

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 351**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2007 E 07821242 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2079758**

54 Título: **Procedimiento para la purificación de DNAK**

30 Prioridad:

13.10.2006 EP 06122292
23.10.2006 US 853567 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.10.2014

73 Titular/es:

BIOTECH TOOLS S.A. (100.0%)
RUE DE RANSBEEK 230 BLOCK V
1120 BRUSSELS, BE

72 Inventor/es:

HENOT, FRÉDÉRIC;
LEGON, THIERRY;
PIROTTON, SABINE y
PLACIER, GAEL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 509 351 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

Procedimiento para la purificación de DnaK

La presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación de proteínas de choque térmico.

5 La expresión de las proteínas de choque térmico (HSPs) puede ser regulada por aumento por todas las células en condiciones de estrés. Son chaperonas moleculares y están implicadas en el plegamiento de las proteínas.

Las HSPs se clasifican en aproximadamente seis familias y están muy conservadas a lo largo de la evolución.

Los complejos entre las HSPs y péptidos juegan un papel en la presentación del antígeno. Las HSPs también están implicadas en algunas enfermedades autoinmunes. Para una revisión, véase van Eden y col., Nature Reviews. Immunology 5 (2005) 318 - 330.

10 La DnaK es el miembro bacteriano de la familia HSP 70. Se conocen procedimientos para la purificación de la DnaK, pero la pureza de las preparaciones es cuestionable. Típicamente, las preparaciones de la DnaK se consideran puras si sólo hay una banda detectable en una SDS-PAGE. No obstante, dichas preparaciones no son muy puras.

Schönfeld y col. J. Biol. Chem. 270 (1995) 2183 - 2189 describen una DnaK pura mediante SDS-PAGE, pero el análisis de filtración en gel muestra al menos tres picos.

15 Los procedimientos para la purificación de las HSP son conocidos, véase por ejemplo,

- Nandan y col. J., Immunological Methods (1994) 176: 255 - 264,

- Grossmann y col., Exp. cell Res. (2004) 297: 108 - 117,

- Peng y col., J. Immunological Methods (1997) 204: 13 - 21 y

- Jindal y col., Biotechnology (1995) 13: 1105 - 1109.

20 Se han notificado datos incoherentes en el pasado relativos a las propiedades inmunológicas de las HSP, especialmente de la DnaK. La DnaK mejora el procesado de los antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o de clase II en las células presentadoras del antígeno (Tobian y col., J. Immunological 172 (2004), 5277 - 5286; Tobian, Canaday, Harding J. Immunol. 173 (2004) 5130 - 5137). La DnaK natural, dependiendo de su origen, la dosis y la vía de administración, puede mostrar diferentes tipos de efectos inmunológicos, incluso contradictorios (van Eden, van der Zee y Prakken Nat Rev. Immunol. 5 (2005): 318 - 330). Se han observado respuestas autoinmunes frente a las HSP autólogas en enfermedades inflamatorias crónicas, tales como la artritis reumatoide, la diabetes de tipo I y la aterosclerosis. Se sospecha que la reacción cruzada antigénica entre la HSP bacteriana y la HSP autóloga es la causa del desarrollo de autoinmunidad. Por otro lado, en ensayos clínicos de diabetes de tipo I y de artritis reumatoide, también se ha demostrado que la HSP promueve un cambio en los linfocitos T desde un perfil de secreción de citocinas proinflamatorias hacia un perfil de secreción de citocinas reguladoras, lo que sugiere una inmunorregulación de la enfermedad inflamatoria (Bloemendal y col., Clin. Exp. Immunol. 110 (1997): 72 - 78). Más recientemente, Galdiero y col. han notificado que la DnaK no induce el aumento de la expresión de moléculas coestimulantes (CD80 / CD86) sobre linfocitos y macrófagos (Galdiero y col., Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 18 (2005) 637 - 644).

35 Se cree que estas incoherencias se basan en los diferentes procedimientos de purificación, que producen DnaK junto con diversas impurezas y contaminantes. Además, dado que la DnaK es una ATPasa, se une a nucleótidos de adenina. Coexisten diferentes formas de DnaK y pueden ser purificadas: la DnaK cargada con ATP, la DnaK cargada con ADP y la DnaK exenta de nucleótidos. Estas diferentes formas de DnaK pueden tener diferentes efectos inmunológicos.

40 Es el objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para la purificación de DnaK que supere al menos algunos de los inconvenientes de la técnica anterior, especialmente proporcionar una DnaK con una pureza aumentada.

El problema es resuelto en un aspecto mediante una preparación de DnaK purificada recombinante, obtenible mediante un procedimiento que comprende las etapas de

45 a) cromatografía de intercambio iónico,
b) cromatografía de hidroxilapatito, y
c) cromatografía de gelatina,

en la que la preparación de la DnaK tiene:

50 - una actividad de ATPasa sin la adición de ninguna otra proteína chaperona,
- una pureza del 98 % en peso de proteína, y

- está esencialmente exenta de impurezas estimulantes de los linfocitos T.

La proteína de choque térmico recombinante modificada se caracteriza por su actividad de ATPasa sin la adición de ninguna otra proteína chaperona. Un procedimiento de ensayo adecuado para la actividad de ATPasa se describe en los ejemplos.

- 5 Además, la preparación está exenta de impurezas estimulantes de los linfocitos T. Esto requiere un contenido en endotoxinas muy bajo. La preparación no muestra un efecto sobre los TH-1 (producción de interferón- γ) ni los TH-2 (producción de IL-5 o de IL-13). Esto se describe adicionalmente en los ejemplos.

La preparación está preferiblemente exenta de impurezas inmunoestimulantes, incluyendo impurezas estimulantes de los linfocitos T.

- 10 "Esencialmente exenta de impurezas inmunoestimulantes" significa:

- no se observa una proliferación de linfocitos T hasta 30 $\mu\text{g/ml}$
- no se observa producción de TNF- α hasta 10 $\mu\text{g/ml}$.

La preparación DnaK recombinante purificada tiene:

- 15 a) una contaminación por ADN residual ≤ 1 ng/mg de proteína
 b) una contaminación por proteínas residuales de la célula hospedadora (HCP) < 5 % en peso, y
 c) una contaminación por endotoxinas $< 0,5$ U.E./ μg de proteína.

La pureza de la DnaK purificada se calcula sobre una base de "peso por proteína", es decir, al menos el 98 % en peso de proteína.

- 20 Preferiblemente, este valor se determina mediante el análisis de una SDS-PAGE en gel seguido de una tinción de coomassie y una densitometría.

El contenido en ADN es preferiblemente muy bajo, es decir ≤ 1 ng/mg de proteína, preferiblemente $\leq 0,5$ ng/mg de proteína. La contaminación por ADN se mide mediante el uso de una RT-PCR mediante el uso de cebadores específicos.

- 25 Las condiciones del ensayo dependen del tipo de sistema de expresión. Por ejemplo, para su expresión en *E. coli*, son adecuados los cebadores específicos del ADN 23S. Para *P. pasteuris*, los cebadores adecuados se eligen en el ADN 18S. Estos procedimientos son conocidos por una persona experta en la técnica.

- 30 Además, la contaminación por proteínas residuales de la célula hospedadora es < 5 % en peso, preferiblemente < 1 % en peso, más preferiblemente $\leq 0,0001$ % en peso. Preferiblemente esto se determina en un ensayo de ELISA, disponible comercialmente en Cygnus Technologies Inc., Estados Unidos, con el nombre de producto "Kit *E. coli* host cell proteins", para medir las proteínas de las células de *E. coli*. El sistema de ensayo debe elegirse para que se corresponda con el sistema de expresión, es decir, Cygnus Technologies Inc. también ha desarrollado en los correspondientes ELISA para otros sistemas de expresión. Como alternativa, son adecuados otros procedimientos tales como una SDS-PAGE con tinción de plata, una HPLC o una inmunotransferencia Western.

- 35 La contaminación por endotoxinas es $< 0,5$ U.E./ μg de proteína según se muestra mediante el ensayo cinético de LAL, disponible comercialmente en Cambrex Corporation, Estados Unidos, con el nombre de producto "Kinetic-QCL®". Preferiblemente, el contenido es $< 0,1$ U.E./ μg de proteína, y preferiblemente $< 0,01$ U.E./ μg de proteína.

Ahora se ha comprendido por qué las DnaK pueden tener contaminaciones con impurezas inmunoestimulantes, especialmente

- 40 - proteínas,
 - péptidos,
 - ácidos nucleicos,
 - lipopolisacáridos (LPS).

La DnaK es una proteína chaperona y por lo tanto, se une a otras proteínas y péptidos.

- 45 Los procedimientos de purificación de la técnica anterior no eran obviamente capaces de eliminar ambas impurezas, las unidas y las no unidas, en las preparaciones de DnaK. Sorprendentemente, el procedimiento de purificación de la invención hace posible la obtención de una DnaK recombinante de elevada pureza, esencialmente exenta de impurezas inmunoestimulantes.

Para su uso en preparaciones farmacéuticas, especialmente como coadyuvante, es absolutamente necesario que la DnaK no contenga impurezas inmunoestimulantes.

- 50 Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la purificación de una proteína de choque térmico

recombinante, preferiblemente la DnaK, a partir de un lisado celular, que comprende las etapas de

- a) cromatografía de intercambio iónico,
- b) cromatografía de hidroxilapatito, y
- c) cromatografía de gelatina.

5 En un aspecto preferido de la invención, la DnaK procede de bacterias saprófitas, tales como *E. coli*, o de bacterias patógenas, tales como *Mycobacterium tuberculosis*.

En una forma de realización preferida, la cromatografía de intercambio iónico es una cromatografía de intercambio aniónico.

Para la cromatografía de hidroxilapatito, se prefiere una cromatografía de hidroxilapatito de tipo II.

10 En una forma de realización, la cromatografía de gelatina se lleva a cabo en sepharosa en gelatina. La DnaK es preferiblemente desorbida de la gelatina mediante el uso de un nucleótido, por ejemplo, ADP, ATP.

Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la formación de un complejo entre la DnaK recombinante y al menos un péptido o al menos una proteína, que comprende las etapas de

- 15 a) combinar la DnaK recombinante de la invención con ATP a una proporción molar DnaK:ATP de desde 1:1 hasta 1:10;
- b) añadir al menos un péptido o al menos una proteína; y
- c) incubar a una temperatura de entre 10 °C y 60 °C, preferiblemente de entre 20 °C y 45 °C.

Un aspecto adicional es una mezcla o un complejo entre la DnaK purificada recombinante de la invención y al menos un péptido o al menos una proteína. Preferiblemente las proteínas se usan en una forma desnaturalizada.

20 La presente invención también cubre combinaciones de la DnaK con dos o más péptidos diferentes, o la combinación de la DnaK con varias proteínas (opcionalmente desnaturalizadas) y complejos entre la DnaK y péptidos y proteínas (opcionalmente desnaturalizados).

Algunos péptidos adecuados son, por ejemplo, insulina, tiroglobulina, peroxidasa tiroidea, colágeno de tipo II, gliadina, GAD65, proteína proteolipídica, antígeno S, receptor de la acetilcolina, proteínas colónicas haptinizadas, proteína de unión retinoide de interfotorreceptor, proteína básica de mielina, glucoproteína oligodendrocítica de mielina, P2 de nervios periféricos, receptor citoplasmático de la TSH, factor intrínseco, proteínas del cristalino, plaquetas, nucleoproteínas tales como histonas, proteínas de choque térmico, MHC I, MHC II, complejos peptídicos del MHC, alérgenos de la leche, alérgenos de venenos, alérgenos del huevo, alérgenos de hierbas, alérgenos del césped, alérgenos de árboles, alérgenos de arbustos, alérgenos de flores, alérgenos de granos, alérgenos de hongos, alérgenos de frutas, alérgenos de bayas, alérgenos de frutos secos, alérgenos de semillas, alérgenos de judías, alérgenos de pescado, alérgenos de marisco, alérgenos de carne, alérgenos de especias, alérgenos de insectos, alérgenos de ácaros, alérgenos de animales, alérgenos de casta de animales, alérgenos de Hevea brasiliensis, antígenos de factores de coagulación y grupos sanguíneos, alérgenos de vegetales, alérgenos de mohos, citocinas, proteínas o péptidos implicados en enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, Alzheimer), péptidos ubicados en sustancias adictivas y fragmentos de los mismos. Estas proteínas podrían usarse directamente, preferiblemente en una forma desnaturalizada, o después de su hidrólisis en fragmentos más pequeños.

Un aspecto adicional de la invención es el uso de la DnaK de la invención en una composición farmacéutica como una proteína portadora o como un coadyuvante que induce una respuesta humoral, una respuesta reguladora en linfocitos T en ausencia de cualquier otra respuesta del linfocito T.

Un aspecto adicional es el uso de la DnaK de la invención o de la mezcla de la invención o del complejo de la invención para un diagnóstico *in vitro*, y el uso de la DnaK purificada recombinante de la invención o del complejo de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para la inducción de tolerancia, en la que la tolerancia es adecuada en el tratamiento y/o en la prevención de alergias, de enfermedades autoinmunes o del rechazo de trasplantes, o de enfermedades neurodegenerativas.

En todos los tipos de aplicaciones, la DnaK de la invención puede usarse en un complejo con ATP, en un complejo con ADP o exenta de nucleótidos. Para algunos usos también es útil hidrolizar la DnaK de la invención. Se entiende que "exenta de nucleótidos" es menos de un 5 % de nucleótidos sobre una base molar.

Algunas enfermedades autoinmunes típicas son, entre otras, enfermedad de lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Sjögren, poliartritis reumatoide, así como patologías tales como sarcoidosis y osteopenia, espondiloartritis, esclerodermia, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, hipertiroidismo, enfermedad de Addison, anemia hemolítica autoinmune, enfermedad de Crohn, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, hemorragia purpúrica idiopática, diabetes dependiente de insulina, miastenia, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, glomerulonefritis postestreptocócica, psoriasis y esterilidad espontánea.

El medicamento puede ser administrado, por ejemplo, intravenosamente, intramuscularmente, oralmente, intranasalmente o intrapulmonarmente. Las vías preferidas son la administración sublingual, bucal o entérica.

5 La "administración sublingual" y la "administración bucal" son procedimientos en los que la sustancia se combina en una formulación farmacéutica que permite la absorción de al menos una sustancia a través de la mucosa bucal. La administración sublingual implica que los pacientes mantengan una composición farmacéutica o una forma de dosificación (sublingual) debajo de su lengua mientras la sustancia difunde en la boca, a través del revestimiento de mucosa y de la boca. En la administración bucal, los pacientes mantienen la composición farmacéutica o la forma de dosificación (bucal) entre la mejilla y las encías, en lugar de debajo de la lengua. La administración bucal puede ser masticada para permitir una absorción o una liberación bucal más rápida; la presente invención proporciona por tanto, en una forma de realización preferida, una formulación basada en goma o una formulación de goma masticable.

10 La "administración entérica" es un procedimiento en el que la sustancia está en una formulación farmacéutica que protege al principio activo de ser absorbido y/o degradado antes de entrar en el intestino. Preferiblemente, la absorción tiene lugar en el íleo, en el duodeno o en el yeyuno. En una forma de realización preferida, dicha formulación farmacéutica puede ser un supositorio.

15 Una formulación especialmente adecuada incluye el recubrimiento con polímeros, por ejemplo, los vendidos con el nombre comercial de Eudragit®, disponible comercialmente en Degussa, Alemania, o acetofalato de celulosa, disponible en Fagron, o ftalato de hidroxipropilmetil celulosa disponible en Shin-Etsu Chemicals Co., Ltd. Estos polímeros son adecuados para formulaciones orales sólidas que son liberadas en el intestino. En una forma de realización preferida, las formulaciones farmacéuticas adecuadas son las que comprenden cualquier aglutinante o excipiente requerido para la neutralización del ácido clorhídrico (secreción de ácido gástrico) y/o para la inhibición de la pepsina y/o para la estimulación de la secreción de bicarbonato y mucus en un paciente.

20 La neutralización del ácido clorhídrico y/o la inhibición de la pepsina en el estómago pueden llevarse a cabo, por ejemplo, con sucralfato o con un polímero de unión de protones, tal como, pero no se limita a, polietilenimina, o cualquier antiácido neutralizante o cualquier bloqueante de ácidos elegido de entre el grupo que consiste en sales de aluminio, sales de bismuto, sales de magnesio, bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio, citrato de potasio, tartrato sódico de potasio, fosfato tricálcico, y mezclas de los mismos.

25 Algunos otros tipos de bloqueantes de ácidos que pueden usarse en la formulación adecuada se denominan inhibidores de la bomba de protones gástrica (o inhibidores de la ATPasa de H⁺/K⁺ gástrica), análogos de prostaglandinas y antagonistas de los receptores H₂ de la histamina. Estos incluyen, pero no se limitan a, misoprostol, ranitidina (usada en ZANTAC®), cimetidina (usada en TAGAMET®), nizatidina (usada en AXID®), famotidina (usada en PEPCID®), sufotidina, roxatidina, bisfentidina, tiotidina, lamtidina, niperotidina, mifentidina, zaltindina, loxitidina, omeprazol (usado en PRISOLEC®) y rabeprazol.

Preferiblemente, la DnaK se usa con agentes espesantes elegidos de entre azúcares no reductores.

35 En otra forma de realización preferida, la formulación adecuada comprende una microesfera de dicha al menos una sustancia unida a, o encapsulada en, una partícula inerte bajo cualquier forma, con un tamaño de malla de aproximadamente 30 - 35 de malla (desde aproximadamente 600 μm hasta 500 μm) o mayor de aproximadamente 40 de malla, y lo más preferiblemente en el intervalo de desde aproximadamente 45 hasta 200 de malla, y puede ser, por ejemplo, un granulado, un polvo de sílice, un cristal de sal o un cristal de azúcar.

40 **Legendas de las figuras**

Figura 1: análisis mediante SDS-PAGE después de una cromatografía en Q-sepharose HP de acuerdo con el ejemplo 1.

Figura 2: análisis mediante SDS-PAGE después de una cromatografía de hidroxapatito de tipo II de acuerdo con el ejemplo 1.

45 **Figura 3:** análisis mediante SDS-PAGE después de una cromatografía por diafiltración / exclusión por tamaños.

Figura 4: análisis mediante SDS-PAGE después de una cromatografía de sepharosa en gelatina. Las muestras (5 μg de cada preparación) se desnaturalizaron y se cargaron en un gel al 12 % de Bis / Tres NU-PAGE. Después de la electroforesis, las proteínas se tiñeron mediante una tinción de plata.

QSHP = Q Sepharose HP; HA = hidroxapatito; GS = sepharosa en gelatina.

50 **Figura 5:** análisis mediante SDS-PAGE de la DnaK purificada. La sustancia farmacológica se desnaturaliza y se carga en un gel al 4 - 12 % de Bis / Tres NU-PAGE. Después de la electroforesis, la proteína se tiñó con azul de Coomassie R250.

Figura 6: actividad ATPasa de la DnaK.

Figura 7: efecto proinflamatorio de la DnaK. Se incubó sangre completa en presencia de diferentes concentraciones de DnaK o de lipopolisacáridos bacterianos (LPS). Se cuantificaron las citocinas interleucina 1b (IL-1b), interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral α (TN-Fa) mediante ELISA.

5 **Figura 8:** efecto de la DnaK sobre las respuestas de los linfocitos T. Se incubaron PBMC humanos 6 días en presencia de DnaK (10 mg/ μ l) o de fitohemaglutinina (5 mg/ μ l). Las diferentes citocinas fueron cuantificadas en el medio de cultivo mediante ELISA. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación de 2 determinaciones, para 6 donantes diferentes. CTRL = control.

10 **Figura 9:** efecto de la DnaK sobre la producción de IFN- γ inducida por candidina. Se incubaron PBMC humanos 3 días en presencia de candidina (3,5 mg/ μ l) y de concentraciones crecientes de DnaK. La producción de IFN- γ se cuantificó mediante ELISA en el medio de cultivo. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación típica de 4 determinaciones.

15 **Figura 10:** producción de IL-10 por parte de Treg. Se añadieron células CD4⁺ / CD25⁺ purificadas y/o células CD4⁺CD25⁻ en cantidades precisas a células dendríticas purificadas pretratadas 3 días con DnaK (10 mg/ μ l) o con BSA (10 mg/ μ l). Las células se cultivaron adicionalmente en presencia de DnaK o de BSA y fueron estimuladas o no con PHA.

El IFN- γ y la IL-10 fueron cuantificados en el medio de cultivo mediante ELISA. 25- / 25+ representa la mezcla de 2 poblaciones en una proporción de 1/1.

Figura 11: presencia de anticuerpos anti-DnaK en suero humano. Se recubrieron placas de 96 pocillos con la DnaK o la BSA para ser usadas como proteína de captura para el ensayo de ELISA.

20 Se usaron sueros de voluntarios sanos y de pacientes alérgicos a una dilución de 1/100. Las IgG fueron detectadas con anticuerpos anti-IgG humana-HRP.

La invención se explica con más detalle mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: producción y purificación de la DnaK

Producción de DnaK

25 Cepa bacteriana

Se modifica genéticamente la cepa de *Escherichia coli* JS219/pOFXtac-1/KJ1 mediante la introducción de un plásmido que codifica para la DnaK de *E. coli*. La etapa de clonación y la construcción del vector pOFXtac-1/KJ1 han sido descritas por Castanie MP, Berges H, Oreglia J, Prere MF, Fayet O A set of pBR322-compatible plasmids allowing the testing of chaperone-assisted folding of proteins overexpressed in *Escherichia coli*; Anal Biochem (1997) 254 (1): 150 - 152.

Precultivo

35 Se deja descongelar un vial de siembra maestra (1,5 ml) a la temperatura ambiente. Se inoculan cada uno de tres matraces de agitación de 2 l que contienen 500 ml de YES + medio de canamicina (30 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl y 50 mg/l de sulfato ácido de canamicina) con 400 ml de la siembra maestra y se incuban con agitación (270 rpm) durante 6 \pm 0,5 horas a 37 °C, hasta que la DO_{600nm} esté por encima de 0,7 unidades.

Fermentación

40 El volumen del precultivo se añade a un fermentador previamente esterilizado que contiene 50 l de NRJ18 + medio de canamicina (5,2 g/l de KH₂PO₄, 10,7 g/l de K₂HPO₄, 0,4 g/l de glicerol, 50 g/l de extracto de levadura, 30 g/l de peptona de soja, 2,5 g/l de MgSO₄ · 7 H₂O, 0,6 ml/l de SAG471, 100 mg/l de sulfato ácido de canamicina). La temperatura se mantiene a 37 °C \pm 5 °C y la presión a 360 mbar. Cuando la densidad óptica es de 25 \pm 1, se induce el cultivo mediante la adición de IPTG (concentración final de 1 mM). Las condiciones de inducción se mantienen entonces durante 4 horas. El cultivo se enfría rápidamente por debajo de 20 °C. El medio se filtra a través de un dispositivo de filtración de 50 pm Sartopure PP2. Los sedimentos celulares se recuperan mediante una centrifugación a 4.500 rpm (5.000 x g) durante 30 minutos a 4 °C y se congelan a -20 °C hasta su uso.

45 Desorganización celular y filtración del sobrenadante

50 Los sedimentos celulares se descongelaron a la temperatura ambiente en Tris-HCl 20 mM a pH 8. Después, la concentración de la pasta células se ajusta a 166,6 g de peso de células frescas / litro mediante la adición de tampón. La suspensión celular se introduce en un tanque colocado en hielo. Las células homogeneizadas se desorganizan con un desorganizador a alta presión Niro Soavi Panda a una presión media de 800 & 50 bares, durante 2 ciclos. El lisado celular se centrifuga durante 30 minutos a 16.000 g (8.000 rpm), a 4 °C. El sobrenadante se recoge y se filtra a través de un Sartobran P Maxicap de 10 pulgadas (0,2 μ m). El sobrenadante filtrado se

mantiene a 4 °C durante una noche antes de la siguiente etapa.

Purificación de la DnaK

Cromatografía en Sepharose Q HP (QHP)

5 Se lleva a cabo una cromatografía de intercambio aniónico con Sepharose Q HP (Amersham Biosciences). La columna se rellena con agua muy purificada a un caudal lineal de 68 cm/h (33,4 l/h). Las dimensiones del lecho de la columna rellena son: diámetro = 250 mm, área transversal = 132 cm², lecho = 25,0 cm, volumen de relleno = aproximadamente 12,27 l.

10 El sobrenadante filtrado se diluye dos veces con Tris-HCl 20 mM a pH 8,0 y si se requiere, el pH se ajusta a pH 8 ± 0,1 con una disolución de Tris 1 M (disolución con el pH no ajustado). La conductividad final debe ser < 10 mS/cm. El sobrenadante diluido se carga entonces en la columna a un caudal de 22,1 l/h (45 cm/h). Una vez completada la carga, la columna se lava con entre 2,0 y 3,0 VC de Tris-HCl 20 mM a pH 8,0 a 19,6 l/h (41,5 cm/h), hasta que la línea de base llega a cero. La elución se realiza en 2 etapas a 22,1 l/h (45 cm/h): la primera etapa se realiza con 2 - 3 VC de tampón de Tris-HCl 20 mM + NaCl 0,25 M a pH 8,0. La segunda etapa se realiza con 2 - 3 VC de tampón de Tris-HCl 20 mM + NaCl 0,45 M a pH 8,0. La fracción recogida durante esta etapa es retenida para la siguiente etapa de purificación. Se sigue la absorbancia a 280 nm. El eluido se almacena a 2 - 8 °C durante una noche hasta la siguiente etapa de purificación.

Las muestras (20 µl de cada fracción) se desnaturalizaron y se cargaron en un gel a entre el 4 y el 12 % de Bis / Tres NU-PAGE. Después de la electroforesis, las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie (véase la figura 1).

Cromatografía de hidroxiapatito de tipo II (HA)

20 La segunda cromatografía se lleva a cabo con hidroxiapatito de tipo II - 40 µm (Bio-Rad). La resina (2.000 g) se vierte en 3,2 l de Na₂HPO₄ · 12 H₂O + NaH₂PO₄ · 2 H₂O 200 mM - pH 6,8 con una mezcla suave. La columna se llena con Na₂HPO₄ · 12 H₂O + NaH₂PO₄ · 2 H₂O 200 mM - pH 6,8 a un caudal lineal de 175 cm/h (26,9 l/h). Las dimensiones del lecho de la columna rellena son: diámetro = 14 cm, área transversal = 154 cm², lecho = 21,5 cm, volumen de relleno = 3,31 l.

25 El eluido de la QHP se carga en 6 fracciones iguales en la columna de HA. Todo el proceso de hidroxiapatito se lleva a cabo a un caudal de 150 cm/h (23,1 l/h).

La columna se equilibra con entre 2,5 y 3,5 VC de 200 mM NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ a pH 6,8 seguido de entre 2,5 y 3,5 VC de NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ 5 mM a pH 6,8 hasta que se estabilizan el pH y la conductividad.

30 Después de ajustar el pH a 6,8 ± 0,1 con HCl al 50 %, el eluido de la QHP (un sexto del volumen total) se carga en la columna (es importante apreciar que la concentración de NaCl de la etapa cromatográfica previa no es importante para la adsorción del HA). Una vez completada la carga, la columna se lava con entre 1,5 y 2,5 VC de tampón de NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄ 5 mM a pH 6,8, hasta que el U.V. vuelve a la línea de base. Se sigue la absorbancia a 280 nm.

Después de eso se realiza la elución con un gradiente del 0 % al 100 % de tampón de NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ 200 mM a pH 6,8 en 10 VC. Habitualmente, la elución se ha completado después de aproximadamente 6 VC.

35 El pico eluido se recoge, las fracciones agrupadas se filtran a través de un filtro de 0,22 µm y se mantienen a 2 - 8 °C.

Después de la elución se lleva a cabo una etapa de regeneración con entre 2,5 y 3,5 VC de tampón de NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄ 5 mM a pH 6,8, antes de la carga de la siguiente muestra.

40 Las muestras se desnaturalizaron y se cargaron en un gel a entre el 4 y el 12 % de Bis / Tres NU-PAGE. Después de la electroforesis, las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie (véase la figura 2).

Diafiltración / cromatografía de exclusión por tamaños

45 Se intentaron separar las impurezas mediante diafiltración en una membrana de 30 kDa y mediante una cromatografía sobre una resina Sephacryl S100 HR. Las impurezas no pudieron ser eliminadas mediante estos dos procedimientos. De hecho, la impureza es recuperada en el retenido de la diafiltración como DnaK. La impureza coeluyó con la DnaK en la cromatografía de Sephacryl S100.

El análisis mediante SDS-PAGE de estas tres diferentes muestras se muestra en la figura 3. Las muestras se desnaturalizaron y se cargaron en un gel a entre el 4 y el 12 % de Bis / Tres NU-PAGE. Después de la electroforesis, las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie.

ES 2 509 351 T3

Cromatografía de flujo rápido en sepharosa en gelatina (GSFF)

5 El tercer procedimiento ensayado para separar las impurezas de la DnaK implica una cromatografía de flujo rápido en sepharosa en gelatina (GE Healthcare). La columna se rellena con agua muy purificada a un caudal lineal de 150 cm/h (19,9 l/h). Las dimensiones del lecho de la columna rellena son: diámetro = 13 cm, área transversal = 133 cm², lecho = 15 cm, volumen de relleno = 1,99 l.

El conjunto de eluidos de HA se carga en 9 fracciones iguales en la columna de GSFF. Entre los ciclos de GSFF se realiza una limpieza con cloruro de guanidio 6 M. Todo el proceso de Sepharose de gelatina se lleva a cabo a un caudal de 120 cm/h (15,9 l/h).

10 La columna se esteriliza con entre 1,5 y 2,5 VC de etanol al 70 % + acético ácido 0,1 M con un tiempo de contacto de 1 hora. Después se equilibra con entre 2,5 y 3,5 VC de NaCl 0,5 M + HEPES 5 mM, a pH 7,5.

El conjunto de eluidos de HA (un noveno del volumen total) se carga en la columna. Una vez completada la carga, la columna se lava con entre 1,5 y 2,5 VC de tampón de NaCl 0,5 M + HEPES 5 mM, a pH 7,5, hasta que el U.V. vuelve a la línea de base. Se sigue la absorbancia a 280 nm.

15 Después de eso se realiza la elución con entre 3 y 4 VC de NaCl 0,5 M + HEPES 5 mM + ATP 3 mM + MgCl₂ 1 mM, a pH 7,5.

Cuando la absorbancia aumenta se recogen las fracciones durante 2 VC. Después del noveno ciclo de GSFF, la columna se lava con entre 1,5 y 2,5 VC de cloruro de guanidio 6 M y después se lava con 3 VC de tampón de NaCl 0,5 M + HEPES 5 mM, a pH 7,5 y se almacena en etanol al 20 %.

20 Según se muestra en la figura 4, la cromatografía de resina de sepharosa en gelatina mejora claramente la pureza de la DnaK en comparación con la muestra obtenida después de la cromatografía de hidroxiapatito (comparación del carril 2 y el carril 3). En este caso, la pureza de la DnaK es mayor del 98,25 % (véase el ejemplo 2 y la figura 5).

Cuando se carga directamente el sobrenadante del lisado celular en la columna de sepharosa en gelatina, la pureza de la DnaK después de esta etapa es de aproximadamente el 95 %.

25 Cuando se realiza la etapa de sepharosa en gelatina etapa después de la Sepharose Q HP, la pureza de la DnaK no aumenta en comparación con la muestra obtenida después de la Sepharose Q HP y de la cromatografía de hidroxiapatito (figura 4, comparación del carril 2 y del carril 4).

Estos resultados demuestran que la combinación de estos tres tipos de cromatografía (IEX, HA y GSFF) es absolutamente necesaria para la obtención de una preparación de DnaK con una pureza > del 98 %.

Concentración y diafiltración mediante filtración de flujo tangencial

30 La concentración se lleva a cabo con dos membranas PLCTK pellicon (30 kDa de peso molecular de corte, 0,1 m², Millipore,) mediante el uso de un Proflux M 12 (Millipore).

35 Las membranas se lavan dos veces con 3 l de agua para inyección, y se comprueba la integridad de las membranas antes de la operación. Se realiza una esterilización mediante la recirculación continua de NaOH 0,5 M durante 60 minutos. Después las membranas se aclaran con tampón de Na₂HPO₄ · 12 H₂O 30 mM + NaH₂PO₄ · 2 H₂O 20 mM a pH 7,3, hasta que el pH del permeado alcanza 7,3 ± 0,1.

El conjunto de eluidos de de la sepharosa en gelatina (conjunto de GSFF-E) se concentran hasta 2.000 ml y después se diafiltran frente a 10 volúmenes de tampón de Na₂HPO₄ · 12 H₂O 30 mM + NaH₂PO₄ · 2 H₂O 20 mM a pH 7,3 con objeto de intercambiar el tampón. Se usan los siguientes parámetros del proceso: P_{in} = 1,5 ± 0,1 bar, P_{out} = 0,5 ± 0,1 bar, TMP = 1 bar.

40 Después de la diafiltración, el sistema y las membranas se aclaran dos veces con 200 ml de tampón de Na₂HPO₄ · 12 H₂O 30 mM + NaH₂PO₄ · 2 H₂O 20 mM a pH 7,3. La disolución de aclarado usada se añade al retenido del diafiltrado.

45 Después de la diafiltración, el sistema y las membranas se aclaran con agua para inyección. Se realiza una estabilización mediante la circulación continua de hidróxido de sodio 0,5 M durante 60 minutos. El sistema se almacena en hidróxido de sodio 0,1 M.

Filtración estéril

De acuerdo con un ensayo de UV realizado sobre el retenido del diafiltrado, se ajusta su concentración a 2,5 mg/ml con tampón de Na₂HPO₄ · 12 H₂O 30 mM + NaH₂PO₄ · 2 H₂O 20 mM a pH 7,3.

50 La filtración de la fracción de DnaK-ATP diafiltrada de la etapa 4 se realiza con un Millipak 60 (filtro de 0,22 µm). Antes de la filtración, el filtro se aclara con tampón de Na₂HPO₄ · 12 H₂O 30 mM + NaH₂PO₄ · 2 H₂O 20 mM a pH

7.3. Todas las alícuotas de DnaK-ATP se almacenan a -20 °C.

Ejemplo 2: características de la DnaK

La DnaK obtenida mediante el ejemplo 1 es muy pura:

Pureza de la proteína

- 5 - en términos de proteínas, la pureza es mayor del 98,25 % según se determina mediante una tinción de Coomassie del gel de SDS-PAGE (figura 5). La sustancia se desnaturalizó y se cargaron cantidades decrecientes en un gel al 4 - 12 % de Bis / Tres NU-PAGE. Las proteínas se separaron mediante electroforesis y se tiñeron con azul de Coomassie R250 (al 0,1 %). La pureza del producto se evalúa mediante la comparación de la intensidad de cada posible banda contaminante detectable en el carril 2 con la intensidad de la banda de la DnaK a diferentes diluciones.
- 10

Contenido en ADN residual

- 15 - el contenido en ADN y residual, cuantificado mediante una RT-PCR con cebadores específicos para el ADN bacteriano para ADN cromosómico 23 S, es de 0,22 ng/mg de proteína. La PCR cuantitativa en tiempo real se basa en la amplificación del ADN genómico mediante un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el que la cantidad de ADN amplificado es seguida en tiempo real mediante mediciones de fluorescencia, mediante el uso del pigmento verde SYBR que se une a la hebra de ADN bicatenario recién formada. Los cebadores para ADN bacterianos se han elegido en el ADN cromosómico 23S según proponen Smith y col. (Smith y col., BioTechnique (1999) 26: 518 - 526).

Contenido en proteínas residuales de la célula hospedadora

- 20 - el contenido en proteínas residuales de la célula hospedadora determinado mediante ELISA es del 0,00004 %. La medición del contenido en proteínas bacterianas desarrollada por Cygnus Technologies Inc. se basa en el principio del sándwich de ELISA. En resumen, se recubren placas de 96 pocillos con anticuerpos de captura anti-*E. coli*. Las proteínas de *E. coli* contenidas en las muestras son atrapadas por estos anticuerpos y detectadas mediante el uso de otros anticuerpos específicos contra *E. coli* acoplados a fosfatasa alcalina. Después de lavar para eliminar los reactivos no unidos, se añade el sustrato de la enzima (p-nitrofenilfosfato - pNPP), y la medición de la absorbancia es proporcional a la concentración del producto de la reacción, y por lo tanto, a las proteínas de la célula hospedadora presentes en la muestra.
- 25

Contenido en endotoxinas

- 30 El contenido en endotoxinas (determinado mediante el método de LAL) es de 0,002 U.E./µg de proteína. El procedimiento usado para la cuantificación de las endotoxinas es el ensayo Kinetic-QCL® desarrollado por Cambrex. Se basa en el siguiente principio, las endotoxinas de las bacterias gramnegativas catalizan la activación de una proenzima en el lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL). Tras la activación de esta enzima se libera p-nitroanilina (pNA-amarillo) desde Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNa (incoloro). La absorbancia a 405 nm se mide de forma continua durante el periodo de incubación, y es proporcional a la concentración de pNA en el medio. La concentración de endotoxinas en la muestra se calcula a partir de su tiempo de reacción mediante la comparación con el tiempo de reacción de cantidades conocidas de estándares de endotoxinas de *E. coli*.
- 35

Contenido en nucleótidos

- el 40 % de la DnaK purificada obtenida mediante este procedimiento se corresponde con una DnaK exenta de nucleótidos, y el otro 60 % es la DnaK-ADP.

40 Ejemplo 3: actividad de ATPasa de la DnaK

- Con objeto de comprobar la funcionalidad de la DnaK, los inventores midieron su actividad de ATPasa. Se añadió ATP exógeno y se siguió la producción de ADP con el tiempo. Los nucleótidos son analizados mediante cromatografía de pares iónicos en fase inversa en una columna C18. La tasa de hidrólisis del ATP es de 0,05 min⁻¹, lo que está de acuerdo con los valores notificados en la bibliografía (Jordan y Mc-Macken, J. Biol. Chem. (1995) 270: 4563 - 4569). En detalle, se añadió ATP exógeno (6 equivalentes molares) a la DnaK, en presencia de Tris 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 3 mM y KCl 10 mM. Se recogió una alícuota (500 µl) del medio de reacción después de 5, 15, 30, 45 y 60 minutos, y las reacciones se detuvieron mediante la adición de 100 µl de HCl 1 M. Los nucleótidos se separaron de la DnaK mediante filtración con filtros de 10 kDa y, después de la neutralización del filtrado, se analizaron mediante cromatografía de pares iónicos en fase inversa en una columna C18 (figura 6). La disolución de elución estaba formada por tampón de fosfato 100 mM y metanol al 20 %, se usó tetrabutil amonio como agente de emparejamiento.
- 45
- 50

Ejemplo 4: propiedades biológicas de la DnaK

La DnaK no tiene un efecto proinflamatorio:

5 Cuando se añadió a sangre completa, la DnaK indujo una producción muy baja de interleucina 1 β (IL-1 β), de interleucina 6 (IL-6) o de factor de necrosis tumoral α (TNF α), en comparación con los lipopolisacáridos bacterianos (LPS). La producción de estas citocinas sólo era detectable a una elevada concentración de DnaK (30 μ g/ml) (figura 7). La producción de citocinas se cuantificó en sangre completa incubada 24 h en presencia de DnaK o de LPS, la medición se realizó mediante ELISA.

La DnaK no induce por sí misma respuestas en los T_H1 ni en los T_H2:

10 Cuando se incubaron PBMC (linfocitos sanguíneos periféricos) humanos (6 días) en presencia de DnaK sola, no hay producción de interferón- γ (IFN- γ), lo que reflejaría la activación de los linfocitos de tipo T_H1 (figura 8). La activación de los linfocitos T_H1 y la producción de IFN- γ conducen a la activación de respuestas inflamatorias.

No hay producción de interleucina 5 ni 13 (IL-5, IL-13) (figura 8), que son producidas tras la activación de los linfocitos T_H2. Las respuestas de los T_H2 están implicadas en la producción de anticuerpos IgE y en la desgranulación de los mastocitos.

15 El control positivo es la PHA (fitohemaglutinina) que activa los linfocitos de una forma no específica. La producción de citocinas se midió mediante ELISA en el medio de cultivo para 5 voluntarios diferentes (cada medición se realizó por duplicado).

Fue detectable una débil producción de interleucina 10 (IL-10) en respuesta a la DnaK, en 2 muestras de 6. La IL-10 está implicada en el desarrollo del fenómeno de tolerancia.

20 La DnaK no estimula la proliferación de los PBMC:

25 Se incubaron PBMC purificados a partir de sangre humana en placas de 96 pocillos durante 5 días en presencia de DnaK (1 - 9 μ g/ml) o de antígeno del virus de la varicela zoster (1 CPAU/ml como control positivo). Los 100 μ l del medio se sustituyeron por medio reciente que contenía 1 μ Ci de timidina tritiada, y las células se cultivaron adicionalmente durante 16 horas. El día 6 se midió la incorporación de la timidina tritiada con un contador beta mediante el uso de centelleo líquido.

Condición	Cpm de [³ H] timidina
Tampón (control negativo)	2812 \pm 3171
DnaK (1 μ g/ml)	3334 \pm 3441
DnaK (3 μ g/ml)	3515 \pm 3617
DnaK (9 μ g/ml)	4405 \pm 4601
Antígenos de varicela zoster	53408 \pm 21180

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación típica 5 determinaciones.

La DnaK inhibe la producción de IFN- γ inducida por otro antígeno:

30 Se incubaron PBMC humanos 3 días con candidina, sola o en presencia de concentraciones crecientes de DnaK (1-20 μ g/ml). El IFN- γ en el medio de cultivo se cuantificó mediante ELISA. Los resultados se presentan como la media \pm DT de 4 determinaciones.

Dado que el IFN- γ está implicado en la respuesta inflamatoria frente a antígenos, el hecho de que su producción fuera inhibida en presencia de la DnaK sugiere que la DnaK podría tener algún efecto antiinflamatorio (figura 9).

La DnaK estimula la producción de IL-10 por parte de las células Treg:

35 La IL-10 es un mediador de la tolerancia. Es producida por algunas células Treg, que expresan fuertemente el CD25 en su superficie celular (son células CD25⁺).

40 Los inventores purificaron células dendríticas, células CD25⁺ y CD25⁻ procedentes de sangre humana, y las mezclaron en una proporción precisa. Las células dendríticas se incubaron en primer lugar en presencia de BSA o de DnaK (10 μ g/ml), después se añadieron los linfocitos: CD25⁻ solos, CD25⁺ solos o la mezcla de CD25⁻ / CD25⁺ (proporción de 1:1). El cultivo se mantuvo durante 3 días y las células fueron estimuladas o no con PHA.

Como se esperaba, la presencia de células CD25⁺ en el cultivo inhibió la producción del IFN- γ por parte de las células CD25⁻ (figura 10). La producción de IL-10 por parte de las células CD25⁺ es más importante para las células incubadas con DnaK que para las células incubadas con BSA, la producción está incluso aumentada para la mezcla

de poblaciones celulares. Esto sugiere que la DnaK estimula la producción de IL-10 por parte de las Treg, después de la activación de los linfocitos T con PHA.

Existen anticuerpos anti-DnaK en la sangre humana:

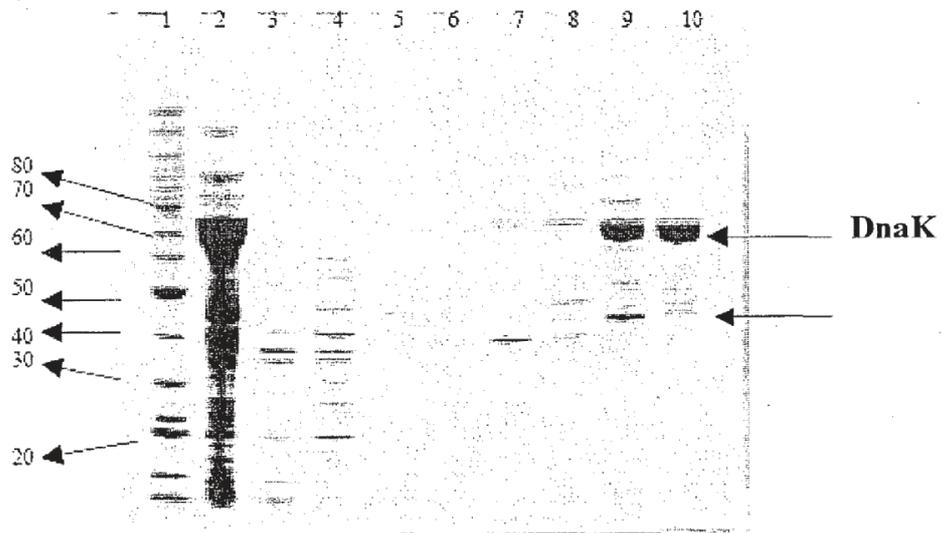
- 5 Usando un ensayo de ELISA los inventores han puesto de relieve la presencia de IgG anti-DnaK en el suero humano. Para el 40 % de las muestras ensayadas (procedentes de voluntarios sanos y de pacientes alérgicos), la DO_{405nm} era mayor en el caso de la DnaK que con la BSA (figura 11), lo que refleja un mayor título de IgG frente a la DnaK que frente a la BSA.

REIVINDICACIONES

1. Preparación de DnaK purificada recombinante obtenible mediante un procedimiento que comprende las etapas de
 - a) cromatografía de intercambio iónico,
 - b) cromatografía de hidroxilapatito, y
 - c) cromatografía de gelatina,
- 5 en la que la preparación de la DnaK tiene:
 - una actividad de ATPasa sin la adición de ninguna otra proteína chaperona,
 - una pureza del 98 % en peso de proteína, y
 - está esencialmente exenta de impurezas estimulantes de los linfocitos T.
- 10 2. La preparación de DnaK purificada recombinante de la reivindicación 1 con que tiene
 - una contaminación por ADN residual ≤ 1 ng/mg de proteína
 - una contaminación por proteínas residuales de la célula hospedadora (HCP) < 5 % en peso, y
 - una contaminación por endotoxinas $< 0,5$ U.E./ μ g de proteína.
- 15 3. La preparación de DnaK recombinante de la reivindicación 1 o 2 en la que
 - la contaminación por ADN residual es $\leq 0,5$ ng/mg, y/o
 - la HCP es $< 0,1$ % en peso, y/o
 - la contaminación por endotoxinas es $\leq 0,01$ U.E./ μ g de proteína.
- 20 4. La preparación de DnaK recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la DnaK está hidrolizada.
5. La preparación de DnaK purificada recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la DnaK está
 - en forma de un complejo con ADP,
 - en forma de un complejo con ATP, o
 - esencialmente exenta de nucleótidos.
- 25 6. Un procedimiento de purificación de una preparación de DnaK recombinante según se define en una de las reivindicaciones 1 a 5, a partir de un lisado celular, que comprende las etapas de
 - a) cromatografía de intercambio iónico,
 - b) cromatografía de hidroxilapatito, y
 - c) cromatografía de gelatina.
- 30 7. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que la DnaK procede de bacterias saprófitas, preferiblemente de *E. coli*.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7 en el que
 - la cromatografía de intercambio iónico es una cromatografía de intercambio aniónico y/o
 - en el que la cromatografía de hidroxilapatito es una cromatografía de hidroxilapatito de tipo II.
- 35 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 en el que la cromatografía de gelatina se lleva a cabo en sepharosa en gelatina.
10. Un procedimiento de formación de un complejo entre la DnaK recombinante y al menos un péptido o al menos una proteína que comprende las etapas de
 - a) combinar la DnaK recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 con ATP a una proporción molar HSP:ATP de 1:1 hasta 1:10;
 - b) añadir al menos un péptido o al menos una proteína; y
 - c) incubar a una temperatura de entre 10 °C y 60 °C, preferiblemente de entre 20 °C y 45 °C.
- 40 11. Una mezcla de DnaK recombinante según se define en las reivindicaciones 1 a 5 y al menos un péptido o al menos una proteína, preferiblemente en forma de un complejo.
- 45 12. La DnaK de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o la mezcla o el complejo de la reivindicación 11, para su uso en diagnósticos *in vivo*.
13. Uso de la DnaK según se define en una de las reivindicaciones 1 a 5, o la mezcla o el complejo de la reivindicación 11, en diagnósticos *in vitro*.

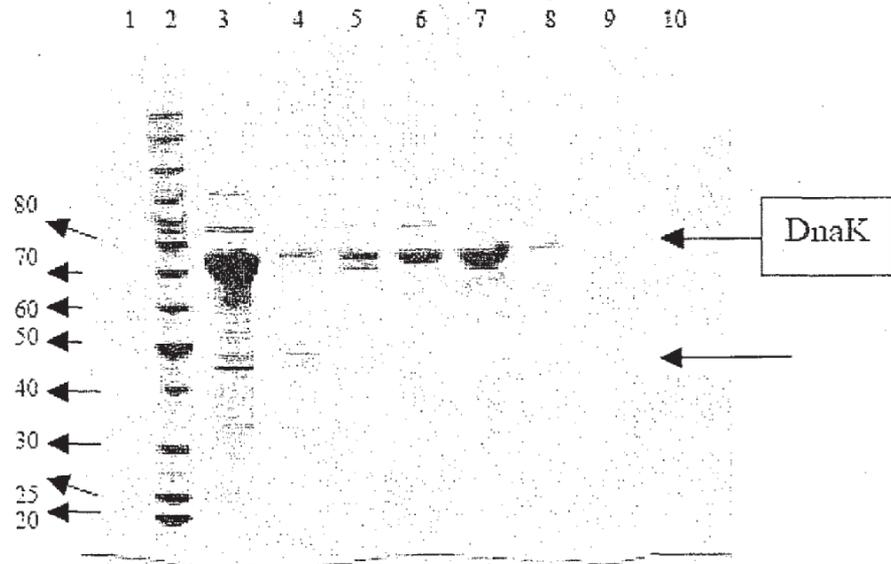
14. La DnaK según se define en las reivindicaciones 1 a 5, o la mezcla o el complejo de la reivindicación 11, para su uso en la inducción de tolerancia, en el tratamiento o la prevención de alergia, de enfermedades autoinmunes, de rechazo de trasplantes o de enfermedades neurodegenerativas, o como un coadyuvante para inducir una respuesta humoral o una respuesta reguladora de los linfocitos T.
- 5 15. Un producto farmacéutico que comprende una preparación de DnaK purificada recombinante según se define en las reivindicaciones 1 a 5, o la mezcla o el complejo de la reivindicación 11.

Figura 1



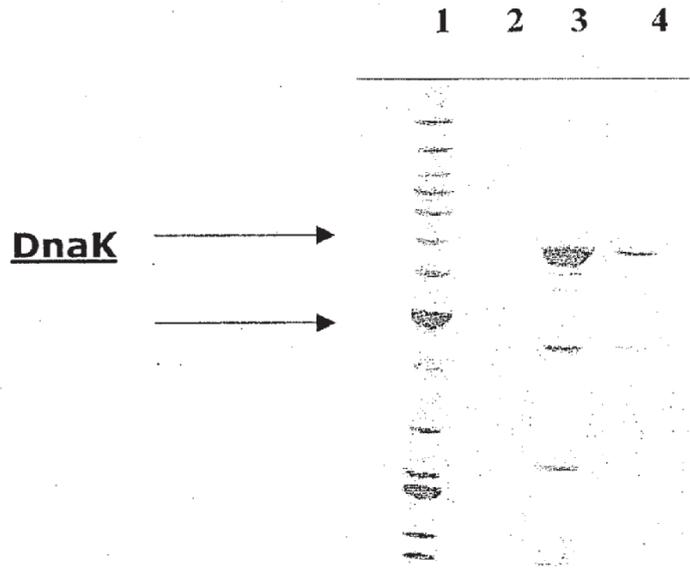
- Carril 1: escalera proteica de referencia
- Carril 2: lisado celular filtrado
- Carril 3: fracciones de elución F26-27
- Carril 4: fracciones de elución F29-33
- Carril 5: fracciones de elución F34-38
- Carril 6: fracciones de elución F41-46
- Carril 7: fracciones de elución F49-52
- Carril 8: fracciones de elución F53-57
- Carril 9: fracciones de elución F65-70
- Carril 10: fracciones de elución F71-77

Figura 2



- Carril 2: escalera proteica de referencia
- Carril 3: carga
- Carril 4: flujo a través
- Carril 5: fracciones de elución 1-9
- Carril 6: fracciones de elución 18-27
- Carril 7: fracciones de elución 28-41
- Carril 8: fracciones de elución 42-48

Figura 3



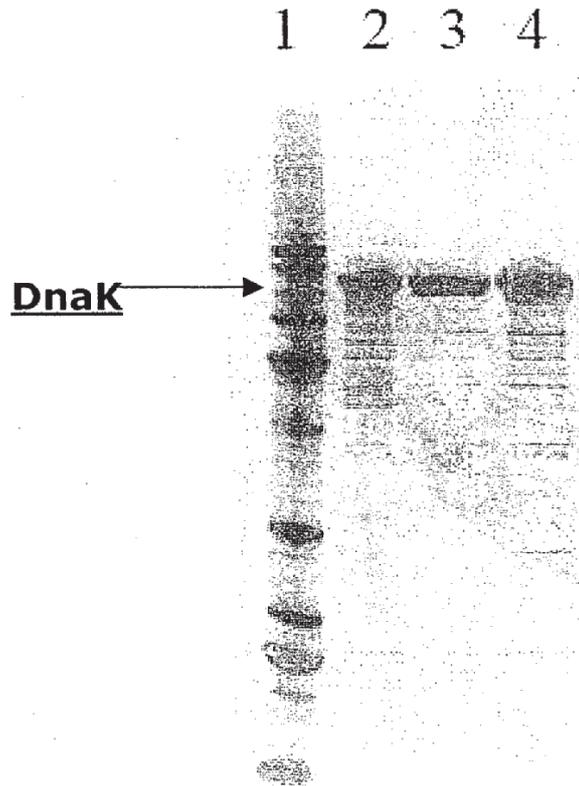
Carril 1: escalera proteica de referencia

Carril 2: permeado de la diafiltración con la membrana de 30 kDa

Carril 3: retenido de la diafiltración con la membrana de 30 kDa

Carril 4: muestra después de la cromatografía en resina Sephacryl S100 HR

Figura 4



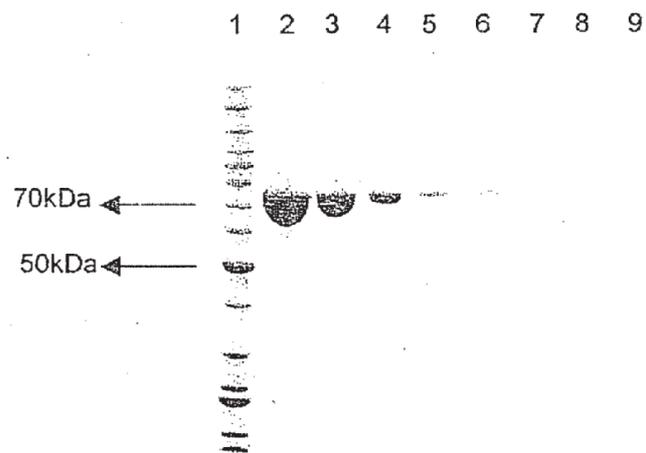
Carril 1: escalera de peso molecular de 10 kDa

Carril 2: preparación de DnaK después de la QSH + HA

Carril 3: preparación de DnaK después de la QSH + HA + GS

Carril 4: preparación de DnaK después de la QSH + GS

Figura 5



- Carril 1: marcadores de peso molecular
- Carril 2: 10 μg de DnaK
- Carril 3: 5 μg de DnaK
- Carril 4: 1 μg de DnaK
- Carril 5: 0,2 μg de DnaK
- Carril 6: 0,1 μg de DnaK
- Carril 7: 0,05 μg de DnaK
- Carril 8: 0,025 μg de DnaK
- Carril 9: 0,01 μg de DnaK

Figura 6

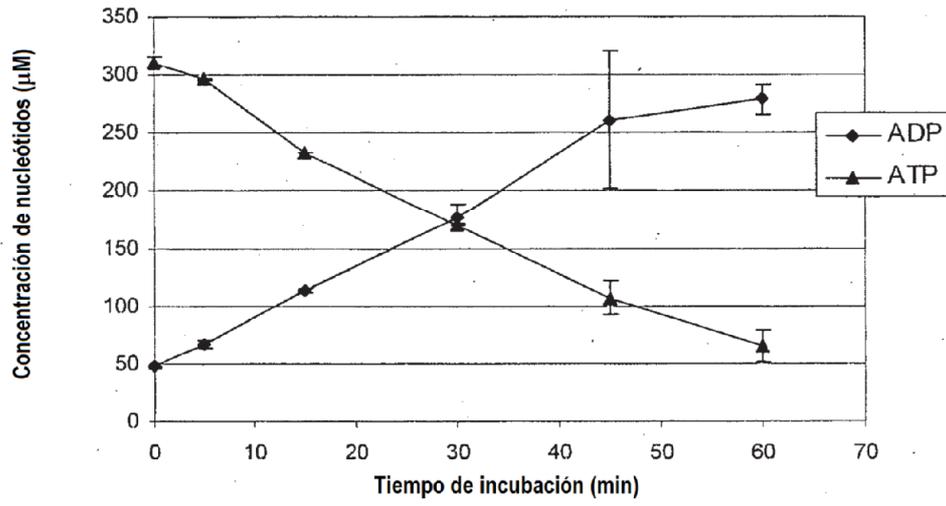


Figura 7

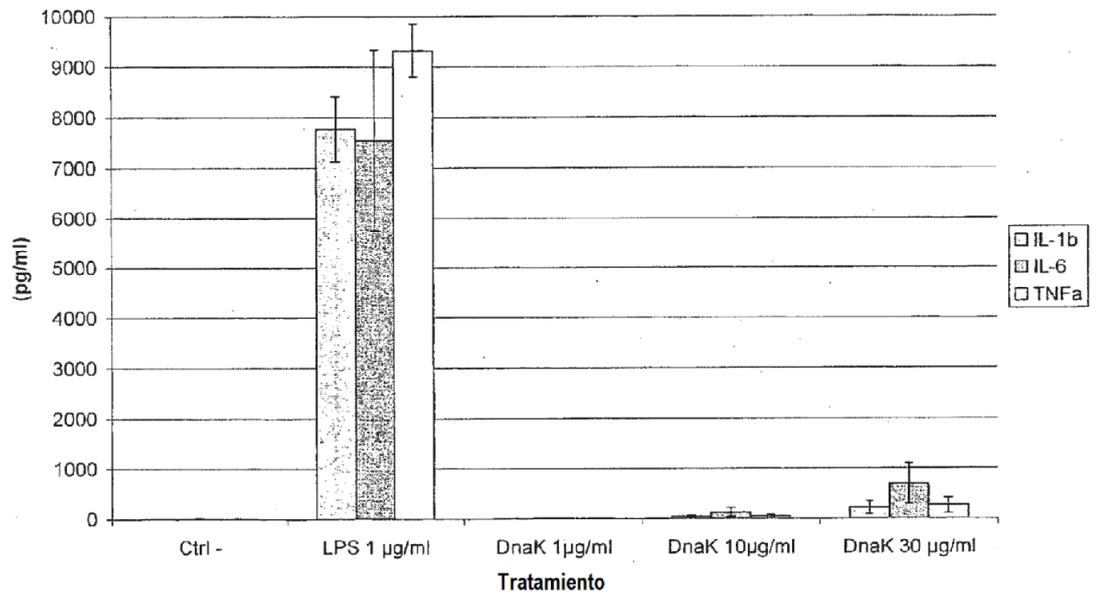


Figura 8

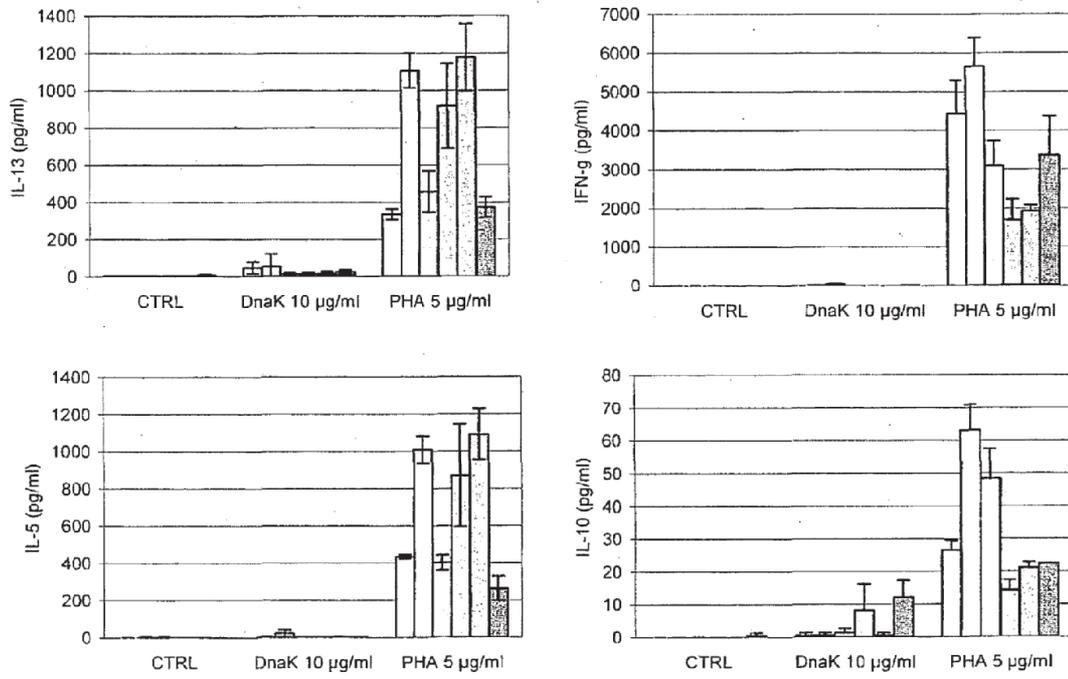


Figura 9

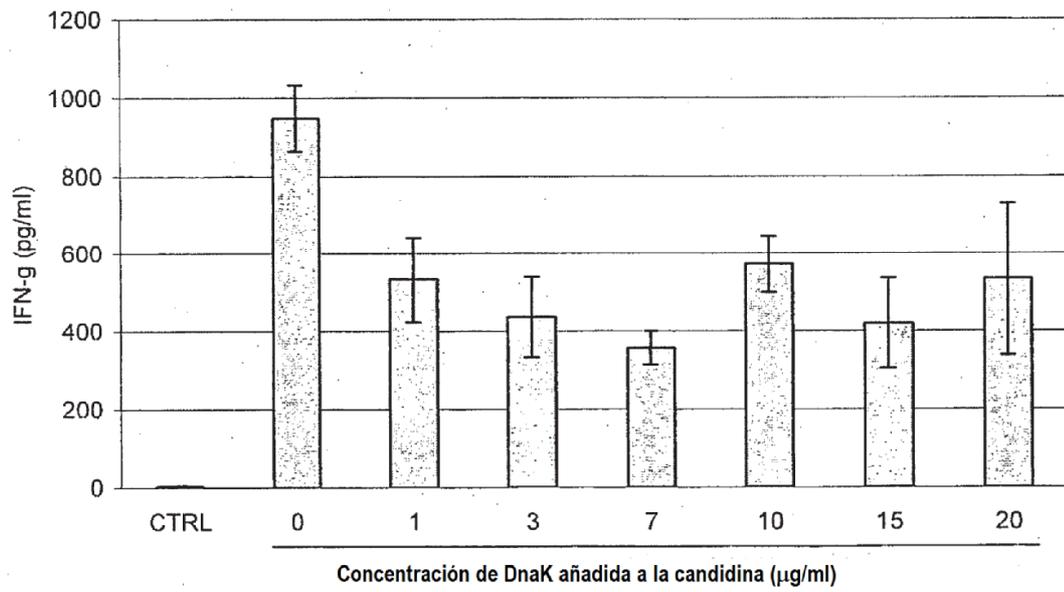


Figura 10

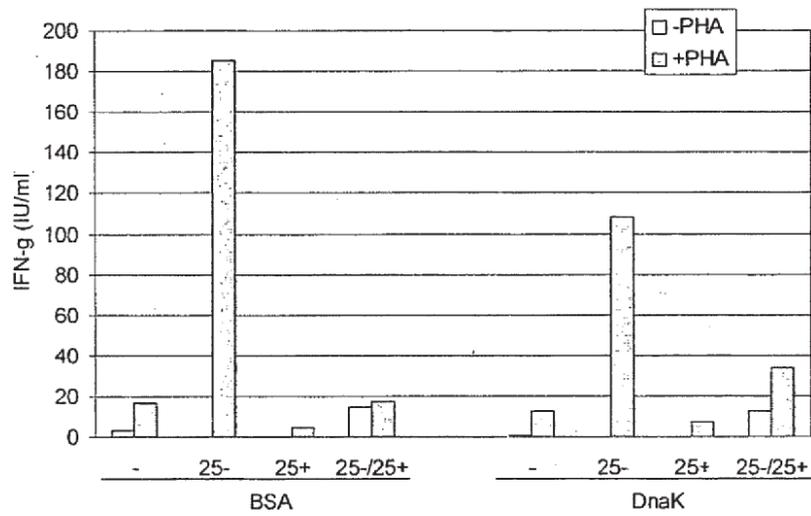
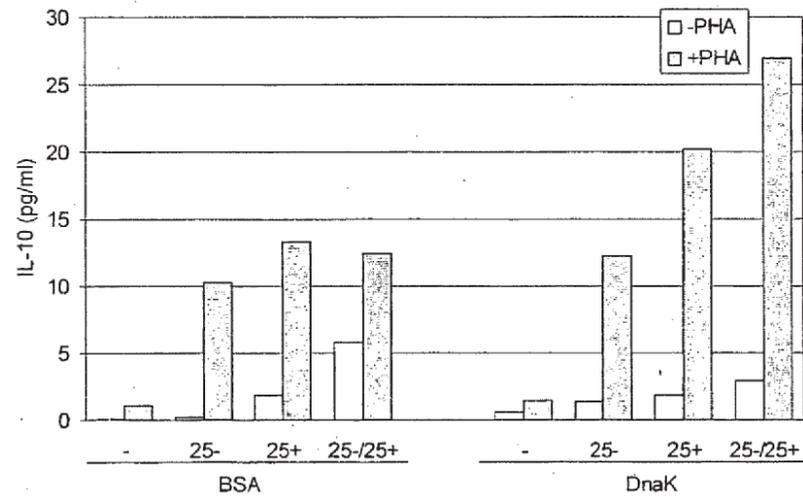


Figura 11

