

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 288**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/04 (2006.01)
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)
C07K 14/22 (2006.01)
C07K 14/35 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2009 E 09785592 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2341926**

54 Título: **Método de purificación de complejos de proteínas de choque térmico**

30 Prioridad:

05.09.2008 GB 0816242

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

22.09.2015

73 Titular/es:

**IMMUNOBIOLOGY LIMITED (100.0%)
Babraham Research Campus Babraham
Cambridge, Cambridgeshire CB22 3AT, GB**

72 Inventor/es:

**COLACO, CAMILO y
SALIM, KAMRAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 546 288 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

Método de purificación de complejos de proteínas de choque térmico

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una nueva metodología para la purificación de complejos de proteínas que comprenden proteínas de choque térmico acopladas con fragmentos de péptidos. Los complejos de proteínas proporcionados pueden emplearse para la preparación de composiciones de vacuna para la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas y del cáncer.

Antecedentes de la invención

10 La vacunación está ampliamente aceptada como el enfoque preferido para abordar la carga sanitaria global de enfermedades infecciosas y cánceres. Sin embargo, a pesar de los avances significativos en la comprensión de la biología molecular relacionada con las enfermedades infecciosas y los cánceres, el desarrollo de vacunas eficaces en estas áreas se ha visto limitado. Las vacunas más eficaces desarrolladas han empleado organismos vivos atenuados, pero el riesgo para la seguridad asociado que supone que estos patógenos atenuados reviertan a la virulencia ha limitado su uso amplio. Otro obstáculo importante que evita el desarrollo y uso a gran escala de vacunas más eficaces es la limitación asociada con la capacidad para identificar proteínas derivadas de patógenos candidatas que induzcan una inmunidad protectora amplia de una manera específica contra cepas variantes de patógenos microbianos cuando se administran como parte de una composición de vacuna.

15 Un enfoque concreto que promete conferir una inmunidad protectora amplia es el uso de complejos de proteínas de estrés como vacunas contra enfermedades infecciosas y cánceres (Colaco *et al.* (2004), *Biochem. Soc. Trans.*, 32:626-628; y Zeng *et al.* (2006), *Cancer Immunol. Immunother.*, 55:329-338). También existe amplia documentación que indica que los complejos de proteínas de choque térmico/péptidos antigénicos son eficaces como vacunas contra cánceres específicos (patente de EEUU n.º 5.997.873; patente de EEUU n.º 5.935.576; patente de EEUU n.º 5.750.119; patente de EEUU n.º 5.961.979; y patente de EEUU n.º 5.837.251). Colaco *et al.* han demostrado que los complejos de proteínas de choque-péptidos derivados de patógenos aislados a partir de células BCG sometidas a choque térmico inducen unas respuestas inmunológicas mediadas por T-auxiliares 1 (Th1) en un sujeto vacunado, que confieren inmunidad protectora contra una exposición viva en un modelo de exposición en aerosol murino de tuberculosis pulmonar (solicitud de patente internacional n.º WO 01/13944). Además, se ha demostrado, en las solicitudes de patente internacional n.ºs WO 02/20045, WO 00/10597 y WO 01/13943, que los complejos de proteínas de estrés aislados a partir de patógenos o de células infectadas por patógenos son eficaces como determinante inmunogénico dentro de vacunas contra enfermedades infecciosas.

20 Las proteínas de choque térmico (hsp) forman una familia de proteínas altamente conservadas que están ampliamente distribuidas a través de los reinos vegetal y animal. Basándose en su peso molecular (kDa), las principales proteínas de choque térmico se agrupan en seis familias diferentes: pequeñas (hsp de 20-30 kDa); hsp40; hsp60; hsp70; hsp90; y hsp100. Aunque las proteínas de choque térmico fueron originariamente identificadas en células sometidas a estrés térmico, se ha descubierto que están asociadas con muchas otras formas de estrés, tales como infecciones, estrés osmótico, estrés de citoquinas y similares. Por consiguiente, las proteínas de choque térmico también se denominan habitualmente proteínas de estrés (SP) debido a que su expresión no es provocada solamente por un estrés térmico. Los miembros de la familia hsp60 incluyen la importante chaperona GroEL. Esta forma complejos multiméricos con cochaperonas, tales como GroES. Muchos patógenos microbianos presentan otras familias de hsp60 que forman complejos diferenciados a partir de GroEL, y algunos miembros de la familia de hsp60 pueden ser más inmunogénicos, tales como la hsp65 de micobacterias. Los miembros de la familia hsp70 incluyen DnaK, y estos miembros de la familia hsp70 también forman complejos multiméricos con cochaperonas, tales como DnaJ. Otras proteínas de choque térmico importantes incluyen las AAA ATPasas, las proteínas Clp, el factor de activación, Hip, HtpG, NAC, Clp, GrpE, SecB y prefoldina.

25 Las proteínas de estrés se expresan de forma ubicua en células procariotas y eucariotas, en donde actúan como chaperonas en el plegamiento y desplegamiento de polipéptidos. Otro papel que desempeñan las proteínas de estrés es acompañar como chaperona a péptidos desde un compartimento celular a otro y, en el caso de células enfermas, también se sabe que las proteínas acompañan como chaperona a los péptidos virales o asociados a un tumor hasta la superficie celular. La función de chaperona de las proteínas de estrés se realiza mediante la formación de complejos entre las proteínas de estrés y el polipéptido acompañado. Estos polipéptidos pueden incluir fragmentos de péptidos.

30 En la respuesta inmunológica, los polipéptidos heterólogos o fragmentos de polipéptidos complejados con las proteínas de estrés forman complejos de proteínas de estrés-péptidos que pueden denominarse complejos de proteínas de choque térmico (HspC). Los HspC son capturados por células presentadoras de antígenos (APC) para proporcionar una fuente de péptidos antigénicos que pueden cargarse sobre moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) para la presentación sobre la superficie celular a las células T del sistema inmunológico.

35 Los HspC se han estudiado a fondo como vacunas del cáncer y se han desarrollado métodos para el aislamiento de

HspC de células tumorales para su uso como vacunas eficaces (patente de EEUU n.º 5.997.873; patente de EEUU n.º 5.935.576; patente de EEUU n.º 5.750.119; patente de EEUU n.º 5.961.979; y patente de EEUU n.º 5.837.251). Sin embargo, estos métodos consiguen al aislamiento de familias limitadas, y por tanto se excluye específicamente el uso de múltiples proteínas de chaperonas como determinante inmunogénico en vacunas. El empleo de HspC como vacuna para el cáncer puede mejorar significativamente con el uso de múltiples proteínas de chaperonas, en particular proteínas de choque térmico (indicado en Zeng *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. (2006), 55:329-338) y, así, se han desarrollado métodos para la purificación de múltiples proteínas de chaperonas y complejos de proteínas de chaperonas para su uso en vacunas. Por ejemplo, la patente de EEUU n.º 6.875.849 describe el uso del enfoque isoeléctrico de disolución libre (FF-IEF) para la purificación de HspC a partir de tumores para su uso como vacuna del cáncer.

Los presentes inventores han descubierto previamente que el FF-IEF también puede emplearse para aislar HspC a partir de patógenos y células infectadas para su uso como determinante inmunogénico en composiciones de vacunas para la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas. Sin embargo, una limitación clave de esta técnica han sido las dificultades asociadas con el desarrollo de un instrumento de FF-IEF a gran escala para producir las cantidades de complejos de proteínas de choque térmico/péptidos (HspC) que serían necesarias para la fabricación de vacunas de GMP comerciales a gran escala. Además, el FF-IEF separa los complejos basándose en sus puntos isoeléctricos (pI), y el proceso de enfoque de flujo libre es lento, con un tiempo de ejecución típico de 4 horas, durante las cuales se produce un alto nivel de degradación de las proteínas, limitando gravemente el uso del FF-IEF para la producción a gran escala de complejos de proteínas de choque térmico-péptidos purificados. Además, el uso de caotropsos, tales como urea, para mantener la solubilidad de las proteínas durante la purificación puede conducir a la alteración de algunos complejos de proteínas de choque térmico-péptidos. Además, el uso de anfólitos (anfólinas) para producir el gradiente de pH necesario durante el proceso de FF-IEF resulta en la introducción de otro contaminante, además de los caotropsos, en las preparaciones que contienen proteínas de choque térmico-péptidos. Estos contaminantes, que en sí mismos son inmunogénicos y también son inaceptables para las autoridades reguladoras, suponen una barrera significativa al uso del FF-IEF para la fabricación de composiciones de vacunas que contienen complejos de proteínas de choque térmico-péptidos.

El documento WO 02/28407 describe un método para purificar complejos de proteínas de choque térmico que emplea una cromatografía de afinidad de heparina.

Sumario de la invención

La invención es un método para la purificación a partir de una mezcla de origen, tal como se indica en la reivindicación 1.

Generalmente, el método proporciona la purificación de una pluralidad de complejos de proteínas de choque térmico-péptidos (HspC) a partir de una mezcla de origen. En ciertas realizaciones, los complejos de proteínas de choque térmico-polipéptidos comprenden proteínas de choque térmico de la misma familia, por ejemplo, proteínas de choque térmico de la familia HSP70. En otras realizaciones, los complejos comprenden proteínas de choque térmico de diferentes familias de proteínas de choque térmico. En ciertas realizaciones, los complejos comprenden un polipéptido que es un antígeno específico de tumor. En ciertas otras realizaciones, el polipéptido se deriva de un organismo patógeno que provoca una enfermedad infecciosa en un hospedante.

En ciertas realizaciones, el método comprende también la etapa de preparar un lisado de células aclarado a partir de la mezcla de origen que comprende el complejo de proteínas de choque térmico identificado. En ciertas realizaciones, el lisado de células, que también puede denominarse lisado celular, se deriva de una célula eucariota. En ciertas otras realizaciones, el lisado de células se deriva de una célula bacteriana. En ciertas otras realizaciones, el lisado de células se deriva de una célula cancerosa o de células aisladas a partir de una masa tumoral.

En ciertas realizaciones, el tampón no incluye caotropsos y/o tensioactivos y/o anfólitos. Los caotropsos (también conocidos como agentes caotrópicos, o reactivos caotrópicos) incluyen urea, clorhidrato de guanidina y percolato de litio. Se sabe que los caotropsos actúan como desnaturizantes de proteínas, que provocan que la proteína se despliegue y se produzca un cambio en la estructura tridimensional. Los anfólitos son moléculas que contienen grupos ácidos y básicos. Existen principalmente como iones bipolares (un compuesto químico cuya carga neta es cero) en un intervalo concreto de pH. Los tensioactivos pueden incluir tensioactivos aniónicos, tales como SDS, tensioactivos catiónicos, tales como CTAC, HTAB y DTAB, tensioactivos no iónicos, tales como Tween 20, y tensioactivos bipolares, tales como DAPS. En ciertas realizaciones, el tampón no contiene un caotropo, un anfólitico ni un tensioactivo.

Generalmente, el tampón no incluye urea y/o anfólitos, o similares.

Después de un gran número de experimentos, los presentes inventores han identificado un método mejorado para la purificación de complejos de proteínas de estrés-polipéptidos, tales como HspC, que pueden utilizarse para la fabricación de vacunas. Este método separa los complejos de proteínas basándose en la carga de la superficie, en lugar del punto isoeléctrico. En particular, se ha identificado un método de purificación que permite la purificación rápida de un complejo de proteínas que comprende una proteína de estrés complejada con un fragmento de péptido,

en el que el rendimiento del producto purificado es suficiente como para permitir la preparación de una cantidad comercialmente aceptable de los complejos de proteínas para su uso en la preparación de una composición de vacuna. De forma ventajosa, los complejos de proteínas purificadas pueden emplearse para la preparación de una preparación de vacuna sin utilizar aditivos farmacéuticamente inaceptables en el proceso de purificación. El método de purificación también reduce o mejora, de forma ventajosa, la degradación y la pérdida de función de los complejos de proteínas purificados, mientras que concomitantemente elimina la necesidad de utilizar caotopos u otros productos químicos, tales como tensioactivos, para aumentar la solubilidad del complejo de proteínas que se está purificando. De forma más sorprendente, las preparaciones enriquecidas en el complejo de proteínas de choque térmico/péptidos antigénicos (HspC) (HEP) purificadas empleando la metodología mejorada de la presente invención provocan que se genere una inmunidad significativamente potenciada en un sujeto vacunado, cuando se compara con la inmunidad producida contra complejos similares aislados empleando la metodología de FF-IEF convencional.

Mezcla de origen

En ciertas realizaciones, la mezcla de origen es una mezcla que comprende al menos un complejo de proteínas de estrés/fragmentos de péptidos (cuya purificación se desea) y uno o más contaminantes. Los ejemplos no limitantes de contaminantes presentes en la mezcla de origen pueden incluir proteínas de la célula hospedante distintas de las proteínas de estrés, metabolitos de la célula hospedante, proteínas constitutivas de la célula hospedante, proteínas inmunodominantes, ácidos nucleicos, endotoxinas, contaminantes relacionados con productos químicos, lípidos, aditivos de medios y derivados de medios.

En ciertas realizaciones, la mezcla de origen es o procede de un lisado de células o un homogeneizado de células. En ciertas realizaciones, el lisado u homogeneizado de células procede de una célula procariota, generalmente una célula procariota patógena, en el que dicha célula procariota puede encontrarse en una bacteria patógena intracelular o una bacteria patógena extracelular. En ciertas otras realizaciones, el lisado u homogeneizado de células puede proceder de una célula infectada por una célula procariota. En otras realizaciones, el lisado u homogeneizado de células procede de una célula eucariota, tal como una célula eucariota infectada por un patógeno, tal como un patógeno procariota. En ciertas realizaciones, el lisado u homogeneizado de células procede de una célula tumoral, un tejido o masa de células cancerosas, o una célula procedente de una biopsia. En ciertas realizaciones, las células son células procedentes de un cultivo celular que han sido transformadas o transfectadas. En ciertas otras realizaciones, el lisado u homogeneizado de células puede obtenerse directamente a partir de una célula hospedante u organismo que produce el polipéptido, o a partir de una célula infectada por un organismo patógeno. Otros ejemplos de mezclas de origen que pueden purificarse empleando el método de la presente invención incluyen fluido de cultivos de células recolectado, sobrenadante de cultivo de células y sobrenadante de cultivo de células condicionado.

En realizaciones en las que la mezcla de origen procede o está compuesta por un lisado de células, el lisado puede obtenerse mediante cualquier medio adecuado conocido por los expertos en la técnica, que incluye, pero no se limita a medios mecánicos, tales como sonicación, cavitación, ciclos de congelación-descongelación, el uso de un homogeneizador de células, tal como una prensa francesa, un homogeneizador Dounce o un homogeneizador de TEFLON/vidrio accionado con un motor, lisis celular empleando un detergente, o lisis osmótica poniendo en contacto las células con un tampón hipotónico o un tampón hipertónico, según sea necesario.

En ciertas realizaciones en las que se emplea la lisis celular para producir la mezcla de origen, también pueden añadirse inhibidores de proteinasas a la mezcla de origen.

En ciertas realizaciones, cuando la mezcla de origen procede de una preparación de células homogeneizadas, tal como un lisado de células o una muestra de tejido, el homogeneizado puede aclararse empleando una centrifugación. En estas realizaciones, el lisado de células puede centrifugarse, al menos una vez, por ejemplo a 10000 g durante 30 minutos. Después el sobrenadante puede recogerse y someterse a otra centrifugación, o puede prepararse para la purificación empleando una metodología basada en el intercambio iónico descrita en la presente. En ciertas otras realizaciones, la etapa de centrifugación puede sustituirse o complementarse con una etapa de filtración.

En ciertas realizaciones, la mezcla de origen es una mezcla proteica, por ejemplo, una disolución compuesta por una pluralidad de proteínas. En ciertas otras realizaciones, la mezcla de origen puede ser un lisado de células derivado de células cancerosas, organismos patógenos, células infectadas por organismos patógenos, o cultivos celulares que comprenden organismos patógenos, o células infectadas por estos.

En ciertas realizaciones, el método de la invención puede emplearse para extraer, purificar y/u obtener un complejo de proteínas procedentes de una fuente natural o biosintética. En ciertas otras realizaciones, el método puede emplearse para purificar un complejo de proteínas de estrés sintéticas o recombinantes procedente de un cultivo de células u otra mezcla de proteínas.

Después del intercambio iónico, en ciertas realizaciones, el complejo de proteínas de estrés diana purificado está presente dentro de al menos una fracción, tal como una fracción de eluato. Generalmente, dicha al menos una

fracción comprende uno o más complejos de proteínas de estrés/péptidos. Dicha fracción puede denominarse un producto purificado o un producto de la purificación, y también puede denominarse una preparación enriquecida en complejos de proteínas de choque térmico/péptidos antigénicos (HspC) (HEP).

5 Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, los inventores han descubierto que puede generarse una respuesta inmunológica potenciada en un sujeto al que se le administra una composición de vacuna que comprende, como determinante inmunogénico, complejos de proteínas de estrés/péptidos antigénicos que proceden de una célula cancerosa, una célula patógena, una célula infectada por un organismo patógeno, o una célula que ha sido genéticamente modificada de modo que exprese una proteína heteróloga que procede de una célula cancerosa o un patógeno que provoca una enfermedad infecciosa en un hospedante, en la que la proteína heteróloga provoca que se genere una respuesta inmunológica contra ella cuando se administra a un sujeto. Como tales, en ciertas realizaciones, los complejos de proteínas de estrés purificados pueden comprender generalmente una mezcla de complejos de péptidos antigénicos/proteínas de choque térmico.

Proteína de choque térmico

15 En ciertas realizaciones, el complejo de proteínas de choque térmico también puede denominarse complejo de proteínas de estrés.

20 En ciertas realizaciones, la proteína de choque térmico puede ser cualquier proteína de choque térmico o proteína de estrés adecuada que esté presente en el lisado celular que se quiere purificar y que, por tanto, puede aislarse de este. En ciertas realizaciones, la proteína de choque térmico puede proceder de una cualquiera de las familias de proteínas de choque térmico que comprenden, pero no se limitan a hsp20-30 kD; hsp40; hsp60; hsp70; hsp90; y hsp100. En ciertas otras realizaciones, la proteína de choque térmico puede ser una proteína que se clasifica como proteína de chaperona. Esta proteína puede incluir, pero no se limita a proteínas seleccionadas del grupo que consiste en calreticulina, hsp40, hsp70, hsp72, hsp90, grp94, grp75 BiP/grp78, grp75/mt y gp96.

25 En ciertas realizaciones, el complejo de proteínas de estrés diana comprende un complejo de proteínas de choque térmico/fragmentos de péptidos antigénicos procedente de una célula hospedante que ha sido genéticamente modificada para que exprese constitutivamente genes de proteínas de estrés y/o para que exprese una proteína heteróloga, tal como un fragmento de péptido o de péptido antigénico. En ciertas otras realizaciones, la célula puede ser una célula hospedante que expresa un gen heterólogo, por ejemplo, una célula de insecto infectada por una construcción de vector de baculovirus que comprende un gen antigénico de interés. En otras realizaciones, la célula puede ser una célula cancerosa procedente de un sujeto humano o animal.

30 En ciertas realizaciones, cuando se proporciona una mezcla de complejos, esta mezcla puede comprender proteínas de choque térmico de una familia concreta, por ejemplo, hsp70 o hsp60. Por tanto, en esta realización, el método de la presente invención proporcionará un método para la purificación de todos los complejos que comprenden proteínas de choque térmico de hsp70 o hsp60 complejadas con un fragmento de péptido (antigénico), independientemente de la identidad, el peso molecular o el tamaño del fragmento de péptido o de péptido antigénico.

35 En ciertas otras realizaciones, las preparaciones enriquecidas en complejos de proteínas de choque térmico/péptidos antigénicos (HspC) (HEP) comprenden proteínas de choque térmico procedentes de diferentes familias de proteínas de estrés, tales como hsp65 y hsp70, y dichas familias se copurifican empleando el método de este aspecto de la invención. En ciertas realizaciones, los complejos de proteínas de estrés tienen un peso molecular en el intervalo de 50 KDa a 900 KDa. En ciertas otras realizaciones, las preparaciones enriquecidas en complejos de proteínas de choque térmico/péptidos antigénicos (HspC) (HEP) pueden consistir o consisten fundamentalmente en proteínas de choque térmico de la misma familia, según se define por el peso molecular, por ejemplo, la familia HSP70.

Fragmento de polipéptido antigénico

45 En ciertas realizaciones, el polipéptido es un fragmento de péptido, es decir, el fragmento de péptido es un fragmento de una proteína, un péptido o un polipéptido más grande. Generalmente, el péptido es un péptido antigénico. Un péptido es un péptido antigénico si puede generarse una respuesta inmunológica mediada por células T contra él, después de la administración de un complejo que comprende el péptido a un sujeto.

50 Generalmente, el polipéptido procede de un patógeno, o de una célula infectada por un patógeno, en el que se desea una respuesta inmunológica contra el patógeno para conferir inmunidad protectora. En ciertas otras realizaciones, el polipéptido procede de un variante no patogénico de un patógeno, en el que una respuesta inmunológica mediada contra dicho polipéptido confiere inmunidad protectora contra el patógeno del cual procede el variante no patogénico, o con el que está relacionado el variante no patogénico. En ciertas otras realizaciones, el polipéptido procede de una célula maligna o cancerosa, o de un lisado de células que lo contienen, en el que el fragmento de polipéptido o péptido es un antígeno asociado a tumor.

55 En ciertas realizaciones, el péptido está complejado con una proteína de estrés de una manera no covalente. En ciertas otras realizaciones, el péptido está complejado con la proteína de estrés por medio de un enlace covalente.

En ciertas realizaciones, el fragmento de péptido es un fragmento de péptido antigénico procedente de un organismo patógeno, en el que el organismo patógeno generalmente provoca una enfermedad infecciosa en un hospedante. En ciertas realizaciones, la célula patógena puede ser una célula procariota, tal como una bacteria gram-positiva o gram-negativa, o un patógeno bacteriano intracelular o extracelular. En ciertas otras realizaciones, el patógeno es un patógeno vírico, o un fragmento de péptido derivado de este. En ciertas otras realizaciones, el patógeno puede ser un protozoo, un parásito o un hongo, tal como una levadura.

En ciertas realizaciones, el patógeno del cual procede el péptido antigénico puede seleccionarse del grupo que consiste, pero no se limita a miembros de los géneros *Escherichia*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bordetella*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Actinomycetes*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Enterobacter*, *Yersinia*, *Fancisella*, *Pasturella*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Erysipelothrix*, *Branhamella*, *Actinobacillus*, *Streptobacillus*, *Listeria*, *Calymmatobacterium*, *Brucella*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Treponema*, *Salmonella*, *Kleibsiella*, *Vibrio*, *Proteus*, *Erwinia*, *Borrelia*, *Leptospira*, *Spirillum*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Borrelia* y *Mycoplasma*.

En ciertas realizaciones, el fragmento de péptido antigénico puede ser un péptido vírico. Los virus de los que procede el péptido pueden seleccionarse del grupo que consiste, pero no se limita al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis A (HAV), hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV), cualquier otro virus asociado con la hepatitis, papilomavirus humano (HPV) y en especial tipos de papilomavirus humanos con alto riesgo oncogénico, herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) (también conocido como herpesvirus-8 humano (HHV-8)), virus del herpes simplex (HSV) (cualquier subtipo), virus respiratorio sincitial (RSV) y virus respiratorios asociados, virus de la gripe, tal como la gripe A, coronavirus que incluyen coronavirus asociado con SARS (SARS-CoV), rinovirus, adenovirus, SIV, rotavirus, virus del papiloma humano, arbovirus, virus del sarampión, virus de la polio, virus de la rubéola, virus de las paperas, papovavirus, citomegalovirus, virus de la varicela zoster, virus de la varicela, huntavirus y cualquier virus emergente, en particular virus de Ébola, virus de Marburgo, virus del Nilo occidental (WNV), virus de la encefalitis de St Louis (SLEV), virus de la fiebre del valle del Rift (RVFV) y otros miembros de *Bunyaviridae*. Los virus de la gripe A pueden dividirse en subtipos según sus proteínas de la superficie, hemaglutinina (HA o H) y neuraminidasa (NA o N). Existen 14 subtipos de H conocidos y 9 subtipos de N conocidos. La presente invención se extiende a todos los subtipos, serotipos y serogrupos de enfermedades infecciosas, tales como la gripe y la meningitis.

En realizaciones en las que el fragmento de péptido antigénico puede proceder de un patógeno protozoario, el protozoo generalmente puede ser un protozoo intracelular, tal como leishmania o tripanosoma.

En realizaciones en las que el fragmento de péptido antigénico puede proceder de una levadura o un hongo, dicho hongo puede proceder de un género seleccionado del grupo que comprende *Acremonium*, *Alternaria*, *Amylomyces*, *Arthoderma*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Blastochizomyces*, *Botrytis*, *Candida*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Dictyostelium*, *Emmonsia*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Geotrichum*, *Microsporium*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pilaira*, *Pityrosporium*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Stachybotrys*, *Trichophyton*, *Trichoporon*, o *Yarrowia*.

En ciertas realizaciones, el fragmento de péptido antigénico puede proceder de una célula tumoral. En estas realizaciones, generalmente el fragmento de péptido antigénico es un antígeno específico de tumor o un fragmento de este. En ciertas realizaciones, la célula tumoral puede proceder de un trastorno canceroso o maligno seleccionado del grupo que incluye la leucemia mielogenousa aguda y crónica (AML, CML), linfoma no hodgkiniano folicular, melanoma maligno, leucemia de células pilosas, mieloma múltiple, tumores carcinoideos con síndrome carcinoide y metástasis del hígado y nódulos linfáticos, sarcoma de Kaposi relacionado con SIDA, carcinoma de células renales, adenocarcinoma del intestino grueso, carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello. Además, los expertos en la técnica saben que algunas enfermedades infecciosas pueden provocar cáncer en los sujetos infectados. Por consiguiente, puede emplearse la administración de un complejo de la invención en el que el polipéptido procede de una enfermedad infecciosa para tratar o prevenir el cáncer. Por ejemplo, un complejo que comprende un polipéptido procedente del papilomavirus humanos puede emplearse para tratar o prevenir un cáncer, tal como un cáncer cervical, en un sujeto adecuado.

El polipéptido que está presente en los complejos aislados y purificados de la invención puede conferir protección heteróloga a un sujeto al que se le administran dichos complejos, por ejemplo, como determinante inmunogénico en una composición de vacuna. Esta protección heteróloga generalmente puede surgir de un polipéptido que procede de una cepa de un patógeno, tal como una bacteria, que media una respuesta inmunológica en el sujeto vacunado que proporciona inmunidad protectora contra al menos otra cepa del mismo patógeno. Por tanto, esta protección heteróloga puede proporcionar una amplia protección inmunológica contra un patógeno, o sus derivados.

De modo específico, la protección heteróloga puede surgir de un polipéptido que procede de una cepa no patogénica, tal como una bacteria atenuada, que media una respuesta inmunológica en el sujeto vacunado que proporciona inmunidad protectora contra al menos otra cepa patogénica de ese organismo. Por tanto, esta protección heteróloga puede proporcionar una amplia protección inmunológica contra un patógeno, o sus derivados.

Un complejo que comprende un polipéptido que confiere dicha protección heteróloga puede emplearse para conferir protección frente a varias cepas de una enfermedad, tal como la meningitis A, B y C. Un polipéptido procedente de

una cepa, por ejemplo, de meningitis B, tal como MC58, puede conferir inmunidad protectora no solo frente a cepas de serotipo cruzado de meningitis B, sino también frente a cepas de serotipo cruzado de meningitis A y C.

5 En ciertas otras realizaciones, el fragmento de péptido antigénico se expresa en una célula hospedante por medios recombinantes, por ejemplo, mediante la introducción en la célula hospedante dentro de un vector o una construcción similar.

En ciertas otras realizaciones, la célula hospedante puede ser una célula eucariota que está infectada por un patógeno intracelular. En estas realizaciones, el complejo de proteínas de estrés puede comprender una proteína de choque térmico procedente de la célula hospedante complejada con un fragmento de péptido antigénico derivado del patógeno intracelular.

10 En ciertas realizaciones de la invención, la mezcla de origen es un lisado de células que se produce a partir de una población de células que ha sido expuesta a un estímulo inductor de estrés que es adecuado para provocar la inducción de la expresión de proteínas de estrés, tales como proteínas de choque térmico. En ciertas realizaciones, el estímulo inductor de estrés se selecciona del grupo que comprende, pero no se limita a choque térmico, choque osmótico, presión y privación de nutrientes. En ciertas otras realizaciones, la inducción del estrés se logra mediante la modificación genética de una célula para provocar la expresión constitutiva de un gen de proteína de choque
15 térmico. En una de estas realizaciones, la modificación genética es la inactivación de genes represores que suprimen la expresión de proteínas de estrés, tales como los genes de represor hspR y HrcA en patógenos microbianos. Otras modificaciones genéticas de este tipo se describen en la publicación PCT n.º WO 2002/020045 y las citas indicadas en ella.

20 Para la inducción no genética de proteínas de estrés, las condiciones óptimas para inducir las proteínas de estrés pueden ser determinadas con facilidad mediante un sencillo ensayo de prueba y error, siendo evaluado el efecto de un cambio en el estímulo de estrés con respecto a los niveles de producción de proteínas de estrés empleando técnicas convencionales, tales como las descritas en Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1997. Otras de estas condiciones se describen en la publicación PCT n.º WO 2001/013944 y las citas indicadas en ella.

25 En una realización, al menos una preparación enriquecida en complejos de proteínas de choque térmico/péptidos antigénicos (HspC) (HEP), que se purifica empleando los métodos de la presente invención, comprende complejos de proteínas de choque térmico/fragmentos de péptidos antigénicos (HspC) que incluyen, pero no se limitan a hspC65, hspC790, hspC90 y hspC100.

Condiciones de intercambio iónico

30 El método de la invención se basa en la separación de proteínas empleando una metodología basada en la cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, el método se ha mejorado frente a los procedimientos y los protocolos de cromatografía de intercambio iónico convencionales que se emplean en la actualidad en la técnica para eliminar los productos químicos que puedan afectar de modo adverso a la estructura e integridad de las proteínas, o que puedan dar lugar a la presencia de contaminantes en las fracciones purificadas.

35 La cromatografía de intercambio iónico se basa en interacciones entre cargas producidas entre proteínas presentes en la mezcla de origen y las cargas proporcionadas por una matriz o resina inmovilizada. La cromatografía de intercambio iónico puede tomar la forma de una cromatografía de intercambio catiónico, en la cual iones con carga positiva se unen a una resina con carga negativa, o una cromatografía de intercambio aniónico, en la cual los iones de unión a la proteína son negativos y la resina o matriz funcional inmovilizada tiene carga positiva. Después de que
40 los complejos de proteínas de estrés presentes en la mezcla de origen se hayan unido a la matriz o resina de intercambio iónico, la matriz o resina se lava para equilibrar la matriz o resina con un tampón inicial. Generalmente, este tampón tiene baja fuerza iónica. El método de la presente invención proporciona que los complejos de proteínas de estrés unidos después se eluyan en fracciones mediante la aplicación de un tampón con un carácter iónico diferente a la matriz o resina. El cambio de las propiedades o la concentración del tampón altera la fuerza de unión
45 de los complejos de proteínas de estrés que están unidas a la matriz o resina. En realizaciones concretas, el tampón se cambia para proporcionar diversas condiciones o caracteres iónicos. Esta diferencia en el carácter iónico puede lograrse proporcionando un gradiente salino creciente a la matriz, generalmente mediante el uso de un segundo tampón, tal como cloruro de sodio o una disolución basada en cloruro de sodio. Las fracciones eluidas del tampón a lo largo del gradiente salino creciente pueden recogerse en fracciones apropiadas, y las fracciones eluidas a
50 diferentes pI contienen diferentes complejos de proteínas. Puesto que se ha identificado el pI (punto isoeléctrico) de los complejos de proteínas deseados, la fracción eluida que contiene los complejos de interés podrá identificarse con facilidad. También pueden emplearse técnicas, tales como la absorbancia a 280 nm, para identificar la elución de las fracciones de proteínas, y estas fracciones pueden ensayarse para identificar las fracciones que contienen el complejo de proteínas de estrés purificado.

55 El punto isoeléctrico (pI) es el pH al cual una molécula concreta, tal como los complejos de proteínas de la invención, no tiene carga eléctrica neta. El valor del pI de un complejo de proteínas puede determinarse a partir de su secuencia primaria, o de modo empírico empleando técnicas de enfoque isoeléctrico convencionales y equipos disponibles en el mercado. El valor del pI de la proteína puede emplearse para afectar a la solubilidad de la proteína

- a un pH concreto. Las moléculas de proteínas contienen grupos funcionales ácidos y básicos. Además, los aminoácidos pueden tener carga positiva, negativa o neutra. Estos factores otorgan a una proteína su carga global. A un pH menor que su pI, las proteínas portan una carga neta positiva. A un pH por encima de su pI, las proteínas portan una carga neta negativa. Las proteínas tienen una solubilidad mínima en disoluciones salinas cuyo pH se corresponde con su pI. Esto puede conducir a que el complejo de proteínas precipite de la disolución. Por tanto, resulta deseable que, cuando se varía el gradiente salino según el método de la invención, el pH no disminuya desde el pH inicial, puesto que esto puede provocar que los complejos de proteínas precipiten de la disolución. Por tanto, generalmente, tras haber ajustado el pH, este no se aumenta. En ciertas realizaciones, un aumento en el gradiente salino produce un aumento en el pH.
- La cromatografía de intercambio iónico se ha empleado de modo convencional para separar proteínas individuales para su purificación. Por ejemplo, las patentes de EEUU 5.750.119 y 5.997.873 emplean columnas MonoQ para purificar hsp70, hsp90 y grp96, mientras que las mismas proteínas de choque térmico también han sido purificadas individualmente empleando una cromatografía de DEAE (Menoret (2004), Methods, 32:7-12; y Zabrecky y Sawilich (2004), Methods, 32:3-6. El método de la presente invención se emplea para el aislamiento y la purificación de mezclas de complejos de proteínas de estrés, y la expresión "complejo de proteínas de estrés purificado", tal como se emplea en la presente, se refiere a preparaciones de chaperonas en las que la purificación produce una reducción de al menos aproximadamente 40% a aproximadamente 75% de otros contaminantes celulares del proteoma.
- El método comprende variar la concentración salina de un tampón empleado en combinación con la resina o matriz, por ejemplo empleando un tampón tal como cloruro de sodio. Generalmente, esta variación en el gradiente salino del tampón provoca la elución de los complejos de proteínas de estrés, generalmente en fracciones coherentes con los cambios en la concentración salina. El tampón de elución proporciona un gradiente salino. Más preferiblemente, el tampón de elución contiene cloruro de sodio (NaCl). En ciertas realizaciones, el gradiente salino se varía variando la presencia de cloruro de sodio (NaCl) en el tampón de elución al cual está expuesta la matriz. En ciertas realizaciones, la adición progresiva del tampón de elución proporciona un gradiente de pH. Generalmente, esto puede variar a medida que se varían los constituyentes del tampón. En ciertas realizaciones, el tampón de elución comprende cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM. En ciertas realizaciones, el pH del tampón de elución es de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 10.
- En ciertas realizaciones, los complejos de proteínas de estrés están presentes en fracciones recogidas en la etapa de la cromatografía de intercambio iónico de la invención, en las que dichas fracciones eluidas tienen un pI en el intervalo de 4 a 8. En ciertas realizaciones, los complejos de proteínas de estrés-polipéptidos eluyen en fracciones que son eluidas a un pI de 4,5 a 6,5. En ciertas realizaciones, el pI de los complejos de proteínas de estrés que se van a purificar puede determinarse en primer lugar mediante enfoque isoeléctrico.
- En ciertas realizaciones, la metodología de purificación no se realiza en presencia (es decir, se realiza en ausencia) de urea o de un compuesto similar o disolución dentro del tampón. En ciertas realizaciones, no se emplean anfolitos en la metodología de purificación, y en particular no están presentes en el tampón.
- Generalmente, el método comprende las etapas de aplicar la mezcla de origen a una matriz de intercambio iónico, en el que la matriz de intercambio iónico puede proporcionarse en una columna, ajustar el pH, variar el gradiente salino a través de la matriz de intercambio iónico, y recoger las fracciones eluidas, y dichas fracciones comprenden los complejos de proteínas de estrés purificados o enriquecidos, cuya elución es provocada por el cambio en el gradiente salino bajo condiciones específicas. En ciertas realizaciones, la matriz es una resina. En otras realizaciones, la matriz es una membrana. Generalmente, la matriz está formada por partículas cargadas.
- En ciertas realizaciones, el intercambio iónico se realiza empleando un absorbente de membrana de intercambio iónico que actúa para separar mezclas de proteínas complejas en fracciones básicas y ácidas. Los inventores han descubierto que esta realización del intercambio iónico produce un método que es conveniente, rápido y reproducible y, por tanto, puede producir un rendimiento constantemente alto de complejos de proteínas de estrés, lo cual es necesario para la producción de cantidades comerciales de una composición de vacuna que comprende un componente de complejo de proteínas, tal como un complejo de proteínas de estrés-péptidos, como determinante inmunogénico.
- En una realización, las preparaciones enriquecidas en complejos de proteínas de choque térmico/péptidos antigénicos (HspC) (HEP) pueden eluirse del medio de cromatografía de intercambio iónico empleando cualquier tampón de elución adecuado conocido por los expertos en la técnica para mantener la integridad de las proteínas.
- Las expresiones "intercambio iónico" y "cromatografía de intercambio iónico" se refieren a un proceso cromatográfico en el que un soluto ionizable de interés (por ejemplo, una proteína de interés en una mezcla de origen) interacciona con un ligando con carga opuesta unido o proporcionado a un material de intercambio iónico en fase sólida bajo condiciones apropiadas de pH y conductividad, de modo que el soluto de interés interacciona de modo no específico con el ligando cargado en mayor o menor grado que las impurezas de solutos o contaminantes en la mezcla. Los solutos contaminantes en la mezcla pueden lavarse del ligando cargado unido al material de intercambio iónico, o se unen o se excluyen del material con mayor o menor rapidez que el soluto de interés. Una "cromatografía de

intercambio iónico” incluye específicamente las cromatografías de intercambio catiónico, de intercambio aniónico y de modo mixto.

5 En ciertas realizaciones, el medio de la cromatografía de intercambio iónico incluye una columna de intercambio iónico. Generalmente, la columna de intercambio iónico incluye una base de alto flujo, tal como una base de alto flujo de agarosa o Sepharose. Opcionalmente, la base de alto flujo incluyen un extensor de superficie, tal como dextrano sin restos animales. Un medio de intercambio iónico adecuado incluye resinas de intercambio catiónico y aniónico y columnas que las incluye derivatizadas con sales de amonio cuaternario y restos sulfónicos, por ejemplo, la columna CaptoQ™ y las resinas CaptoS™ (GE Healthcare Limited).

10 En ciertas realizaciones, el material de origen, por ejemplo, el lisado de células, se somete a un intercambio de tampón hacia tampón fosfato 50 mM, pH 6,8. En ciertas realizaciones, la columna de intercambio iónico incluye una base de alto flujo, preferiblemente una base de alto flujo de agarosa. En ciertas realizaciones, la base de alto flujo incluye un extensor de superficie, por ejemplo, dextrano sin restos animales, y un ligando Q, por ejemplo, una sal de amonio cuaternario.

15 La expresión “material de intercambio iónico” se refiere a una fase sólida que está cargada negativamente (es decir, una resina de intercambio catiónico) o cargada positivamente (es decir, una resina de intercambio aniónico). En una realización, la carga puede proporcionarse uniendo uno o más ligandos cargados (o adsorbentes) a la fase sólida, por ejemplo, mediante un enlace covalente. Como alternativa, o además, la carga puede ser una propiedad inherente de la fase sólida (por ejemplo, como es el caso del sílice, que tiene una carga global negativa).

20 En ciertas realizaciones, cuando la cromatografía de intercambio iónico es una cromatografía de intercambio catiónico, la etapa de cromatografía de intercambio catiónico emplea un ligando seleccionado del grupo que comprende, pero no se limita a sulfonato, ácido carboxílico, ácido carboximetilsulfónico, sulfoisobutilo, sulfoetilo, carboxilo, sulfopropilo, sulfonilo, sulfoxietilo y ortofosfato.

25 Una “resina de intercambio catiónico” se refiere a una fase sólida que está cargada negativamente y que tiene cationes libres para su intercambio por cationes en una disolución acuosa que se hace pasar sobre o a través de la fase sólida. Puede emplearse cualquier ligando cargado negativamente unido a la fase sólida que sea adecuado para formar la resina de intercambio catiónico, por ejemplo, un carboxilato, sulfonato y otros, tal como se describe a continuación. Las resinas de intercambio catiónico disponibles en el mercado incluyen, pero no se limitan, por ejemplo, a las que presentan un grupo con base de sulfonato (por ejemplo, MonoS, MiniS, Source 15S y 30S, SP Sepharose Fast Flow™, SP Sepharose High Performance de GE Healthcare, Toyopearl SP-650S y SP-650M de Tosoh, Macro-Prep High S de BioRad, Ceramic HyperD S, Trisacryl M y LS SP, y Spherodex LS SP de Pall Technologies); un grupo con base de sulfoetilo (por ejemplo, Fractogel SE de EMD, o Poros S-10 y S-20 de Applied Biosystems); un grupo con base de sulfopropilo (por ejemplo, TSK Gel SP 5PW y SP-5PW-HR de Tosoh, Poros HS-20 y HS 50 de Applied Biosystems); un grupo con base de sulfoisobutilo (por ejemplo, Fractogel EMD SO3 de EMD); un grupo con base de sulfoxietilo (por ejemplo, SE52, SE53 y Express-Ion S de Whatman), un grupo con base de carboximetilo (por ejemplo, CM Sepharose Fast Flow de GE Healthcare, Hydrocell CM de Biochrom Labs Inc., Macro-Prep CM de BioRad, Ceramic HyperD CM, Trisacryl M CM, Trisacryl LS CM, de Pall Technologies, Matrex Cellufine C500 y C200 de Millipore, CM52, CM32, CM23 y Express-Ion C de Whatman, Toyopearl CM-650S, CM-650M y CM-650C de Tosoh); grupos con base de ácido sulfónico y carboxílico (por ejemplo, BAKERBOND Carboxy-Sulfon de J. T. Baker); un grupo con base de ácido carboxílico (por ejemplo, WP CBX de J. T. Baker, DOWEX MAC-3 de Dow Liquid Separations, Amberlite Weak Cation Exchangers, DOWEX Weak Cation Exchanger, y Diaion Weak Cation Exchangers de Sigma-Aldrich y Fractogel EMD COO- de EMD); un grupo con base de ácido sulfónico (por ejemplo, Hydrocell SP de Biochrom Labs Inc., DOWEX Fine Mesh Strong Acid Cation Resin de Dow Liquid Separations, UNOsphere S, WP Sulfonic de J. T. Baker, membrana Sartobind S de Sartorius, Amberlite Strong Cation Exchangers, DOWEX Strong Cation y Diaion Strong Cation Exchanger de Sigma-Aldrich); y un grupo con base de ortofosfato (por ejemplo, pl 1 de Whatman).

Si resulta deseable, puede emplearse una membrana de intercambio catiónico en lugar de una resina de intercambio catiónico, por ejemplo, Sartobind S (Sartorius, Edgewood, NY).

50 En ciertas realizaciones, cuando la cromatografía de intercambio iónico es una cromatografía de intercambio aniónico, la etapa de cromatografía de intercambio aniónico puede emplear un ligando seleccionado del grupo que consiste en amonio cuaternario o amina, dietilamina, dietilaminopropilo, amino, trimetilamonio, trimetilbencilamonio, dimetiletanolbencilamonio, poliamina.

55 Una “resina de intercambio aniónico” se refiere a una fase sólida que está cargada positivamente, y así tiene uno o más ligandos cargados positivamente unidos a ella. Puede emplearse cualquier ligando cargado positivamente unido a una fase sólida adecuado para formar la resina de intercambio aniónico, tal como grupos amino cuaternario. Por ejemplo, el ligando empleado en AEC puede ser un amonio cuaternario, tal como alquilamina cuaternaria y alquilalcanolamina cuaternaria, o amina, dietilamina, dietilaminopropilo, amino, trimetilamonio, trimetilbencilamonio, dimetiletanolbencilamonio y poliamina. Como alternativa, para AEC, puede emplearse una membrana que tenga un ligando cargado positivamente, tal como un ligando descrito anteriormente, en lugar de una resina de intercambio aniónico.

Las resinas de intercambio aniónico disponibles en el mercado incluyen, pero no se limitan a DEAE-celulosa, Poros PI 20, PI 50, HQ 10, HQ 20, HQ 50, D 50 de Applied Biosystems, MonoQ, MiniQ, Source 15Q y 30Q, Q, DEAE y ANX Sepharose Fast Flow, Q Sepharose High Performance, QAE SEPHADEX™ y FAST Q SEPHAROSE™ de GE Healthcare, WP PEI, WP DEAM, WP QUAT de J. T. Baker, Hydrocell DEAE e Hydrocell QA de Biochrom Labs Inc., UNOsphere Q, Macro-Prep DEAE y Macro-Prep High Q de Biorad, Ceramic HyperD Q, Ceramic HyperD DEAE, Q HyperZ, Trisacryl M y LS DEAE, Spherodex LS DEAE, QMA Spherosil LS, QMA Spherosil M de Pall Technologies, DOWEX Fine Mesh Strong Base Type I and Type II Anion Resins y DOWEX MONOSPHER E 77, anión de base débil de Dow Liquid Separations, Matrex Cellufine A200, A500, Q500, y Q800 de Millipore, Fractogel EMD TMAE₃ Fractogel EMD DEAE y Fractogel EMD DMAE de EMD, intercambiadores de aniones débiles y fuertes de tipo I y II de Amberlite, intercambiadores de aniones débiles y fuertes de tipo I y II de DOWEX, intercambiadores de aniones débiles y fuertes de tipo I y II de Diaion, Duolite de Sigma-Aldrich, TSK gel Q y DEAE 5PW y 5PW-HR, Toyopearl SuperQ-6505, 650M y 6500₃ QAE-5500 y 650S, DEAE-650M y 6500 de Tosoh, y QA52, DE23, DE32, DE51, DE52, DE53, Express-Ion D y Q de Whatman.

Si resulta deseable, puede utilizarse una membrana de intercambio aniónico en lugar de una resina de intercambio aniónico. Las membranas de intercambio aniónico disponibles en el mercado incluyen, pero no se limitan a Sartobind Q de Sartorius, Mustang Q de Pall Technologies, y la membrana Intercept Q de Millipore.

En ciertas realizaciones, la cromatografía de intercambio aniónico se realiza a un pH de 5,0 a 9,0, y a una conductividad de 0,5 a 5 mS/cm.

En ciertas realizaciones, la cromatografía de intercambio catiónico se realiza a un pH de 4,0 a 9,0, y a una conductividad de 0,5 a 15 mS/cm.

El "pI" o "punto isoeléctrico" de un polipéptido se refiere al pH en el que la carga positiva del polipéptido se equilibra con su carga negativa. El pI puede calcularse según diversas metodologías convencionales, por ejemplo, a partir de la carga neta de restos aminoácidos y/o ácido siálico sobre el polipéptido, o puede determinarse de modo empírico empleando técnicas de enfoque isoeléctrico.

La expresión "tampón de elución", tal como se emplea en la presente, se refiere a un tampón empleado para eluir la proteína de interés de la resina. El pH y la conductividad del tampón de elución se seleccionan de modo que la proteína de interés eluye de la resina CEC empleada en el proceso. Los ejemplos de tampones adecuados para su uso como tampón de elución pueden incluir un tampón fosfato o con base de TRIS.

En ciertas realizaciones, el tampón de elución es cloruro de sodio (NaCl) que puede emplearse a una concentración de 50 mM a 500 mM.

El pH del tampón de elución puede ser de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, y más preferiblemente un pH de 4 a 9. En ciertas realizaciones, el pH del tampón es 6,8.

La presente invención se extiende también a lisados enriquecidos en HspC (HEL) que se purifican según los métodos de la presente invención. Dicho lisado enriquecido en HspC también puede denominarse fracción enriquecida en HspC (HEF) o composición enriquecida en HspC (HEC). Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención proporciona al menos un lisado enriquecido en HspC purificado mediante el método del anterior aspecto de la invención para su uso en la preparación de una composición de vacuna. Generalmente, el lisado enriquecido en HspC procede de al menos una fracción eluida obtenida en el método de intercambio iónico de la presente invención.

En ciertas realizaciones, el lisado enriquecido en HspC comprende un complejo formado entre una proteína de estrés (proteína de choque térmico) que está complejada con un polipéptido o un fragmento de péptido, en particular un fragmento de péptido antigénico. En ciertas realizaciones, el lisado enriquecido en HspC purificado procede de un hospedante microbiano, un patógeno, un hospedante eucariota, una célula infectada por un patógeno, o una célula maligna o cancerosa. En una realización preferida, el complejo purificado es un complejo de proteínas de estrés/péptidos, en el que las proteínas de estrés se seleccionan del grupo que consiste en hsp65, hsp70, hsp90 y hsp100.

Los lisados enriquecidos en HspC purificados según los métodos de la invención pueden proporcionar composiciones de vacuna. Dichas composiciones de vacuna generalmente se administran a sujetos mamíferos, en particular a seres humanos. Sin embargo, debido al alto nivel de homología reconocido entre las proteínas de estrés procedentes de diferentes especies, las composiciones de vacuna pueden emplearse para vacunar a una amplia diversidad de sujetos, generalmente animales y preferiblemente seres humanos, para conferir una inmunidad protectora a largo plazo a dicho sujeto.

Los complejos de proteínas de choque térmico-polipéptidos purificados aislados obtenidos mediante los métodos de la invención pueden emplearse en una composición de vacuna para su uso en mediar una respuesta inmunológica en un sujeto contra el patógeno o la célula cancerosa de la cual procede el polipéptido del complejo.

Pueden proporcionarse composiciones de vacuna que comprenden al menos un complejo de proteínas de choque

térmico-polipéptidos (hspc) como determinante inmunogénico contra el cual se genera una respuesta inmunológica cuando la composición de vacuna se administra a un sujeto, en las que el complejo de proteínas de choque térmico-polipéptidos se produce mediante un método que comprende las etapas de:

- 5 (i) proporcionar una mezcla de origen que comprende al menos un complejo de proteínas de estrés diana formado a partir de una proteína de estrés complejada con un fragmento de polipéptido;
- (ii) determinar el punto isoeléctrico (pI) de dicho al menos un complejo de proteínas de estrés diana que se va a purificar de la mezcla de origen;
- 10 (iii) someter la mezcla de origen a una purificación empleando un intercambio iónico, en el que el lisado de células se tampona hasta un pH a una distancia de 2 unidades del pI del complejo de proteínas de estrés diana, y en el que se emplea un gradiente salino para eluir el complejo de proteínas de estrés diana.

En ciertas realizaciones, el método de purificación proporciona el aislamiento de una pluralidad de complejos de proteínas de choque térmico-péptidos (hspc) a partir de la mezcla de origen. En ciertas realizaciones, los complejos de proteínas de choque térmico-polipéptidos comprenden proteínas de choque térmico de la misma familia, por ejemplo, proteínas de choque térmico de la familia HSP70. En otras realizaciones, los complejos de proteínas de choque térmico-péptidos comprenden proteínas de choque térmico de diferentes familias de proteínas de choque térmico. Generalmente, es necesario que el fragmento de polipéptido proceda del patógeno infeccioso contra el cual se va a inducir inmunidad mediante la vacuna. El polipéptido puede provocar la generación de una respuesta inmunológica, en el que dicha respuesta media en una inmunidad protectora en un hospedante contra un patógeno, y en particular un patógeno que provoca una enfermedad infecciosa. Por ejemplo, el polipéptido puede proceder de un variante no patogénico de un patógeno, en el que un polipéptido derivado de dicho variante no patogénico media en una respuesta inmunológica protectora en el sujeto al cual se administra, que proporciona una inmunidad protectora contra el patógeno con el que está relacionado el variante no patogénico. El polipéptido puede ser un antígeno específico de tumor, en el que cualquier respuesta inmunológica generada contra él produce una inmunidad protectora mediada en el hospedante vacunado contra una célula cancerosa que expresa dicho antígeno. El polipéptido puede proceder de un patógeno, tal como el papilomavirus humano, en el que dicho patógeno puede provocar cáncer en un hospedante infectado por dicho patógeno.

La composición de vacuna puede comprender un polipéptido que se deriva de un organismo patógeno y que media en una respuesta inmunológica heteróloga, y dicha respuesta inmunológica heteróloga produce una inmunidad protectora mediada no solo contra ese patógeno, sino también contra otras cepas relacionadas con ese patógeno.

30 La composición de vacuna puede comprender un polipéptido que procede de un organismo no patogénico y que media en una respuesta inmunológica heteróloga, y dicha respuesta inmunológica heteróloga produce una inmunidad protectora mediada no solo contra ese organismo no patogénico, sino también contra otras cepas patógenas relacionadas con ese organismo.

La composición de vacuna puede comprender también, o puede administrarse junto con al menos un adyuvante. El adyuvante puede seleccionarse del grupo que consiste, pero no se limita a adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, Quil A, Detox, ISCOM y escualeno. Otros adyuvantes adecuados incluyen moléculas que se dirigen a receptores que median en respuestas inmunológicas innatas, tales como receptores similares a Toll, NOD, NALP y RIG.

40 La composición de vacuna puede ser adecuada para la administración a un sujeto mediante inyección. El método de inyección puede ser sin aguja o puede emplear una aguja que, por ejemplo, penetra en la dermis de un sujeto humano. En ciertas otras realizaciones, la vacuna es adecuada para la administración oral, o puede administrarse por vía transdérmica o mediante administración pulmonar.

45 Las proteínas de choque térmico-fragmentos de polipéptidos purificados y aislados, o las composiciones de vacuna que las contienen, pueden administrarse como una vacuna profiláctica. Las proteínas de choque térmico-fragmentos de polipéptidos purificados y aislados pueden administrarse como una vacuna terapéutica.

Las proteínas de choque térmico-fragmentos de polipéptidos purificadas, o las composiciones de vacuna que las contienen, pueden administrarse como una vacuna de refuerzo para potenciar la respuesta inmunológica generada en un hospedante contra un patógeno o antígeno del cáncer al cual el sujeto se ha visto previamente expuesto, generalmente por una infección o una vacuna previamente administrada.

50 Los complejos de proteínas de estrés-péptidos que se han purificado empleando los métodos de la invención pueden utilizarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad infecciosa o un trastorno canceroso o maligno. Generalmente, la enfermedad infecciosa o cancerosa es la misma de la cual procede el polipéptido del complejo. En ciertas realizaciones, los complejos de proteínas de estrés-péptidos purificados pueden aislarse.

55 Un complejo de proteínas de estrés-péptidos que se ha purificado mediante el método del primer aspecto de la presente invención puede emplearse como determinante inmunogénico en una composición de vacuna para su uso

para tratar o prevenir la infección de un sujeto por una enfermedad infecciosa. Generalmente, la enfermedad infecciosa o trastorno canceroso es el mismo del cual procede el polipéptido del complejo. En ciertas realizaciones, los complejos de proteínas de estrés-péptidos purificados pueden aislarse.

5 Un complejo de proteínas de estrés-péptidos que se ha purificado mediante el método del primer aspecto de la presente invención puede emplearse como determinante inmunogénico en una composición de vacuna para su uso para tratar o prevenir la aparición de un trastorno maligno o canceroso en un sujeto. Generalmente, el trastorno maligno o canceroso es el mismo del cual procede el polipéptido del complejo. En ciertas realizaciones, los complejos de proteínas de estrés-péptidos purificados pueden aislarse.

10 Puede emplearse una composición de vacuna que comprende un complejo de proteínas de estrés-polipéptidos aislado que se ha purificado según un método de la presente invención para la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa. Generalmente, la enfermedad infecciosa es la misma de la cual procede el polipéptido del complejo. En ciertas realizaciones, la enfermedad infecciosa es la tuberculosis o la meningitis.

15 Puede emplearse una composición de vacuna que comprende un complejo de proteínas de estrés-polipéptidos aislado que se ha purificado según un método de la presente invención para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto. Generalmente, la enfermedad infecciosa es la misma de la cual procede el polipéptido del complejo. La enfermedad infecciosa puede ser la tuberculosis o la meningitis.

20 Tal como se emplea en la presente, la expresión "composición de vacuna" significa cualquier composición que contiene un determinante inmunogénico que estimula el sistema inmunológico de tal manera que puede responder mejor a posteriores exposiciones o a infecciones patógenas. Se apreciará que una vacuna normalmente contiene un determinante inmunogénico y un adyuvante, y el adyuvante actúa para potenciar, de modo no específico, la respuesta inmunológica contra el determinante inmunogénico.

25 El sujeto, tal como se emplea en la presente, es un animal, generalmente un ser humano. Los métodos de la invención también pueden utilizarse para purificar complejos de proteínas para su uso en una composición de vacuna para el tratamiento de otros animales, tales como caballos, ganado vacuno, cabras, ovejas, cerdos y aves.

30 En ciertas realizaciones, el patógeno microbiano del que proceden las preparaciones enriquecidas en HspC puede seleccionarse basándose en que provoque una enfermedad o una infección o, si un polipéptido derivado de él se administra a un sujeto, basándose en que dicho polipéptido provoque la generación de una inmunidad protectora en el hospedante contra un organismo patógeno que provoca una enfermedad infecciosa. Las composiciones de vacuna proporcionadas por la invención pueden utilizarse de modo profiláctico o terapéutico. Sin embargo, los inventores reconocen que las composiciones pueden ser particularmente útiles como vacunas profilácticas, debido a que son baratas de producir y a su capacidad de suscitar una respuesta inmunológica protectora.

35 Los inventores también han descubierto, de modo sorprendente, que los complejos de proteínas de estrés-péptidos que se obtienen utilizando los métodos de la invención pueden utilizarse como vacunaciones "de refuerzo", y dichas vacunaciones de refuerzo potencian la inmunidad otorgada a un sujeto contra un patógeno o un trastorno canceroso, en los que la inmunidad inicial fue conferida por una vacunación con una vacuna viva o atenuada, o por una composición de vacuna en la que el determinante inmunogénico era un complejo de proteínas de estrés-péptidos.

40 Las composiciones de vacuna que contienen HspC pueden emplearse para reforzar las respuestas inmunológicas en animales que previamente han sido inmunizados con otras vacunas de subunidades, de multi-subunidades, de carbohidratos o conjugadas. Las vacunas de HspC pueden utilizarse para reforzar las respuestas inmunológicas en animales que previamente han sido inmunizados con vacunas de ácidos nucleicos o vivas. Las composiciones de vacunas que contienen HspC pueden emplearse para reforzar las respuestas inmunológicas mediadas en sujetos que previamente han sido infectados o inmunizados contra un patógeno o un antígeno específico de un cáncer.

45 Las composiciones de vacunas que comprenden los complejos de proteínas de estrés-péptidos purificados según la invención pueden emplearse para reforzar las respuestas inmunológicas en animales, en los que el animal ha sido previamente vacunado con una composición de vacuna que comprende al menos un antígeno derivado de un patógeno, un patógeno, en particular un patógeno atenuado, o un antígeno específico de un cáncer. Generalmente, el componente de péptido procede del mismo patógeno o célula cancerosa que proporcionó el determinante inmunogénico para la vacunación inicial.

50 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 muestra el análisis de SDS-PAGE de la purificación de complejos de proteínas a partir de lisados de células bacterianas BCG y el análisis de estas muestra para las principales familias de proteínas de choque térmico DnaK y GroEL (Hsp71 y Hsp65) y Ag85 mediante un análisis de la transferencia Western, que demuestra una purificación clara de las HEP de otros antígenos de BCG importantes, tales como Ag85.

55 La figura 2 muestra la inmunogenicidad mejorada de las HEP aisladas a partir de BCG (IEX) empleando el método de la invención (IEX), comparado con el lisado de origen (LSS) y HspC aislados empleando métodos de enfoque

isoeléctricas convencionales (IEF).

La figura 3 muestra la reducción en los recuentos de colonias en pulmón en animales inmunizados expuestos a TB vivo. Los animales fueron inmunizados con disolución salina como control negativo, bacterias BCG vivas (BCG) como control positivo, o fueron cebados con BCG vivas e inmunizados con HEP aisladas a partir de lisados de células bacterianas BCG (una única dosis de IEC y un refuerzo de IEC).

La figura 4 muestra el análisis de SDS-PAGE de la purificación de complejos de proteínas procedentes de *Neisseria meningitidis*, eluidos mediante un gradiente salino discontinuo (A) y el análisis de estas muestras para las proteínas de Hsp70, Hsp65 y PorA mediante un análisis de la transferencia Western (B) que demuestra una purificación clara de las HEP de otros antígenos de *N. meningitidis* importantes, tales como PorA.

La figura 5 muestra la inmunogenicidad de HEP aisladas a partir de *Neisseria meningitidis* empleando el método de la invención (IEC HspC), comparado con las HEP aisladas a partir de *Neisseria meningitidis* empleando métodos de enfoque isoeléctricas convencionales (IEF HspC). Aunque ambos HspC muestran una opsonización significativamente mejor contra cepas heterólogas que la vacuna de vesículas de la membrana externa actual (H44/760MV), los IEC HspC mostraron una inmunogenicidad de cepa cruzada mucho mejor que los IEF HspC.

La figura 6 muestra la inmunogenicidad protectora de HEP aisladas a partir de *N. meningitidis* (MC58 HspC), comparado con la vacuna de vesículas de la membrana externa (OMV) en un modelo de exposición letal en ratón que demuestra que la vacuna que contienen hspC es equivalente a la vacuna OMV actual en puntuaciones de salud (A) y supervivencia (B) frente a una exposición con organismos vivos con la cepa homóloga de *N. meningitidis*.

La figura 7 muestra la inmunogenicidad de HEP aisladas a partir del serotipo B de *N. meningitidis* que demuestra que no solo una buena reactividad de serotipo cruzado, sino una significativa inmunogenicidad de serogrupo cruzado contra cepas de meningitis A (NmA) y meningitis C (NmC). La inmunogenicidad protectora, evaluada mediante la actividad de opsonización, fue significativamente mejor que la observada con las vacunas OMV empleadas en la clínica en la actualidad, que no muestran inmunogenicidad de serogrupo cruzado.

La figura 8 muestra un análisis de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de la purificación de HEP a partir de células CHO, eluidas mediante un gradiente salino discontinuo (A) y el análisis de estas muestras para las proteínas de Hsp70 (B) y Hsp60 (C) mediante una transferencia Western. Carril 1 - marcadores de peso molecular (Pm), carril 2 - flujo, carril 3 - lavado, carril 4 - elución 150 mM, carril 5 - elución 150 mM, carril 6 - elución 250 mM, carril 7 - elución 250 mM, carril 8 - elución 350 mM, carril 9 - elución 350 mM, carril 10 - elución 500 mM, carril 11 - elución 500 mM, carril 12 - elución 1 M.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. El método de la presente invención proporciona también la recuperación de proteínas de choque térmico de diferentes familias, tales como hsp40, hsp60, hsp70, hsp90, gp96, a partir de una única muestra.

Dichos complejos recuperados, o la fracción que los contiene, pueden emplearse como determinantes inmunogénicos en composiciones de vacunas para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Los métodos de la invención tienen la ventaja de que pueden estar presentes complejos que comprenden diferentes polipéptidos derivados de un patógeno común en las fracciones o complejos recuperados. Cuando se administran como determinante inmunogénico de una composición de vacuna puede producirse una respuesta inmunológica heteróloga que media en una inmunidad protectora a largo plazo que no es específica de serotipo ni es específica de serogrupo con relación a otros patógenos relacionados con el patógeno del cual proceden los polipéptidos del complejo.

El método mejorado de la invención proporciona la purificación de complejos de proteínas empleando métodos basados en el intercambio iónico, sin tener que utilizar productos químicos, tales como caotrofos, tensioactivos y anfólitos (anfólinas) en la metodología de purificación. Este método resulta ventajoso, puesto que la presencia de ingredientes extraños en las preparaciones farmacéuticas en general resulta indeseable. Por tanto, los complejos purificados obtenidos empleando el método de la invención pueden utilizarse para producir preparaciones de vacuna mejoradas.

El método de la invención también resulta ventajoso porque proporciona un método de purificación que tiene una mayor capacidad que las técnicas previamente utilizadas, tales como el enfoque isoeléctrico, para la purificación de complejos de proteínas de estrés, de forma que puede lograrse una producción barata de vacunas que contienen estos complejos.

Además, los inventores han demostrado, de modo sorprendente, que los complejos de proteínas de estrés que se purifican empleando los métodos de la invención son más inmunogénicos que complejos similares obtenidos empleando técnicas de purificación, tales como el enfoque isoeléctrico (IEF). Por tanto, los complejos HspC obtenidos mediante los métodos de la invención son más inmunogénicos que los purificados empleando los métodos de purificación convencionales conocidos en la técnica.

La cromatografía de intercambio iónico (IEC) se basa en las interacciones entre cargas producida entre las proteínas en la muestra y las cargas inmobilizadas sobre la resina elegida. En general, la IEC puede subdividirse en cromatografía de intercambio catiónico o cromatografía de intercambio aniónico. Por ejemplo, puede utilizarse CaptoQ™ (un intercambiador aniónico cargado positivamente) cuando se predice que el complejo de proteínas diana esté cargado negativamente a pH 6,8 (véase la tabla 1) y puede utilizarse CaptoS™ (un intercambiador aniónico cargado negativamente) cuando se predice que el complejo de proteínas diana esté cargado positivamente a pH 6,8.

Tabla 1 - Unión predicha de Hsp a una columna de CaptoQ

Proteína	PM (kDa)	pI	Unión predicha a CaptoQ*
Hsp90	75	4,7	fuerte
Hsp71	67	4,9	fuerte
Hsp60 (Cpn60.1/groEL1)	56	4,7	fuerte
Hsp65 (Cpn60.2/groEL2)	57	4,6	fuerte
HspX	16	5	fuerte
BCG-A (GroES)	11	4,6	fuerte

*se emplea tampón fosfato, pH 6,8, para el equilibrio de la columna

Además, la distribución del punto isoeléctrico (pI) de las proteínas en un proteoma es universal para todos los procariotas y puede representarse como una distribución bimodal o “efecto mariposa”, de modo que aproximadamente 60% de las proteínas tienen un $pI \leq 7$, y 40% del proteoma tiene un $pI \geq 8$ (véase la tabla 1). Por ejemplo, cuando se emplean hspC procedentes de cultivos micobacterianos para generar un lisado de células, se espera que, a pH 6,8, al menos 40% del proteoma micobacteriano contaminante pueda ser eliminado con facilidad del complejo purificado y, por tanto, también del producto de vacuna empleando CaptoQ™ IEC. Los expertos en la técnica comprenderán con facilidad que los métodos de la presente invención pueden realizarse empleando cualquier medio de intercambio iónico adecuado que sea un medio de alto rendimiento.

Ciertas cuestiones técnicas importantes que deben considerarse cuando se está desarrollando una estrategia de purificación de proteínas robusta incluyen un tiempo corto de ejecución del proceso y la consideración cuidadosa de la composición del tampón. Los presentes inventores han intentado purificar complejos de proteínas y, al hacerlo, solucionar o reducir las cuestiones asociadas con la degradación de las proteínas, la modificación o la alteración de los complejos de proteínas durante el proceso de purificación. Aunque se prepararon vacunas enriquecidas en HspC muy inmunogénicas con un enfoque isoeléctrico de flujo libre (FF-IEF), los tiempos de ejecución típicos fueron de 4 horas y también resultó necesario mantener la solubilidad de las proteínas con urea. Se ha demostrado que este caotropro tiene efectos desestabilizantes sobre la estructura macromolecular y la función de las proteínas. De forma prometedora, CaptoQ™, debido a la estabilidad química de la matriz “respetuosa con las proteínas” de alto flujo, genera un tiempo de ejecución más corto y ofrece una mayor flexibilidad con respecto a la elección del tampón. Los presentes inventores, de modo sorprendente, han reducido el tiempo necesario para preparar 3 mg de preparación enriquecida en HspC a partir de 10 mg de material de partida hasta aproximadamente 2 horas, y además la solubilidad de las proteínas se mantuvo sin necesidad de caotropros o tensioactivos. Además, se redujeron los niveles de degradación de las proteínas.

Los métodos de la presente invención se han empleado para preparar vacunas potenciales contra la tuberculosis, la meningitis y la gripe. El método utiliza el punto isoeléctrico de las proteínas diana y el pH del tampón. La composición de vacuna puede comprender al menos dos de las principales proteínas de choque térmico que se cree que son importantes para generar inmunidad, de modo específico las familias Hsp69 y Hsp70.

Los métodos de la presente invención tienen la ventaja de ser dimensionables y rápidos, con la posibilidad de procesar litros de lisado para generar cantidades en kg de complejo de proteínas purificado y composición de vacuna.

La composición puede administrarse como una composición inyectable, por ejemplo, en una aplicación intravenosa, intradérmica o subcutánea, y el ingrediente activo puede estar en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que es apirógena y tiene un pH, una isotonicidad y una estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica son capaces de preparar disoluciones adecuadas empleando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como una inyección de cloruro de sodio, una inyección de Ringer o una inyección de Ringer lactado. Si es necesario, pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos.

Los complejos o las composiciones de vacunas también pueden administrarse por medio de microesferas, liposomas, otros sistemas de transporte en micropartículas o formulaciones de liberación sostenida colocados en ciertos tejidos, que incluyen sangre.

5 Pueden encontrarse ejemplos de las técnicas y los protocolos mencionados anteriormente y otras técnicas y protocolos que se pueden utilizar según la invención en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Gennaro, A. R., Lippincott Williams & Wilkins; 20ª edición, ISBN 0-912734-04-3; y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Ansel, H. C. *et al.*, 7ª edición, ISBN 0-683305-72-7, cuyas descripciones en su totalidad se incorporan en la presente como referencia.

Las referencias en la presente a tratamientos “terapéuticos” y “profilácticos” deben considerarse en su sentido más amplio. El término “terapéutico” no implica necesariamente que un sujeto se trate hasta su total recuperación. De modo similar, “profiláctico” no significa necesariamente que el sujeto no contraiga finalmente una enfermedad infecciosa o un trastorno canceroso. La invención no incluye estos tratamientos.

10 Definiciones

A menos que indique lo contrario, todas las expresiones y los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el significado que entienden habitualmente los expertos en la técnica en el campo de la presente invención.

15 A través de la memoria descriptiva, a menos que el contexto indique lo contrario, los términos “comprende” o “incluye”, o sus variaciones tales como “comprendiendo” o “incluyendo”, implican la inclusión del número entero mencionado o grupos de números enteros, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

20 Tal como se emplea en la presente, los términos tales como “un/una” y “el/la” incluyen los referentes en singular y en plural, a menos que el contexto claramente indique lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a “un agente activo” o “un agente farmacológicamente activo” incluye un único agente activo, así como dos o más agentes activos diferentes en combinación, mientras que las referencias a “un vehículo” incluye mezclas de dos o más vehículos, así como un único vehículo, y similares.

25 Los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se emplean en la presente de modo intercambiable para describir una serie de al menos dos aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, tales como isómeros. No existe limitación en cuanto al número máximo de aminoácidos que pueden comprender un péptido o una proteína. Además, el término polipéptido se extiende a fragmentos, análogos y derivados de un péptido, en los que dicho fragmento, análogo o derivado conserva la misma actividad funcional biológica que el péptido del cual procede el fragmento, derivado o análogo.

30 Tal como se emplea en la presente, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” significa la cantidad de un agente, compuesto de unión, molécula pequeña, proteína de fusión o peptidomético de la invención que es necesaria para inducir una respuesta inmunológica protectora contra una enfermedad infecciosa o un trastorno canceroso. Tal como se emplea en la presente, la expresión “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a la cantidad de una composición que es necesaria para prevenir la aparición inicial, el avance o la recurrencia de una enfermedad infecciosa o un trastorno canceroso. El término “terapéutico” no implica necesariamente que un sujeto se trate hasta su total recuperación. De modo similar, “profiláctico” no significa necesariamente que el sujeto no contraiga finalmente un trastorno de enfermedad.

35 Tal como se emplea en la presente, el término “sujeto” se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, y en particular un ser humano. En una realización concreta, el sujeto es un mamífero, en particular un ser humano. El término “sujeto” es intercambiable con el término “paciente”, tal como se emplea en la presente.

40 El término “aislado”, cuando se emplea con referencia a los complejos de proteínas de choque térmico-polipéptidos purificados de la invención, se refiere al estado en el que dichos complejos se proporcionan en una forma aislada y/o purificada, es decir, se han separado, aislado o purificado a partir de una mezcla de origen y/o de su entorno natural, y se proporcionan en una forma sustancialmente pura u homogénea. Por consiguiente, dichos complejos aislados estarán exentos o sustancialmente exentos de los materiales con los que pueden estar asociados en la naturaleza, tales como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural, o el entorno en el que se han preparado (por ejemplo, cultivo celular) cuando dicha preparación se realiza mediante la tecnología del ADN recombinante llevada a cabo *in vitro* o *in vivo*.

Ejemplos

La presente invención se describirá a continuación haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan como ilustración y no pretenden considerarse como limitantes de la presente invención.

50 Ejemplo 1: Preparación de preparaciones enriquecidas en HspC a partir de lisados celulares de BCG

55 Se lisaron sedimentos de células BCG procedentes de cultivos sometidos a choque térmico semilogarítmicos y se aclararon mediante centrifugación. Los sedimentos celulares se resuspendieron en PBS estéril que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas sin EDTA. Las células resuspendidas se lisaron empleando sonicación, un Beadbeater o haciéndolas pasar a través de un homogeneizador de alta presión Emulsiflex C5, y se recogieron en una bolsa estéril. Se añadió benzonasa (250 U/ml) al lisado. Las muestras después se homogeneizaron dos veces

más, el lisado celular se trasladó a tubos de centrifuga y se retiraron los restos celulares mediante una centrifugación durante 20 minutos a 6000 g. El lisado aclarado se recogió y se centrifugó durante 60 minutos más a 14000 g, y el sobrenadante se retiró y se denominó los lisados aclarados a alta velocidad. Se desalaron 10 ml de los lisados aclarados y se cambió el tampón a tampón fosfato 50 mM, pH 6,8. Se determinó la concentración de proteínas de la muestra y se preparó una preparación enriquecida en HspC IEC (cromatografía de intercambio iónico) mediante una cromatografía en columna como sigue. Se cargaron 10 mg de proteínas sobre una columna CaptoQ™ con un caudal de 0,5 ml/minuto. Después de un lavado a fondo de la columna con tampón fosfato 50 mM, pH 6,8, las proteínas se eluyeron de modo discontinuo empleando concentraciones crecientes de NaCl (150 mM, 300 mM, 500 mM y 1 M). Las fracciones eluidas que contienen Hsp70 y Hsp65 se analizaron empleando SDS-PAGE y transferencia Western empleando antisueros comerciales contra DnaK (Hsp70), GroEL (Hsp65) y Ag85. Se muestran ejemplos de las HEP preparadas en la figura 1, que muestra la purificación clara de las HEP de otros antígenos de BCG importantes, tales como Ag85.

Ejemplo 2: Inmunogenicidad de preparaciones enriquecidas en HspC derivadas de BCG e inducción de una respuesta inmunológica protectora contra una exposición de TB vivo

Se emplearon BCG HEP para inmunizar a ratones BalbC y se recogieron los bazos de los animales inmunizados 28 días después de la inmunización. Los bazos se introdujeron en RPMI-1640 y se prepararon suspensiones de células individuales presionando los bazos a través de un tamiz de células de 70 µm empleando un émbolo de jeringa de 5 ml hacia un tubo Falcon de 50 ml. Las células se contaron empleando exclusión de azul de tripano sobre un hemocitómetro para portaobjetos de Glasstic KOVA, y la producción de gamma-interferón (IFN-γ) se ensayó para una respuesta de memoria frente a antígenos de TB. Se añadieron 2 x 10⁶ esplenocitos a cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos (Nunc) en 1 ml de medio de cultivo, y a cada pocillo se le añadió uno de los siguientes antígenos: BSA (10 µg/ml), Con A (10 µg/ml), lisado de células completas TB (WCL, de 50 a 1,56 µg/ml), HEP, IEF HspC o Ag85 (10 µg/ml). Los sobrenadantes de los cultivos de los pocillos reestimulados se ensayaron para IFN-γ, IL-2, IL-4 e IL-5 empleando un kit de ELISA murino según el protocolo del fabricante (R&D Systems). La figura 2 muestra los resultados típicos obtenidos con células de bazo procedentes de ratones inmunizados reestimulados con WCL *in vitro*. Los resultados demuestran que las HEP aisladas a partir de BCG (IEC) inducen una potente respuesta de IFN-γ en los animales inmunizados, más potente que los lisados de BCG de origen (LSS) y mucho más potente que los HspC aislados empleando el método de enfoque isoeléctrico de flujo libre previamente descrito (IEX) para el aislamiento de múltiples familias de HspC (figura 2). Las respuestas de memoria a WCL fueron comparables a las observadas con Con A, y se observaron respuestas significativas, pero menos potentes, contra Ag85. Las respuestas de IFN-γ *in vitro* también se tradujeron en una protección *in vivo* frente a una exposición de TB vivos en un modelo de exposición en aerosol de ratón, con una reducción de 0,6 log en las cfu (unidades formadoras de colonias) en pulmón, una protección equivalente o mejor que la protección observada con la vacuna de BCG viva en este modelo; las HEP aisladas a partir de BCG también fueron capaces de reforzar a los animales cebados con BCG, según se ilustra por una mayor reducción en las cfu en pulmón (figura 3).

Ejemplo 3: Preparación de HEP a partir de *Neisseria meningitidis*

Cultivos de un variante de cepa acapsulado de *Neisseria meningitidis*, MC58 (Mol. Microbiol., 1995, noviembre, 18(4):741-754) se sometieron a un choque térmico a 44 °C y se mataron mediante un tratamiento con el antibiótico gentamicina. Las células se procesaron para producir HEP según se describe en el ejemplo 1. Brevemente, las células se lisaron mediante ciclos de congelación y descongelación o sonicación, y se aclararon mediante centrifugación durante 20 minutos a 6.000 g. El extracto aclarado se cargó sobre una columna cargada con la resina de intercambio iónico CaptoQ. Después de un lavado a fondo de la columna con tampón fosfato 50 mM, pH 6,8, las proteínas se eluyeron de modo discontinuo empleando concentraciones crecientes de NaCl (150 mM, 350 mM, 500 mM). Las fracciones eluidas que contienen Hsp70 y Hsp65 se analizaron empleando SDS-PAGE (figura 4A). Las fracciones eluidas con NaCl 150 mM y 300 mM se reunieron y se dializaron en PBS para su uso como vacunas. La composición de vacuna se evaluó mediante una electroforesis en gel y una transferencia Western para la presencia de las principales familias de proteínas de choque térmico y la porina de la membrana externa PorA. Los resultados se muestran en la figura 4, que demuestra la purificación clara de las HEP de otros antígenos importantes de BCG de *N. meningitidis*, tales como PorA.

Ejemplo 4. Inmunogenicidad de HEP de *Neisseria meningitidis* e inducción de una respuesta inmunológica protectora contra una exposición viva

Las HEP preparadas a partir de la cepa MC58 de *Neisseria meningitidis* según el método del ejemplo 3 se emplearon para inmunizar ratones para generar sueros para la evaluación de las respuestas de cepa cruzada. Los sueros de los animales inmunizados se reunieron y se evaluaron para su capacidad para suscitar una opsonofagocitosis mediada por anticuerpos de cepa cruzada empleando las siguientes cepas clínicas de *Neisseria meningitidis* (meningitis B, MnB); MC58, H44/76-SL, M01-240101, M01-240013, M01-240149, M01-240185 y M01-240355. Para el ensayo, las muestras de suero se incubaron con bacterias marcadas con fluorescencia de BCECF y complemento de cría de conejo sin IgG durante 7,5 min a 37 °C. Las células HL60 se diferenciaron con DMF al 0,8%, se añadieron, y las muestras se incubaron durante 7,5 min antes de la adición de DPBS enfriado en hielo para detener la reacción. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo y los datos se expresaron como un

valor de índice de fluorescencia (FI-C'). Para todas las cepas, el suero obtenido de ratones vacunados con las HEP derivadas de MC58 induce respuestas de opsonización significativamente mayores que las obtenidas con suero procedente de controles no vacunados y animales inmunizados con hspC purificados empleando métodos de enfoque isoelectrico convencionales o con un candidato a vacuna de vesículas de la membrana externa comercial (H44/76 OMV). Los resultados obtenidos con la cepa heteróloga M01-240101 se muestran en la figura 5 y muestran la protección de cepa cruzada obtenida con las HEP (IEC HspC), los hspC purificados de modo convencional (IEF HspC) y la vacuna OMV (H44/76 OMV). La vacuna que contiene HEP también generó unos valores de opsonización mayores que la vacuna de IEF HspC contra MC58 y la cepa H44/76 de la cual procede la vacuna OMV. Las HEP preparadas a partir de un cultivo de fermentación a gran escala de MC58 empleando IEC como en el ejemplo 3, con el uso de tampónes HEPES 50 mM a pH 6,8 y un homogeneizador C5 Emuliflex (Avestin Inc.) para lisar las células, se ensayaron como vacunas contra la meningitis en un modelo de ratón de exposición letal empleando la cepa de *N. meningitidis* 44/76-SL, con una exposición de alta dosis de $0,8 \times 10^7$ organismos vivos. La inmunogenicidad protectora de las HEP aisladas a partir de *N. meningitidis* (MC58 HspC) contra una exposición letal por una cepa homóloga fue equivalente a la observada con la vacuna de vesículas de la membrana externa convencional (OMV) de uso clínico en la actualidad (figura 6), según se evalúa mediante las puntuaciones de salud (6A) o de supervivencia (6B). De modo importante, las vacunas de HEP mostraron una inmunogenicidad significativamente mayor contra cepas heterólogas que las vacunas OMV (figura 7).

Ejemplo 5: Inmunogenicidad protectora de serotipo y serogrupo cruzada de HEP de *N. meningitidis*

Las vacunas de la meningitis B actuales están formadas por preparaciones de vesículas de la membrana externa (OMV) aisladas a partir del serotipo B de *N. meningitidis* y muestran una mala protección de serotipo cruzado entre sí, y no confieren protección de serogrupo cruzado frente a los serogrupos de meningitis A y C. Las vacunas de HEP aisladas a partir del serotipo B de *N. meningitidis* H44/76-SL se compararon con vacunas OMV convencionales procedentes de H44/76-SL y se evaluó la inmunogenicidad protectora mediante un ensayo de opsonización, según se validó en el anterior ejemplo 4. Las HEP aisladas a partir del serotipo B de *N. meningitidis* H44/76-SL suscitaban no solo una buena inmunidad de serotipo cruzado (serotipos MC58 y 240-013,085, 101,149 y 355), sino que también mostraron una buena inmunogenicidad de serogrupo cruzado contra cepas de meningitis A (NmA) y meningitis C (NmC) (figura 7). Además, la inmunogenicidad fue significativamente mejor que con las vacunas OMV que se emplean en la clínica en la actualidad, que no muestra inmunogenicidad de serogrupo cruzado ni inmunogenicidad de serogrupo cruzado (figura 7, HspC frente a OMV).

Ejemplo 6: Purificación e inmunogenicidad de HEPs procedentes de células de insecto infectadas por baculovirus

Baculovirus recombinantes que expresan la hemaglutinina del virus de la gripe H3 de Panamá y los polipéptidos E1 y E2 del virus de la hepatitis C como proteínas de fusión con un fragmento Fc de IgG humana se emplearon para infectar células de insecto Sf9. Las células infectadas se cultivaron durante 72 horas en medio sin proteínas Insect-Xpress y las células se sedimentaron a 4.500 rpm durante 10 minutos en una centrifuga Jouan GR4 22. Los sedimentos celulares se resuspendieron y se lisaron en hielo en Tris-HCl 10 mM, pH 6,8, que contenía NP40 al 0,2%, pepstatina 1 mg/ml y PMSF 0,2 mM, empleando un homogeneizador Dounce. El lisado se centrifugó a 12.000 g durante 15 min y el sobrenadante se centrifugó a 100.000 g durante 30 minutos para producir un lisado aclarado que después se cargó sobre una columna CaptoQ™. La columna se lavó en Tris-HCl 10 mM, pH 6,8, que contenía NaCl 100 mM, y las HEP se eluyeron con un gradiente salino de NaCl 150-350 mM. Las HEP purificadas se emplearon para inmunizar ratones y conejos, y los sueros de los animales inmunizados se ensayaron mediante transferencia Western y la inhibición de la hemaglutinación.

Ejemplo 7: Purificación e inmunogenicidad de HEP procedentes de células tumorales

Células EL4 y A20 se cultivaron en medio RPMI, se lisaron en tampones que contenían no iónicos empleando un homogeneizador Potter, y las HEP de células tumorales se purificaron y se ensayaron para la inmunogenicidad mediante transferencia Western como en el ejemplo 5.

Ejemplo 8: Purificación e inmunogenicidad de HEP procedentes de células hospedantes que expresan antígenos heterólogos

Células CHO (ovario de hámster chino) y células CHO que expresan proteínas de fusión de Fc de inmunoglobulina se cultivaron en medio CHO CD (Gibco). Las células CHO se recolectaron, se lavaron en PBS, se resuspendieron en HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 6,8, con o sin ADP 1 mM y MgCl 1 mM, y se lisaron mediante sonicación. El lisado se aclaró mediante centrifugación, seguido de una filtración a través de filtros de 0,8 μ M y después 0,2 μ M, se diluyó 10x en HEPES 50 mM, pH 6,8, y las HEP se purificaron empleando un sistema de cromatografía AKTA en una columna CaptoQ de 1 ml. La columna se lavó con 20 ml de tampón que contenía HEPES 50 mM, pH 6,8 y B, HEPES 50 mM, NaCl 20 mM, pH 6,8, con o sin ADP 1 mM y MgCl 1 mM añadidos, y las HEP se eluyeron en tampón de lavado que contenía una concentración salina creciente de NaCl 150 mM, NaCl 250 mM, NaCl 350 mM y 500 mM. Las HEP se ensayaron en geles de SDS-PAGE y se tiñeron para las proteínas con Coomassie (figura 6A) o se sometieron a una transferencia Western para hsp60 (anticuerpo SPA-875, Stressgene) o Hsp70 (anticuerpo SPA-811, Stressgene) (figuras 6B y 6C, respectivamente), que mostraron una buena separación de las HEP mediante la

elución en gradiente discontinuo de la columna CaptoQ.

5 A los expertos en la técnica les resultarán evidentes diversas modificaciones y variaciones de las realizaciones descritas de las invenciones sin apartarse del alcance de la invención. Aunque la invención se ha descrito con relación a realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención, tal como se reivindica, no debe limitarse a estas realizaciones específicas. En efecto, se pretende que las diversas modificaciones de los modos de realizar la invención descritos, que serán obvias para los expertos en la técnica, se incluyan en la presente invención. La referencia a la técnica anterior en esta memoria descriptiva no es ni debe considerarse como un reconocimiento o como ningún tipo de insinuación de que esta técnica anterior forme parte del conocimiento general común de cualquier país.

10

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para la purificación, a partir de una mezcla de origen, de al menos un complejo de proteínas de choque térmico formado por una proteína de choque térmico complejada con un fragmento de péptido, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 (i) proporcionar una mezcla de origen que comprende al menos un complejo de proteínas de choque térmico diana;
- (ii) determinar el punto isoeléctrico (pI) de dicho al menos un complejo de proteínas de choque térmico diana que se va a purificar de la mezcla de origen;
- (iii) preparar un lisado de células aclarado a partir de la mezcla de origen que comprende dicho al menos un complejo de proteínas de choque térmico diana;
- 10 (iv) someter el lisado de células a una purificación empleando una fase sólida de intercambio iónico, en el que el lisado de células se tampona empleando un tampón hasta un pH a una distancia de 2 unidades del pI de dicho complejo de proteínas de choque térmico diana, y en el que se emplea un gradiente salino para eluir dicho al menos un complejo de proteínas de choque térmico diana de la fase sólida de intercambio iónico;
- 15 (v) identificar una fracción eluida que contiene dicho al menos un complejo de proteínas de choque térmico diana basándose en el pI.
- 2.- El método según la reivindicación 1, en el que el tampón no incluye un caotropo.
- 3.- El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el tampón no incluye un anfolito.
- 4.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el tampón no incluye un tensioactivo.
- 5.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el gradiente salino es proporcionado por un tampón de elución que comprende cloruro de sodio.
- 20 6.- El método según la reivindicación 5, en el que el pH del tampón de elución es de 3 a 10.
- 7.- El método según la reivindicación 5, en el que el cloruro de sodio se proporciona dentro del tampón de elución a una concentración de 50 mM a 500 mM, y en el que el pH del tampón de elución es 6,8.
- 8.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la intercambio iónico se selecciona del grupo que consiste en cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de modo mixto.
- 25 9.- El método según la reivindicación 8, en el que la cromatografía de intercambio aniónico se realiza a un pH de 5,0 a 9,0 y a una conductividad de 0,5 a 5 mS/cm.
- 10.- El método según la reivindicación 8, en el que la cromatografía de intercambio catiónico se realiza a un pH de 4,0 a 9,0 y a una conductividad de 0,5 a 15 mS/cm.
- 30 11.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho al menos un complejo de proteínas de choque térmico diana procede del grupo que consiste en una célula cancerosa, una célula patógena, una célula infectada por un organismo patógeno, una célula que se ha sido genéticamente modificada para que exprese una proteína heteróloga que procede de una célula cancerosa, y una célula que se ha sido genéticamente modificada para que exprese una proteína heteróloga que procede de un patógeno que provoca una enfermedad infecciosa en un hospedante.
- 35 12.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el fragmento de péptido procede de un organismo patógeno que provoca una enfermedad infecciosa en un hospedante infectado, en el que el organismo patógeno se selecciona del grupo que consiste en una célula procariota, un protozoo, un virus, un parásito y un hongo.
- 40 13.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la expresión de la proteína de choque térmico de dicho al menos un complejo de proteínas de choque térmico no solamente es provocada por un estrés térmico y puede estar asociada con otras formas de estrés, que incluyen infecciones, estrés osmótico y estrés de citoquinas.

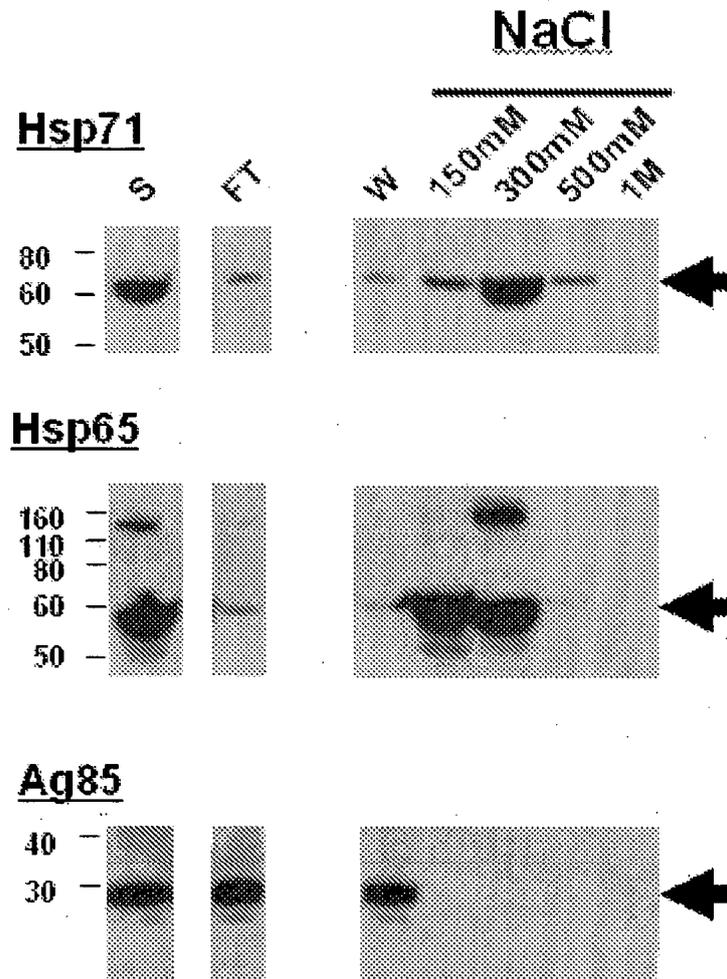


Figura 1

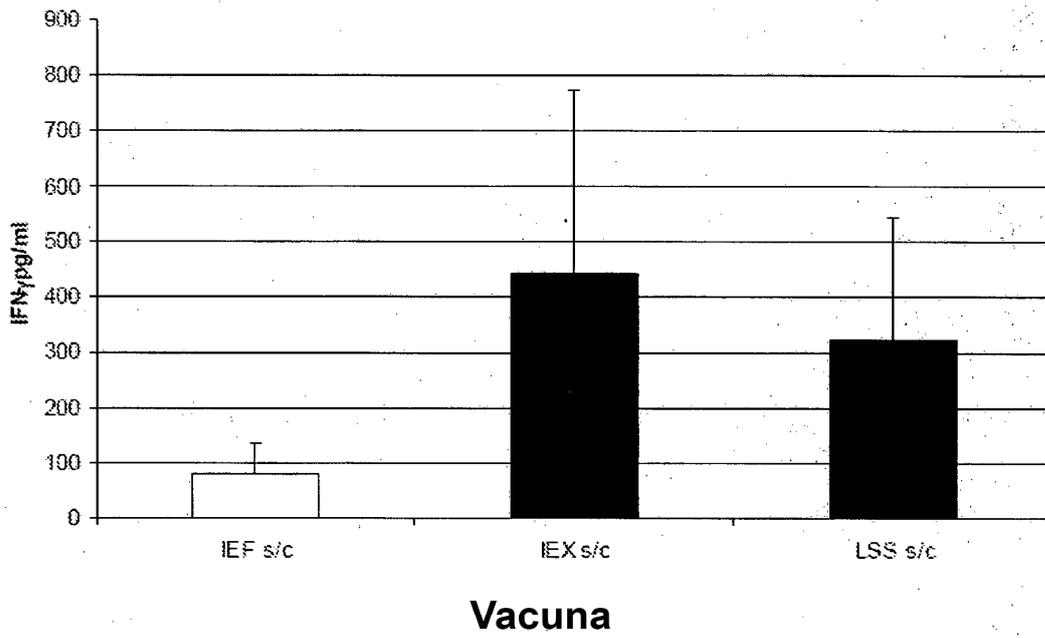


Figura 2

Recuento de colonias en pulmón

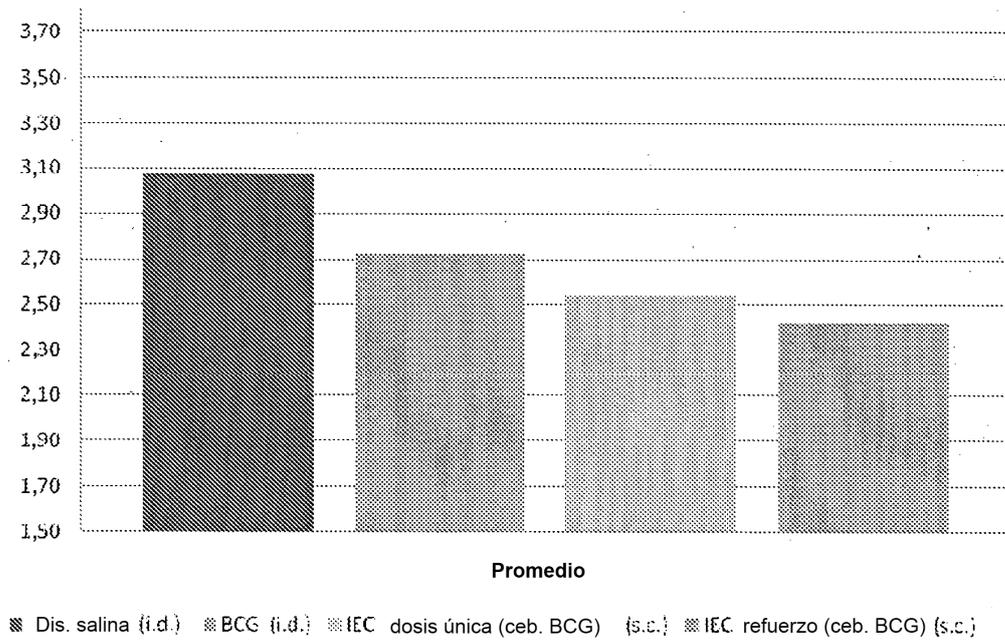


Figura 3

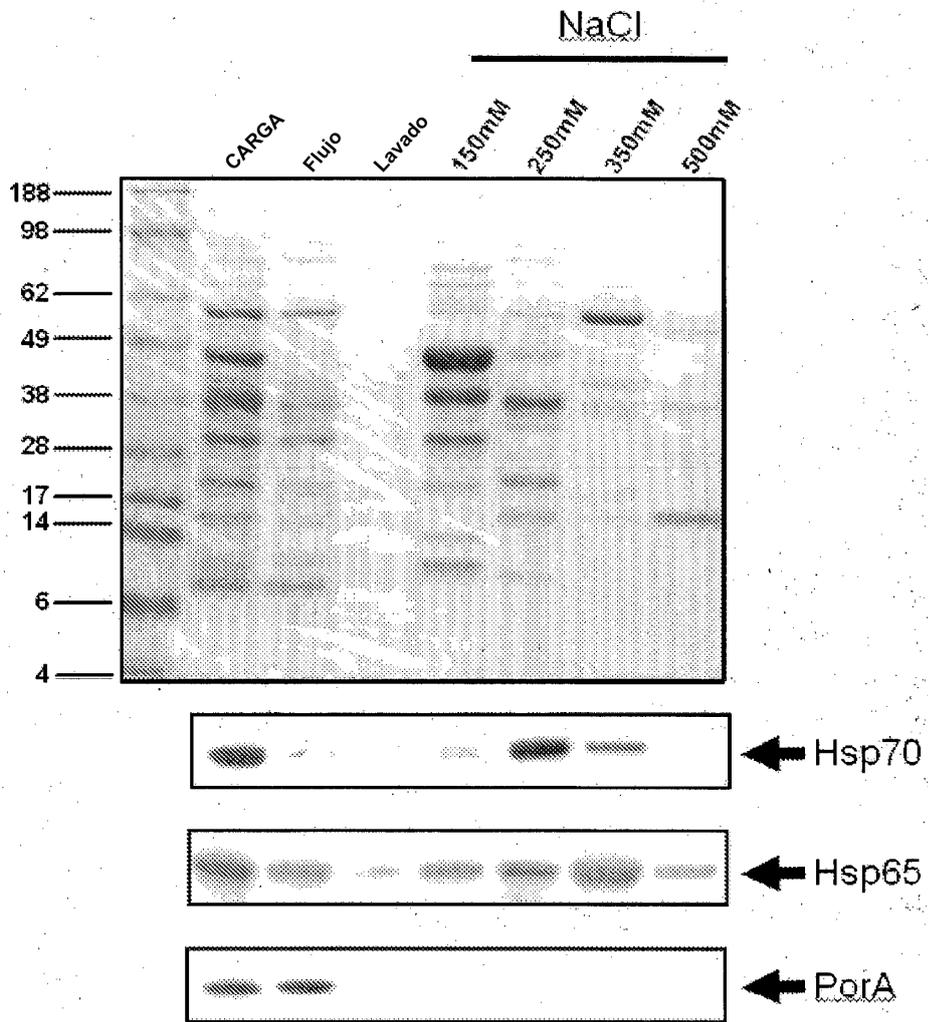


Figura 4

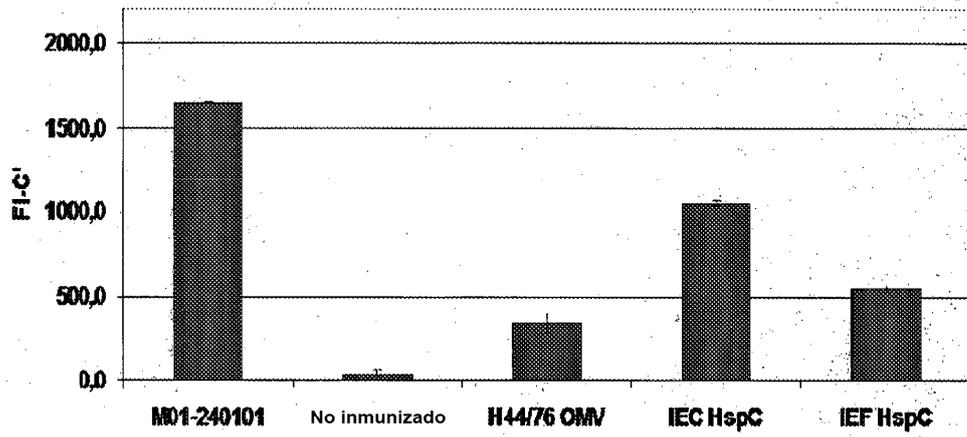


Figura 5

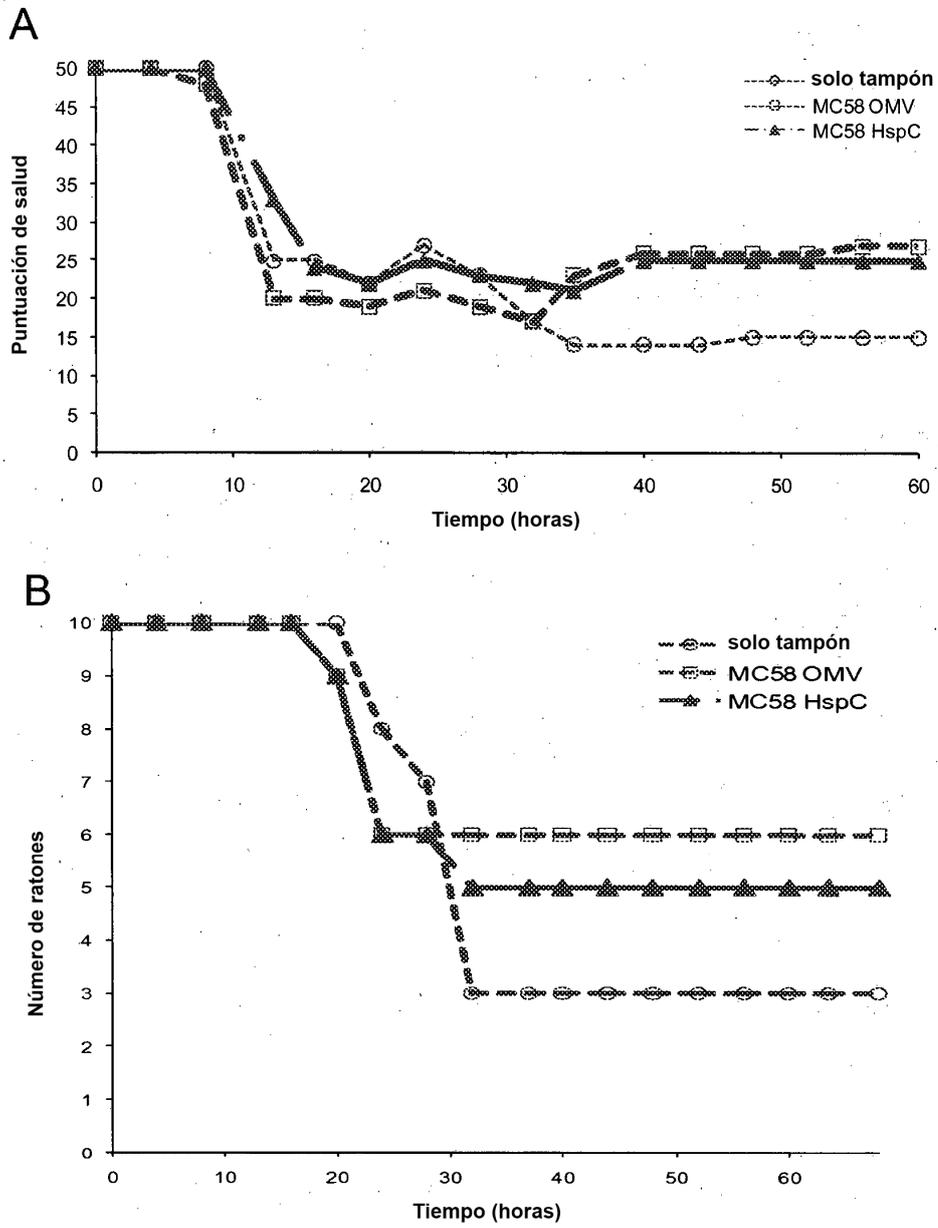


Figura 6

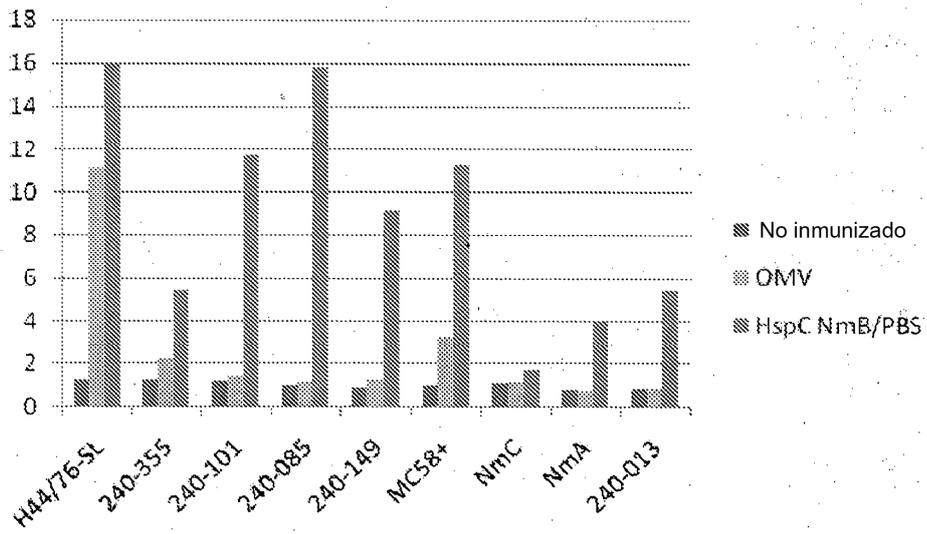


Figura 7

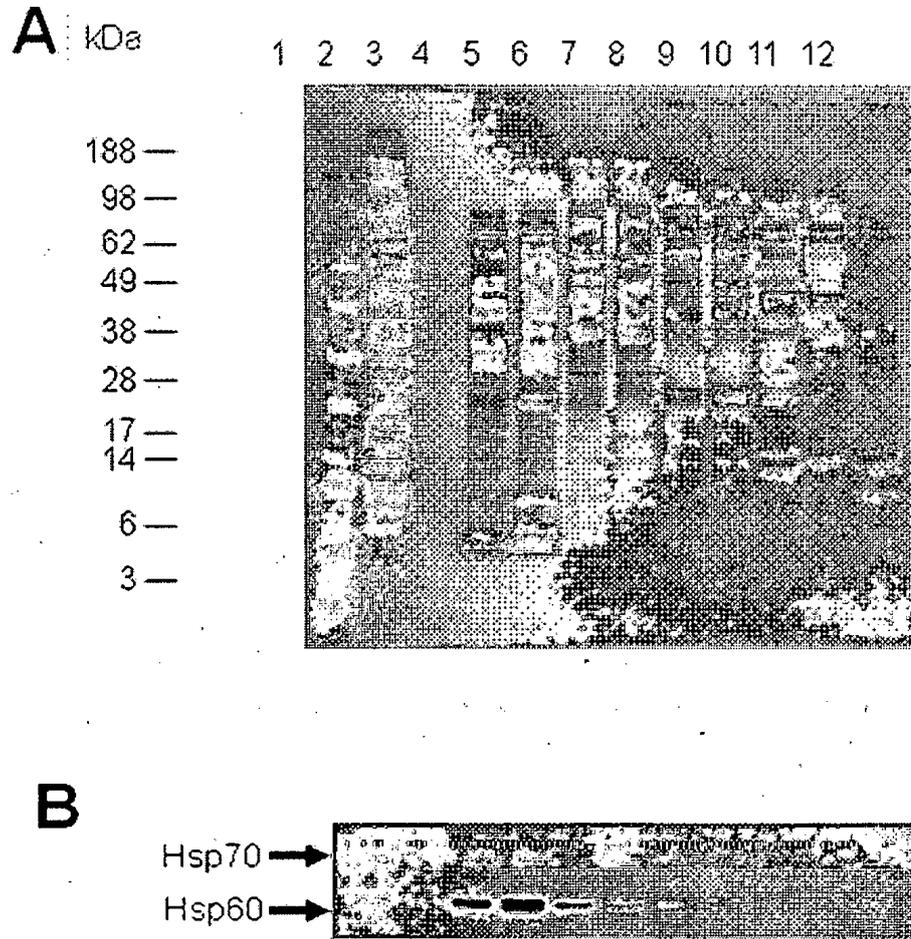


Figura 8