 horas de incubación sin cambios mensurables en el tamaño o apariencia de productos de degradación de menor peso molecular (fig. 5). Estos datos sugieren que la Hsp70 intracelular dirigida quedó retenida por la célula sin degradación significativa con una semivida superior a 48 horas.

Ejemplo 5

La NF-κB p50 transportada muestra actividad de enlace con ADN

Para resolver si las proteínas de fusión internalizadas retienen la actividad funcional, los inventores ensayaron extractos nucleares de células tratadas con la proteína de fusión Hsp70-p50 para su capacidad para enlazar una secuencia específica de ADN kappa. Los inventores pudieron demostrar que las proteínas de fusión eran capaces enlazar ADN kappa (datos no mostrados), sugiriendo que las subunidades de p50 no se desequilibraban conformacionalmente por la presencia de las secuencias de Hsp70. Una vez tratadas las células 70Z/3 con 100 ng/ml de LPS, 10 µg/ml de Hsp70/10-p50 o de Hsp70/28-p50 durante 1 hora, se prepararon los extractos nucleares y se llevaron a cabo los ensayos de desplazamiento en gel. Los inventores encontraron que la actividad de enlace del ADN se retenía por la proteína de fusión tras la recaptación nuclear por las células, indicando que el proceso de importación no dio como resultado una degradación o pérdida de actividad significativas (fig. 6A). Esta actividad de enlace del ADN era específica, ya que el complejo estaba completado con un exceso de secuencia NF-κB no marcada pero no con secuencia de octámero (fig. 6A). Los inventores vieron distintos complejos formados por extractos nucleares procedentes de células tratadas con diferentes proteínas de fusión; además, se diferenciaban del complejo formado por NF-κB endógeno inducido por LPS. En los experimentos de superdesplazamiento, los inventores observaron que los anticuerpos anti-p50 eran capaces de desplazarse por el complejo de enlace del ADN casi completo desde las células tratadas con proteína de fusión según lo esperado, confirmando que la proteína de fusión estaba posiblemente ligada con el ADN principalmente en forma de homodímero (fig. 6B). Los inventores también observaron una disminución detectable en el complejo específico tras la incubación con ambos anticuerpos anti-p65 y anti-Hsp70 (dirigidos contra los cuatro aminoácidos carboxiterminales EEVD), indicando la presencia de subunidades p65 endógenas además de las subunidades Hsp70-p50 recombinantes. Por el contrario, los extractos nucleares procedentes de células control tratadas con LPS formaron un complejo que contenía ambas subunidades p50 y p65, y los modelos de superdesplazamiento diferían de los de las células tratadas con la proteína de fusión. Estos datos indican la formación de complejos proteína/ADN diferentes, y sugieren que las proteínas de fusión se enlazaban directamente con el ADN y no simplemente activan el NF-κB endógeno.

Ejemplo 6

La proteína de fusión Hsp70-p50 activa la expresión superficial de Ig kappa y la producción de TNF α

5 Puesto que el tratamiento de las células con las proteínas de fusión Hsp70-p50 podría potencialmente dar como resultado la formación de complejos que interactúan con los emplazamientos de unión del ADN de NF- κ B, los inventores decidieron evaluar los eventos biológicos más adelantados en la ruta de NF- κ B. Los inventores observaron que el tratamiento de diferentes células con las proteínas de fusión Hsp70-p50 dio como resultado la activación de varias respuestas inflamatorias e inmunológicas normalmente reguladas por NF- κ B. El tratamiento de células pre-B 70Z/3
 10 de ratón con la proteína de fusión Hsp70/10-p50 se demostró tan eficaz como LPS en la inducción de elevados niveles de cadena ligera de Ig kappa en la superficie (fig. 7A). Además, a diferencia de la activación inducida por LPS, la expresión kappa superficial inducida por la proteína de fusión quedó abolida a los 30 minutos de una desnaturalización térmica a 65°C de la proteína previa al tratamiento de las células, confirmando que la proteína intacta era necesaria para la activación. Se obtuvieron resultados similares con Hsp70/28-p50 (datos no mostrados). La producción de TNF α es
 15 otro ejemplo de una respuesta inflamatoria también ampliamente regulada por NF- κ B. Los inventores observaron que la proteína de fusión internalizada era también capaz de inducir la producción de TNF α por los linfocitos de la sangre periférica (fig. 7B). Células PBL recientemente aisladas se incubaron con LPS o Hsp70-p50 durante 6 horas, tras dicho tiempo se recogieron los sobrenadantes y se ensayaron para los niveles de citoquina mediante ELISA. De nuevo, los inventores encontraron que las proteínas de fusión eran tan eficaces como LPS en la inducción de la producción de
 20 TNF α , y establecieron que la proteína intacta era la responsable de la activación demostrando que la desnaturalización térmica de la proteína de fusión abolía el efecto.

Se usaron en los ejemplos anteriores los siguientes procedimientos experimentales:

25 *Expresión y purificación de las proteínas de fusión Hsp70-p50.* Se construyeron dos proteínas de fusión p50 usando la secuencia de nucleótidos correspondiente a los aminoácidos 1-406 de la subunidad p105 de la proteína NF- κ B. Esta secuencia incluye el dominio de enlace del ADN así como el dominio de homología rel. Las dos proteínas de fusión variaron en la longitud del fragmento Hsp70 usado. Las dos secuencias Hsp70 se derivaron del término C, incluyendo tanto los nucleótidos terminales 276 ó 735 que corresponden a un fragmento de proteína de 10 kD (el polipéptido de
 30 92 aminoácidos anteriormente descrito) y uno de 28 kD (el polipéptido de 244 aminoácidos anteriormente descrito). La proteína Hsp70 tanto de 10 kD como de 28 kD se fusionó en el término C con la proteína p50, y las proteínas de fusión resultantes se denominaron Hsp70/10-p50 o Hsp70/28-p50; respectivamente. El vector de expresión procariótico ProEX HTTM (Life Technologies, Gaithersburg, MD) se usó para la clonación, expresión y purificación, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

35 *Microscopía de barrido con láser confocal.* Las células se trataron típicamente con 10 μ g/ml de proteínas conjugadas con FITC o como se indica en el texto durante una hora a 37°C seguido por un lavado en PBS, fijación en paraformaldehído al 2%, un lavado adicional en PBS y posterior análisis visual mediante microscopía confocal (Bio-Rad, Hercules, CA) usando un programa informático Molecular Dynamics LaserSharp y Adobe[®] Photoshop[®].

40 *Análisis por transferencia Western de las proteínas de fusión Hsp70-p50 importadas.* Las células se trataron con proteínas conjugadas con durante una hora a 37°C, se lavaron en PBS y se usaron para la preparación de extractos nucleares, se separaron cantidades iguales de proteína mediante SDS-PAGE. El gel se fijó en ácido acético y se sometió a análisis de fluorescencia mediante fluorimager y programa informático ImageQuant.

45 *Ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética.* Se prepararon extractos nucleares de células 70Z/3 usando una modificación de los protocolos establecidos (Tepper, y col., (1995) J. Immunol. 155:2427-2436). Se determinaron las concentraciones de proteínas usando el ensayo de Bradford, y los oligonucleótidos (Promega, Madison, WI) NF- κ B (5'GATCCGAGGGGACTTTCCGCTGGGGACTTCCAGG3' (SEC DE ID N°: 4)) u octámero (5'TGTCTGAATG
 50 CAAATCACTAGAA3' (SEC DE ID N°: 5)) se marcaron al final con [γ -³²P]ATP y T4 quinasa. Las condiciones de las reacciones de enlace con las sondas de oligonucleótidos fueron las anteriormente descritas. Los ensayos de superdesplazamiento se realizaron con los anticuerpos policlonales p50, p65 y c-Rel de NF- κ B (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y el anticuerpo Hsp70 preincubando los extractos nucleares con 3 μ l del anticuerpo en el tampón de reacción durante 30 minutos y continuando con el ensayo de retraso en gel según los procedimientos estándar.
 55 Se realizaron ensayos de competición usando los oligonucleótidos no marcados NF- κ B y octámero. Las muestras se analizaron sobre geles nativos de poli(acrilamida) al 6% y se autorradiografiaron.

Ensayo de inmunofluorescencia (FACS). Células 70Z/3 se trataron bien con 30 μ g/ml de Hsp70/10-p50 de la proteína de fusión o 100 ng/ml de LPS y se incubaron toda la noche a 37°C. A continuación las células se lavaron
 60 PBS y se fijaron en paraformaldehído al 2% antes de teñir con el anticuerpo anti-kappa conjugado con FITC. Tras un lavado adicional con PBS, las células se sometieron a toma de imagen y análisis en el FACSTARTM.

Ensayo TNF α . Linfocitos de sangre humana periférica se aislaron como se ha indicado y se trataron con 40 μ g/ml de la proteína de fusión Hsp70 o LPS durante 6 horas. Se recogieron los sobrenadantes y se analizaron para TNF α
 65 mediante ELISA (Genzyme, Cambridge, MA).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para administrar un compuesto seleccionado entre el grupo constituido por una proteína, un péptido, un polinucleótido o un agente terapéutico al interior de un núcleo de una célula o células, comprendiendo dicho procedimiento juntar dicho compuesto con Hsp70, o un fragmento de Hsp70 que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC DE ID N°: 2 o la SEC DE ID N°: 3, para formar un complejo de Hsp70, y proporcionar dicho complejo de Hsp70 de forma exógena a dicha célula o al entorno que rodea dicha célula de manera que el complejo de Hsp70 se importa al interior de dicho núcleo de una célula o células.
2. Uso de un complejo de Hsp70 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar el rechazo por trasplante, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, cáncer, o una enfermedad vascular en un paciente, en el que un compuesto se une covalentemente con Hsp70, o un fragmento de Hsp70 que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC DE ID N°: 2 o la SEC DE ID N°: 3, para formar el complejo de Hsp70 y en el que dicho complejo se va a importar al interior de dicho núcleo de una célula o células.
3. El uso de la reivindicación 2 en el que dicho complejo de Hsp70 comprende un compuesto seleccionado entre el grupo constituido por una proteína, un péptido, un polinucleótido y un agente terapéutico.
4. El procedimiento *in vitro* de la reivindicación 1 para administrar una proteína o un péptido al compartimiento nuclear de una célula o células, comprendiendo dicho procedimiento juntar dicha proteína o péptido con Hsp70 o un fragmento de Hsp70 que comprende de una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC DE ID N°: 2 o la SEC DE ID N°: 3 para formar un complejo de Hsp70, proporcionar dicho complejo a dicha célula o células de manera que dicho complejo se transporta al interior del compartimiento nuclear de dicha célula o células.
5. El uso de la reivindicación 2, en el que una proteína nuclear o un péptido nuclear se une con Hsp70, o un fragmento de Hsp70 que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC DE ID N°: 2 o la SEC DE ID N°: 3 para formar el complejo de Hsp70.
6. El procedimiento de la reivindicación 4 o el uso de la reivindicación 5, en el que dicho fragmento de Hsp70 comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC DE ID N°: 2 o la SEC DE ID N°: 3.
7. El procedimiento de las reivindicaciones 4 ó 6, o el uso de la reivindicaciones 3 ó 5 en el que dicha proteína o péptido comprende la subunidad p50 del factor de transcripción NF- κ B.
8. Una composición farmacéutica que comprende un complejo de Hsp70, dicho complejo de Hsp70 comprendiendo una primera porción y una segunda porción, comprendiendo dicha primera porción proteína Hsp70, o un fragmento de Hsp70 que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC DE ID N°: 2 o la SEC DE ID N°: 3; y dicha segunda porción que comprende una proteína nuclear, péptido nuclear, o polinucleótido.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en la que el complejo de Hsp70 comprende una proteína Hsp70 de origen humano.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 8 ó 9, en la que dicha proteína o péptido comprende la subunidad p50 del factor de transcripción NF- κ B.
11. El procedimiento o el uso de la reivindicación 6, en el que dicho fragmento de Hsp70 está constituido por la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC DE ID N° 2: o en la SEC DE ID N°: 3.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 8 ó 9 que comprende además al menos un compuesto activo seleccionado entre el grupo constituido por un inmunosupresor, un agente anticanceroso, un agente antiviral, un agente antiinflamatorio, un agente antifúngico, un antibiótico y un compuesto hiperproliferativo antivascular.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 8 ó 9 o el procedimiento de la reivindicación 4 que comprende una proteína nuclear o un péptido nuclear covalentemente unido a dicha proteína Hsp70 o un fragmento de Hsp70 que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC DE ID N°: 2 o la SEC DE ID N°: 3.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, 9 ó 13, en la que dicha Hsp70 o fragmento de Hsp70 comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC DE ID N°: 2 o la SEC DE ID N°: 3.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 13 ó 14, en la que dicha Hsp70 o un fragmento de Hsp70 que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC DE ID N° 2: o la SEC DE ID N°: 3 es C-terminal respecto de dicha proteína o péptido.
16. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en la que dicha proteína o péptido comprende los restos 37-409 de la subunidad p50 del factor de transcripción NF- κ B.

ES 2 327 986 T3

17. La composición farmacéutica de una cualquiera de la reivindicaciones 8, 9, 12, 13 ó 14 para tratar rechazo por trasplante, una enfermedad autoinmune o una enfermedad inflamatoria en un paciente.

5 18. El procedimiento de la reivindicación 13, el uso de la reivindicación 5, o la composición farmacéutica de la reivindicaciones 8 ó 13, en la que dicha proteína nuclear o péptido nuclear es capaz de modular la expresión génica en dicho compartimiento nuclear.

10 19. El procedimiento, uso, o composición farmacéutica de la reivindicación 18, en la que dicha modulación de la expresión génica proporciona un control inmunosupresor o inmunoestimulante.

20. El procedimiento, uso, o composición farmacéutica de la reivindicación 18, en la que dicha proteína nuclear o péptido nuclear es un factor de transcripción.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

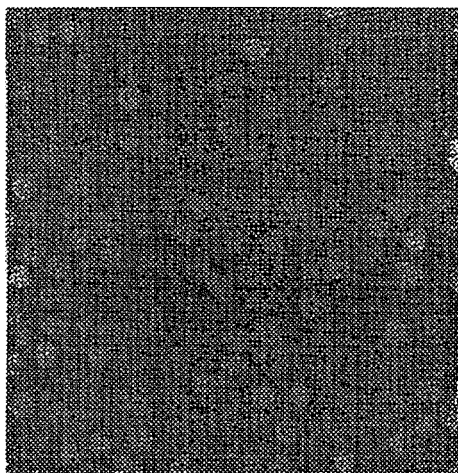


FIG. 1A

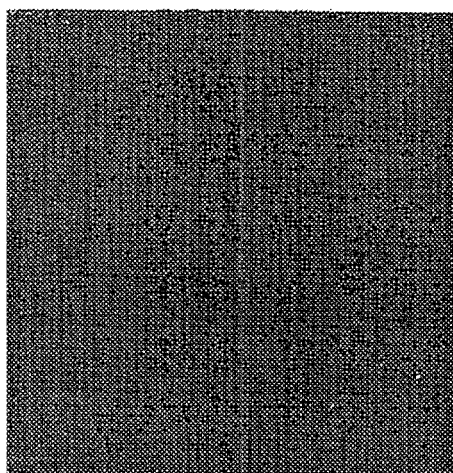


FIG. 1B

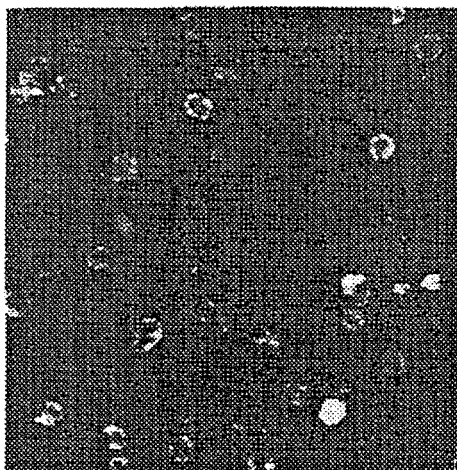


FIG. 1C

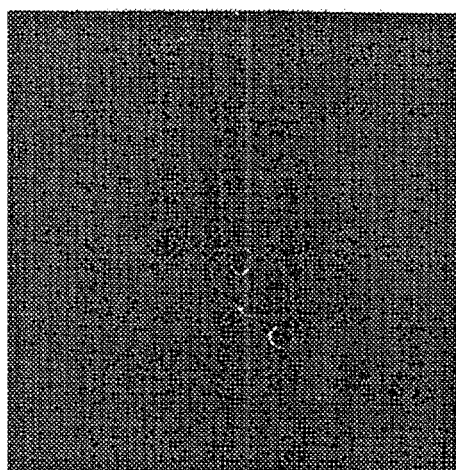


FIG. 1D

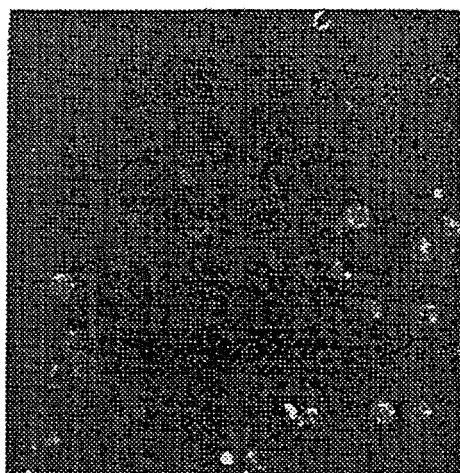


FIG. 1E

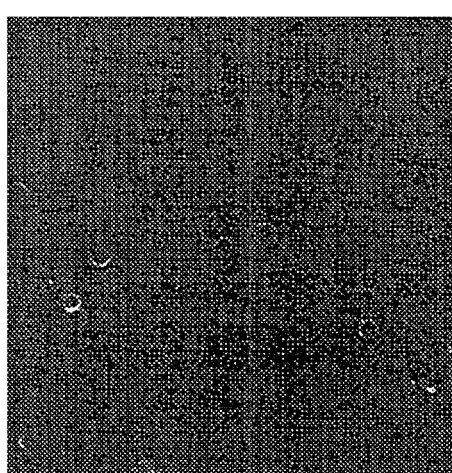


FIG. 1F

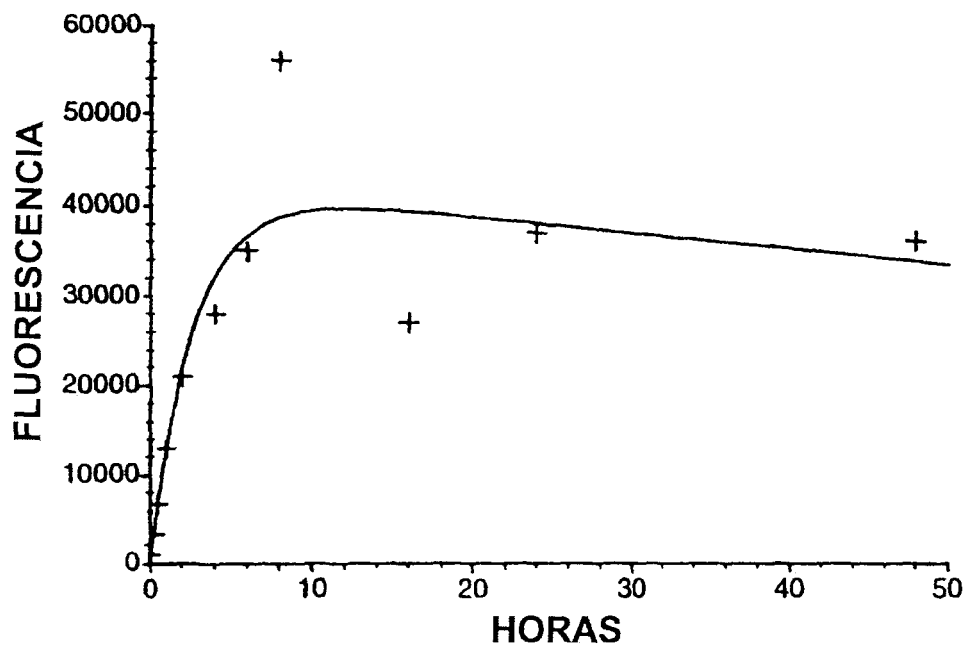


FIG. 2A

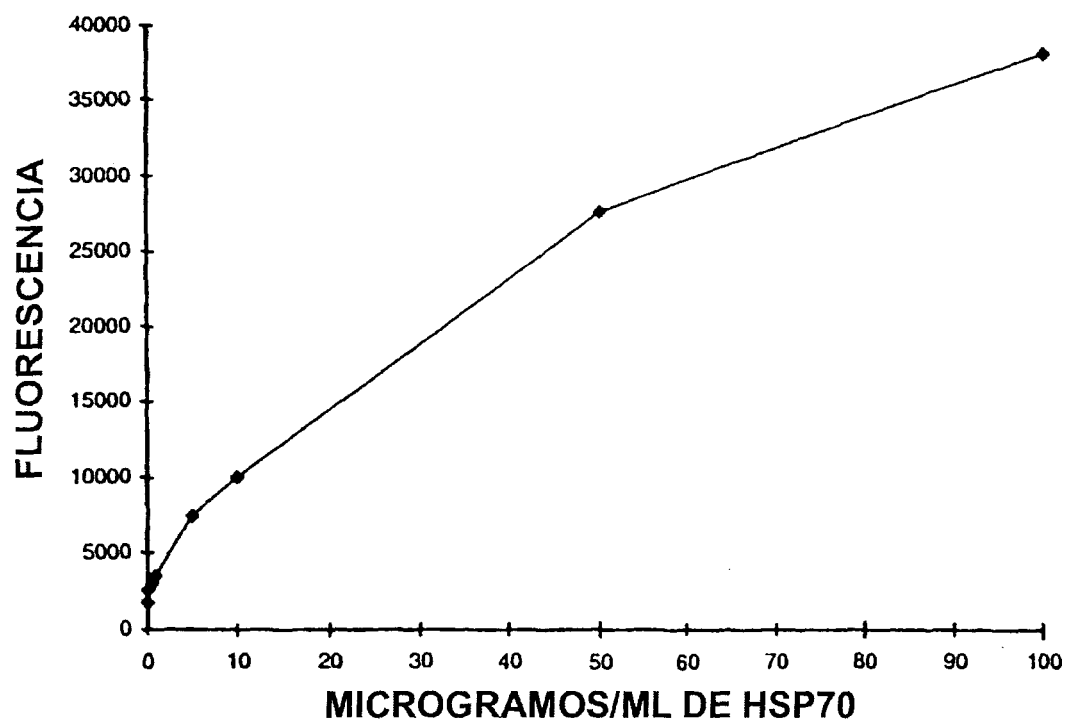


FIG. 2B

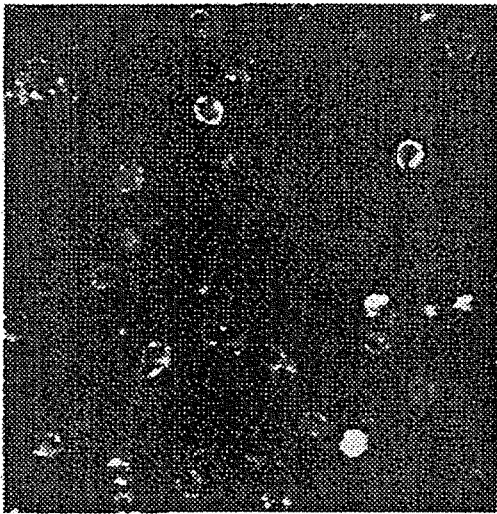


FIG. 3A

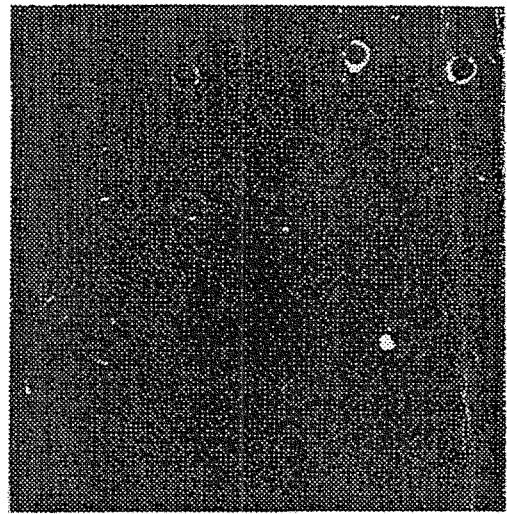


FIG. 3C

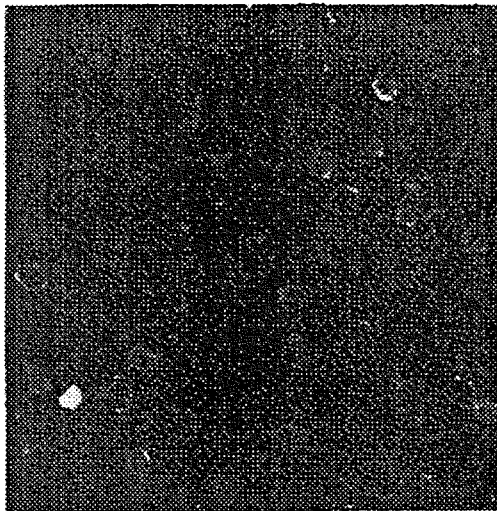


FIG. 3B

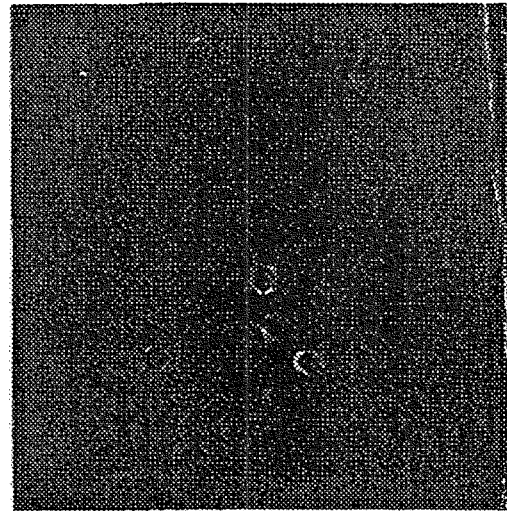


FIG. 3D

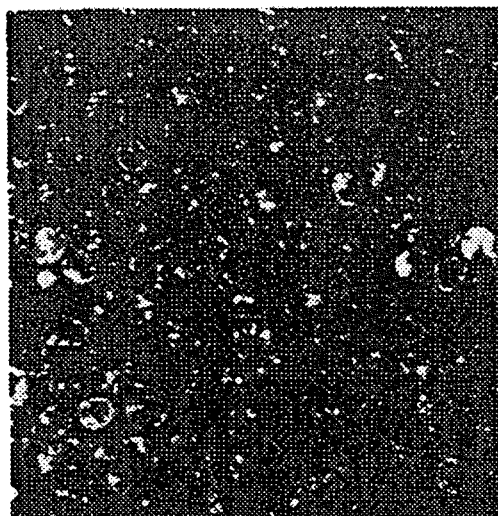


FIG. 3E

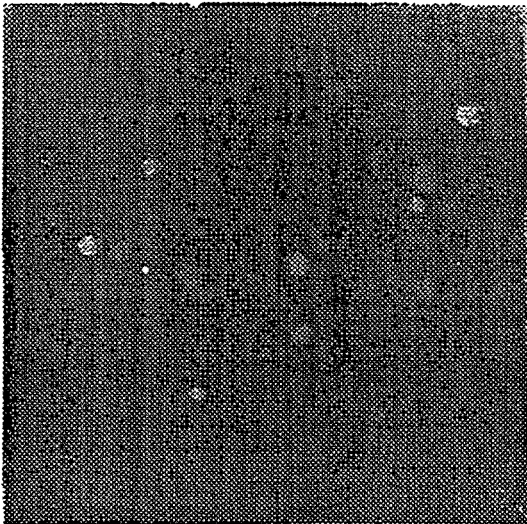


FIG. 4A

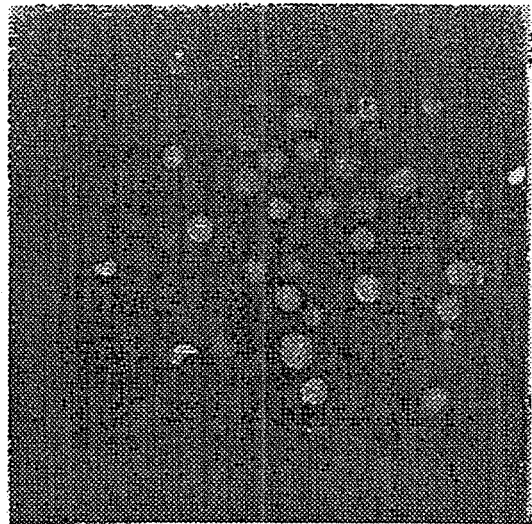


FIG. 4C

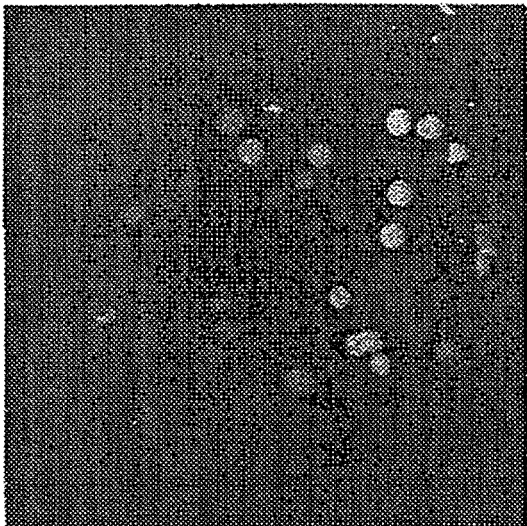


FIG. 4B

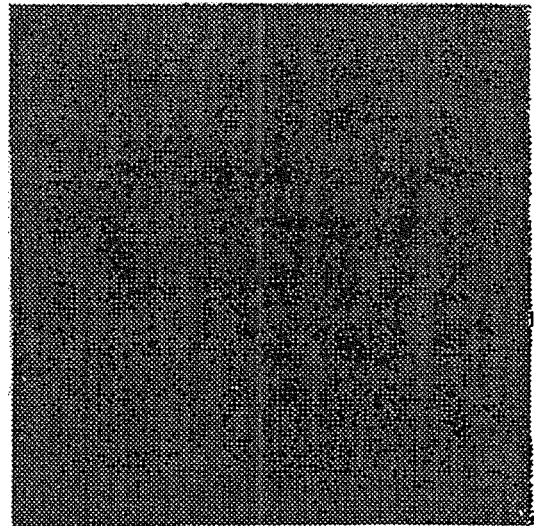


FIG. 4D

FIG. 5A

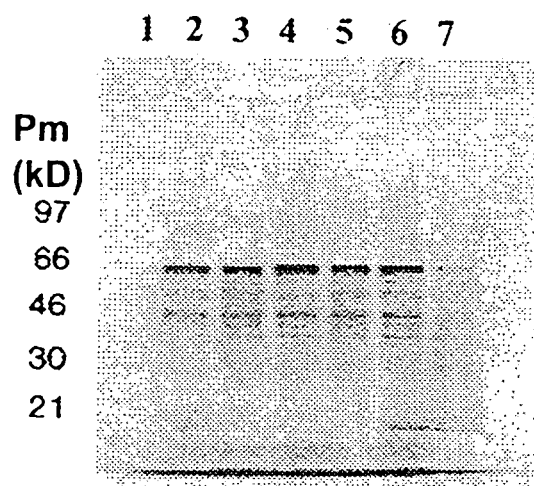
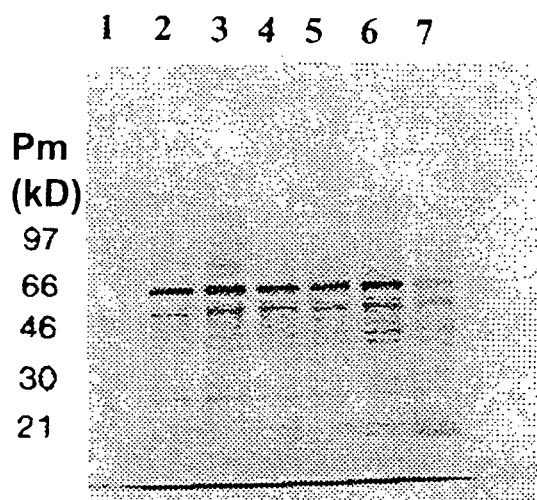


FIG. 5B



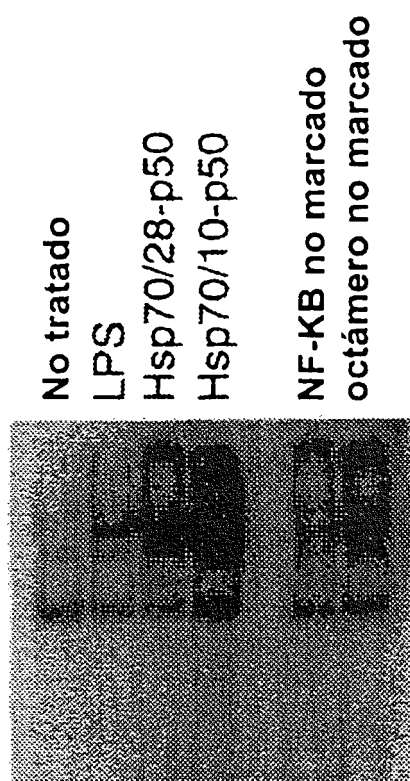


FIG. 6A

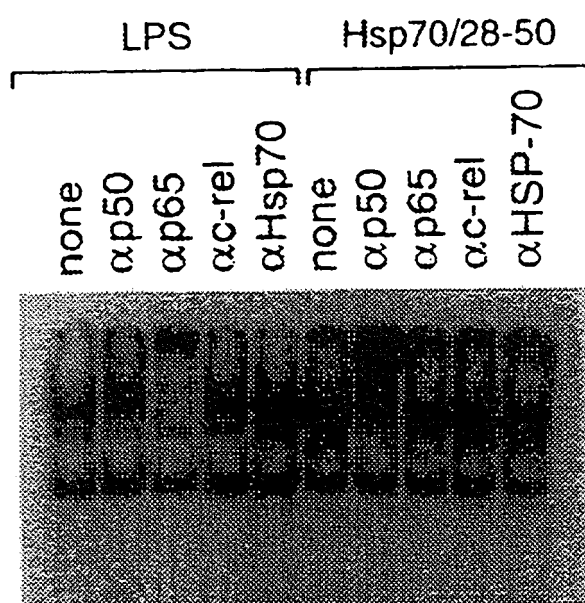


FIG. 6B

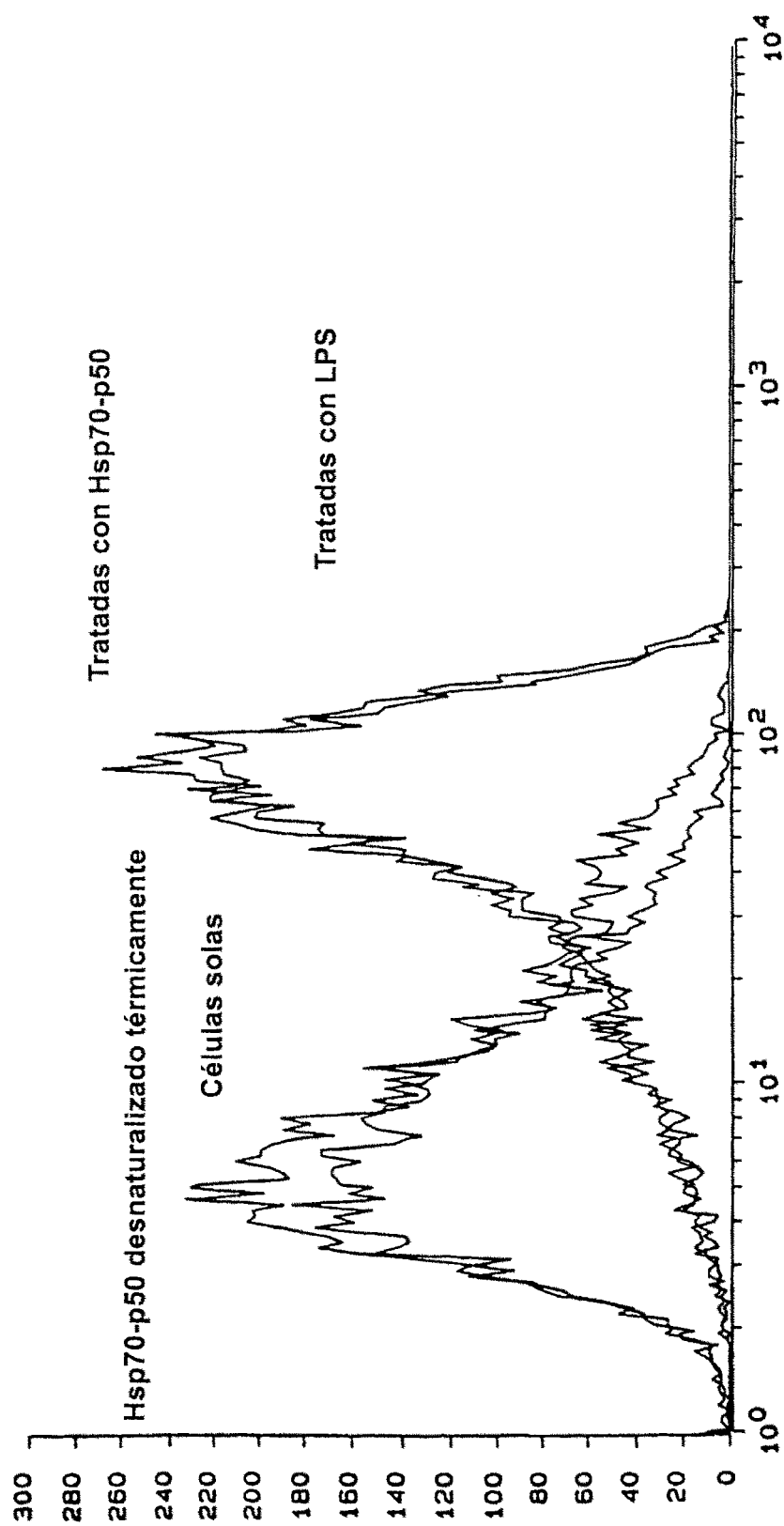


FIG. 7A

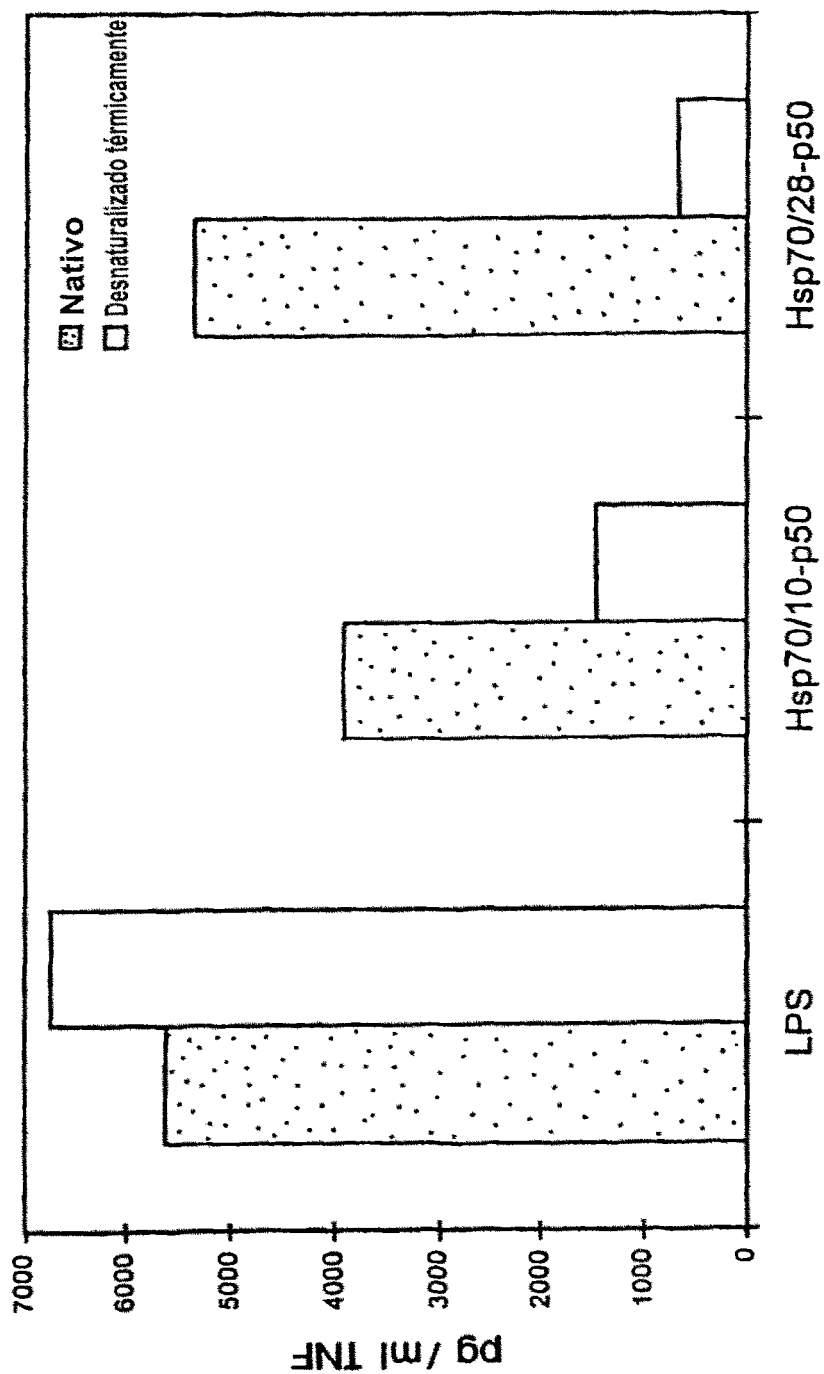


FIG. 7B