

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 984**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00	(2006.01)	C07H 21/04	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)		
A61K 39/40	(2006.01)		
A61K 39/00	(2006.01)		
A61K 39/02	(2006.01)		
A61K 39/385	(2006.01)		
A61K 39/04	(2006.01)		
A61K 45/00	(2006.01)		
A61K 38/00	(2006.01)		
C07H 21/02	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2007 E 07811793 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 1988927**

54 Título: **Fusiones de anticuerpos manipulados y proteínas de estrés**

30 Prioridad:

02.02.2006 US 764620 P

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

08.09.2016

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(100.0%)
55 FRUIT STREET
BOSTON, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

GELFAND, JEFFREY A.

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 581 984 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

Fusiones de anticuerpos manipulados y proteínas de estrés

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] Los anticuerpos monoclonales clásicos se producen actualmente en células de mamífero. Los inconvenientes de este procedimiento de producción incluyen la dificultad de producir y seleccionar clones apropiados, y el gasto de cultivo de células de mamíferos. La "próxima generación" de anticuerpos monoclonales están siendo manipulados en *E. coli*. Recientemente, la expresión microbiana de los dominios V_H y V_L unidos juntos por enlazadores polipeptídicos ha creado la capacidad de generar "mini-anticuerpos" manipulados. Estos minianticuerpos pueden generarse en *E. coli* de una manera prácticamente combinatoria. Estos Fab o Fv de cadena sencilla (scFv) creados artificialmente se pueden unir entre sí para formar multímeros, por ejemplo, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. A pesar de que son capaces de unirse a antígenos con una eficiencia casi similar a anticuerpo, estos minianticuerpos manipulados deficientes en Fc carecen de la capacidad de interactuar con las células presentadoras de antígenos y son poco inmunogénicos.

[0002] Las soluciones existentes a la falta de inmunogenicidad de anticuerpos de diseño implican dirigir uno de los sitios de unión a antígeno para enlazar directamente con las células inmunes. Esto los lleva a la aposición, pero no da lugar a la misma imprimación de MHC de clase I que se observaría para un anticuerpo monoclonal.

[0003] El documento WO 03/091266 describe la estabilización de proteínas en relación con chaperones de proteína, tales como chaperones híbridos y procedimientos para estabilizar proteínas y actividades de proteínas que comprenden la adición de dicha chaperona de proteína a la proteína. El documento WO 03/068822 describe la desinmunización de construcciones de (poli) péptidos.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0004] En un aspecto, se proporcionan fusiones de un anticuerpo manipulado, tal como un Fab o scFv, con una proteína de estrés, tal como la HSP70. Las proteínas de estrés son muy eficientes en la presentación de antígenos a células presentadoras de antígeno y en la provocación de una respuesta de células T. Han sido particularmente eficaces en la obtención de respuestas inmunes mediadas por células y respuestas inmunes humorales mediante este mecanismo.

[0005] Por lo tanto, las moléculas de fusión se unen a antígenos con alta afinidad, son altamente inmunogénicas, exhiben imprimación de MHC de clase I, provocan una respuesta de células T y son capaces de ser producidas en sistemas no mamíferos, tales como *E. coli*. Las moléculas de fusión son por lo tanto adecuadas para su uso como vacunas altamente inmunogénicas para la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas, inflamatorias, autoinmunes, o malignas.

[0006] Por consiguiente, se proporcionan polipéptidos de fusión que comprenden al menos un anticuerpo manipulado y al menos una proteína de estrés. Estos anticuerpos modificados que comprenden los polipéptidos de fusión pueden ser multivalente, es decir, pueden ser bivalentes, trivalentes, tetravalentes, pentavalentes, etc. Además, pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos.

[0007] También se proporcionan ácidos nucleicos y vectores que codifican los polipéptidos de fusión de proteína de estrés y anticuerpo modificado, células huésped que comprenden los ácidos nucleicos y vectores y procedimientos para producir los polipéptidos de fusión de proteína de estrés y anticuerpo modificado. Los sitios de combinación de antígeno o fragmentos de anticuerpos modificados se pueden crear de forma rápida y con alta afinidad, y pueden fusionarse a bajo coste a una proteína de estrés.

[0008] Además, se proporcionan composiciones farmacéuticas y vacunas que comprenden los polipéptidos de fusión de proteínas de estrés y anticuerpos modificados de la invención. Tales composiciones pueden comprender además un adyuvante u otro agente. También se proporcionan procedimientos para prevenir o tratar enfermedades infecciosas, inflamatorias, autoinmunes o malignas en un paciente, que comprende administrar a un paciente con necesidad de la misma, una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente.

[0009] También se describen en el presente documento kits para la práctica de los procedimientos.

[0010] Otras características y ventajas serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0011]

La Figura 1 representa un polipéptido de fusión de proteína de estrés y anticuerpo modificado de ejemplo que comprende un Tandab tetravalente (anticuerpo manipulado) y HSP70 (proteína de estrés).

La Figura 2 representa las secuencias de polipéptidos de longitud completa de HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis* HSP70 y *Mycobacterium bovis* HSP70, respectivamente.

La Figura 3 representa los resultados de PAAG al 12% tal como se describe en el Ejemplo 1, todas las proteínas cargadas a 4 µg/pista bajo condiciones desnaturizantes (DTT).

Figura 4. DO 450 nm. Los antígenos para el recubrimiento fueron tomados a la concentración de 1 µg/ml en PBS. Los anticuerpos primarios se incubaron en PBS con BSA al 0,2% y Tween 20 al 0,05% en diluciones en serie. Se usaron anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados con HRP.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0012] Por conveniencia, antes de una descripción adicional de la presente invención, se definen ciertos términos empleados en la memoria, ejemplos y reivindicaciones adjuntas.

[0013] Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0014] El término "administración" incluye cualquier procedimiento de administración de un compuesto de la presente invención, incluyendo, pero no limitado a, una composición farmacéutica o agente terapéutico, en el sistema de un sujeto o a una región particular en o sobre un sujeto. Las frases "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente" como se utilizan en el presente documento significan la administración de un compuesto, fármaco u otro material que no sea directamente en el sistema nervioso central, de tal manera que entra en el sistema del paciente y, por lo tanto, está sujeto al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea. "Administración parenteral" y "administrado parenteralmente" significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal y perfusión.

[0015] El término "aminoácido" pretende abarcar todas las moléculas, ya sean naturales o sintéticas, que incluyen una funcionalidad amino y una funcionalidad ácida y son capaces de ser incluidos en un polímero de aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de ejemplo incluyen aminoácidos de origen natural; análogos, derivados y congéneres de los mismos; análogos de aminoácidos que tienen cadenas laterales variantes; y todos los estereoisómeros de cualquiera de los anteriores. Los nombres de los aminoácidos naturales se abrevian en el presente documento de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC-IUB.

[0016] El término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina, derivados de la misma, que mantienen la capacidad de unión específica, y proteínas que tienen un dominio de unión que es homólogo o en gran parte homólogo a un dominio de unión de inmunoglobulina. Estas proteínas pueden derivarse de fuentes naturales, o pueden ser, en parte o totalmente, producidos sintéticamente. Un anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede ser un miembro de cualquier clase de inmunoglobulina de cualquier especie, incluyendo cualquiera de las clases humanas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. En realizaciones de ejemplo, los anticuerpos utilizados con los procedimientos y composiciones descritos en este documento son derivados de la clase IgG.

[0017] El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a cualquier derivado de un anticuerpo que es menor que la longitud completa. En realizaciones de ejemplo, el fragmento de anticuerpo retiene al menos una parte significativa de la capacidad de unión específica del anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, diacuerpo dsFv, y fragmentos Fd. El fragmento de anticuerpo puede producirse por cualquier medio. Por ejemplo, el fragmento de anticuerpo puede producirse enzimática o químicamente mediante la fragmentación de un anticuerpo intacto, puede producirse de forma recombinante a partir de un gen que codifica la secuencia del anticuerpo parcial, o puede producirse sintéticamente de manera total o parcial. El fragmento de anticuerpo puede ser, opcionalmente, un fragmento de anticuerpo de cadena única. Alternativamente, el fragmento puede comprender múltiples cadenas que están unidas entre sí, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro. El fragmento también puede ser, opcionalmente, un complejo multimolecular. Un fragmento de anticuerpo funcional comprenderá típicamente al menos aproximadamente 50 aminoácidos y más típicamente comprenderá al menos aproximadamente 200 aminoácidos.

[0018] El término "sitio de unión al antígeno" se refiere a una región de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo en un antígeno.

[0019] Los términos "comprende" y "que comprende" se utilizan en el sentido inclusivo, abierto, lo que significa que pueden incluirse elementos adicionales.

- [0020] El término "cantidad eficaz" se refiere a aquella cantidad de un compuesto, material o composición que es suficiente para lograr un resultado deseado. Una cantidad eficaz de un compuesto se puede administrar en una o más administraciones.
- 5 [0021] El término "anticuerpo manipulado" se refiere a una molécula recombinante que comprende al menos un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de unión al antígeno derivado del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo y puede, opcionalmente, comprender la totalidad o parte de los dominios variable y/o constante de un anticuerpo de cualquiera de las clases de Ig (por ejemplo IgA, IgD, IgE, IgG, IgM e IgY).
- 10 [0022] El término "epítopo" se refiere a la región de un antígeno a la que un anticuerpo se une preferentemente y específicamente. Un anticuerpo monoclonal se une preferentemente a un único epítopo específico de una molécula que puede estar definida molecularmente. En la presente invención, pueden reconocerse múltiples epítopos por un anticuerpo multiespecífico.
- 15 [0023] Una "proteína de fusión" o "polipéptido de fusión" se refiere a un polipéptido híbrido que comprende porciones de polipéptido de al menos dos polipéptidos diferentes. Las porciones pueden ser de proteínas del mismo organismo, en cuyo caso se dice que la proteína de fusión es "intraespecie", "intragénica", etc. En diversas realizaciones, el polipéptido de fusión puede comprender una o más secuencias de aminoácidos unidas a un primer polipéptido. En el caso en el que se fusiona más de una secuencia de aminoácidos a un primer polipéptido, las secuencias de fusión pueden ser múltiples copias de la misma secuencia, o alternativamente, pueden ser diferentes secuencias de aminoácidos. Un primer polipéptido puede fusionarse al extremo N-terminal, C-terminal, o N- y C-terminal de un segundo polipéptido. Además, un primer polipéptido puede insertarse dentro de la secuencia de un segundo polipéptido.
- 20 [0024] El término "fragmento Fab" se refiere a un fragmento de un anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno generado por escisión del anticuerpo con la enzima papaína, que corta en la región bisagra N-terminal al enlace disulfuro entre la cadena H y genera dos fragmentos Fab de una molécula de anticuerpo.
- 25 [0025] El término "fragmento F(ab')₂" se refiere a un fragmento de un anticuerpo que contiene dos sitios de unión a antígeno, generado por escisión de la molécula de anticuerpo con la enzima pepsina, que corta la región bisagra C terminal al enlace disulfuro entre la cadena H.
- 30 [0026] El término "fragmento Fc" se refiere al fragmento de un anticuerpo que comprende el dominio constante de la cadena pesada.
- 35 [0027] El término "fragmento Fv" se refiere al fragmento de un anticuerpo que comprende los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera.
- 40 [0028] "Construcción génica" se refiere a un ácido nucleico, tal como un vector, plásmido, genoma viral o similar, que incluye una "secuencia de codificación" de un polipéptido o que de otro modo es transcribible a un ARN biológicamente activo (por ejemplo, antisentido, señuelo, ribozima, etc.), puede transfectarse en las células, por ejemplo, en ciertas realizaciones células de mamífero, y puede provocar la expresión de la secuencia de codificación en las células transfectadas con la construcción. La construcción génica puede incluir uno o más elementos reguladores unidos operativamente a la secuencia de codificación, así como secuencias intrónicas, sitios de poliadenilación, origen de replicación, genes marcadores, etc.
- 45 [0029] "Célula huésped" se refiere a una célula que pueden ser transducida con un vector de transferencia específico. La célula se selecciona opcionalmente entre células *in vitro*, tales como las derivadas de cultivo celular, células *ex vivo*, tales como las derivadas de un organismo, y células *in vivo*, tales como los de un organismo. Se entiende que tales términos se refieren no sólo a la célula sujeto particular, sino a la progenie o potencial progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía se incluyen dentro del alcance del término tal como se usa en el presente documento.
- 50 [0030] El término "que incluye" se usa en el presente documento para significar "que incluye, pero no limitado a". "Que incluye" y "que incluye pero no limitado a" se utilizan indistintamente.
- 55 [0031] El término "inmunógeno" se refiere a la capacidad de una sustancia para provocar una respuesta inmune. Una "composición inmunogénica" o "sustancia inmunogénica" es una composición o sustancia que provoca una respuesta inmune. Una "respuesta inmune" se refiere a la reacción de un sujeto a la presencia de un antígeno, que puede incluir al menos uno de los siguientes: fabricación de anticuerpos, desarrollo de la inmunidad, desarrollo de hipersensibilidad al antígeno, y desarrollo de la tolerancia.
- 60 [0032] El término "polipéptido aislado" se refiere a un polipéptido, que se puede preparar a partir de ADN o ARN recombinante, o puede ser de origen sintético, alguna combinación de los mismos, o que puede ser un polipéptido de origen natural, que (1) no está asociado con proteínas con las que se asocia normalmente en la naturaleza, (2)
- 65

está aislado de la célula en la que se produce normalmente, (3) está esencialmente libre de otras proteínas de la misma fuente celular, (4) se expresa por una célula de una especie diferente, o (5) no se produce en la naturaleza.

5 **[0033]** El término "ácido nucleico aislado" se refiere a un polinucleótido de origen genómico, ADNc, sintético, o de origen natural o alguna combinación de los mismos, que (1) no está asociado con la célula en la que el "ácido nucleico aislado" se encuentra en la naturaleza, o (2) está unido operativamente a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza.

10 **[0034]** El término "enlazador" está reconocido en la técnica y se refiere a una molécula o grupo de moléculas que conectan dos compuestos, tales como dos polipéptidos. El enlazador puede estar comprendido por una sola molécula de unión o puede comprender una molécula de unión y una molécula espaciadora, con la intención de separar la molécula de unión y un compuesto por una distancia específica.

15 **[0035]** El término "anticuerpo multivalente" se refiere a un anticuerpo o anticuerpo manipulado que comprende más de un sitio de reconocimiento de antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo "bivalente" tiene dos sitios de reconocimiento de antígeno, mientras que un anticuerpo "tetraivalente" tiene cuatro sitios de reconocimiento de antígeno. Los términos "monoespecífico", "biespecífico", "triespecífico", "tetraespecífico", etc. se refieren al número de diferentes especificidades del sitio de reconocimiento de antígeno (en comparación con el número de sitios de reconocimiento de antígeno) presentes en un anticuerpo multivalente. Por ejemplo, los sitios de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo "monoespecífico" se unen todos al mismo epítipo. Un anticuerpo "biespecífico" tiene al menos un sitio de reconocimiento de antígeno que se une a un primer epítipo y al menos un sitio de reconocimiento de antígeno que se une a un segundo epítipo que es diferente del primer epítipo. Un anticuerpo "monoespecífico multivalente" tiene múltiples sitios de reconocimiento de antígeno que se unen todos al mismo epítipo. Un anticuerpo "biespecífico multivalente" tiene múltiples sitios de reconocimiento de antígeno, algunos de los cuales se unen a un primer epítipo y algunos de los cuales se unen a un segundo epítipo que es diferente del primer epítipo.

20 **[0036]** El término "ácido nucleico" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos, ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Los términos también deben entenderse que incluyen, como equivalentes, análogos de ARN o ADN fabricados de análogos de nucleótidos, y polinucleótidos monocatenarios (tales como, de sentido o antisentido) y de doble cadena.

25 **[0037]** "Proteína" (si es de una sola cadena), "polipéptido" y "péptido" se usan indistintamente en el presente documento cuando se refieren a un producto génico, por ejemplo, como puede codificarse por una secuencia de codificación. Cuando se hace referencia a "polipéptido" en el presente documento, una persona experta en la materia reconocerá que se puede utilizar una proteína en su lugar, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Una "proteína" también puede referirse a una asociación de uno o más polipéptidos. Por "producto génico" se entiende una molécula que se produce como resultado de la transcripción de un gen. Los productos génicos incluyen moléculas de ARN transcritas a partir de un gen, así como proteínas traducidas a partir de dichas transcripciones.

30 **[0038]** Los términos "fragmento de polipéptido" o "fragmento", cuando se usan en referencia a un polipéptido particular, se refieren a un polipéptido en el que los residuos de aminoácido se eliminan, en comparación con el propio polipéptido de referencia, pero donde la secuencia de aminoácidos restante es por lo general idéntica a la del polipéptido de referencia. Tales deleciones pueden producirse en el extremo amino-terminal o carboxi-terminal del polipéptido de referencia, o alternativamente ambos. Los fragmentos normalmente son de al menos aproximadamente 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud, al menos aproximadamente 14 aminoácidos de longitud, al menos aproximadamente 20, 30, 40 o 50 aminoácidos de longitud, al menos aproximadamente 75 aminoácidos de longitud, o al menos aproximadamente 100, 150, 200, 300, 500 o más aminoácidos de longitud. Un fragmento puede retener una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. En diversas realizaciones, un fragmento puede comprender una actividad enzimática y/o un sitio de interacción del polipéptido de referencia. En otra realización, un fragmento puede tener propiedades inmunogénicas.

35 **[0039]** Un "paciente" o "sujeto" o "huésped" se refiere tanto a un animal no humano o humano.

40 **[0040]** La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea aquí para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico, adecuados para usar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

45 **[0041]** Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga, diluyente, excipiente líquidos o sólidos, o material de encapsulación de disolvente, implicado en llevar o transportar el compuesto objeto desde un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa, y sus

derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua exento de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tamponadas de pH; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhidridos; y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

[0042] Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos relativamente no tóxicas.

[0043] El término "fragmento variable de cadena sencilla o scFv" se refiere a un fragmento Fv en el que el dominio de cadena pesada y el dominio de cadena ligera están unidos. Uno o más fragmentos scFv pueden estar unidos a otros fragmentos de anticuerpos (tales como el dominio constante de una cadena pesada o una cadena ligera) para formar construcciones de anticuerpos que tienen uno o más sitios de reconocimiento de antígeno.

[0044] Tal como se utiliza en el presente documento, una "proteína de estrés", también conocida como una "proteína de choque térmico" o "Hsp," es una proteína que está codificada por un gen de estrés, y por lo tanto se produce típicamente en cantidades significativamente mayores tras el contacto o la expresión del factor de estrés al organismo. El término "proteína de estrés" tal como se usa en el presente documento pretende que incluya tales partes y péptidos de una proteína de estrés. Un "gen de estrés", también conocido como "gen de choque térmico", tal como se usa en el presente documento, se refiere un gen que se activa o de otro modo se regula por incremento de forma detectable debido al contacto o expresión de un organismo (que contiene el gen) a un factor de estrés, como el choque térmico, hipoxia, privación de glucosa, sales de metales pesados, inhibidores del metabolismo energético y del transporte de electrones, y desnaturizantes de proteínas, o a ciertas ansamicinas de benzoquinona. Nover, L., Heat Shock Response, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1991). "Gen de estrés" también incluye genes homólogos dentro de las familias de genes de estrés conocidas, tales como ciertos genes dentro de las familias de genes de estrés Hsp70 y Hsp90, aún cuando dichos genes homólogos no son inducidos por sí mismos por un factor de estrés. Cada uno de los términos gen de estrés y proteína de estrés, tal como se utilizan en la presente memoria, pueden incluirse mutuamente, a menos que el contexto indique lo contrario.

[0045] "Tratar" una enfermedad en un sujeto o "tratamiento" de un sujeto que tiene una enfermedad se refiere a someter al sujeto a un tratamiento farmacéutico, por ejemplo, la administración de un fármaco, de tal manera que la extensión de la enfermedad se reduce o se evita. El tratamiento incluye (pero no se limita a) la administración de una composición, tal como una composición farmacéutica, y puede realizarse de forma profiláctica, o después de la iniciación de un suceso patológico.

[0046] El término "vacuna" se refiere a una sustancia que provoca una respuesta inmune y también confiere inmunidad protectora en un sujeto.

[0047] "Vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector preferido es un episoma, es decir, un ácido nucleico capaz de replicación extra-cromosómica. Los vectores preferidos son aquellos capaces de replicación y/o expresión autónoma de ácidos nucleicos al que están unidos. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente se denominan en este documento "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de "plásmidos" que se refieren generalmente a bucles de ADN circular de doble cadena, que en su forma de vector no están unidos al cromosoma. En la presente memoria, "plásmido" y "vector" se usan indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, como se entenderá por los expertos en la materia, la invención pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión que realizan funciones equivalentes y que serán conocidas posteriormente en la técnica.

1. Polipéptidos de fusión de proteína de estrés y anticuerpo manipulado

[0048] Se proporcionan polipéptidos de fusión que comprenden un anticuerpo manipuladodirigido y una proteína de choque térmico. El anticuerpo manipulado puede comprender, por ejemplo, al menos un scFv, al menos un fragmento Fab, al menos un fragmento Fv, etc. Puede ser monovalente o puede ser multivalente. En realizaciones en las que el anticuerpo manipulado es multivalente, puede ser bivalente, trivalente, tetravalente, etc. Los anticuerpos multivalentes pueden ser mono-específicos o multi-específicos, por ejemplo, bio-específicos, tri-específicos, tetra-específicos, etc. Los anticuerpos multivalentes pueden estar en cualquier forma, tal como un diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, etc. En ciertas realizaciones, el anticuerpo manipulado es un Tandab. La proteína de choque térmico puede comprender cualquier proteína de choque térmico. En ciertas realizaciones, la proteína de choque térmico comprende HSP70, por ejemplo, HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis* o HSP70 de *Mycobacterium bovis*.

Las secuencias de polipéptidos de longitud completa de HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis* y HSP70 de *Mycobacterium bovis* se representan en la figura 2 como SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente.

5 [0049] A continuación, se proporcionan más detalles sobre anticuerpos manipulados y proteínas de estrés que pueden incorporarse en los polipéptidos de fusión de la invención.

A. Anticuerpos manipulados

10 [0050] Los anticuerpos naturales son en sí mismos dímeros y, por tanto, bivalentes. Si dos células de hibridoma que producen anticuerpos diferentes se fusionan artificialmente, algunos de los anticuerpos producidos por el hibridoma híbrido están compuestos por dos monómeros con especificidades diferentes. Tales anticuerpos biespecíficos también pueden producirse mediante conjugación química de dos anticuerpos. Los anticuerpos naturales y sus derivados biespecíficos son relativamente grandes y caros de producir. Los dominios constantes de anticuerpos de ratón también son una causa importante de la respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA), lo que impide su amplio uso como agentes terapéuticos. También pueden dar lugar a efectos no deseados debido a su unión de receptores de Fc. Por estas razones, los inmunólogos moleculares se han concentrado en la producción de fragmentos Fab y Fv mucho más pequeños en microorganismos. Estos fragmentos más pequeños no sólo son mucho más fáciles de producir, sino que también son menos inmunogénicos, no tienen funciones efectoras y, debido a su tamaño relativamente pequeño, son más capaces de penetrar en tejidos y tumores. En el caso de los fragmentos Fab, los dominios constantes adyacentes a los dominios variables juegan un papel importante en la estabilización del dímero de cadena pesada y ligera. En consecuencia, aunque los anticuerpos manipulados de longitud completa o casi longitud completa pueden comprender los polipéptidos de fusión de la invención, se prefieren anticuerpos manipulados de un solo dominio más pequeños (que puedan ser multivalentes y multiespecíficos) para su uso en los polipéptidos de fusión.

25 [0051] El fragmento Fv es mucho menos estable, y por lo tanto se puede introducir un enlazador peptídico entre los dominios variables de cadena pesada y ligera para aumentar la estabilidad. Esta construcción se conoce como fragmento Fv(scFv) de cadena única. A veces se introduce un enlace disulfuro entre los dos dominios para una mayor estabilidad. Hasta el momento, los anticuerpos basados en scFv tetravalentes se han producido por fusión a dominios de polimerización adicionales, tales como el monómero de estreptavidina que forma tetrámeros, y a hélices alfa anfipáticas. Sin embargo, estos dominios adicionales pueden aumentar la inmunogenicidad de la molécula tetravalente.

35 [0052] Los anticuerpos bivalentes y biespecíficos se pueden construir usando sólo dominios variables de anticuerpos. Un procedimiento bastante eficiente y relativamente sencillo es hacer que la secuencia enlazadora entre los dominios V_H y V_L sea tan corta que no se pueden plegar y unirse entre sí. La reducción de la longitud del enlazador de 3-12 residuos evita la configuración monomérica de la molécula scFv y favorece los emparejamientos intermoleculares V_H-V_L con la formación de un dímero "diacuerpo" de scFv no covalente de 60 kDa (Holliger y otros., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448). El formato diacuerpo también se puede utilizar para la generación de anticuerpos biespecíficos recombinantes, que se obtienen mediante la asociación no covalente de dos productos de fusión de cadena simple, que consisten en el dominio V_H de un anticuerpo conectado por un enlazador corto al dominio V_L de otro anticuerpo. La reducción de la longitud del enlazador aún más por debajo de tres residuos puede dar lugar a la formación de trímeros ("triacuerpo", alrededor de 90 kDa) o tetrámeros ("tetracuerpo", alrededor de 120 kDa) (Le Gall y otros., 1999, FEBS Letters 453, 164-168). Para una revisión de anticuerpos manipulados, en particular fragmentos de dominio único, véase Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23: 1126-1136. Todos dichos anticuerpos manipulados pueden utilizarse en los polipéptidos de fusión proporcionados en este documento.

50 [0053] Otros anticuerpos multivalentes manipulados que pueden comprender la fusión de la invención. Los polipéptidos se describen en Lu, y otros., 2003, J. Immunol. Meth. 279: 219-232 (di-diacuerpos o anticuerpos biespecíficos tetravalentes); solicitud publicada de Estados Unidos 20050079170 (moléculas Fv multiméricas o "flexicuerpos"), y WO99/57150 y Kipriyanov, y otros., 1999, J. Mol. Biol. 293: 41-56 (diacuerpos en tándem, o "Tandabs").

55 [0054] Cualquiera de los anticuerpos multivalentes manipulados descritos anteriormente pueden desarrollarse por un experto en la materia utilizando técnicas rutinarias de ADN recombinante, por ejemplo tal como se describe en la Solicitud Internacional PCT No. PCT/US86/02269; Solicitud de Patente Europea No. 184.187; Solicitud de Patente Europea No. 171.496; Solicitud de Patente Europea No. 173.494; publicación Internacional PCT No. WO 86/01533; Patente de Estados Unidos. No. 4.816.567; Solicitud de Patente Europea No. 125.023; Better y otros. (1988) Science 240: 1041-1043; Liu y otros. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443; Liu y otros. (1987) J. Immunol. 139: 3521-3526; Sun y otros. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218; Nishimura y otros. (1987) Cancer Res. 47: 999-1005; Wood y otros. (1985) Nature 314: 446-449; Shaw y otros. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559; Morrison (1985) Science 229: 1202-1207; Oi y otros. (1986) Biotechniques 4: 214; Patente de Estados Unidos. N° 5.225.539; Jones y otros. (1986) Nature 321: 552-525; Verhoeyan y otros. (1988) Science 239: 1534; Beidler y otros. (1988) J. Immunol. 141: 4053-4060; y Winter y Milstein, Nature, 349, pág. 293-99 (1991)). Preferiblemente, los anticuerpos no humanos están "humanizados" mediante la unión del dominio de unión a

antígeno no humano con un dominio constante humano (por ejemplo Cabilly y otros, Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison y otros, Proc Natl Acad Sci USA, 81, pág. 6851-55 (1984)).

[0055] Los sitios de reconocimiento de antígeno o regiones variables enteras de los anticuerpos manipulados pueden derivar de uno o más anticuerpos parentales dirigidos contra cualquier antígeno de interés. Los anticuerpos parentales pueden incluir anticuerpos de origen natural o fragmentos de anticuerpos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos adaptados de anticuerpos naturales, anticuerpos construidos de novo utilizando secuencias de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos conocidos por ser específicas para un antígeno de interés. Las secuencias que pueden derivarse de anticuerpos parentales incluyen regiones variables de cadena pesada y/o ligera y/o CDR, las regiones andamio u otras partes de las mismas.

[0056] Los anticuerpos multivalentes, multiespecíficos pueden contener una cadena pesada que comprende dos o más regiones variables y/o una cadena ligera que comprende una o más regiones variables en las que al menos dos de las regiones variables reconocen diferentes epítotos en el mismo antígeno.

[0057] Los anticuerpos manipulados candidatos diseñados para su inclusión en los polipéptidos de fusión, o los propios polipéptidos de fusión, pueden cribarse por la actividad usando una variedad de ensayos conocidos. Por ejemplo, los ensayos de cribado para determinar la especificidad de unión son bien conocidos y realizados habitualmente en la técnica. Para una descripción exhaustiva de tales ensayos, véase Harlow y otros. (Eds.), Antibodies: A LABORATORY MANUAL; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, Nueva York, 1988, Capítulo 6.

[0058] Se proporcionan además procedimientos de selección de anticuerpos candidatos manipulados. Por ejemplo, los candidatos pueden derivarse de scFv humano y otras bibliotecas de anticuerpos. En consecuencia, se proporcionan bibliotecas de expresión bacteriana de anticuerpos. Una biblioteca comprende preferiblemente una pluralidad de bacterias en las que la expresión bacteriana, de promedio, tiene al menos una copia de un scFv o V_H o V_L; la biblioteca comprende una pluralidad de especies de scFv o V_H o V_L. En los casos preferidos, la expresión bacteriana, de promedio, comprende al menos 3, al menos 4, o al menos 5 copias de un scFv o V_H o V_L por bacteria. Las bibliotecas particularmente preferidas comprenden, de promedio, al menos aproximadamente 10⁶, preferiblemente al menos aproximadamente 10⁷, más preferiblemente al menos aproximadamente 10⁸ especies diferentes de scFv o V_H o V_L. En una realización más preferida, los anticuerpos son codificados por un ácido nucleico que es parte de vectores plásmido o fagémido. En todavía otro ejemplo, esta descripción proporciona una biblioteca de ácido nucleico codificante como las bibliotecas de anticuerpos de expresión bacteriana. La biblioteca de ácido nucleico comprende al menos aproximadamente 10⁶, más preferiblemente al menos aproximadamente 10⁷, y más preferiblemente al menos aproximadamente 10⁸ diferentes vectores plásmido o fagémido.

[0059] Las bacterias endocitadas pueden ser seleccionadas mediante dos procedimientos diferentes. Una forma es la lisis y placado de estas células de mamífero en medios bacterianos que contienen marcadores antibióticos apropiados, pero estos procedimientos son engorrosos y laboriosos cuando debe cribarse una gran biblioteca de >10⁸ variantes. Otro enfoque es expresar una proteína fluorescente, tal como GFP, en *E. coli*, y una vez endocitada, la célula de mamífero es fluorescente y se puede aislar por FACS. GFP es un marcador fluorescente novedoso para seleccionar bacterias que son endocitadas debido a las siguientes características: a) GFP es una proteína citoplasmática con baja toxicidad (Chalfie y otros, Science 263:.. 802, 1994); por lo tanto, la presencia de GFP debe tener efectos mínimos sobre la dinámica de la superficie celular bacteriana; b) GFP se puede sintetizar de forma continua, lo que minimiza el efecto de la dilución de la señal de fluorescencia durante la replicación bacteriana; y c) GFP es fácilmente fotografiada y cuantificada (Wang y Hazelrigg, Nature 369: 400, 1994). Además, la intensidad de fluorescencia de una sola célula de mamífero es directamente proporcional al número de bacterias asociadas con la misma (Valdivia y otros, Gene 173: 47, 1996). Por lo tanto, el análisis de citometría de flujo de las bacterias productoras de GFP asociadas con las células huésped proporciona una medición rápida y conveniente de la adherencia e invasión bacteriana. Se ha demostrado que a) el gen *gfp* se expresa y se produce una GFP fluorescente funcional en diversos sistemas bacterianos, tales como *E. coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, y *Mycobacterium marinum*, b) producción de GFP no alteró la interacción de tres patógenos con sus respectivas células huésped, c) los patógenos bacterianos intracelulares que producen GFP se pueden reflejar en imágenes en asociación con células y tejidos vivos, y d) la producción de GFP puede detectarse por citometría de flujo y se puede utilizar para medir el grado de asociación bacterianos con células de mamíferos (Valdivia et. al. supra).

[0060] Es posible seleccionar directamente la internalización de los candidatos de anticuerpos de grandes bibliotecas de expresión bacteriana no inmunes o inmunes mediante la recuperación de bacterias internalizadas del interior de células de mamíferos después de la endocitosis mediada por receptor. Por lo tanto, en un caso, esta descripción proporciona procedimientos de selección de polipéptido o dominios de anticuerpo que se internalizan en células diana específicas. Los procedimientos implican a) poner en contacto una o más de células diana con uno o más miembros de una biblioteca de expresión bacteriana; b) cultivar las células diana en condiciones donde los miembros de la biblioteca de expresión pueden ser internalizados; y c) identificar los miembros internalizados de la biblioteca de expresión bacteriana si los miembros de la biblioteca de expresión bacteriana están internalizados en una o más de las células diana. Preferiblemente, los procedimientos implican adicionalmente poner en contacto

miembros de la biblioteca de expresión bacteriana con células de líneas celulares sustractivas; y a continuación lavar las células diana para eliminar las células de una línea celular sustractiva; y eliminar los miembros de la biblioteca de expresión bacteriana que no se unen específicamente unido o se unen débilmente a las células diana. En un caso preferido, la biblioteca de expresión bacteriana es una biblioteca de expresión bacteriana de anticuerpos, más preferiblemente una biblioteca de expresión bacteriana de anticuerpos que expresa anticuerpos de cadena sencilla (scFv), o los dominios variables de las cadenas ligera (VL) o pesada (VH).

[0061] En un caso preferido, la etapa de *identificación* comprende recuperar la bacteria internalizada y repetir las etapas del proceso de nuevo para seleccionar adicionalmente los grupos de unión de internalización. En un caso, la etapa de *recuperación* implica la lisis de las células diana para liberar la bacteria internalizada, y el subcultivo de la bacteria para producir bacterias para una posterior ronda de selección. La etapa de recuperación puede implicar la recuperación de la bacteria infecciosa, y/o la recuperación de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo expresado en bacteria y/o la selección de bacterias que expresan un marcador seleccionable. La etapa de identificación puede implicar la detección de la expresión de un gen informador, la detección de la presencia o cantidad de un ácido nucleico particular, o la selección de la bacteria a través de un marcador seleccionable. La etapa de identificación también puede implicar la clasificación de células de mamífero con bacterias internalizadas mediante FACS. En procedimientos preferidos, las células de una línea celular sustractiva están presentes en exceso, al menos 2 veces más que las células diana. En los procedimientos preferidos, la línea celular diana se cultiva adherente a una placa de cultivo de tejidos y se coincide con la línea celular sustractiva en suspensión en un único matraz de cultivo. En procedimientos particularmente preferidos, el contacto con una línea celular sustractiva se realiza a una temperatura (por ejemplo, a 4°C) más baja que las condiciones de cultivo de internalización (por ejemplo, a 37°C). En casos particularmente preferidos, las bacterias expresan un marcador seleccionable y/o un gen informador. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen, pero no se limitan a, los genes (o ADNc) que codifica proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP), y un gen o ADNc cromogénico (por ejemplo, *beta* lactamasa, luciferasa y *beta* galactosidasa). En ciertos casos, las células diana pueden incluir células que sobreexpresan un receptor particular, miembros de una biblioteca de expresión de ADNc, células que sobreexpresan un receptor de quimioquinas, células de una línea celular transformada, células transformadas con un gen o ADNc que codifica un receptor diana de superficie específico. Las líneas celulares sustractivas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, fibroblastos humanos normales, células de mama humanas normales, células pancreáticas, y cardiomiocitos.

[0062] Los receptores de superficie celular implicados en endocitosis mediada por receptor se pueden identificar de novo (Gao y otros, J. Immunol Meth 274: 185, 2003). En la primera etapa, a través de un enfoque de sustracción, los scFv de internalización específicos de tumor se aíslan mediante la expresión de manera secuencial de la biblioteca de scFv a diversas células humanas y, finalmente, al tipo de célula deseado. Como próxima etapa, los scFv seleccionados se utilizan como sondas para la posterior identificación de sus receptores afines por inmunoprecipitación, espectrometría de masas y búsqueda en base de datos. En base a estos procedimientos, se seleccionaron scFv específicos al receptor de la transferrina en las células tumorales de próstata, y $\alpha_3\beta_1$ integrina presente en células de adenocarcinoma de páncreas (Gao et. al., supra). Este enfoque sustractivo se ha usado con éxito para seleccionar los receptores de internalización en mama humana y líneas celulares de carcinoma de páncreas (Fransson y otros, Cancer Lett 208: 235, 2004), así como en células de carcinoma de próstata (Liu y otros, Cancer Res. 64: 704, 2004).

[0063] Por consiguiente, los procedimientos de esta descripción pueden también ser utilizados para identificar receptores de internalización. La identificación de un receptor endocitante presente sólo en hepatocitos (células del hígado) y no en cualquier otro tipo de células es un ejemplo de esto. Se utilizan procedimientos que generalmente implican cualquiera de los procedimientos para la identificación de anticuerpos o polipéptidos de internalización identificados para sondear las células diana originales, o células diferentes. A medida que se unen los anticuerpos o polipéptidos de internalización, permiten el aislamiento de la célula que lleva el receptor de la internalización y el aislamiento del receptor y/o el propio epítipo del receptor. Por lo tanto, en un caso, los procedimientos implican a) poner en contacto una o más de las células diana con uno o más miembros de una biblioteca de expresión bacteriana, b) opcionalmente, pero preferiblemente, poner en contacto los miembros de la biblioteca de expresión bacteriana con células de una línea celular sustractiva, c) opcionalmente, pero preferiblemente, lavar las células diana para eliminar dichas células de una línea celular sustractiva y eliminar los miembros de la biblioteca de expresión bacteriana que están unidos no específicamente o están unidos débilmente a dichas células diana, d) cultivar las células bajo condiciones en las que los miembros de dicha biblioteca de expresión bacteriana se pueden internalizar si se unen a un marcador de la internalización, e) identificar los miembros internalizados de la biblioteca de expresión bacteriana si los miembros de la biblioteca de expresión bacteriana están internalizados en una o más de dichas células diana, f) poner en contacto las mismas o diferentes células diana con los miembros internalizados identificados de la etapa (e) o los miembros propagados de los mismos, mediante lo cual los miembros se unen a la superficie de dichas células diana. El procedimiento puede implicar además aislar un componente de las mismas o diferentes células diana a la que se unen los miembros. En algunos procedimientos, la etapa de "identificación" implica recuperar bacterias internalizadas y repetir las etapas (a-e) para seleccionar posteriormente los receptores de internalización. Las etapas de puesta en contacto, lavado, cultivo, e identificación se realizan preferiblemente como se describe en el presente documento, y las líneas de células sustractivas incluyen cardiomiocitos, células de mama normales y cancerosas.

[0064] Se pueden utilizar otras tecnologías de expresión de proteínas en los procedimientos descritos anteriormente. La modificación de tales procedimientos para incorporar otras tecnologías de expresión es bien conocida para un experto en la materia. A continuación se proporciona una revisión de las tecnologías de expresión de proteínas de ejemplo que se puede usar en los presentes procedimientos.

5

Tecnología de expresión de proteínas:

[0065] La manipulación de anticuerpos desempeña un papel crítico en el desarrollo de terapias de anticuerpos con propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas superiores (Burks y otros, Proc Natl Acad Sci USA 94: 412, 1997; patente de Estados Unidos: 6.180.341). La evolución dirigida implica, primero, la generación de una biblioteca recombinante de clones que expresan la proteína con secuencias al azar utilizando técnicas de biología molecular, y segundo, el uso de tecnologías de cribado para el aislamiento de variantes de proteínas que presentan la actividad más aumentada. El cribado de grandes bibliotecas requiere un enlace físico entre un gen, la proteína que codifica, y la función deseada. Tal relación puede establecerse mediante el uso de una variedad de tecnologías de expresión *in vivo* que han demostrado ser de gran valor (Wittrup, Nature Biotechnol 18: 1039, 2000; Hayhurst y Georgiou, Curr Opin Chem Biol. 5: 683, 2001).

10

15

[0066] Las tecnologías de expresión de proteínas representan colectivamente una de las herramientas más potentes para la manipulación de proteínas (Olsen y otros, Curr Opin Biotechnol 11: 331, 2000). Para fines de expresión, una proteína se fusiona con el extremo C o N de una secuencia de polipéptido que se dirige a la quimera resultante sobre las superficies de las partículas biológicas, tales como virus, bacterias, y levadura. Las bibliotecas se criban típicamente para la unión a ligando mediante una serie de ciclos de adsorción-desorción por un proceso llamado "panning". El "panning" ha sido utilizado con éxito para cribar bibliotecas altamente complejas producidas por clonación del repertorio de anticuerpos de mamíferos y su expresión en fago (hasta 10^{11} clones). Para bibliotecas algo menos diversas (hasta 10^9 clones), la expresión en bacterias o levaduras junto con la citometría de flujo es una herramienta potente para el descubrimiento de proteínas con afinidades de unión a ligando excepcionalmente altas (Chen et. Al., Nature Biotechnol. 19: 537, 2001). Aunque la importancia de las tecnologías de expresión para la manipulación de proteínas es indiscutible, la necesidad de anclar el polipéptido diana sobre la superficie de una partícula biológica impone una serie de limitaciones que pueden reducir significativamente la diversidad de la biblioteca en relación a la totalidad de proteínas que se pueden producir en una forma soluble dentro de la célula. En primer lugar, la expresión de la proteína requiere que la proteína de interés se exprese como una fusión C- o N-terminal, un proceso que puede afectar negativamente a la función y/o estabilidad de las proteínas. En segundo lugar, la expresión de la proteína está sujeta a limitaciones biológicas asociadas con la exportación y presentación de proteínas, lo que puede comprometer la viabilidad del virus o la célula. En tercer lugar, la expresión puede introducir artefactos del cribado, tales como efectos de avidéz en fagos (O'Connell y otros, J. Mol Biol 321: 49, 2002).

20

25

30

35

[0067] Los anticuerpos manipulados candidatos se pueden seleccionar a través de una combinación de tecnologías de expresión de proteínas, en particular la tecnología de expresión bacteriana, que implica la construcción de bibliotecas de expresión periplásmica anclada (APEX) en el periplasma bacteriano, así como bibliotecas expresadas en el citoplasma bacteriano, de manera que los anticuerpos manipulados candidatos están correctamente plegados y son funcionalmente activos en condiciones fisiológicamente reductoras del citosol.

40

[0068] Un enfoque ha sido el aislamiento de scFv a partir de bibliotecas de expresión en fagos, seguido por el cribado de un gran número de clones para la expresión en *E. coli* o función en células de mamífero (Lecerf et. Al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 4764, 2001; Gennari y otros, J. Mol Biol 335: 193, 2004; Emadi y otros., Biochemistry 43: 2871, 2004). Otros han utilizado el sistema de dos híbridos para aislar anticuerpos manipulados (Tes y otros, J. Mol Biol 317: 85, 2002; Tanaka y otros, EMBO J. 22: 1025, 2003), pero esto no permite el ajuste fino de las propiedades biofísicas de los anticuerpos, tales como la afinidad y la expresión.

45

50

A: Biblioteca de expresión en fagos:

[0069] La expresión en el bacteriófago M13 es el procedimiento de cribado de bibliotecas de proteínas más ampliamente utilizado y más antiguo (Marks y otros, J. Mol Biol 222: 581, 1991; Marks y otros, J. Biol. Chem. 267: 16007, 1992; Rodi y Makowski, Curr Opin Biotechnol 10:87, 1999). Las bibliotecas de anticuerpos en fagos se han convertido en un recurso importante para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos (Bradbury y Marks, J. Immunol Meth 290: 29, 2004). Las grandes bibliotecas no inmunes sirven como un recurso en único paso para la rápida generación de anticuerpos monoclonales humanos (HuMAB) hasta una amplia gama de antígenos propios y no propios, incluidos los receptores del factor de crecimiento del tumor (Li et. Al., Cancer Gene Ther. 8: 555, 2001; Liu y otros, Cancer Res 64: 704, 2004). La mayoría de los MAb aislados a partir de bibliotecas combinatorias expresadas en fagos han sido seleccionados utilizando antígenos purificados o péptidos inmovilizados en superficies artificiales. Este enfoque puede seleccionar MAb que no reconocen la proteína nativa en un contexto fisiológico, sobre todo con los receptores de la superficie celular de masa molecular grande. Se han hecho intentos para seleccionar un antígeno en conformación nativa ya sea utilizando lisados de células (Parren y otros, J. Virol 70: 9046, 1996; Sanna y otros, Proc Natl Acad Sci USA. 92: 6439, 1995; Sawyer y otros, J. Immunol. Meth. 204: 193, 1997) o células vivas (Andersen y otros, Proc Natl Acad Sci USA. 93: 1820, 1996; Osbourn y otros., Immunotechnol. 3: 293, 1998). Debido a la heterogeneidad del material de partida, estos enfoques requieren protocolos elaborados que incluyen etapas

55

60

65

sustractivas para evitar la selección de anticuerpos irrelevantes. Las pocas selecciones exitosas realizadas en el material heterogéneo se realizaron generalmente usando pequeñas bibliotecas de fuentes inmunizadas. El uso de bibliotecas inmunizadas limita el espectro de especificidades antigénicas que potencialmente se pueden obtener de la misma biblioteca y típicamente producen anticuerpos murinos. Sólo hay tres informes de selección con éxito en células utilizando grandes bibliotecas no inmunes (de Kruif y otros, Proc Natl Acad Sci USA. 92: 3938, 1995; Marks y otros, Biotechnology 11: 1145, 1993; Vaughan y otros, Nature Biotechnol 14: 309, 1996).

[0070] La etapa de limitación de la selección de ligantes de grandes bibliotecas sin tratar mediante “panning” celular parece ser la unión de base relativamente alta de fago no específico y la unión relativamente baja de fago específico (Becerril et. Al., Biochem. Biophys. Res. Comm 255: 386, 1999; Pereira y otros, J. Immunol Meth 203: 11, 1997; Watters y otros, Immunolechnol 3:21, 1997). La baja unión del fago específico está parcialmente relacionada con la baja concentración de un fago de unión determinado en la preparación policlonal (aproximadamente $1,6 \times 10^{-17}$ M para un solo miembro de una biblioteca de 10^9 en una preparación de fagos de 1×10^{13} partículas/ml). La baja concentración limita al mismo tiempo la eficiencia de la sustracción de ligantes comunes y el enriquecimiento de ligantes específicos. Para superar esta limitación, se recurrió aprovechar la biología de receptores de superficie de células normales. Muchos receptores experimentan endocitosis después de la unión del ligando. Se planteó la hipótesis que las proporciones de enriquecimiento de ligantes específicos se podrían aumentar significativamente mediante la recuperación de anticuerpos en fagos endocitados del citosol después de la eliminación rigurosa de fagos no específicos de la superficie celular (Poul y otros, J. Mol Biol 301: 1149, 2000).

B: Biblioteca de expresión en superficie de levadura:

[0071] La expresión en superficie de levadura (YSD; Boder y Wittrup, Nature Biotechnol. 15: 553, 1997) es otra herramienta probada para la manipulación de proteínas. En YSD, la proteína de interés se expresa como una fusión con una proteína de apareamiento de levadura, Aga2p, que se dirige a la pared celular de la levadura. Una vez expresada en la superficie de la levadura, las propiedades de la proteína, tales como la estabilidad y la afinidad, se pueden medir cuantitativamente usando reactivos marcados fluorescentemente y citometría de flujo. Además, las bibliotecas de mutantes se pueden clasificar para las propiedades deseadas utilizando la clasificación de células activadas fluorescentes (FACS). YSD se ha aplicado con éxito a varias facetas de la manipulación de anticuerpos: aislamiento de nuevos Ab contra antígenos específicos de una biblioteca de HuMAb no inmune (Feldhaus y otros., Nature, Biotechnol 21: 163, 2003); maduración de afinidad que da lugar al anticuerpo de afinidad más elevada notificada hasta la fecha (Boder y otros, Proc Natl Acad Sci USA. 97: 10 701, 2000); y la estabilidad y optimización de expresión extracelular (Shusta y otros, Nature Biotechnol. 18: 754, 2000). Además, YSD es una herramienta útil para el análisis del nivel de dominio de un sitio de unión a anticuerpo (parátipo), y la manipulación de anticuerpos funcionales (Colby y otros, J. Mol Biol 342: 901, 2004). En un intento de identificar un fragmento de anticuerpo mínimo con expresión y función intracelular superior, se utilizó YSD para manipular un scFv intracelularmente no funcional en un anticuerpo con V_L de dominio único funcional a través de la maduración de afinidad y el análisis de sitio de unión.

[0072] A pesar de todas estas ventajas, pueden aparecer potenciales limitaciones de la plataforma de YSD para su aplicación en la manipulación de anticuerpos a partir de la diferencia en el medio redox en la superficie celular en comparación con el citoplasma, donde no se forman de manera estable enlaces disulfuro. Los MAb contienen enlaces disulfuro entre dominios altamente conservados en los dominios V_H y V_L que mantienen los residuos del andamio que forman una lámina β en una conformación rígida. La alteración de estos enlaces disulfuro perturba la estructura del dominio, lo que reduce la estabilidad de la proteína (Ramm y otros, J. Mol Biol 290: 535, 1999). Se supone que esto es responsable de la disparidad entre los niveles de expresión en la superficie celular y los niveles de expresión citoplásmica para el scFv. Además, la expresión de proteínas de fusión (por ejemplo, scFv) es generalmente dominante en cis; es decir, la expresión de la proteína de fusión es sólo tan buena como la expresión del miembro con la estabilidad más baja, por lo que una explicación alternativa de la mejora en la expresión observada cuando el V_H se elimina es que el dominio V_H de 2.4.3 fue significativamente menos estable que el V_L en condiciones reductoras (Colby et. al., supra).

[0073] Una cuestión importante con cualquier tecnología de cribado de bibliotecas (tecnologías de expresión en fagos y levadura) es la capacidad de expresar clones aislados en un nivel alto. Los formatos de expresión existentes implican la fusión a grandes secuencias de anclaje, lo que puede influir en las características de expresión de las proteínas expresadas. Por esta razón, los scFv que se expresan bien como fusiones en fago, levadura o bacterias (en particular, las bibliotecas de proteínas expresadas en la membrana externa) pueden no ser necesariamente susceptibles de alta expresión en forma soluble como proteínas de no fusión (Hayhurst et. Al., J. Immunol Meth 276: 185, 2003). Por el contrario, la secuencia corta (6 aminoácidos) requerida para la unión N-terminal de las proteínas en la membrana citoplásmica en la expresión APEX es improbable que afecte a las características de expresión de la fusión. Consistente con esta hipótesis, los tres clones de afinidad mejorada a la toxina de AP de ántrax aislada por APEX mostraron excelentes características de expresión soluble a pesar de tener numerosas sustituciones de aminoácidos, lo que sugiere que el aislamiento de clones que se pueden producir fácilmente en forma soluble en bacterias a gran escala puede ser una característica intrínseca de las selecciones APEX (Harvey y otros, Proc Natl Acad Sci USA 101: 9193, 2004).

C: Biblioteca de expresión bacteriana APEX:

[0074] Se ha desarrollado un procedimiento basado en citometría de flujo utilizando la expresión bacteriana para la selección eficiente de proteínas de unión a ligandos de alta afinidad, y específicamente scFv, de bibliotecas combinatorias. APEX se basa en el anclaje de proteínas a la cara periplásmica de la membrana interna, seguido por la ruptura de la membrana externa antes de la incubación con antígeno marcado con fluorescencia y clasificación FC (Harvey et. Al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 9193, 2004). En APEX, las proteínas se expresan en el periplasma mediante la unión a la membrana interna de *E. coli*. Después de la permeabilización química/enzimática de la membrana externa bacteriana, las células de *E. coli* que expresan anticuerpos scFv anclados pueden marcarse específicamente con antígenos fluorescentes, que varían en tamaño de hasta al menos 240 kDa, y analizarse por FC. Otra ventaja es que las fusiones entre GFP y el antígeno se pueden expresar de forma endógena y capturarse por scFv anclados de forma periplásmica. De este modo, después de una etapa de lavado, las células que expresan tanto el antígeno fluorescente como un scFv anclado por APEX son altamente fluorescentes y pueden clasificarse fácilmente a partir de células que expresan sólo un scFv o la fusión GFP-antígeno.

[0075] Con las tasas de clasificación de > 400 millones de células por hora, las máquinas de FC comerciales se pueden utilizar para cribar bibliotecas del tamaño accesible dentro de las limitaciones de la eficiencia de transformación microbiana. Además, la FC multiparamétrica puede proporcionar información valiosa con respecto a la función de cada clon de la biblioteca en tiempo real, lo que ayuda a guiar el proceso de construcción de la biblioteca y optimizar las condiciones de clasificación (Daugherty, PS et. Al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 2029, 2000). En particular, *E. coli* ofrece una expresión fácil de la proteína recombinante y eficiencias de transformación de ADN elevadas que permiten la producción eficiente de una biblioteca grande y una mayor cobertura del espacio de secuencias de la biblioteca de proteínas.

[0076] La expresión APEX ofrece varias ventajas sobre la expresión periplásmica bacteriana previamente desarrollada con el procedimiento de cribado citométrico, llamado PECS (Chen y otros, Nature Biotechnol 19: 537, 2001), así como las estrategias de expresión en superficie, tales como las tecnologías de expresión en fago y levadura: (i) APEX es un sistema basado en *E. coli* y por lo tanto proporciona una ruta fácil para la creación de grandes bibliotecas mediante transformación y expresión de proteína preparativa de anticuerpos aislados; (ii) mediante el uso de un anclaje graso acilado para retener la proteína en la membrana interna, una fusión tan corta como de 6 aminoácidos es todo lo que se requiere para su expresión. Los corta de la fusión es poco probable que influya en las características de afinidad o de expresión de las proteínas aisladas; (iii) la membrana interna carece de moléculas, tales como LPS u otros hidratos de carbono complejos que pueden interferir estéricamente con el antígeno grande que se une a polipéptidos expresados; (iv) la fusión sólo debe atravesar una membrana antes de expresarse, y por lo tanto pueden eludirse las limitaciones biosintéticas que pudieran restringir la exportación de ciertas secuencias a la superficie de la levadura o la superficie bacteriana; (v) la expresión se lleva a cabo mediante el uso de fusión a los extremos N- o C-terminal, (vi) APEX se puede utilizar directamente para proteínas expresadas a partir de vectores de expresión en fagos ampliamente usados. Finalmente, (vii) APEX proporciona un medio para la expresión simultánea de antígeno fluorescente y anticuerpos dentro de la misma célula. Esto es particularmente importante para antígenos peptídicos, y evita los procesos que consumen mucho tiempo para la síntesis, purificación y conjugación de cantidades preparativas de sonda, tal como se requiere cuando se incuba el antígeno fluorescente con la biblioteca. APEX se puede utilizar para la detección de antígenos que van desde pequeñas moléculas (<1 kDa) a conjugados de ficoeritrina (240 kDa), y posiblemente antígenos mucho más grandes.

[0077] El procedimiento de expresión APEX se puede utilizar para derivar anticuerpos de un solo dominio (DAb) de un scFv cuando la energía de unión del scFv es aportado predominantemente por uno de los dos dominios.

B. Dominios HSP70

[0078] Cualquier proteína de choque térmico (Hsp) adecuada se puede usar en los polipéptidos de fusión de la presente invención. Por ejemplo, se pueden utilizar Hsp60 y/o Hsp70. En cuanto a proteínas de estrés en general, las células responden a un factor de estrés (normalmente tratamiento de choque térmico) mediante el aumento de la expresión de un grupo de genes comúnmente referidos como genes de estrés o de choque térmico. El tratamiento de choque térmico implica la exposición de células u organismos a temperaturas que son de uno a varios grados centígrados por encima de la temperatura a la que las células están adaptadas. En coordinación con la inducción de tales genes, los niveles de proteínas de estrés correspondientes aumentan en las células estresadas.

[0079] En las bacterias, las proteínas de estrés predominantes son proteínas con tamaños moleculares de aproximadamente 70 y 60 kDa, respectivamente, que se refieren comúnmente como Hsp70 y Hsp60, respectivamente. Estas y otras proteínas de estrés específicas y los genes que las codifican se discuten más adelante. En las bacterias, Hsp70 y Hsp60 representan típicamente alrededor de 1-3% de proteína celular basado en el patrón de tinción utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio y la tinción con azul de Coomassie, pero se acumulan a niveles tan altos como del 25% en condiciones de estrés. Las proteínas de estrés parecen participar en importantes procesos celulares, tales como la síntesis de proteínas, tráfico intracelular, y el montaje y desmontaje de complejos de proteínas. Parece que las cantidades aumentadas de proteínas de estrés sintetizadas durante el estrés sirven principalmente para minimizar las consecuencias del no plegamiento de

proteína inducido. En efecto, la preexpresión de las células a condiciones ligeramente estresantes que inducen la síntesis de proteínas de estrés proporciona protección a las células frente a los efectos perjudiciales de un posterior estrés más extremo.

5 [0080] Las proteínas de estrés principales parecen expresarse en cada tipo de organismo y tejido examinado hasta la fecha. También, parece que las proteínas de estrés representan el grupo de proteínas identificadas hasta la fecha más altamente conservadas. Por ejemplo, cuando se comparan proteínas de estrés en organismos muy diversos, Hsp90 y Hsp70 exhiben 50% o más de identidad a nivel de aminoácidos y comparten muchas similitudes en posiciones no idénticas. Se observa que existen niveles similares o superiores de homología entre los diferentes miembros de una familia de proteínas de estrés particular dentro de las especies.

15 [0081] Las proteínas de estrés, particularmente Hsp70, Hsp60, Hsp20-30 y HSP 10, se encuentran entre los principales determinantes reconocidos por el sistema inmune del huésped en la respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*. Young, R.A. y Elliott, T.J, Stress proteins, infection, and immune surveillance, Cell 50: 5-8 (1989). Además, algunas células T artrtrógenas de rata reconocen epítomos de Hsp60. Van Eden, W. y otros, Nature 331: 171-173 (1988). Sin embargo, individuos, incluyendo individuos sanos, sin historial de infección micobacteriana o enfermedad autoinmune también llevan células T que reconocen epítomos de Hsp60 tanto bacterianos como humanos; una fracción considerable de células T en individuos sanos que se caracterizan por la expresión del receptor de células T gamma-delta reconoce proteínas de estrés propias como exógenas. O'Brien, R. y otros, Cell 57: 664-674 (1989). Por lo tanto, los individuos, incluso los individuos sanos, poseen poblaciones de células T que reconocen epítomos de proteínas de estrés propias y exógenas.

25 [0082] Este sistema de reconocimiento de epítomos de proteínas de estrés presumiblemente constituye un "sistema de defensa temprana" contra organismos invasores. Murray, P.J y Young, R.A, J. Bacteriol 174: 4193-6 (1992). El sistema puede mantenerse mediante la estimulación frecuente por bacterias y virus. Como se discutió antes, los individuos sanos tienen poblaciones de células T que reconocen proteínas de estrés propias. Por lo tanto, la presencia de células T autorreactivas es compatible con la salud normal y no causa enfermedad autoinmune; esto demuestra la seguridad de las proteínas de estrés dentro de un individuo. La seguridad de las proteínas de estrés está, además, demostrada por el éxito y seguridad relativa de vacunas de BCG (bacilo de Calmette Guerin, una cepa de *Mycobacterium bovis*), que inducen una respuesta inmune contra las proteínas de estrés que es también protectora frente a *Mycobacterium tuberculosis*.

35 [0083] Las familias de genes y proteínas de estrés para su uso en los polipéptidos de fusión son los bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, Hsp 100-200, Hsp100, Hsp90, Lon, Hsp70, Hsp60, TF55, Hsp40, FKBP, ciclofilinas, Hsp20-30, ClpP, GrpE, Hsp10, ubiquitina, calnexina e isomerasas de proteína disulfuro. Macario, A.J.L., Cold Spring Harbor Laboratory Res. 25: 59-70, 1995; Parsell, D.A & Lindquist, S. Ann. Rev. Genet. 27: 437-496 (1993); Patente de Estados Unidos No. 5.232.833 (Sanders y otros.). Un grupo particular de proteínas de estrés incluye Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp20-30, más preferiblemente Hsp70 y Hsp60.

40 [0084] Los ejemplos de Hsp100-200 incluyen Grp170 (para la proteína regulada por glucosa). Grp170 reside en el lumen del ER, en el compartimiento de pre-Golgi, y puede jugar un papel en el plegamiento y ensamblaje de inmunoglobulinas.

45 [0085] Los ejemplos de Hsp100 incluyen Hsp110 de mamífero, Hsp104 de levadura, ClpA, ClpB, ClpC, ClpX y ClpY. Hsp104 de levadura y ClpA de *E. coli* forman partículas hexaméricas y ClpB de *E. coli* partículas tetraméricas, cuyo ensamblaje parece requerir de unión a nucleótidos de adenina. La proteasa Clp proporciona un heterooligómero de 750 kDa compuesto por ClpP (una subunidad proteolítica) y ClpA. ClpB-Y está estructuralmente relacionado con ClpA, aunque a diferencia de ClpA no parece formar complejos con ClpP.

50 [0086] Los ejemplos de Hsp90 incluyen Hsp90 en *E. coli*, Hsp83 y Hsc83 de levadura, y Hsp90alpha, Hsp90beta y Grp94 en seres humanos. Hsp90 es un grupo de proteínas, cuyas proteínas son típicamente moléculas reguladoras celulares, tales como receptores de hormonas esteroideas (por ejemplo, receptores de glucocorticoides, estrógenos, progesterona, y testosterona), factores de transcripción y proteínas quinasas que juegan un papel en los mecanismos de transducción de señales. Las proteínas Hsp90 también participan en la formación de complejos de proteínas grandes y abundantes que incluyen otras proteínas de estrés.

55 [0087] Lon es una proteína tetramérica que funciona como una proteasa dependiente de ATP que degrada las proteínas no nativas en *E. coli*.

60 [0088] Los ejemplos de Hsp70 incluyen Hsp72 y Hsc73 de células de mamífero, DnaK de bacterias, particularmente micobacterias tales como *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, y *Mycobacterium bovis* (tales como el bacilo de Calmette Guerin: denominado en este documento como Hsp71), DnaK de *Escherichia coli*, levaduras, y otros procariotas, y BiP y GRP78. Hsp70 es capaz de unirse específicamente a ATP así como polipéptidos y péptidos no plegados, participando así en el plegamiento y desplegamiento de proteínas, así como en el ensamblaje y desensamblaje de los complejos de proteínas.

65

- 5 [0089] Los ejemplos de Hsp60 incluyen Hsp65 de micobacterias. La Hsp60 bacteriana también se conoce comúnmente como GroEL, tal como GroEL de *E. coli*. Hsp60 forma grandes complejos homooligoméricos y parece jugar un papel clave en el plegamiento de proteínas. Homólogos de Hsp60 están presentes en la mitocondria eucariota y los cloroplastos.
- 10 [0090] Los ejemplos de TF55 incluyen Tcpl, TRiC y termosoma. Las proteínas se producen normalmente en el citoplasma de eucariotas y algunas arqueobacterias, y forman anillos con múltiples miembros que promueven el plegado de proteínas. También son débilmente homólogos a Hsp60.
- 15 [0091] Los ejemplos de Hsp40 incluyen DnaJ de procariotas, tales como *E. coli* y micobacterias y HSJI, HDJI y Hsp40. Hsp40 desempeña un papel como chaperona molecular en el plegado de proteínas, termotolerancia y replicación del ADN, entre otras actividades celulares.
- [0092] Ejemplos de FKBP incluyen FKBP12, FKBP13, FKBP25, y FKBP59, Fprl y Nepl. Las proteínas tienen típicamente actividad peptidil-prolil isomerasa e interactúan con inmunosupresores, tales como FK506 y rapamicina. Las proteínas se encuentran típicamente en el citoplasma y el retículo endoplásmico.
- 20 [0093] Los ejemplos de ciclofilina incluyen ciclofilinas A, B y C. Las proteínas tienen actividad peptidil-prolil isomerasa e interactúan con el inmunosupresor ciclosporina A. La proteína ciclosporina A se une a calcineurina (una proteína fosfatasa).
- 25 [0094] Hsp20-30 también se denomina como Hsp pequeña. Hsp20-30 se encuentra habitualmente en grandes complejos homooligoméricos o, posiblemente, también complejos heterooligoméricos cuando un organismo o tipo de célula expresa varios tipos diferentes de Hsp pequeñas. Hsp20-30 interactúa con las estructuras citoesqueléticas y puede jugar un papel regulador en la polimerización/despolimerización de la actina. Hsp20-30 se fosforila rápidamente tras el estrés o la expresión de las células en reposo a factores de crecimiento. Los homólogos de Hsp20-30 incluyen alfa-cristalina.
- 30 [0095] ClpP es una proteasa de *E. coli* implicada en la degradación de proteínas anormales. Los homólogos de ClpP se encuentran en cloroplastos. ClpP forma un complejo heterooligomérico con ClpA.
- 35 [0096] GrpE es una proteína de *E. coli* de aproximadamente 20 kDa que está implicada tanto en el rescate de las proteínas dañadas por estrés como en la degradación de las proteínas dañadas. GrpE juega un papel en la regulación de la expresión del gen de estrés en *E. coli*.
- 40 [0097] Ejemplos de Hsp10 incluyen GroES y Cpn10. Hsp10 se encuentra típicamente en *E. coli* y en mitocondrias y cloroplastos de células eucariotas. Hsp10 forma un anillo de siete miembros que se asocia con oligómeros de Hsp60. Hsp10 también está involucrada en el plegamiento de proteínas.
- 45 [0098] Se ha encontrado que la ubiquitina une proteínas en coordinación con la eliminación proteolítica de las proteínas por proteasas citosólicas dependientes de ATP.
- [0099] En realizaciones particulares, las proteínas de choque térmico de la presente invención se obtienen de enterobacterias, micobacterias (en particular, *M. leprae*, *M. tuberculosis*, *M. vaccae*, *M. smegmatis* y *M. bovis*), *E. coli*, levadura, *Drosophila*, vertebrados, aves, pollos, mamíferos, ratas, ratones, primates, o seres humanos.
- 50 [0100] En realizaciones particulares, por ejemplo, en los casos que implican conjugados químicos entre una proteína de choque térmico y un anticuerpo manipulado, las proteínas de choque térmico utilizadas son proteínas de choque térmico aisladas, lo que significa que las proteínas de choque térmico se han seleccionado y separado de la célula huésped en la que se produjeron. Dicho aislamiento puede llevarse a cabo como se describe en el presente documento y utilizando procedimientos de rutina de aislamiento de proteínas conocidos en la técnica.
- 55 [0101] Las proteínas de estrés pueden estar en forma de sales ácidas o básicas, o en forma neutra. Además, los residuos de aminoácidos individuales pueden ser modificados por oxidación o reducción. Además, diversas sustituciones, deleciones o adiciones pueden realizarse a las secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico, el efecto neto de las cuales es retener o mejorar aún más el aumento de la actividad biológica de la proteína de estrés. Debido a la degeneración del código, por ejemplo, puede haber una variación considerable en las secuencias de nucleótidos que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las porciones de proteínas o péptidos de estrés obtenidas de proteínas de estrés pueden utilizarse en los polipéptidos de fusión, siempre que tales partes o péptidos incluyan los epítomos implicados en la mejora de la respuesta inmune. Las porciones de las proteínas de estrés pueden obtenerse mediante fragmentación utilizando proteinasas, o por procedimientos recombinantes, tales como la expresión de sólo una parte de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de estrés (sola o fusionada con otra secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína). Los péptidos también pueden producirse por tales procedimientos, o por síntesis química. Las proteínas de estrés pueden incluir mutaciones introducidas en loci particulares mediante una variedad de técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Drinkwater y Klinedinst Proc.
- 60
- 65

Natl. Acad. Sci. USA. 83: 3402-3406 (1986); Liao y Wise, Gene 88: 107-111 (1990); Horwitz y otros, Genome 3: 112-117 (1989).

2. Procedimientos de fabricación de los polipéptidos de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés

[0102] También se proporcionan composiciones y procedimientos para fabricar los polipéptidos de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés. Una proteína de fusión que incluye un anticuerpo manipulado y una proteína de estrés puede producirse por medios recombinantes. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la proteína de estrés puede unirse a cualquiera de los extremos de una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo manipulado, de manera que las dos secuencias codificantes de proteína están compartiendo un marco de lectura traduccional común y se pueden expresar como una proteína de fusión que incluye el anticuerpo manipulado y la proteína de estrés. La secuencia combinada se inserta en un vector adecuado elegido basado en las características de expresión deseadas y la naturaleza de la célula huésped. En los ejemplos proporcionados más adelante, las secuencias de ácido nucleico se ensamblan en un vector adecuado para la expresión de proteínas en la bacteria *E. coli*. Después de la expresión en la célula huésped elegida, la proteína de fusión puede purificarse mediante técnicas de separación bioquímica de rutina o por procedimientos de inmunoafinidad utilizando un anticuerpo para una o la otra parte de la proteína de fusión. Alternativamente, el vector seleccionado puede añadir una etiqueta a la secuencia de proteína de fusión, por ejemplo, una etiqueta de oligohistidina tal como se describe en los ejemplos presentados más adelante, lo que permite la expresión de una proteína de fusión etiquetada que puede purificarse por procedimientos de afinidad utilizando un anticuerpo u otro material con una afinidad apropiadamente alta para la etiqueta. Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Deutscher, M. Guide to Protein Purification Methods Enzimology, vol. 182. Academic Press, Inc. San Diego, CA (1990). Si se utiliza un vector adecuado para la expresión en células de mamífero, por ejemplo, uno de los vectores descritos a continuación, la proteína de fusión puede expresarse y purificarse a partir de células de mamífero. Alternativamente, el vector de expresión de mamífero (incluyendo secuencias de codificación de la proteína de fusión) se puede administrar a un sujeto para la expresión directa del polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés en las células del sujeto. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés también se puede producir químicamente y a continuación insertarse en un vector adecuado para la producción de la proteína de fusión y la purificación o la administración a un sujeto. Finalmente, una proteína de fusión también se puede preparar químicamente.

[0103] Las técnicas para fabricar genes de fusión son bien conocidas en la técnica. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se lleva a cabo de acuerdo con técnicas convencionales, empleando extremos romos o escalonados para la ligadura, la digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, el relleno de extremos cohesivos según sea apropiado, el tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión indeseable, y ligadura enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden hibridarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel y otros, John Wiley & Sons: 1992). Por consiguiente, se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende un gen de fusión de un gen que codifica al menos un anticuerpo manipulado y un gen que codifica al menos una proteína de estrés.

[0104] El ácido nucleico puede proporcionarse en un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés, y unida operativamente a al menos una secuencia reguladora. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores, tales como la elección de la célula huésped a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. El número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como marcadores de antibióticos, debe tenerse en cuenta. Tales vectores se pueden administrar en cualquier vehículo biológicamente eficaz, por ejemplo, cualquier formulación o composición capaz de transfectar células con eficacia, ya sea *ex vivo* o *in vivo* con material genético que codifica un polipéptido quimérico. Los enfoques incluyen la inserción del ácido nucleico en vectores virales, incluyendo retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus de la inmunodeficiencia humana, y virus del herpes simplex-1 recombinantes, o plásmidos bacterianos o eucariotas recombinantes. Los vectores virales se pueden utilizar para transfectar células directamente; se puede administrar ADN plásmido solo con la ayuda de, por ejemplo, liposomas catiónicos (lipofectina) o derivatizados (por ejemplo, conjugado a anticuerpo), conjugados de polilisina, gramicidina S, envolturas virales artificiales u otros de dichos vehículos intracelulares. Los ácidos nucleicos también pueden inyectarse directamente. Alternativamente, se puede llevar a cabo la precipitación con fosfato de calcio para facilitar la entrada de un ácido nucleico en una célula.

[0105] Los ácidos nucleicos en cuestión pueden usarse para causar la expresión y la sobreexpresión de un polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas o polipéptidos de fusión.

5 **[0106]** También se proporciona una célula huésped transfectada con un gen recombinante con el fin de expresar un polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés. La célula huésped puede ser cualquier célula procarionota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés se puede expresar en células bacterianas, tales como *E. coli*, células de insecto (baculovirus), levadura, insecto, planta, o células de mamífero. En aquellos casos en los que la célula huésped es humana, puede estar o no en un sujeto vivo. Otras células huésped adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica. Además, la célula huésped puede estar suplementada con moléculas de ARNt que no se encuentran normalmente en el huésped con el fin de optimizar la expresión del polipéptido. Otros procedimientos adecuados para maximizar la expresión del polipéptido de fusión serán conocidos por los expertos en la materia.

15 **[0107]** Un cultivo celular incluye células huésped, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Un polipéptido de fusión puede secretarse y aislarse de una mezcla de células y medio que comprenden el polipéptido. Alternativamente, un polipéptido de fusión puede ser retenido citoplásmicamente y las células se recogen, se lisan y se aísla la proteína. Un polipéptido de fusión puede ser aislado de un medio de cultivo celular, células huésped, o ambos usando técnicas conocidas en el sector para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis y purificación por inmovinoafinidad con anticuerpos específicos para epítomos particulares de una fusión.

20 **[0108]** Por lo tanto, se puede utilizar una secuencia de nucleótidos que codifica todo o parte de un polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés para producir una forma recombinante de una proteína a través de procesos microbianos o procesos celulares eucariotas. La ligación de la secuencia en una construcción de polinucleótido, tal como un vector de expresión, y la transformación o transfección en huéspedes, ya sea eucariota (levadura, aviar, insecto o mamífero) o procarionota (células bacterianas), son procedimientos estándar. Se pueden emplear procedimientos similares, o modificaciones de los mismos, para preparar polipéptidos de fusión recombinantes por medios microbianos o tecnología de cultivo de tejidos de acuerdo con la presente invención.

30 **[0109]** Los vehículos de expresión para la producción de una proteína recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, vectores adecuados para la expresión de un polipéptido de fusión incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUG para la expresión en células procarionotas, tales como *E. coli*.

35 **[0110]** En otra realización, el ácido nucleico es un polipéptido de fusión de anticuerpos manipulado y proteína de choque térmico unido operativamente a un promotor bacteriano, por ejemplo, el promotor *NirB* de *E. coli* anaeróbico o el promotor *lpp* de lipoproteína de *E. coli*, que se describen; por ejemplo, en Inouye y otros (1985) Nucl. Acids Res. 13: 3101; promotor *pagC* de *Salmonella* (Miller y otros., Supra), promotor *ent* de *Shigella* (Schmitt y Payne, J. Bacteriol. 173: 816 (1991)), promotor *tet* en Tn10 (Miller y otros, supra), o el promotor *ctx* de *Vibrio cholera*. Se puede utilizar cualquier otro promotor. El promotor bacteriano puede ser un promotor constitutivo o un promotor inducible. Un promotor inducible de ejemplo es un promotor que es inducible por hierro o en condiciones limitativas de hierro limitativo. De hecho, se cree que algunas bacterias, por ejemplo, organismos intracelulares, encontrar condiciones limitativas de hierro en el citoplasma huésped. Ejemplos de promotores regulados por hierro de *FepA* y *TonB* son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las siguientes referencias: Headley, V. y otros. (1997) Infection & Immunity 65: 818; Ochsner, UA y otros. (1995) Journal of Bacteriology 177: 7194; Hunt, MD y otros. (1994) Journal of Bacteriology 176: 3944; Svinarich, MS y S. Palchaudhuri. (1992) Journal of Diarrhoeal Diseases Research 10: 139; Prince, RW y otros (1991) Molecular Microbiology 5: 2823; Goldberg, MB y otros (1990) Journal of Bacteriology 172: 6863; de Lorenzo, V. y otros. (1987) Journal of Bacteriology 169: 2624; y Hantke, K. (1981) Molecular & General Genetics 182: 288.

50 **[0111]** Un plásmido comprende preferiblemente una secuencia necesaria para la transcripción apropiada del ácido nucleico en bacterias, por ejemplo, una señal de terminación de la transcripción. El vector puede comprender además secuencias de factores que permiten la selección de bacterias que comprenden el ácido nucleico de interés, por ejemplo, gen que codifica una proteína que proporciona resistencia a un antibiótico, secuencias necesarias para la amplificación del ácido nucleico, por ejemplo, un origen de replicación bacteriano.

55 **[0112]** En otra realización, se añade una secuencia de péptido señal a la construcción, de manera que el polipéptido de fusión es secretado de células. Dichos péptidos señal son bien conocidos en la técnica.

60 **[0113]** En una realización, el potente promotor T5 de fago, que es reconocido por ARN polimerasa de *E. coli*, se utiliza junto con un módulo de represión del operador lac para proporcionar una expresión de alto nivel estrictamente regulado o proteínas recombinantes en *E. coli*. En este sistema, la expresión de proteína es bloqueada en presencia de altos niveles de represor lac.

65 **[0114]** En un caso, el ADN está unido operativamente a un primer promotor y la bacteria comprende además un segundo ADN que codifica una primera polimerasa que es capaz de mediar la transcripción del primer promotor, en el que el ADN que codifica la primera polimerasa está unido operativamente a un segundo promotor. En un caso preferente, el segundo promotor es un promotor bacteriano, tales como los indicados anteriormente. En un caso aún

más preferido, la polimerasa es una polimerasa de bacteriófago, por ejemplo, SP6, T3, o 17 polimerasa y el primer promotor es un promotor de bacteriófago, por ejemplo, un promotor SP6, T3, o T7, respectivamente. Los plásmidos que comprenden promotores de bacteriófagos y plásmidos que codifican polimerasas de bacteriófagos se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, de Promega Corp. (Madison, Wis.) y de InVitrogen (San Diego, California), o pueden obtenerse directamente del bacteriófago utilizando técnicas de ADN recombinante estándar (J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, 1989). Las polimerasas y promotores de bacteriófagos se describen adicionalmente, por ejemplo, en las siguientes referencias: Sagawa, H. y otros. (1996) Gen 168: 37; Cheng, X. y otros (1994) PNAS USA 91: 4034; Dubendorff, JW y FW Studier (1991) Journal of Molecular Biology 219: 45; Bujarski, JJ y P. Kaesberg (1987) Nucleic Acids Research 15: 1337; y Studier, FW y otros. (1990) Methods in Enzymology 185: 60). Tales plásmidos pueden modificarse adicionalmente de acuerdo con el caso específico del polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés a expresar.

[0115] En otro caso, la bacteria comprende además un ADN que codifica una segunda polimerasa que es capaz de mediar la transcripción del segundo promotor, en el que el ADN que codifica la segunda polimerasa está unido operativamente a un tercer promotor. El tercer promotor puede ser un promotor bacteriano. Sin embargo, más de dos polimerasas y promotores diferentes podrían introducirse en una bacteria para obtener altos niveles de transcripción. El uso de una o más polimerasas para la mediación de la transcripción en la bacteria puede proporcionar un aumento significativo en la cantidad de polipéptido en la bacteria en relación con una bacteria en la que el ADN está directamente bajo el control de un promotor bacteriano. La selección del sistema a adoptar variará dependiendo del uso específico, por ejemplo, de la cantidad de proteína que se desea producir.

[0116] En general, se introduce un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión en una célula huésped, tal como mediante transfección, y la célula huésped se cultiva en condiciones que permiten la expresión del polipéptido de fusión. Los procedimientos para introducir ácidos nucleicos en células procariotas y eucariotas son bien conocidos en la técnica. Los medios adecuados para el cultivo de células huésped de mamífero y procariotas son bien conocidos en la técnica. Generalmente, el ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión de la invención está bajo el control de un promotor inducible, que es inducido una vez que las células huésped que comprenden el ácido nucleico se han dividido un número determinado de veces. Por ejemplo, cuando un ácido nucleico está bajo el control de un operador y represor de beta-galactosa, se añade isopropil beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) al cultivo cuando las células huésped bacterianas han alcanzado una densidad DO_{600} de aproximadamente 0,45-0,60. El cultivo se desarrolla a continuación durante algo más de tiempo para dar tiempo a la célula huésped para sintetizar el polipéptido. A continuación, habitualmente los cultivos se congelan y se pueden almacenar congelados durante algún tiempo, antes del aislamiento y la purificación del polipéptido.

[0117] Cuando se utiliza una célula huésped procariota, la célula huésped puede incluir un plásmido que expresa una lisozima T7 interna, por ejemplo, expresada del plásmido pLysSL (véanse los Ejemplos). La lisis de dichas células huésped libera la lisozima que a continuación degrada la membrana bacteriana.

[0118] Otras secuencias que pueden incluirse en un vector para la expresión en células procarióticas bacterianas u otras incluyen un sitio de unión ribosomal sintético; fuertes terminadores de la transcripción, por ejemplo, de fago lambda y t_4 del operón rmb en *E. coli*, para prevenir la lectura a través de la transcripción y asegurar la estabilidad del polipéptido expresado; un origen de replicación, por ejemplo, ColE1; y el gen de beta-lactamasa, que confiere resistencia a la ampicilina.

[0119] Otras células huésped incluyen las células huésped procariotas. Las células huésped incluso más preferidas son bacterias, por ejemplo, *E. coli*. Otras bacterias que pueden utilizarse incluyen *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Rickettsia spp.*, *Yersinia spp.*, *Escherichia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Bordetella spp.*, *Neisseria spp.*, *Aeromonas spp.*, *Francisella spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Citrobacter spp.*, *Chlamydia spp.*, *Haemophilus spp.*, *Brucella spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Legionella spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Helicobacter spp.*, *Vibrio spp.*, *Bacillus spp.*, y *Erysipelothrix spp.* La mayoría de estas bacterias se puede obtener de la American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209).

[0120] Existe un conjunto de vectores para la expresión de proteínas recombinantes en levadura. Por ejemplo, YEP24, YIP5, YEP51, YEP52, pYES2 y YRP17 son vehículos de clonación y expresión útiles en la introducción de construcciones genéticas en *S. cerevisiae* (ver, por ejemplo, Broach y otros, (1983) en Experimental Manipulation og Gene Expression, ed. M. Inouye Academic Press, p. 83). Estos vectores pueden replicarse en *E. coli* debido a la presencia del pBR322 ori, y en *S. cerevisiae* debido al determinante de replicación del plásmido de levadura 2 micras. Además, se pueden utilizar marcadores de resistencia a fármacos, tales como ampicilina.

[0121] En ciertas realizaciones, los vectores de expresión de mamíferos contienen tanto secuencias procarióticas para facilitar la propagación del vector en bacterias, como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSV-neo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión en mamífero adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y selección de resistencia a

fármacos en células tanto procariotas como eucariotas. Alternativamente, los derivados de virus, tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1), o de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) pueden utilizarse para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Los diversos procedimientos empleados en la preparación de los plásmidos y la transformación de organismos huésped son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados para células procariotas y eucariotas, así como procedimientos recombinantes generales, véase *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, segunda Ed., por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) capítulos 16 y 17. En algunos casos, puede ser deseable expresar la proteína recombinante mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1), y vectores derivados de pBlueBac (tales como el B-gal que comprende pBlueBac III).

[0122] En otra variación, la producción de proteínas se puede conseguir usando en sistemas de traducción *in vitro*. Los sistemas de traducción *in vitro* son, en general, un sistema de traducción que es un extracto libre de células que comprende al menos los elementos mínimos necesarios para la traducción de una molécula de ARN en una proteína. Un sistema de traducción *in vitro* comprende típicamente al menos ribosomas, ARNt, iniciador de metionil-ARNtMet, proteínas o complejos implicados en la traducción, por ejemplo, eIF2, eIF3, el complejo de unión a la caperuza (CB), que comprende la proteína de unión a la caperuza (CBP) y factor de iniciación eucariota 4F (eIF4F). Una variedad de sistemas de traducción *in vitro* son bien conocidos en la técnica e incluyen kits comercialmente disponibles. Ejemplos de sistemas de traducción *in vitro* incluyen lisados eucariotas, tales como lisados de reticulocitos de conejo, lisados de oocitos de conejo, lisados celulares humanos, lisados de células de insectos y extractos de germen de trigo. Los lisados están disponibles en el mercado de fabricantes, tales como Promega Corp., Madison, Wis.; Stratagene, La Jolla, Calif.; Amersham, Arlington Heights, Ill.; y GIBCO/BRL, Grand Island, NY. Los sistemas de traducción *in vitro* comprenden típicamente macromoléculas, tales como enzimas, factores de traducción, iniciación y elongación, reactivos químicos, y ribosomas. Además, se puede utilizar un sistema de transcripción *in vitro*. Tales sistemas comprenden típicamente al menos una holoenzima de ARN polimerasa, ribonucleótidos y cualquier factor de iniciación de la transcripción, elongación y terminación necesarios. Un nucleótido de ARN para la traducción *in vitro* se puede producir usando procedimientos conocidos en la técnica. La transcripción y traducción *in vitro* pueden acoplarse en una reacción de una sola etapa para producir proteínas a partir de uno o más ADN aislados.

[0123] Cuando se desea la expresión de un fragmento carboxi terminal de un polipéptido, es decir un mutante por truncamiento, puede ser necesario añadir un codón de inicio (ATG) al fragmento de oligonucleótido que comprende la secuencia que se desea expresar. Es bien conocido en la técnica que una metionina en la posición N-terminal puede ser enzimáticamente escindida mediante el uso de la enzima metionina aminopeptidasa (MAP). MAP ha sido clonada a partir de *E. coli* (Ben-Bassat y otros, (1987) *J. Bacteriol* 169: 751-757) y *Salmonella typhimurium* y su actividad *in vitro* se ha demostrado en proteínas recombinantes (Miller y otros, (1987) *PNAS USA* 84: 2718-1722). Por lo tanto, la eliminación de una metionina N-terminal, si se desea, puede lograrse ya sea *in vivo* mediante la expresión de tales polipéptidos recombinantes en un huésped que produce MAP (por ejemplo, *E. coli* o CM89 o *S. cerevisiae*), o *in vitro* mediante el uso de MAP purificada (por ejemplo, procedimiento de Miller y otros.).

[0124] En los casos en que se utilizan vectores de expresión de plantas, la expresión de un polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés puede impulsarse por cualquiera de un número de promotores. Por ejemplo, se pueden utilizar promotores virales, tales como los promotores 35S ARN y 19S ARN de CaMV (Brisson y otros, 1984, *Nature*, 310: 511-514), o el promotor de proteína de cubierta de TMV (Takamatsu y otros, 1987, *EMBO J.*, 6: 307-311); alternativamente, se pueden utilizar promotores de plantas, tales como la subunidad pequeña de RUBISCO (Coruzzi y otros, 1994, *EMBO J.*, 3: 1671-1680; Broglie y otros, 1984, *Science*, 224: 838-843); o promotores de choque térmico, por ejemplo, Hsp 17.5-E o Hsp 17.3-B de soja (Gurley y otros., 1986, *Mol Cell Biol*, 6: 559-565.). Estas construcciones pueden introducirse en células vegetales usando plásmidos Ti, plásmidos Ri, vectores de virus de plantas; transformación directa de ADN; microinyección, electroporación, etc. Para revisiones de tales técnicas ver, por ejemplo, Weissbach y Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, Nueva York, Sección VIII, pág. 421-463; y Grierson y Corey, 1988, *Plant Molecular Biology*, 2ª Ed., Blackie, Londres, cap. 7-9.

[0125] Un sistema de expresión alternativo que puede utilizarse para expresar un polipéptido etiqueta o proteína de fusión que comprende un polipéptido etiqueta es un sistema de insecto. En uno de tales sistemas, el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se utiliza como vector para expresar genes exógenos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia de PGHS-2 puede clonarse en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y se coloca bajo control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina). La inserción exitosa de la secuencia codificante resultará en la inactivación del gen de polihedrina y la producción de virus recombinante no ocluido (es decir, virus que carecen de la cubierta proteica codificada por el gen de la polihedrina). Estos virus recombinantes se utilizan después para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en las que se expresa el gen insertado. (Por ejemplo, ver Smith y otros, 1983, *J. Virol.*, 46: 584, Smith, Patente de Estados Unidos No. 4.215.051).

[0126] En una realización específica de un sistema de insectos, el ADN que codifica un polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de choque térmico se clona en el vector de transferencia recombinante

pBlueBacIII (Invitrogen, San Diego, Calif.) en dirección 3' del promotor de polihedrina y se transfecta en células de insecto Sf9 (derivadas de células de ovario de *Spodoptera frugiperda*, disponibles de Invitrogen, San Diego, Calif.) para generar virus recombinante. Después de la purificación de placas del virus recombinante, se preparan poblaciones virales de título elevado que a su vez se utilizan para infectar células de insectos Sf9 o High Five™ (células BTI-TN-5B1-4 derivadas de homogenatos de ovocitos de *Trichoplusia nt*; disponible de Invitrogen, San Diego, Calif), para producir grandes cantidades de polipéptido de la invención modificado apropiadamente después de la traducción.

[0127] En otras realizaciones, un anticuerpo manipulado y una proteína de choque térmico se pueden producir por separado y a continuación unirse, por ejemplo, covalentemente entre sí. Por ejemplo, un anticuerpo manipulado y una proteína de choque térmico se producen por separado *in vitro*, se purifican, y se mezclan conjuntamente bajo condiciones en las que la etiqueta será capaz de unirse al polipéptido de interés. Por ejemplo, la proteína de choque térmico y/o el anticuerpo manipulado se pueden obtener (aislar) de una fuente en la que se sabe que se producen, pueden producirse y recogerse de cultivos de células, pueden producirse por clonación y expresión de un gen que codifica la proteína de choque térmico o el anticuerpo manipulado deseados, o se pueden sintetizar químicamente. Además, una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de choque térmico o el anticuerpo manipulado deseados se puede sintetizar químicamente. Tales mezclas de proteínas conjugadas pueden tener propiedades diferentes de las proteínas de fusión individuales.

[0128] Los enlazadores (también conocidos como "moléculas de enlace" o "agentes de reticulación") pueden ser utilizados para conjugar un anticuerpo manipulado y una proteína de estrés. Los enlazadores incluyen productos químicos capaces de reaccionar con un grupo químico definido de varias, por lo general dos, moléculas y así conjugarlos. La mayoría de los agentes de reticulación conocidos reaccionan con grupos amina, carboxilo, y sulfhidrilo. La elección del grupo químico diana es crucial si el grupo puede estar implicado en la actividad biológica de los polipéptidos a conjugar. Por ejemplo, las maleimidias, que reaccionan con grupos sulfhidrilo, pueden inactivar péptidos o proteínas que comprenden Cys que requieren la Cys para unirse a una diana. Los enlazadores pueden ser homofuncionales (que comprenden grupos reactivos del mismo tipo), heterofuncionales (que comprenden diferentes grupos reactivos), o fotorreactivos (que comprenden grupos que se convierten en reactivos con la luz).

[0129] Las moléculas de enlace pueden ser responsables de diferentes propiedades de las composiciones conjugadas. La longitud del enlazador debe considerarse a la luz de la flexibilidad molecular durante la etapa de conjugación, y la disponibilidad de la molécula de conjugado por su diana (moléculas de superficie celular y similares.) Los enlazadores más largos pueden por lo tanto mejorar la actividad biológica de las composiciones de la presente invención, así como la facilidad de preparación de las mismas. La geometría del enlazador se puede usar para orientar una molécula para la reacción óptima con una diana. Un enlazador con geometría flexible puede permitir que los polipéptidos reticulados adapten su conformación al unirse a otros polipéptidos. La naturaleza del enlazador puede ser alterada para otros fines diversos. Por ejemplo, la estructura de arilo de MBuS se encontró que era menos inmunogénica que el espaciador aromático de MBS. Además, la hidrofobicidad y la funcionalidad de las moléculas de enlace pueden ser controladas por las propiedades físicas de las moléculas componentes. Por ejemplo, la hidrofobicidad de un enlazador polimérico puede ser controlada por el orden de unidades monoméricas a lo largo del polímero, por ejemplo un polímero de bloque en el que hay un bloque de monómeros hidrófobos intercalados con un bloque de monómeros hidrófilos.

[0130] La química de la preparación y la utilización de una amplia variedad de enlazadores moleculares es bien conocido en la técnica y muchos enlazadores prefabricados para su uso en la conjugación de moléculas están disponibles comercialmente de proveedores tales como Pierce Chemical Co., Roche Molecular Biochemicals, United States Biological, y similares.

3. Procedimientos de uso de polipéptidos de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés y composiciones adecuadas para los mismos

[0131] Los polipéptidos de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés descritos en este documento pueden administrarse a un sujeto para mejorar la respuesta inmune del sujeto, en particular una respuesta citolítica mediada por células, contra una célula que expresa un antígeno contra el que los dominios del anticuerpo manipulado del polipéptido de fusión están dirigidos. El polipéptido de fusión puede simplemente aumentar la respuesta inmune (sirviendo así como composición inmunogénica), o conferir inmunidad protectora (sirviendo así como una vacuna).

[0132] Por lo tanto, los polipéptidos de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés producidos como se describe anteriormente se pueden purificar hasta una pureza adecuada para su uso como composición farmacéutica. Generalmente, una composición purificada tendrá una especie que comprende más de aproximadamente 85 por ciento de todas las especies presentes en la composición, más de aproximadamente 85%, 90%, 95%, 99% o más de todas las especies presentes. La especie objetivo se puede purificar hasta la homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante procedimientos de detección convencionales) donde la composición consiste esencialmente en una sola especie. Un experto en la técnica puede purificar un polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés

utilizando técnicas estándar para la purificación de proteínas, por ejemplo, cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía de exclusión de tamaño, etc. a la luz de las enseñanzas de este documento. La pureza de un polipéptido puede determinarse por un número de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo por ejemplo, análisis de la secuencia de aminoácidos amino-terminal, la electroforesis en gel y el análisis de espectrometría de masas.

[0133] Por consiguiente, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos de fusión de proteína de anticuerpo manipulado y proteína de estrés anteriormente descritos. En un aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos descritos anteriormente, formulados junto con uno o más portadores(aditivos) y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. En otro aspecto, en ciertas realizaciones, los compuestos se pueden administrar como tales o en mezclas con portadores farmacéuticamente aceptables y también se pueden administrar en combinación con otros agentes. Por lo tanto, la terapia conjuntiva (en combinación) incluye la administración secuencial, simultánea y separada, o coadministración del compuesto activo en una forma que los efectos terapéuticos del primero administrado no ha desaparecido por completo cuando se administra el siguiente.

[0134] Los polipéptidos de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés descritos en este documento se pueden administrar a un sujeto en una variedad de maneras. Las rutas de administración incluyen intradérmica, transdérmica (por ejemplo, polímeros de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, epidural e intranasal. Se puede utilizar cualquier otra vía de administración conveniente, por ejemplo, infusión o inyección en bolo, o absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos. Además, las composiciones descritas en este documento pueden contener y ser administrados junto con otros componentes farmacológicamente aceptables, tales como agentes biológicamente activos (por ejemplo, adyuvantes como alumbre), tensioactivos (por ejemplo, glicéridos), excipientes (por ejemplo, lactosa), portadores, diluyentes y vehículos. Además, las composiciones pueden utilizarse *ex vivo* como medio de estimulación de glóbulos blancos obtenidos de un sujeto para producir, expandir y propagar células inmunes específicas de antígeno *in vitro* que son reintroducidas posteriormente en el sujeto.

[0135] Además, un polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés puede administrarse mediante la expresión *in vivo* de un ácido nucleico que codifica tales secuencias de proteína en un sujeto humano. La expresión de dicho ácido nucleico también se puede lograr *ex vivo* como medio de estimulación de los glóbulos blancos obtenidos de un sujeto para producir, expandir y propagar células inmunes específicas de antígeno *in vitro* que son reintroducidas posteriormente en el sujeto. Los vectores de expresión adecuados para dirigir la expresión de polipéptidos de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés se pueden seleccionar entre la gran variedad de vectores que se utilizan actualmente en el campo. Son preferentes los vectores que son capaces de producir altos niveles de expresión, así como son eficaces en la transducción de un gen de interés. Por ejemplo, se pueden utilizar el vector de adenovirus recombinante PJM 17 (All y otros, *Gene Therapy* 1: 367-84 (1994); Berkner KL, *Biotechniques* 6: 616-24 (1988)), vectores de adenovirus de segunda generación DE1/DE4 (Wang y Finer, *Nature Medicine* 2: 714-6 (1996)), o vector viral adeno-asociado AAV/Neo (Muro-Cacho y otros, *J. Immunotherapy* 11: 231-7 (1992)). Además, se pueden emplear vectores retrovirales recombinantes MFG (Jaffee y otros, *Cancer Res.* 53: 2221-6 (1993)) o LN, LNSX, LNCX, LXSN (Miller y Rosman, *Biotechniques* 7: 980-9 (1989)). Los vectores basados en virus del herpes simple, tales como pHSV1 (Geller y otros, *Proc Natl Acad Sci.* 87: 8950-4 (1990)) o vectores de vaccinia viral, tales como MVA (Sutter y Moss *Proc Natl Acad. Sci.* 89: 10847-51 (1992)) pueden servir como alternativas.

[0136] Las unidades de expresión específica utilizadas con frecuencia que incluyen secuencias de promotor y 3' son las encontrados en el plásmido CDNA3 (Invitrogen), plásmido AH5, pRC/CMV (Invitrogen), pCMU II (Paabo y otros, *EMBO J.* 5: 1921-1927 (1986)), pZip-Neo SV (Cepko y otros, *Cell* 37: 1053-1062 (1984)) y pSRa (DNAX, Palo Alto, CA). La introducción de genes en las unidades de expresión y/o vectores puede conseguirse utilizando técnicas de manipulación genética, tal como se describe en los manuales como *Molecular Cloning and Current Protocols in Molecular Biology* (Sambrook, J., y otros., *Molecular Cloning Cold Spring Harbor Press* (1989)); Ausubel, FM y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience (1989)). Un ácido nucleico expresable resultante se puede introducir en células de un sujeto humano mediante cualquier procedimiento capaz de colocar el ácido nucleico en células en una forma expresable, por ejemplo como parte de un vector viral tal como se ha descrito anteriormente, como plásmido desnudo u otro ADN, o encapsulado en liposomas dirigidos o fantasmas de eritrocitos (Friedman, T., *Science*, 244: 1275-1281 (1989); Rabinovich, NR y otros, *Science* 265: 1401-1404 (1994)). Los procedimientos de transducción incluyen la inyección directa en tejidos y tumores, la transfección liposomal (Fraley y otros, *Nature* 370: 111-117 (1980)), endocitosis mediada por receptores (Zatloukal y otros, *Ann NY Acad Sci* 660: 136 -153 (1992)), y la transferencia de genes mediada por bombardeo de partículas (Eisenbraun y otros, *DNA & Cell Biol* 12: 791-797 (1993)).

[0137] La cantidad de polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de choque térmico (fusionado, conjugado o no covalentemente unido tal como se ha descrito antes) en las composiciones de la presente invención es una cantidad que produce una respuesta inmunoestimuladora eficaz en un sujeto. Una cantidad eficaz es una cantidad tal que cuando se administra, induce una respuesta inmune. Además, la cantidad de polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés administrada al sujeto variará dependiendo de una variedad de

factores, incluyendo el anticuerpo y la proteína de estrés empleados, el tamaño, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto, así como de su capacidad de respuesta inmunológica general. El ajuste y la manipulación de los intervalos de dosis establecidos están dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Por ejemplo, la cantidad de polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés puede ser de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 1 gramo, preferiblemente de aproximadamente 100 microgramos a aproximadamente 1 gramo, y de aproximadamente 1 miligramo a aproximadamente 1 gramo. Una cantidad eficaz de una composición que comprende un vector de expresión es una cantidad tal que cuando se administra, induce una respuesta inmune contra el antígeno contra el que se dirige el anticuerpo manipulado. Además, la cantidad de vector de expresión administrado al sujeto variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo el anticuerpo y la proteína de estrés empleados, el tamaño, edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto, así como en su capacidad de respuesta inmunológica general. Los factores adicionales que deben tenerse en cuenta son la ruta de aplicación y el tipo de vector utilizado. Por ejemplo, cuando el tratamiento profiláctico o terapéutico se lleva a cabo con un vector viral que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés, la cantidad efectiva estará en el intervalo de 10^4 a 10^{12} de virus de replicación defectuosa libre de agente auxiliar por kg de peso corporal, preferiblemente en el intervalo de 10^5 a 10^{11} de virus por kg de peso corporal y lo más preferiblemente en el intervalo de 10^6 a 10^{10} de virus por kg de peso corporal.

[0138] La determinación de una cantidad eficaz de polipéptido de fusión para inducir una respuesta inmune en un sujeto está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en el presente documento.

[0139] Puede estimarse una dosis eficaz inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir la inducción de una respuesta inmune usando técnicas que son bien conocidas en el sector. Un experto en la materia podría optimizar fácilmente la administración a humanos en base a los datos en animales. La cantidad e intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente. Por ejemplo, cuando se utiliza como una vacuna, los polipéptidos y/o cepas de la invención se pueden administrar en aproximadamente 1 a 3 dosis durante un período de 1 a 36 semanas. Preferiblemente, se administran 3 dosis, a intervalos de aproximadamente 3 a 4 meses, y las vacunas de refuerzo se pueden administrar periódicamente a partir de entonces. Protocolos alternativos pueden ser apropiados para pacientes individuales. Una dosis adecuada es una cantidad de polipéptido o cepa que, cuando se administra como se ha descrito anteriormente, es capaz de aumentar una respuesta inmune en un paciente inmunizado de forma suficiente para proteger al paciente de la enfermedad o infección durante al menos 1-2 años.

[0140] Las composiciones también pueden incluir adyuvantes para mejorar la respuesta inmune. Además, dichas proteínas pueden suspenderse adicionalmente en una emulsión de aceite para causar una liberación más lenta de las proteínas *in vivo* después de la inyección. Las proporciones óptimas de cada componente en la formulación se pueden determinar mediante técnicas bien conocidas para los expertos en la materia.

[0141] Se pueden emplear cualquiera de una variedad de adyuvantes en las vacunas de la presente invención para mejorar la respuesta inmune. La mayoría de los adyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger el antígeno del catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, y un estimulador específico o no específico de la respuesta inmune, tal como lípido A, o *Bordetella pertussis*. Los adyuvantes adecuados están disponibles comercialmente e incluyen, por ejemplo, adyuvante incompleto de Freund y adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories) y Adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ). Otros adyuvantes adecuados incluyen alumbre, microesferas biodegradables, monofosforil lípido A, Quil A, SBAS1c, SBAS2 (Ling y otros, 1997, Vaccine 15: 1562-1567), SBAS7, Al(OH)₃ y el oligonucleótido CpG (WO96/02555).

[0142] En las vacunas de la presente invención, el adyuvante puede inducir una respuesta inmune de tipo Th1. Los sistemas adyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, preferiblemente monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) junto con una sal de aluminio. Un sistema potenciado implica la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, particularmente la combinación de 3D-MPL y la saponina QS21 como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactiva en la que QS21 se inactiva con colesterol como se describe en el documento WO 96/33739. Los experimentos anteriores han demostrado un claro efecto sinérgico de las combinaciones de 3D-MPL y QS21 en la inducción de respuestas inmunes celulares tanto humorales como de tipo Th1. Una formación de adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210 y puede comprender una formulación.

4. Kits

[0143] La presente invención proporciona kits para la expresión de un polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de choque térmico. Tales kits pueden comprender ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de choque térmico. Los ácidos nucleicos pueden estar incluidos en un plásmido o un vector, por ejemplo, un plásmido bacteriano o vector viral. Otros kits comprenden un polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de choque térmico. Además, la presente descripción

proporciona kits para la producción y/o purificación de un polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de choque térmico.

5 [0144] La presente descripción proporciona kits para prevenir o tratar una enfermedad infecciosa, inflamatoria, autoinmune o maligna en un paciente. Por ejemplo, un kit puede comprender una o más composiciones farmacéuticas como se describe anteriormente y, opcionalmente, instrucciones para su uso. En aún otros casos, la descripción proporciona kits que comprenden una o más composiciones farmacéuticas y uno o más dispositivos para llevar a cabo la administración de tales composiciones.

10 [0145] Los componentes del kit se pueden envasar, ya sea para la práctica manual o parcial o totalmente automatizada de los procedimientos anteriores. En otras realizaciones que implican los kits, se pueden proporcionar instrucciones para su uso.

15 EJEMPLIFICACIÓN

[0146] La presente invención descrita ahora en general, se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos.

20 [0147] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se describen en la literatura. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. por Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); *DNA Cloning*, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); Mullis y otros. patente de Estados Unidos No: 4.683.195; *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of*
 25 *Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 y 155 (Wu y otros. eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

35 Ejemplo 1: Construcción de un conjugado Mab-HSP70 e inmunización utilizando el conjugado

[0148] Se eligió un péptido MISR2 de 14 aminoácidos de largo (SEQ ID No. 3: NANYSHLPPSGNRG) debido a su estabilidad, hidrofilia y similitud con MISR2 de ratón. El péptido se conjugó con HSP70 usando glutaraldehído al 25%. Se inmunizó un ratón Balb/c dos veces con un intervalo de 2 semanas en las patas a 100 µg de conjugado de péptido MISR-HSP70. Las células de ganglios linfáticos inmunes se fusionaron con células sp2/0 de mieloma. El sobrenadante se cribó mediante ELISA indirecto utilizando péptido MISR o proteína de fusión MISR-HSP70 o HSP70 pura. Los positivos fueron clonados 2-4 veces y se propagaron en ratón para ascitis.

40 [0149] Los anticuerpos se purificaron a partir de los fluidos ascíticos mediante doble precipitación de sal con sulfato de amonio. Los anticuerpos fueron probados en electroforesis PAAG en condiciones desnaturalizantes (Figura 3). Los anticuerpos se ensayaron en ELISA indirecto para la unión con conjugado MISR-HSP70, péptido MISR o HSP70. Los resultados se muestran en la figura 4.

Ejemplo Profético # 1: Tandab que comprende scFv y HSP70

50 [0150] La Figura 1 representa un polipéptido de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés de ejemplo que comprende un Tandab (anticuerpo manipulado) tetravalente y HSP70 (proteína de estrés). Los Tandabs tetravalentes se pueden preparar sustancialmente como se describe en los documentos WO 99/57150, US20050089519 y Kipriyanov, y otros., 1999, J. Mol. Biol. 293: 41-56. Brevemente, la construcción que codifica la molécula de cadena única que comprende cuatro dominios variables de anticuerpo puede incorporar adicionalmente un gen de la proteína de estrés, por ejemplo, HSP70. Alternativamente, la molécula de cadena única que comprende cuatro dominios variables de anticuerpo se puede producir por separado y a continuación unirse, por ejemplo, covalentemente, a una proteína de estrés, tal como HSP70.

60 Ejemplo Profético # 2: Producción de scFv en *E. coli*

[0151] Se pueden obtener la cepa GX6712 de *E. coli* (F galk2 rspL cl857) y el plásmido pGX8773 de Genexcorp (Gaithersburg, MD). El vector de expresión pGX8773 codifica con éxito una construcción de anticuerpo de cadena única, fusionada a la secuencia señal OmpA, y contiene un enlazador entre dominios. El enlazador es el péptido enlazador flexible de *Trichoderma reesi*. El vector de expresión PLY3 codifica los genes de VH y VL de scFv fusionados a la secuencia señal OmpA, con los dominios de VH y VL unidos por el enlazador. Los vectores de

expresión utilizan un promotor lambda OL/PR híbrido con expresión de la proteína iniciada por un cambio de temperatura de 30°C a 42°C en GX6712 de *E. coli*. (Mallender & Voss, J. Biol Chem (1994) 269: 199-206).

5 [0152] El scFv puede expresarse y a continuación unirse a HSP70 por separado, o el scFv se puede incorporar en un polipéptido de fusión, tal como se describe en toda la memoria y en el Ejemplo 3 a continuación.

Ejemplo Profético # 3: Producción de la fusión HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis*-scFv en *E. coli*

10 [0153] Se puede producir una fusión de HSP 70 de *Mycobacterium tuberculosis* con un scFv en *E. coli* de la siguiente manera:

I. Características de la cepa de *E. coli* productora de proteínas scFv y DnaK (HSP70) de *M. tuberculosis*.

15 [0154] La cepa de *E. coli* DLT 1270 se generó a partir DH 10A mediante la integración del gen lac 1 en el cromosoma con transducción de D1. El genotipo de DH 10A fue el siguiente: DH 10B (ara D139 Δ (ara, leu) 7697 Δ (lac) X74 galU galK rpsL deoR φ80lacZ DM15 endA1 nupG recA1 mcrA Δ (mrr hsdRMS mcrAN)). Para una referencia a DH 10B, véase Grant, S., G., y otros. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1990) 87: 4.645-4649.

20 II. Características del plásmido

[0155] Como vector, puede usarse el plásmido "QIAGEN" pQE - 30 ("QIAGEN" Product Guide, www.qiagen.com).

III. Clonación de la secuencia del gen de scFv de interés en el vector recombinante dnaK

25 [0156] Para la clonación, puede usarse un vector obtenido previamente pQE30-dnaK-Y. El plásmido recombinante pQE30-E711-dnaK produce la proteína híbrida 6HIS-E7 (tipo 11)-dnaK permitiendo la expresión de la proteína dnaK fusionada con una secuencia de 6HIS en el extremo N-terminal. Los productos recombinantes con la orientación correcta se han identificado usando un análisis de restricción. El gen de scFv de interés (por ejemplo, del vector pGX8773 descrito anteriormente y/o amplificado utilizando PCR) puede escindirse de la fuente por digestión de restricción y se clona en el sitio BamHI con el plásmido pQE30-dnaK-Y.

30

IV. Protocolo para el cultivo de la cepa que produce proteínas scFv y DnaK (HSP70) de *M. tuberculosis*.

35 [0157] Para el cultivo, se puede preparar medio nutriente Luria-Bertani (LB) en agua destilada y su pH se ajusta a 7,5 con NaOH o ácido cítrico. Los medios deben esterilizarse en una autoclave a 1 atm durante 40 min. Cuando el medio se haya enfriado hasta 40°C, puede añadirse ampicilina asépticamente hasta una concentración final de 50 μg/ml. Los medios con agar pueden ser transferidos asépticamente a una placa de Petri.

40 [0158] La cepa productora se puede añadir a continuación a los medios LB recién preparados con agar. La placa de Petri se puede colocar en un termostato y se incuba a 37°C durante la noche para permitir que el cultivo crezca. Para la preparación del cultivo de noche, se puede preparar una cantidad deseada del medios LB en un matraz cónico. Los medios se transfieren a los matraces cónicos resistentes térmicamente de manera que la cantidad no sea superior a 1/4 del volumen de los matraces. Una colonia aislada de *E. coli* puede transferirse de la placa de Petri y sembrarse en el matraz cónico. Los matraces se colocan en un termoagitador y se incuban durante la noche a 37°C a 50 rev/min.

45

V. Fermentación de DLT1270-pQE30-srFv-dnaK

50 [0159] La síntesis del péptido híbrido scFv-DnaK puede ser inducida mediante la adición de IPTG al cultivo. El cultivo de la noche DLT1270/pQE30-scFv-DnaK, crecido en medios LB, se puede diluir 1: 100 y cultivarse en un medio LB hasta DO600 = 0,5. Se añade IPTG 0,1 mM y el cultivo se continúa durante 3 h. La densidad del cultivo se puede medir usando un espectrofotómetro. Después del final de la fermentación, la biomasa puede recogerse por centrifugación a 3000 xg durante 15 minutos a 4°C. La generación de la proteína puede ser seguida por electroforesis en gel de poliacrilamida.

55

EQUIVALENTES

60 [0160] La presente invención proporciona, entre otras cosas, polipéptidos de fusión de anticuerpo manipulado y proteína de estrés.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido de fusión que comprende un anticuerpo manipulado y una proteína de choque térmico para utilizar en un procedimiento de aumento de la respuesta inmune contra una célula que expresa un antígeno contra el que está dirigido el dominio del anticuerpo manipulado del polipéptido de fusión, en el que el anticuerpo manipulado es deficiente en Fc y el polipéptido de fusión es inmunogénico.
- 10 2. Polipéptido de fusión para utilizar, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo manipulado comprende al menos un scFv.
3. Polipéptido de fusión para utilizar, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo manipulado comprende al menos un fragmento Fab.
- 15 4. Polipéptido de fusión para utilizar, según la reivindicación 1, en el que la proteína de choque térmico es HSP70.
5. Polipéptido de fusión para utilizar, según la reivindicación 4, en el que la proteína de choque térmico es HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis*.
- 20 6. Polipéptido de fusión para utilizar, según la reivindicación 4, en el que la proteína de choque térmico es HSP70 de *Mycobacterium bovis*.
7. Polipéptido de fusión para utilizar, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo manipulado es multivalente.
- 25 8. Polipéptido de fusión para utilizar, según la reivindicación 7, en el que el anticuerpo manipulado multivalente es multiespecífico.
9. Polipéptido de fusión para utilizar, según la reivindicación 7, en el que el anticuerpo manipulado es tetravalente.
- 30 10. Polipéptido de fusión para utilizar, según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo manipulado es un Tandab.
11. Polipéptido de fusión para utilizar, según la reivindicación 9, en el que la proteína de choque térmico es HSP70.
- 35 12. Polipéptido de fusión para utilizar, según la reivindicación 11, en el que la proteína de choque térmico es HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis*.
13. Polipéptido de fusión para utilizar, según la reivindicación 11, en el que la proteína de choque térmico es HSP70 de *Mycobacterium bovis*.
- 40 14. Ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de fusión que comprende un anticuerpo manipulado y una proteína de choque térmico para utilizar en un procedimiento de aumento de la respuesta inmune contra una célula que expresa un antígeno contra el que está dirigido el dominio del anticuerpo manipulado del polipéptido de fusión, en el que el anticuerpo manipulado es deficiente en Fc y el polipéptido de fusión es inmunogénico.
- 45 15. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión para utilizar según la reivindicación 14.
16. Célula que comprende el vector de expresión según la reivindicación 15.
- 50 17. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un polipéptido de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, y un portador farmacéuticamente aceptable, en el que el polipéptido de fusión es inmunogénico.
18. Composición inmunogénica o vacuna que comprende un polipéptido de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
- 55 19. Kit de vacuna que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-17.
20. Kit de vacuna, según la reivindicación 19, que comprende además instrucciones para el uso de la composición.

Figura 1

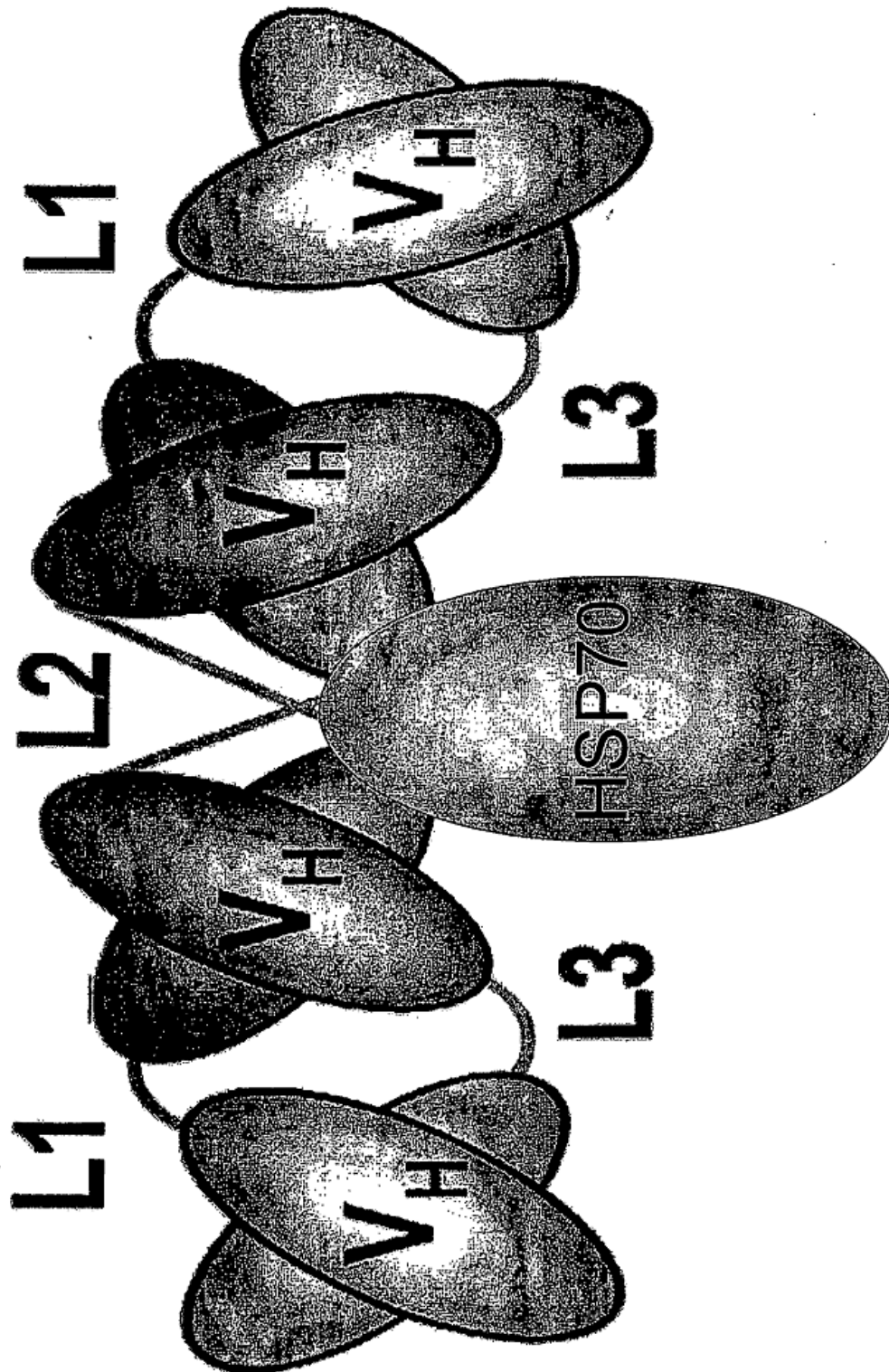


Figura 2

SEQ ID NO: 1 Proteína chaperona dnaK (proteína de choque térmico 70) de *Mycobacterium tuberculosis* (P0A5B9, GI: 61222666)

```

1   maravgidlg ttnsvvsvle  ggdpvvans  egsrttpsiv  afarngenvlv  ggpaknqavt
61  nvdrtvrsvk rhmgsdwsie  idgkkytape  isarilmklk  rdaeaylged  itdavittpa
121 yfndaqrqat kdagqiagln  vlrivnepta  aalaygldkg  ekeqrilvfd  lgggtfdvsl
181 leigegvvev ratsgdnhlg  gddwdqrvvd  wlvdkfkgts  gidltkdkma  mqrleaaek
241 akielsssqts  tsinlpyitv  dadknplfld  eqltraefqr  itqdlldrtr  kpfqsviadt
301 gisvseidhv  vlvggstrmp  avtdlvkelt  ggkepnkgvn  pdevvavgaa  lqagvlkgev
361 kvllldvtp  lslgietskkg  vmtrliernt  tiptkrsetf  ttaddnqpsv  qiavyggere
421 iaahnkllgs  feltgippap  rgipqievtf  didangivhv  takdkgtgke  ntiriqegsg
481 lskedidrmi  kdaeahaeed  rkrreeadvr  nqaetlvyqt  ekfvkeqrea  eggskvpedt
541 lnkvdaavae  akaalggdsi  saiksamekl  ggesqalgqa  iyaaqaasq  atgaahpgge
601 pggahpgsad  dvvdaevvdd  greak

```

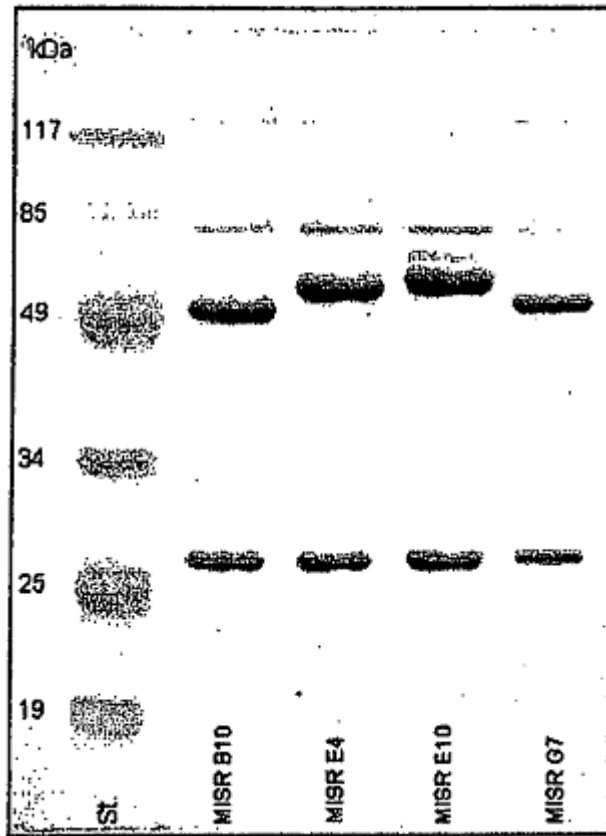
SEQ ID NO: 2 Proteína chaperona dnaK (proteína de choque térmico 70) de *Mycobacterium bovis* (NP_854021.1, GI:31791528)

```

1   maravgidlg ttnsvvsvle  ggdpvvans  egsrttpsiv  afarngenvlv  ggpaknqavt
61  nvdrtvrsvk rhmgsdwsie  idgkkytape  isarilmklk  rdaeaylged  itdavittpa
121 yfndaqrqat kdagqiagln  vlrivnepta  aalaygldkg  ekeqrilvfd  lgggtfdvsl
181 leigegvvev ratsgdnhlg  gddwdqrvvd  wlvdkfkgts  gidltkdkma  mqrleaaek
241 akielsssqts  tsinlpyitv  dadknplfld  eqltraefqr  itqdlldrtr  kpfqsviadt
301 gisvseidhv  vlvggstrmp  avtdlvkelt  ggkepnkgvn  pdevvavgaa  lqagvlkgev
361 kvllldvtp  lslgietskkg  vmtrliernt  tiptkrsetf  ttaddnqpsv  qiavyggere
421 iaahnkllgs  feltgippap  rgipqievtf  didangivhv  takdkgtgke  ntiriqegsg
481 lskedidrmi  kdaeahaeed  rkrreeadvr  nqaetlvyqt  ekfvkeqrea  eggskvpedt
541 lnkvdaavae  akaalggdsi  saiksamekl  ggesqalgqa  iyaaqaasq  atgaahpgge
601 pggahpgsad  dvvdaevvdd  greak

```

Figura 3



ES 2 581 984 T3

Figura 4

Adsorbido	Fusión MISR-hsp70	Péptido MISR	Hsp70
Clon de Mab	MISR B10		
ng/ml			
1000	2,033	2,017	0,097
333	1,864	1,884	0,061
111	1,499	1,504	0,058
37	1,051	1,005	0,057
12,3	0,616	0,521	0,060
4,1	0,431	0,229	0,059
1,3	0,216	0,069	0,058
0	0,199	0,054	0,078

Adsorbido	Fusión MISR-hsp70	Péptido MISR	Hsp70
Clon de Mab	MISR E4		
ng/ml			
1000	2,073	2,031	0,112
333	2,037	2,172	0,064
111	1,512	2,178	0,063
37	0,838	1,860	0,062
12,3	0,437	1,069	0,065
4,1	0,322	0,495	0,064
1,3	0,169	0,116	0,063
0	0,082	0,061	0,078

Figura 4 (continuación)

Adsorbido	Fusión MISR-hsp70	Péptido MISR	Hsp70
Clon de Mab	MISR E10		
ng/ml			
1000	1,827	2,068	0,122
333	1,564	2,029	0,071
111	1,206	1,783	0,070
37	0,818	1,380	0,069
12,3	0,503	0,915	0,072
4,1	0,352	0,467	0,070
1,3	0,170	0,124	0,071
0	0,171	0,061	0,090

Adsorbido	Fusión MISR-hsp70	Péptido MISR	Hsp70
Clon de Mab	MISR G7		
ng/ml			
1000	1,956	1,936	0,146
333	1,753	1,584	0,106
111	1,306	1,166	0,098
37	0,805	0,684	0,099
12,3	0,471	0,301	0,104
4,1	0,322	0,117	0,101
1,3	0,163	0,055	0,097
0	0,180	0,062	0,110