

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 924**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2009 PCT/US2009/041029**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2009 WO09129502**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2009 E 09732789 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2285397**

54 Título: **Inmunoterapias que emplean vacunas autoensamblantes**

30 Prioridad:

**18.04.2008 US 46195 P**

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

**30.01.2018**

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION  
(100.0%)**

**55 Fruit Street  
Boston, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

**GELFAND, JEFFREY A.;  
POZNANSKY, MARK C.;  
LEBLANC, PIERRE R. y  
KOROCHKINA, SVETLANA E.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 651 924 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**

Inmunoterapias que emplean vacunas autoensamblantes

**5 ANTECEDENTES**

La inmunización con vacunas sigue siendo una piedra angular de la protección contra la amenaza de enfermedad e infección. La dificultad clave en el desarrollo de una vacuna es corresponder rápidamente una vacuna, o antitoxina, con una amenaza específica. Las estrategias actuales de desarrollo de vacunas se basan en la identificación y caracterización de antígenos que se pueden dirigir para erradicar con éxito una infección o enfermedad. Las estrategias actuales de desarrollo de vacunas requieren mucho tiempo y mano de obra, y solo pueden comenzar una vez que surge una amenaza. Dichas estrategias tampoco son prácticas para generar vacunas personalizadas para combatir enfermedades para las cuales los antígenos diana varían entre individuos. Las estrategias actuales de desarrollo de vacunas son, por lo tanto, insuficientes si surgiera una amenaza nueva y grave, para la cual no se dispuso de tiempo suficiente para identificar y caracterizar los antígenos diana antes de que pudiera contenerse dicha amenaza. Las estrategias actuales de desarrollo de vacunas también son insuficientes para generar vacunas personalizadas para la población en general.

Por lo tanto, existe la necesidad de una plataforma tecnológica o generación de vacunas personalizadas y de contener amenazas graves que evolucionan rápidamente, son de acción rápida y/o altamente contagiosas.

**RESUMEN DE LA INVENCION**

La presente invención se define por las reivindicaciones. En un aspecto, la presente invención presenta composiciones farmacéuticas que pueden administrarse a un sujeto para inducir una respuesta inmune a un antígeno de interés. En una realización, la composición farmacéutica que comprende una proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina, donde la proteína de unión a biotina es avidina, estreptavidina, neutravidina, o la proteína de unión a biotina es una proteína que es al menos un 80 % idéntica a avidina o estreptavidina; y la proteína de unión a biotina se une de forma no covalente a un anticuerpo manipulado monoclonal biotinilado, o cuatro componentes biotinilados, donde al menos dos de los cuatro componentes biotinilados no son idénticos.

En cierto caso, los componentes biotinilados son las mismas o diferentes moléculas. Los ejemplos no limitantes de componentes biotinilados incluyen proteínas, células y virus biotinilados. Los ejemplos no limitantes de proteínas biotiniladas incluyen antígenos biotinilados, anticuerpos y moléculas coestimulantes.

En una realización adicional, la proteína de unión a biotina se selecciona del grupo que consiste en avidina, estreptavidina y neutravidina. En una realización adicional, la proteína de choque térmico es una proteína de choque térmico de mamífero o una proteína de choque térmico bacteriana. En una realización adicional, la proteína de choque térmico se selecciona del grupo que consiste en una proteína de choque térmico MTBhsp70 y una proteína de choque térmico humana. En una realización adicional, la composición farmacéutica es una vacuna. Las composiciones de la presente invención se pueden usar profilácticamente para aumentar la inmunidad frente a un antígeno de interés, evitando el establecimiento y la proliferación de virus o células en un sujeto que expresa y que muestra el antígeno de interés o que presenta porciones del mismo. De esta manera, puede lograrse la prevención del establecimiento y la proliferación de células tumorales o extrañas que expresan el antígeno de interés. Las composiciones proporcionadas en el presente documento también se pueden usar terapéuticamente en un sujeto previamente infectado con virus o que alberga dichas células para evitar una proliferación vírica o celular adicional o para eliminar células del sujeto que proliferan, incluyendo células tumorales que expresan y muestran el antígeno de interés o que presentan una porción del antígeno.

En otro caso, las composiciones comprenden vectores de expresión capaces de dirigir la expresión de proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina y/o proteínas a biotinar, como se proporciona en el presente documento.

En otra realización más, la presente invención proporciona métodos para producir una composición farmacéutica de autoensamblaje, que comprende poner en contacto una proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina con un anticuerpo manipulado monoclonal biotinilado, o cuatro componentes biotinilados, donde al menos dos de los cuatro componentes biotinilados no son idénticos, suficientes para formar un complejo no covalente de la proteína de choque térmico, el anticuerpo manipulado monoclonal biotinilado o los cuatro componentes biotinilados. La presente invención también proporciona métodos para inducir una respuesta inmune en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina y cuatro componentes biotinilados, donde al menos dos de los cuatro componentes biotinilados no son idénticos. La presente invención proporciona además métodos para aumentar la potencia de un producto terapéutico en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina y cuatro componentes biotinilados, donde al menos dos de los cuatro componentes biotinilados no son idénticos.

La administración de un anticuerpo monoclonal biotinilado y una proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina puede reforzar drásticamente la eficacia inmunológica y la potencia de los anticuerpos monoclonales disponibles, que de otro modo servirían como inmunógenos vacunales débiles. Además, la disponibilidad de un anticuerpo monoclonal o un suero inmune contra un antígeno diana específico puede ser suficiente por sí sola para producir un complejo inmunoestimulador que podría estimular la producción de anticuerpos contra un antígeno de interés y la estimulación de linfocitos T citotóxicos. Finalmente, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento evitarán la necesidad de crear proteínas de fusión de choque térmico específicas de scFv para cada scFv específico de antígeno y/o anticuerpo.

Por lo tanto, la presente invención proporciona ventajas claras sobre las tecnologías existentes al permitir: 1) la preparación de la vacuna frente a un antígeno o antígenos no caracterizados y no identificados; 2) preparación de vacunas personalizadas; 3) producción rápida de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, vacunas), que, a su vez, permiten una capacidad aumentada para la producción de tales composiciones farmacéuticas; y 4) "sobrealimentación" de productos terapéuticos existentes tales como anticuerpos monoclonales. Las tecnologías descritas en el presente documento proporcionan el autoensamblaje de adyuvantes fijos y potentes con una diversidad de diferentes antígenos, péptidos o moléculas dirigidas a antígenos, incluyendo anticuerpos monoclonales específicos de antígenos tumorales de anticuerpos monocatenarios.

Se describirán características y ventajas adicionales en la descripción detallada y las reivindicaciones.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIGURA 1** ilustra la modificación del vector de expresión pET-45b(+). A) Esquema de la inserción del sitio de restricción Sfil. B) Sitios de clonación múltiple finales del vector pET-45b(+) modificado.

La **FIGURA 2** muestra la introducción de los sitios de restricción NotI y XhoI en MTBhsp70. Utilizando cebadores que solapan los extremos N y C de MTBhsp70, se introdujeron por PCR un sitio NotI y un sitio XhoI. El producto de PCR resultante se muestra en el carril 1.

La **FIGURA 3** muestra la digestión del MTBhsp70 amplificado con NotI y XhoI produciendo 2 bandas como se muestra en la imagen del gel. Los análisis de secuenciación establecieron la presencia de sitios internos NotI y Sfil.

La **FIGURA 4** muestra la eliminación de los sitios NotI y Sfil mediante el uso de mutagénesis de sitio dirigido basada en PCR. Usando cebadores modificados que contenían las mutaciones deseadas, se generaron dos productos de PCR solapantes. Estos se extendieron por PCR en ausencia de cebadores seguido de la adición de cebadores específicos.

La **FIGURA 5** muestra la introducción del péptido de Ovoalbúmina (residuos 254-264) en el extremo N-terminal de MTBhsp70. Se diseñó un enlazador sintético que codificó el péptido de Ovoalbúmina SIINFEKL y se digirió con Sfil y NotI. De forma similar, se cortó el plásmido pET-45b(+) MTBhsp70 con Sfil y NotI. Ambos componentes se ligaron y el producto de ligación se usó para transformar bacterias competentes. Las colonias resistentes a ampicilina se recogieron y cribaron mediante secuenciación.

La **FIGURA 6** muestra la secuenciación parcial de la región N-terminal de Ova<sub>257-264</sub>-MTBhsp70.

La **FIGURA 7** es una estructura esquemática de fusiones de proteínas de choque térmico de una composición farmacéutica de autoensamblaje. Se representan las proteínas de choque térmico MTB HSP-70 y HSP-70 humana fusionadas cada una por separado a Avidina como proteína de unión a biotina.

La **FIGURA 8** representa una estrategia para el ensamblaje de Avidina de tipo silvestre y monomérica.

La **FIGURA 9** ilustra una comparación de aminoácidos y nucleótidos entre Avidina monomérica y de tipo silvestre.

La **FIGURA 10** ilustra los errores de secuencia corregidos por mutagénesis basada en PCR.

La **FIGURA 11** ilustra secuencias de Avidina monomérica/de tipo silvestre-Enlazador-MTBhsp70 con la secuencia parcial de MTBhsp70 mostrada.

La **FIGURA 12** muestra el replegamiento de proteínas de Avidina-Enlazador-MTBhsp70 encontradas en cuerpos de inclusión.

La **FIGURA 13** es un esquema de un autoensamblaje multivalente de una fusión de proteína de choque térmico (mostrada como una proteína de fusión de MTb HSP70 y Avidina) y cuatro componentes biotinilados (mostrados como péptidos biotinilados 1-4) para formar una vacuna multivalente autoensamblada.

La **FIGURA 14** representa las secuencias de proteína de longitud completa de HSP70 de *Mycobacterium*

*tuberculosis* HSP70 de *Mycobacterium bovis*, respectivamente.

La **FIGURA 15** es una representación de una vacuna autoensamblada de una proteína de fusión de choque térmico y un componente biotinilado. La proteína de fusión por choque térmico aquí se muestra como fusión de HSP-Avidina, y el componente biotinilado se muestra como un anticuerpo monoclonal biotinilado (mAb biotinilado).

La **FIGURA 16** muestra un análisis de citometría de flujo de la producción de interferón- $\gamma$ .

La **FIGURA 17** muestra un modelo molecular bidimensional de una fusión de MTb HSP70-Avidina con 4 fusiones monoméricas de HSP-avidina unidas como un tetrámero alrededor de 4 miembros de avidina tetramerizados, ya que se une para unirse a la biotina.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Definiciones

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

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

El término "administración" o "administración" incluye cualquier método de administración de una composición farmacéutica de la presente invención, incluyendo, administración sistémica o localizada. "Parenteral" se refiere a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intralesional, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal, oral, epidural, intranasal, e infusión.

El término "aminoácido" pretende incluir todas las moléculas, ya sean naturales o sintéticas, que incluyan tanto una funcionalidad amino como una funcionalidad ácida y sean capaces de incluirse en un polímero de aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos ejemplares 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.

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. El término "anticuerpo" pretende incluir anticuerpos completos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Estas proteínas pueden derivarse de fuentes naturales, o pueden producirse, en parte o totalmente, 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 ejemplares, los anticuerpos utilizados con los métodos y composiciones que se describen en el presente documento son derivados de la clase IgG. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo manipulado o de origen natural.

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a cualquier derivado de un anticuerpo que es menor que la longitud completa. En realizaciones ejemplares, el fragmento de anticuerpo conserva al menos una parte significativa de la capacidad de unión específica del anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fc, 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. Como alternativa, 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.

Un "antígeno" se refiere a una diana de una respuesta inmune inducida por una composición descrita en el presente documento. Un antígeno puede ser un antígeno de proteína y se entiende que incluye una proteína completa, un fragmento de la proteína mostrada en la superficie de un virus o una célula infectada, extraña o tumoral de un sujeto, así como un péptido mostrado por una célula infectada, extraña, o tumoral como resultado del procesamiento y presentación de la proteína, por ejemplo, a través de las vías típicas MHC clase I o II. Los ejemplos de tales células extrañas incluyen bacterias, hongos y protozoos. Los ejemplos de antígenos bacterianos incluyen Proteína A (PrA), Proteína G (PrG) y Proteína L (PrL).

La expresión "sitio de unión a antígeno" se refiere a una región de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo en un antígeno.

5 La expresión "proteína de unión a biotina" se refiere a una proteína, que se une no covalentemente a biotina. Una proteína de unión a biotina puede ser un monómero, dímero o tetrámero, capaz de formar composiciones farmacéuticas monovalentes, divalentes o tetravalentes, respectivamente, como se describe en el presente documento. Los ejemplos no limitantes incluyen anticuerpos anti-biotina, avidina, estreptavidina y neutravidina. La  
10 avidina puede comprender avidina madura, o una secuencia que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o un 99 % idéntica a la secuencia identificada por el Acceso NCBI N.º NP\_990651. La estreptavidina puede comprender, por ejemplo, una secuencia que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o un 99 % idéntica a la secuencia identificada por el Acceso NCBI N.º AAU48617. La expresión "proteína de unión a biotina" pretende incluir el tipo silvestre y los derivados de avidina, estreptavidina y neutravidina, que forman monómeros, dímeros o tetrámeros. Los ejemplos de dichos derivados se exponen a continuación y también se describen en Laitinen, O. H. (2007), "Brave New  
15 (Strept)avidins in Biotechnology", Trends in Biotechnology 25 (6): 269-277 y Nordlund, H. R. (2003), "Introduction of histidine residues into avidin subunit interfaces allows pH-dependent regulation of quaternary structure and biotin binding", FEBS Letters 555: 449-454, cuyo contenido se incorpora expresamente en el presente documento por referencia.

20 El término "célula" cuando se usa en el contexto como un componente biotinilado que contiene antígeno pretende incluir células completas o porciones de las mismas, siempre que las porciones contengan el antígeno de interés en una superficie accesible para reconocimiento por el sistema inmune cuando una composición farmacéutica que comprende la "célula" biotinilada se administra a un sujeto.

25 El término "comprender" y la expresión "que comprende" se usan en el sentido abierto inclusivo, lo que significa que se pueden incluir elementos adicionales.

La expresión "molécula coestimulante" como se usa en el presente documento, incluye cualquier molécula que sea capaz de potenciar el efecto estimulante de un estimulante de los linfocitos T primarios específicos de antígeno o  
30 elevar su actividad más allá del nivel umbral requerido para la activación celular, dando como resultado la activación de linfocitos T sin tratar. Tal molécula coestimuladora puede ser una proteína receptora residente en la membrana.

La expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una composición farmacéutica que es suficiente para lograr un resultado deseado. Una cantidad eficaz de una composición farmacéutica puede administrarse en una o más  
35 administraciones.

La expresión "anticuerpo manipulado" se refiere a una molécula recombinante que comprende al menos un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno derivado del dominio variable de la cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo y puede comprender opcionalmente la totalidad o parte de los dominios variables y/o constantes de un anticuerpo de cualquiera de las clases de Ig (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM e  
40 IgY). Los ejemplos de anticuerpos manipulados incluyen anticuerpos monoclonales monocatenarios potenciados y anticuerpos monoclonales potenciados. Los ejemplos de anticuerpos manipulados se describen adicionalmente en el documento PCT/US2007/061554, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia.

45 El término "epítipo" se refiere a la región de un antígeno a la que un anticuerpo se une preferible y específicamente. Un anticuerpo monoclonal se une preferiblemente a un único epítipo específico de una molécula que puede definirse molecularmente. En la presente invención, pueden reconocerse múltiples epítopos por un anticuerpo multiespecífico.

50 Una "proteína de fusión" se refiere a una proteína híbrida que comprende secuencias de al menos dos proteínas diferentes. Las secuencias pueden ser de proteínas del mismo o de diferente organismo. En diversas realizaciones, la proteína de fusión puede comprender una o más secuencias de aminoácidos unidas a una primera proteína. En el caso en el que se fusiona más de una secuencia de aminoácidos a una primera proteína, las secuencias de fusión pueden ser múltiples copias de la misma secuencia, o como alternativa, pueden ser diferentes secuencias de  
55 aminoácidos. Una primera proteína puede fusionarse al extremo N-terminal, C-terminal, o N- y C- terminal de una segunda proteína.

La expresión "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 de forma N-terminal al enlace disulfuro entre la cadena H y genera dos fragmentos Fab de una molécula de anticuerpo.  
60

La expresión "fragmento F(ab)<sub>2</sub>" 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.  
65

El término "fragmento Fc" se refiere al fragmento de un anticuerpo que comprende el dominio constante de su

cadena pesada.

El término "fragmento Fv" se refiere al fragmento de un anticuerpo que comprende los dominios variables de su cadena pesada y su cadena ligera. "Construcción génica" se refiere a un ácido nucleico, tal como un vector, plásmido, genoma viral o similar, que incluye una "secuencia codificante" 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 codificante en las células transfectadas con la construcción. La construcción génica puede incluir uno o más elementos reguladores unidos operativamente a la secuencia codificante, así como secuencias intrónicas, sitios de poliadenilación, origen de replicación, genes marcadores, etc.

"Célula huésped" se refiere a una célula que pueden transducirse 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 las de un organismo. Se entiende que tales términos se refieren no sólo a la célula objeto 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 precursora, pero todavía se incluyen dentro del alcance del término como se usa en el presente documento.

El término "inmunógeno" se refiere a la capacidad de una sustancia para provocar una respuesta inmune. Una "composición inmunógena" o "sustancia inmunógena" 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.

La expresión "que incluye" se usa en el presente documento para referirse a "que incluye, pero sin limitación". "Que incluye" y "que incluye, pero sin limitación" se utilizan indistintamente.

El término "enlazador" se reconoce en la técnica y se refiere a una molécula o grupo de moléculas que conectan dos restos covalentes, tal como una proteína de choque térmico y una proteína de unión a biotina. El enlazador puede estar compuesto por una única 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 resto en una distancia específica.

La expresión "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.

El término "multivalente", cuando se hace referencia a una composición farmacéutica de autoensamblaje descrita en el presente documento, se refiere a una proteína de fusión de choque térmico que está unida de forma no covalente a más de un componente biotinilado. El término "divalente", cuando se hace referencia a una composición farmacéutica de autoensamblaje descrita en el presente documento, se refiere a una proteína de fusión por choque térmico que está unida de forma no covalente a dos componentes biotinilados. El término "tetraivalente", cuando se hace referencia a una composición farmacéutica de autoensamblaje descrita en el presente documento, se refiere a una proteína de fusión por choque térmico que está unida de forma no covalente a cuatro componentes biotinilados. Los componentes biotinilados de una composición farmacéutica multivalente pueden tener identidades idénticas o diferentes.

La expresión "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 cuando sea aplicable a la realización que se describe, polinucleótidos monocatenarios (tales como, de sentido o antisentido) y bicatenarios.

Un "paciente" o "sujeto" o "huésped" se usan de forma intercambiable, y cada uno se refiere a un animal no humano o humano.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a las composiciones farmacéuticas que son, dentro del alcance del criterio médico, adecuadas para su uso 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.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento, se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga, diluyente, excipiente líquidos o sólidos, o material de encapsulación de disolvente, implicados en llevar o transportar la composición farmacéutica 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 vehículos 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 exenta de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) Solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones de pH tamponado; y (21) poliésteres, policarbonatos, y/o polianhídridos; y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

A menos que el contexto indique claramente otra cosa, "proteína", "polipéptido" y "péptido" se usan indistintamente en el presente documento cuando se refieren a un producto de expresión génica, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que se codifica por una secuencia codificante. Una "proteína" también puede referirse a una asociación de una o más proteínas, tal como un anticuerpo. Una "proteína" también puede hacer referencia a un fragmento de proteína. Una proteína puede ser una proteína modificada postraduccionalmente tal como una proteína glicosilada. Por "producto de expresión génica" se refiere a una molécula que se produce como resultado de la transcripción de un gen entero o parte de un gen. Los productos génicos incluyen moléculas de ARN transcritas a partir de un gen, así como proteínas traducidas a partir de dichos transcritos. Las proteínas pueden ser proteínas aisladas de origen natural o pueden ser el producto de una síntesis recombinante o química. La expresión "fragmento de proteína" se refiere a una proteína en la que los residuos de aminoácido se eliminan, en comparación con la propia proteína de referencia, pero donde la secuencia de aminoácidos restante es por lo general idéntica a la de la proteína de referencia. Tales deleciones pueden producirse en el extremo amino-terminal o carboxi-terminal de la proteína 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. Se pueden obtener fragmentos de proteínas para fragmentar una proteína más grande, o mediante métodos recombinantes, tales como la expresión de solo una parte de una secuencia de nucleótidos que codifica proteínas (ya sea en solitario o fusionada con otra secuencia de ácidos nucleicos que codifica proteínas). En diversas realizaciones, un fragmento puede comprender una actividad enzimática y/o un sitio de interacción de la proteína de referencia para, por ejemplo, un receptor celular. En otro caso, un fragmento puede tener propiedades inmunógenas. Las proteínas pueden incluir mutaciones introducidas en loci particulares mediante una diversidad de técnicas conocidas, que no afectan adversamente, pero pueden potenciar, su uso en los métodos proporcionados en el presente documento. Un fragmento puede conservar una o más de las actividades biológicas de la proteína de referencia.

El término "autoensamblaje" como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de una proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina para formar un complejo no covalente con uno o más componentes biotinilados como se describe en el presente documento. Tal capacidad es conferida por la asociación no covalente de biotina con una proteína de unión a biotina.

La expresión "fragmento variable monocatenario" 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.

"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 sin limitación) la administración de una composición, tal como una composición farmacéutica, y puede realizarse de forma profiláctica, o después del inicio de un evento patológico.

El término "vacuna" se refiere a una composición farmacéutica que provoca una respuesta inmune a un antígeno de interés. La vacuna también puede conferir inmunidad protectora a un sujeto.

"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 realizar una replicación y/o expresión autónoma de ácidos nucleicos a los que están unidos. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente se denominan en el presente 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 bicatenarios, que en su forma de vector no están unidos al cromosoma. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se usan indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, como se apreciará por los expertos en la técnica, la invención pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión que realizan funciones equivalentes y que serán conocidas posteriormente en la técnica.

El término "virus" cuando se usa en el contexto como un componente biotinilado que contiene antígeno pretende incluir partículas víricas completas o porciones de las mismas, siempre que las porciones contengan el antígeno de interés en una superficie accesible para reconocimiento por el sistema inmune cuando una composición farmacéutica que comprende el "virus" biotinilado se administra a un sujeto.

### **General**

En el presente documento se presenta una plataforma de vacuna novedosa que combina múltiples componentes inmunológicos para generar una respuesta inmune altamente potente cuando se administra a un sujeto. También se proporcionan composiciones y métodos para unir las múltiples subunidades para el ensamblaje rápido de la nueva vacuna.

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que una fusión de proteína de choque térmico en asociación no covalente con un componente biotinilado de anticuerpo o antígeno da como resultado una composición que estimula fuertemente respuestas celulares, en particular citolíticas mediadas por células, contra la antígeno proteico no asociado covalentemente, cuyas respuestas pueden matar las células que presentan el antígeno.

### **Fusiones de proteínas de choque térmico**

Una "proteína de choque térmico" está codificada por un "gen de choque térmico" o un gen de estrés, y se refiere a un gen que se activa o de otro modo se aumenta de forma detectable debido al contacto o expresión de un organismo (que contiene el gen) a un factor de estrés, tal como choque térmico, hipoxia, privación de glucosa, sales de metales pesados, inhibidores del metabolismo energético y del transporte de electrones, y desnaturalizantes de proteínas, o a ciertas ansamicinas de benzoquinona. Nover, L., Heat Shock Response, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1991). "Proteína de choque térmico" también incluye proteínas homólogas codificadas por genes dentro de las familias de genes de estrés conocidas, aún cuando dichos genes homólogos no son inducidos por sí mismos por un factor de estrés.

Una "fusión de proteína de choque térmico" se refiere a una proteína de choque térmico unida a una proteína de unión a biotina. Por ejemplo, una proteína de choque térmico puede unirse en C o N-terminal en una proteína de unión a biotina para generar una fusión de proteína de choque térmico. Cuando se administra junto con un componente biotinilado proporcionado en el presente documento, una fusión de proteína de choque térmico es capaz de estimular o potenciar respuestas inmunes humorales y/o celulares, incluyendo respuestas de linfocitos T citotóxicas CD8 (CTL), a un antígeno de interés.

Por ejemplo, pero no a modo de limitación, las proteínas de choque térmico que pueden usarse de acuerdo con la invención incluyen BiP (también denominado grp78), Hsp10, Hsp20-30, Hsp60 hsp70, hsc70, gp96 (grp94), hsp60, hsp40, y Hsp100-200, Hsp100, Hsp90, y miembros de sus familias. Las proteínas de choque térmico especialmente preferidas son BiP, gp96 y hsp70, como se ilustra a continuación. Un grupo particular de proteínas de choque térmico incluye Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp20-30, más preferiblemente Hsp70 y Hsp60. El más preferido es un miembro de la familia hsp70.

Los ejemplos de Hsp10 incluyen GroES y Cpn10. Hsp10 se encuentra típicamente en E. coli y en mitocondrias y cloroplastos de células eucarióticas. Hsp10 forma un anillo de siete miembros que se asocia con oligómeros de Hsp60. Hsp10 también está involucrado en el plegamiento de proteínas.

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. Los homólogos de Hsp60 están presentes en las mitocondrias eucariotas y los cloroplastos.

Los ejemplos de Hsp70 incluyen Hsp72 y Hsc73 de células de mamífero, DnaK de bacterias, particularmente micobacterias tales como Mycobacterium leprae, Mycobacterium tuberculosis (MTb) y Mycobacterium bovis (tales como Bacille-Calmette Guerin, denominado en el presente documento Hsp71), DnaK de Escherichia coli, levadura, y otros procariontes, y BiP y Grip78. Hsp70 es capaz de unirse específicamente a ATP, así como proteínas

desplegadas, participando así en el plegamiento y despliegue de proteínas, así como en el ensamblaje y desensamblaje de complejos proteicos. En una realización preferida, la proteína de choque térmico es o se obtiene a partir de MTb HSP 70. Las secuencias de proteína 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. Una fusión de proteína de choque térmico a usar junto con los métodos descritos en el presente documento puede comprender una secuencia que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o un 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 o 2.

Los ejemplos de Hsp90 incluyen HtpG en *E. coli*, Hsp83 y levadura de Hsc83, y Hsp90 alfa, Hsp90 beta y Grip94 en seres humanos. Hsp90 se une a grupos de proteínas, que 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 proteicos grandes y abundantes que incluyen otras proteínas de choque térmico.

Los ejemplos de Hsp100 incluyen Hsp 110 de mamífero, Hsp104 de levadura, ClpA, ClpB, ClpC, ClpX y ClpY. Hsp104 de levadura y *E. coli* ClpA, forman hexámeros y ClpB de *E. coli*, partículas tetraméricas cuyo ensamblaje parece requerir la unión del nucleótido de adenina. La proteasa Clp proporciona un heterooligómero de 750 kDa compuesto por ClpP (una subunidad proteolítica) y por ClpA. ClpB-Y están estructuralmente relacionados con ClpA, aunque a diferencia de ClpA no parecen formar complejos con ClpP.

Los ejemplos de Hsp100-200 incluyen Grip 170 (para proteína regulada por glucosa). Grip 170 reside en el lumen del ER, en el compartimento pre-golgi, y puede desempeñar un papel en el plegamiento y ensamblaje de inmunoglobulinas.

Pueden usarse mutantes de origen natural o derivados recombinantes de proteínas de choque térmico de acuerdo con la invención. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, la presente invención proporciona el uso de proteínas de choque térmico mutadas para facilitar su secreción de la célula (por ejemplo, teniendo una mutación o delección de un elemento que facilita la recaptura del retículo endoplásmico, tal como KDEL (SEQ ID NO:266) o sus homólogos; dichos mutantes se describen en la Solicitud PCT N.º PCT/US96/13233(WO 97/06685), en casos particulares, las proteínas de choque térmico de la presente invención se obtienen de enterobacterias, micobacterias (particularmente *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.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento pueden tener residuos de aminoácidos individuales que se modifican por oxidación o reducción. Además, se pueden realizar diversas sustituciones, delecciones o adiciones a las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, cuyo efecto neto es retener o mejorar aún más la actividad biológica aumentada de la proteína de choque térmico. 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. La expresión "proteína de choque térmico" pretende incluir fragmentos de proteínas de choque térmico obtenidas a partir de proteínas de choque térmico, con la condición de que dichos fragmentos incluyan los epítomos implicados en la mejora de la respuesta inmune a un antígeno de interés. Se pueden obtener fragmentos de proteínas de choque térmico usando proteinasas, o mediante métodos recombinantes, tales como la expresión de solo parte de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de estrés (en solitario o fusionada con otra secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína). Las proteínas de choque térmico pueden incluir mutaciones introducidas en loci particulares mediante una diversidad de técnicas conocidas para potenciar su efecto sobre el sistema inmune. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Drinkwater y Klinedinst Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3402-3406 (1986); Liao y Wise, *Gene* 88:107-111 (1990); Horwitz et al., *Genome* 3:112-117 (1989).

En casos particulares, por ejemplo, en fusiones de proteínas de choque térmico que implican conjugados químicos entre una proteína de choque térmico y una proteína de unión a biotina, las proteínas de choque térmico usadas en la presente invención 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. En algunas realizaciones, cuando el choque térmico se expresa de forma recombinante como una fusión de una proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina, las fusiones de proteína de choque térmico usadas en la presente invención son fusiones aisladas de proteína de choque térmico, lo que significa que las fusiones de proteína de choque térmico se han seleccionado y separado de la célula huésped en la que se produjeron. Dicho aislamiento se puede realizar como se describe en el presente documento y usando métodos de rutina de aislamiento de proteínas conocidos en la técnica. Maniatis et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Deutscher, M., *Guide to Protein Purification Methods Enzymology*, vol. 182, Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (1990).

### **Componentes biotinilados**

La expresión "componente biotinilado" como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína, célula o

virus biotinilado. Los ejemplos no limitantes de proteínas biotiniladas incluyen antígenos biotinilados, anticuerpos y moléculas coestimulantes. El componente biotinilado debe administrarse a un sujeto junto con una fusión de proteína de choque térmico como se describe en el presente documento.

#### 5 **i) Componentes biotinilados que contienen antígeno**

10 En una realización, el componente biotinilado se deriva de un sujeto, que puede ser la misma o una persona diferente a la que se van a administrar las composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, una proteína, célula y/o virus a los que se desea una respuesta inmune se pueden aislar de un sujeto y opcionalmente se pueden amplificar o clonar in vitro. La proteína, célula y/o virus pueden biotinilarse entonces in vitro utilizando métodos conocidos en la técnica. El componente biotinilado puede entonces administrarse junto con una fusión de proteína de choque térmico descrita en el presente documento al sujeto idéntico del cual se aisló la proteína, célula y/o virus, permitiendo así el desarrollo de vacunas personalizadas. Como alternativa, el componente biotinilado se puede administrar junto con una fusión de proteína de choque térmico descrita en el presente documento a un sujeto diferente del cual se aisló la proteína, célula y/o virus. El último enfoque permite el desarrollo de vacunas para la población general contra una enfermedad o agente infeccioso cuando se administra a una población general.

20 Ambos enfoques proporcionan ventajas claras sobre la técnica, concretamente, que el componente solo necesita identificarse en la medida en que permita su correlación con una enfermedad o infección específica y permita su aislamiento del sujeto. Éste es un enfoque novedoso para dirigir antígenos cuya secuencia puede no conocerse o incluso puede identificarse la estructura. Por lo tanto, la presente invención permite la preparación de composiciones farmacéuticas para inducir una respuesta inmune contra un antígeno o antígenos conocidos, no caracterizados, no identificados. Las vacunas personalizadas proporcionan una ventaja adicional sobre las vacunas convencionales ya que la restricción de HLA no es problemática debido a que la célula o proteína, tal como un anticuerpo, por ejemplo, se deriva del huésped idéntico al que se va a administrar el componente biotinilado.

30 En lugar de unir directamente péptidos antigénicos sintéticos a proteínas de choque térmico para generar una vacuna, scFV, por ejemplo, pueden conjugarse en cambio con biotina y se administran junto con un resto de fusión de proteína de choque térmico descrito en el presente documento, empleando de este modo una novedosa vacuna de proteínas de fusión para la presentación de antígenos a APC con el fin de generar tanto una respuesta humoral como CD-8. Los scFV1 pueden, por ejemplo, seleccionarse mediante su unión a un antígeno no caracterizado o a un antígeno caracterizado mediante estudios de unión. En este ejemplo, los scFV deben ser biotinilados y administrados junto con un resto de fusión de proteína de choque térmico, por ejemplo.

35 De la misma manera, cualquier proteína, célula, y/o virus puede biotinilarse y administrarse a un sujeto junto con un resto de fusión de proteína de choque térmico descrito en el presente documento, de tal forma que la proteína biotinilada, célula, y/o virus al administrarse junto con una proteína de fusión de choque térmico descrita en el presente documento, se dirige a una respuesta inmune a un antígeno de interés.

40 Un ejemplo de dicha célula es una célula tumoral aislada de un sujeto, que está biotinilada y se administra junto con una fusión de proteína de choque térmico descrita en el presente documento. La célula tumoral antes de la introducción o reintroducción en un sujeto en la presente invención se debe tratar de manera que la célula ya no se reproduzca ni cause daño al sujeto al que se administra. Esto se puede lograr irradiando de manera subletal la célula tumoral antes o después de la biotinilación. La célula tumoral expresa el antígeno en su superficie, cuya identidad puede o no ser conocida o caracterizada. Cuando se administra a un sujeto junto con la fusión de proteína de choque térmico, el complejo no covalente induce una respuesta inmune al antígeno tumoral. El resultado es una respuesta de "linfocito T asesino" contra el antígeno que expresa la célula, dirigiendo así los tipos de células enfermas para la destrucción.

50 La célula tumoral es una célula de un tipo de cáncer a tratar o prevenir mediante los métodos de la presente invención. Dichas células incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, una célula de sarcoma humano o una célula de carcinoma, por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, carcinoma de colon, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leucemias, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia); leucemia crónica (leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica); y policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, o enfermedad de cadena pesada.

Otras células que pueden biotinilarse y administrarse junto con una fusión de proteína de choque térmico de la misma manera que la descrita anteriormente incluyen cualquier célula en un sujeto al que se desea una respuesta de "linfocito T asesino". Los ejemplos de dichas células incluyen otras células enfermas y/o infectadas víricamente que expresan antígeno en su superficie. Como se ha descrito anteriormente para las células tumorales, estas células antes de la introducción o reintroducción en un sujeto en la presente invención se tratan preferiblemente de tal forma que las células ya no se reproducen ni causan daño al sujeto. Esto se puede lograr irradiando de manera subletal las células antes o después de la biotinilación. Dichas células pueden tratarse de manera que se vuelvan no infecciosas o, si son células secretoras de toxinas, ya no secretan toxina.

Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse mediante los métodos de la presente invención están causadas por agentes infecciosos. Dichos agentes infecciosos o antígenos derivados de los mismos, que pueden biotinilarse y administrarse junto con la presente invención, incluyen, pero sin limitación, virus, bacterias, hongos y protozoos. La invención no se limita a tratar o prevenir enfermedades infecciosas causadas por patógenos intracelulares, sino que también pretende incluir patógenos extracelulares. Muchos microorganismos médicamente relevantes se han descrito ampliamente en la bibliografía, por ejemplo, véase C. G. A Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Great Britain 1983, cuyo contenido en su totalidad se incorpora por la presente por referencia.

En un caso, el antígeno que exprese el virus o el antígeno viral puede biotinilarse y administrarse junto con una fusión de proteína de choque térmico de la misma manera que la descrita anteriormente.

Los virus infecciosos de vertebrados tanto humanos como no humanos incluyen retrovirus, virus de ARN y virus de ADN que expresan antígeno. Los ejemplos de virus incluyen, pero sin limitación: retroviridae (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana, tales como VIH-1 (también denominado HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV o VIH-III y otros aislados, tales como HIV-LP; Picomaviridae (por ejemplo, virus de la polio, virus de hepatitis A; enterovirus, virus Coxsackie humanos, rinovirus, echovirus); Calciviridae (por ejemplo, cepas que causan la gastroenteritis); Togaviridae (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); Flaviridae (por ejemplo, virus del dengue, virus de encefalitis, virus de la fiebre amarilla); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (por ejemplo, virus de ébola); Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de parainfluenza, virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial); Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de la influenza); Bungaviridae (por ejemplo, virus Hantaan, virus Bunga, flebovirus y virus Nairo); Arena viridae (virus de la fiebre hemorrágica); Reoviridae (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); Bimaviridae; Hepadnavirida (virus de la hepatitis B); Parvoviridae (parvovirus); Papovaviridae (virus del papiloma, virus de polioma); Adenoviridae (la mayoría de los adenovirus); Herpesviridae (virus del herpes simple (HSV) 1 y 2, el virus de la varicela zoster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes; Poxviridae (virus de la viruela, virus vaccinia, poxvirus), e Iridoviridae (por ejemplo, el virus de la peste porcina africana); y los virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de las encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (se piensa que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de hepatitis diferente de A, diferente de B (clase 1 = transmitidos internamente, clase 2 = transmisión parenteral (es decir, hepatitis C), virus Norwalk y relacionados, y astrovirus).

Los retrovirus que se contemplan incluyen tanto retrovirus simples como retrovirus complejos. Los retrovirus simples incluyen los subgrupos de los retrovirus de tipo B, los retrovirus de tipo C y los retrovirus de tipo D. Un ejemplo de un retrovirus de tipo B es el virus del tumor mamario del ratón (MMTV). Los retrovirus tipo C incluyen subgrupos de tipo C del grupo A (incluyendo el virus del sarcoma de Rous (RSV), virus de la leucemia aviar (ALV), y virus de mieloblastosis aviar (AMV)) y el grupo C de tipo B (incluido el virus de la leucemia murina (MLV), el virus de la leucemia felina (FeLV), virus del sarcoma de murino (MSV), el virus de la leucemia del mono gibón (GALV), virus de la necrosis del bazo (SNV), el virus de reticuloendoteliosis (RV) y el virus del sarcoma de simios (SSV)). Los retrovirus de tipo D incluyen el virus de mono Mason-Pfizer (MPMV) y el retrovirus de simio de tipo 1 (SRV-1). Los retrovirus complejos incluyen los subgrupos de lentivirus, virus de la leucemia de linfocitos T y el virus espumoso. Los lentivirus incluyen el VIH-1, pero también incluyen el VIH-2, SIV, el virus Visna, virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), y el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV). Los virus de la leucemia de linfocitos T incluyen HTLV-1, HTLV-II, el virus de leucemia de linfocitos T del simio (STLV), y el virus de la leucemia bovina (BLV). Los virus espumosos incluyen virus espumoso humano (VAF), virus espumoso del simio (SFV) y el virus espumoso bovino (BFV).

Los ejemplos de virus de ARN que son antígenos en animales vertebrados incluyen, pero sin limitación, los siguientes: miembros de la familia Reoviridae, incluyendo el género Orthoreovirus (múltiples serotipos tanto de retrovirus de mamíferos y aves), el género Orbivirus (virus de la lengua azul, virus Eugenangee, virus Kemerovo, virus de la peste equina y virus de la fiebre de garrapata de Colorado), el género Rotavirus (rotavirus humano, virus de la diarrea de ternero de Nebraska, rotavirus murino, rotavirus de simio, rotavirus bovino u ovino, rotavirus aviar); la familia Picomaviridae, incluyendo el género Enterovirus (poliovirus, virus Coxsackie A y B, virus huérfanos entéricos citopáticos humanos (ECHO), virus de hepatitis A, enterovirus de simio, virus encefalomiелitis murina (ME), muris poliovirus, enterovirus bovino, enterovirus porcino, el género Cardiovirus (virus encefalomiocarditis (EMC), virus Mengo), el género Rinovirus (rinovirus humanos, incluyendo al menos 113 subtipos; otros rinovirus), el género Apthovirus (enfermedad de la fiebre aftosa (FMDV)); la familia Calciviridae, incluyendo exantema vesicular de virus porcino, virus de lobos marinos de San Miguel, picornavirus felina y el virus de Norwalk; la familia Togaviridae,

incluyendo el género Alphavirus (virus de la encefalitis equina del este, virus Semliki Forest, virus Sindbis, virus Chikungunya, virus O'Nyong-Nyong, virus del río Ross, el virus de la encefalitis equina Venezolana, virus de la encefalitis equina occidental), el género Flavivirus (virus transmitido por mosquitos de la fiebre amarilla, virus del Dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis del Valle Murray, virus del Nilo Occidental, virus Kunjin, virus transmitido por la garrapata de Europa central, virus transmitido por la garrapata del Lejano Oriente, virus del bosque Kyasanur, virus Louping III, virus Powassan, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk), el género Rubivirus (virus de la Rubéola), el género Pestivirus (virus de la enfermedad de las mucosas, virus del cólera porcino, virus de la enfermedad de la frontera), la familia Bunyaviridae, incluyendo el género Bunyavirus (Bunyamwera y virus relacionados, virus del grupo encefalitis de California), el género Phlebovirus (virus Sandfly de la fiebre de Sicilia, virus de la fiebre del Valle del Rift), el género Nairovirus (virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus de la enfermedad ovina de Nairobi), y el género Uukuvirus (Uukuniemi y los virus relacionados); la familia Orthomyxoviridae, incluyendo el virus del género influenza (virus de la influenza tipo A, muchos subtipos humanos); Virus de la gripe porcina, y el virus de la gripe aviar y equina, influenza tipo B (muchos subtipos humanos), y la influenza de tipo C (posible género separado), la familia Paramyxoviridae, incluyendo el género Paramyxovirus (virus parainfluenza de tipo 1, virus Sendai, virus Hemadsorción, virus parainfluenza de tipo 2 a 5, virus de la Enfermedad de Newcastle, virus de las paperas), el género Morbillivirus (virus del sarampión, virus panencefalitis esclerosante subaguda, virus del moquillo, virus de la peste bovina), el género Pneumovirus (virus respiratorio sincitial (VRS), virus sincitial respiratorio bovino y el virus de la neumonía de ratones); virus de la selva, virus Sindbis, virus Chikungunya, virus O'Nyong-Nyong, virus del río Ross, virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis equina occidental), el género Flavivirus (transmitida por mosquitos del virus de la fiebre amarilla, virus del Dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis del Valle Murray, virus del Nilo Occidental, virus Kunjin, virus transmitido por la garrapata de europa central, virus de la transmitido por la garrapata del Lejano Oriente, virus del bosque Kyasanur, virus Louping III, virus Powassan, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk), el género Rubivirus (virus de la Rubéola), el género Pestivirus (virus de la enfermedad de las mucosas, virus del cólera porcino, virus de la enfermedad de la frontera); la familia Bunyaviridae, incluyendo el género Bunyavirus (Bunyamwera y virus relacionados, virus del grupo encefalitis de California), el género Phlebovirus (virus de la fiebre por flebótomos siciliana, virusde la fiebre del Valle del Rift ), el género Nairovirus (virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus de la enfermedad ovina de Nairobi ), y el género Uukuvirus (Uukuniemi y virus relacionados), la familia Orthomyxoviridae, incluyendo el virus del género influenza (virus influenza tipo A, muchos subtipos humanos), virus de la gripe porcina, y el virus de la gripe aviar y equina, influenza tipo B (muchos subtipos humanos) y la influenza de tipo C (posible género separado); la familia Paramyxoviridae, incluyendo el género Paramyxovirus (virus de la parainfluenza de tipo 1, el virus Sendai, virus Hemadsorción, virus de la parainfluenza de tipo 2 a 5, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la parotiditis), el género Morbillivirus (virus del sarampión, virus panencefalitis esclerosante subaguda, virus del moquillo, virus de la peste bovina), el género Pneumovirus (virus respiratorio sincitial (VRS), virus respiratorio sincitial bovino y el virus de la neumonía de los ratones); la familia Rhabdoviridae, incluyendo el género Vesiculovirus (VSV), virus ChanBipura, virus Flandes-Hart Park), el género Lyssavirus (virus de la rabia), rabdovirus de peces, y dos rabdovirus probables (el virus de Marburg y el virus del Ébola), la familia Arenaviridae, incluyendo virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM), complejo vírica Tacaribe, y virus de Lassa; la familia Coronaviridae, incluido el virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), el virus de la hepatitis del ratón, coronavirus entérico humano, y peritonitis infecciosa felina (coronavirus felino).

Los virus de ADN ilustrativos que son antígenos en animales vertebrados incluyen, pero sin limitación: la familia Poxviridae, incluyendo el género Orthopoxvirus (Variola mayor, Variola menor, vacuna de viruela de mono, viruela vacuna, viruela de búfalo, viruela de conejo, Ectromelia), el género Leporipoxvirus (Mixoma, fibroma), el género Avipoxvirus (viruela aviar, virus de la viruela aviar de otro tipo), el género capripoxvirus (viruela ovina, viruela caprina), el género Suipoxvirus (viruela porcina), el género parapoxvirus (virus de la dermatitis postular contagioso, pseudoviruela bovina, virus de la estomatitis papular bovina); la familia Iridoviridae (virus de la peste porcina africana, los virus de la rana 2 y 3, el virus de Linfocistis de pescado), la familia Herpesviridae, incluyendo los alfa-herpesvirus (herpes simple tipos 1 y 2, varicela-zoster, el virus del aborto equino, el virus del herpes equino 2 y 3, virus de la pseudorrabia, virus queratoconjuntivitis bovino infecciosa, virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa, virus de la rinotraqueitis felina, virus de la laringotraqueitis infecciosa), los betaherpesvirus (citomegalovirus humano y citomegalovirus de cerdos, monos y roedores); la gamma-herpesvirus (virus Epstein-Barr (VEB), virus de la enfermedad de Marek, Herpes saimiri, Herpesvirus ateles, Herpesvirus sylvilagus, el virus del herpes de conejillo de indias, el virus del tumor de Lucke); la familia Adenoviridae, incluyendo el género Mastadenovirus (subgrupos humanos A, B, C, D, E y no agrupados; adenovirus de simio (al menos 23 serotipos), la hepatitis infecciosa canina, y adenovirus de ganado vacuno, cerdos, ovejas, ranas y muchas otras especies, el género Aviadenovirus (adenovirus aviar); y los adenovirus no cultivables; la familia Papoviridae, incluyendo el género del virus del papiloma (virus del papiloma humano, virus del papiloma bovino, virus del papiloma de conejo Shope, y varios virus del papiloma patógenos de otras especies), el género Polioma (polioma, agente vacuolizante de simio (SV-40), agente vacuolizante de conejo (RKV), virus K, virus BK, virus JC, y otros virus polioma de primates tales como el virus del papiloma linfotrópico); la familia Parvoviridae incluyendo el género de virus Adeno-asociados, el género parvovirus (virus de la panleucopenia felina, parvovirus bovino, parvovirus canino, virus de la enfermedad de visón Aleutianas, etc.). Por último, los virus de ADN pueden incluir virus que no se ajusten a las familias anteriores, tales como los virus de la enfermedad de Kuru y Creutzfeldt-Jacob y agentes neuropáticos crónicos infecciosos.

**ii) Componentes biotinilados que contienen anticuerpos**

En otro caso, los agentes inmunoterapéuticos, tales como los anticuerpos, pueden biotinilarse y administrarse junto con una fusión de proteína de choque térmico como se describe en el presente documento. Los anticuerpos naturales son en sí mismos dímeros y, por lo 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. Dichos 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 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. Por consiguiente, aunque los anticuerpos a usar junto con los presentes métodos pueden incluir anticuerpos manipulados de longitud completa o casi de longitud completa pueden preferirse anticuerpos manipulados de un único dominio más pequeños (que pueden ser multivalentes y multiespecíficos).

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) monocatenario. A veces se introduce un enlace disulfuro entre los dos dominios para una mayor estabilidad.

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  $V_{HY}$   $V_L$  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 et al., 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 monocatenarios, 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", aproximadamente de 90 kDa) o tetrámeros ("tetracuerpo", aproximadamente de 120 kDa) (Le Gall et al., 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 estos anticuerpos manipulados pueden conjugarse con biotina y usarse en los métodos proporcionados en el presente documento.

Otros anticuerpos multivalentes manipulados que pueden usarse junto con los presentes casos se describen en Lu, et al., 2003, J. Immunol. Meth. 279:219-232(di-diacuerpos o anticuerpos biespecíficos tetraivalentes); Solicitud Publicada de Estados Unidos 20050079170(moléculas Fv multiméricas o "flexicuerpos"), y el documento WO99/57150yKipriyanov, et al., 1999, J. Mol. Biol. 293:41-56(diacuerpos en tándem, o "Tandabs").

Cualquiera de los anticuerpos multivalentes manipulados descritos anteriormente pueden desarrollarse por un experto en la técnica utilizando técnicas rutinarias de ADN recombinante, por ejemplo, como se describe en la Solicitud Internacional PCT N.º PCT/US86/02269; la Solicitud de Patente Europea N.º 184.187; la Solicitud de Patente Europea N.º 171.496; la Solicitud de Patente Europea N.º 173.494; la Publicación Internacional PCT N.º WO 86/01533; Pat. de Estados Unidos N.º 4.816.567; Solicitud de Patente Europea N.º 125.023; Better et al. (1988) Science 240:1041-1043; Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-449; Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison (1985) Science 229:1202-1207; Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214; U.S. Pat. No. 5,225,539; Jones et al. (1986) Nature 321:552-525; Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534; Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060; and Winter and Milstein, Nature, 349, pp. 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 et al., Pat. de Estados Unidos N.º 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, págs. 6851-55 (1984)).

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, anticuerpos adaptados de anticuerpos de origen natural, o anticuerpos construidos de novo utilizando secuencias de anticuerpos o que se sabe que son 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 marco u otras porciones de las mismas.

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 donde al menos dos de las regiones variables reconocen diferentes epítomos en el mismo antígeno.

Los anticuerpos candidatos a biotinar se pueden cribar para determinar la actividad usando una diversidad de ensayos conocidos. Por ejemplo, los ensayos de cribado para determinar la especificidad de unión se conocen bien y se realizan habitualmente en la técnica. Para una descripción exhaustiva de tales ensayos, véase Harlow et al. (Eds.), ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, N.Y., 1988, Capítulo 6.

En un caso, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales y/o tienen usos terapéuticos y/o profilácticos in vivo contra el cáncer. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden usarse para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades infecciosas. Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos y profilácticos incluyen, pero sin limitación, ERBITUX® (Cetuximab) (ImClone System), MDX-010 (Medarex, NJ) que es un anticuerpo humanizado anti-CTLA-4 actualmente en uso clínico para el tratamiento de cáncer de próstata; SYNAGIS® (MedImmune, MD) que es un anticuerpo monoclonal de virus sincitial anti respiratorio humanizado (RSV) para el tratamiento de pacientes con infección RSV; HERCEPTIN® (Trastuzumab) (Genentech, CA) que es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado para el tratamiento de pacientes con cáncer metastático de mama. Otros ejemplos son un F(ab')<sub>2</sub> anti-CD18 humanizado (Genentech); CDP860 que es un F(ab')<sub>2</sub> anti-CD18 humanizado (Celltech, Reino Unido); PRO542 que es un anticuerpo anti-HIV gp 120 fusionado con CD4 (Progenics/Genzyme Transgenics); Ostavir que es un anticuerpo anti virus de Hepatitis B humano (Protein Design Lab/Novartis); PROTOVIR™ que es un anticuerpo humanizado anti-CMV IgG1 (Protein Design Lab/Novartis); MAK-195 (SEGARD) que es un F(ab')<sub>2</sub> anti-TNF-α murino (Knoll Pharma/BASF); IC14 que es un anticuerpo anti-CD14 (ICOS Pharm); un anticuerpo IgG1 humanizado anti-VEGF (Genentech); OVAREX™ que es un anticuerpo anti-CA 125 murino (Altarex); PANOREX™ que es un anticuerpo IgG2a de antígeno de superficie celular anti-17-IA murino (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 que es un anticuerpo IgG antiidiotipo (epítipo GD3) murino (ImClone System); IMC-C225 que es un anticuerpo IgG quimérico anti-EGFR (ImClone System); VITAXIN™ que es un anticuerpo anti-αVB3 de integrina humanizado (Applied Molecular Evolution/ MedImmune); Campath 1H/LDP-03 que es un anticuerpo humanizado anti CD52 IgG1 (Leukosite); Smart M195 que es un anticuerpo humanizado anti-CD33 IgG (Protein Design Lab/Kanebo); RITUXAN™ que es un anticuerpo quimérico anti-CD20 IgG1 (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); LYMPHOCIDE™ que es un anticuerpo que es un anticuerpo IgG anti-CD22 inmunizado (Immunomedics); Smart ID10 que es un anticuerpo humanizado anti-HLA (Protein Design Lab); ONCOLY™ (Lym-1) es un anticuerpo radioetiquetado murino anti-HLA DIAGNOSTIC REAGENT (Techniclone); ABX-IL8 es un anticuerpo humano anti-IL8 (Abgenix); anti-CD11a es un anticuerpo IgG1 humanizado (Genentech/Xoma); ICM3 es un anticuerpo humanizado anti-ICAM3 (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo primatizado anti-CD80 (IDEC Pharm/Mitsubishi); ZEVALIN™ es un anticuerpo radioetiquetado murino anti-CD20 (IDEC/Schering AG); IDEC-131 es un anticuerpo humanizado anti-CD40L (IDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo primatizado anti-CD4 (IDEC); IDEC-1 52 es un anticuerpo primatizado anti-CD23 (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es un anticuerpo humanizado anti-CD3 IgG (Protein Design Lab); 501.1 es un anticuerpo humanizado anti-complemento factor 5 (C5) (Alexion Pharm); D2E7 es un anticuerpo humanizado anti-TNF-α (CAT/BASF); CDP870 es un fragmento Fab humanizado anti-TNF-α (Celltech); IDEC-151 es un anticuerpo primatizado anti-CD4 IgG1 (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDXCD4 es un anticuerpo humano anti-CD4 IgG (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo humanizado IgG4 anti-TNF-α (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo humanizado anti-α4B7 (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo humanizado anti-CD4 IgG (Ortho Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo IgG humanizado anti-CD40L (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo IgG humanizado anti-VLA-4 (Elan); MDX-33 es un anticuerpo humano anti-CD64 (FcγR) (Medarex/Centocor); SCH55700 es un anticuerpo IgG4 humanizado anti-IL-5 (Colltech/Schering); SB-240563 y SB-240683 son anticuerpos humanizados anti-IL-5 y IL-4, respectivamente, (SmithKline Beecham); rhuMab-E25 es un anticuerpo humanizado anti-IgE IgG1 (Genentech/Norvartis/Tanox Biosystems); ABX-CBL es un anticuerpo IgM murino anti CD-147 (Abgenix); BTI-322 es un anticuerpo IgG de rata anti-CD2 (Medimmune/Bio Transplant); Orthoclone/OKT3 es un anticuerpo IgG2a murino anti-CD3 (ortho Biotech); SIMULECT™ es un anticuerpo IgG1 quimérico anti-CD25 (Novartis Pharm); LDP-01 es un anticuerpo IgG humanizado anti-β2-integrina (LeukoSite); Anti-LFA-1 es F(ab')<sub>2</sub> anti CD18 murino (Pasteur-Merieux/Immunotech); CAT-152 es un anticuerpo anti-TGF-β2 humano (Cambridge Ab Tech); y Corsevin M es un anticuerpo quimérico anti-Factor VII (Centocor).

### **Vacunas de autoensamblaje**

Se pueden administrar múltiples componentes biotinilados junto con una fusión de proteína de choque térmico como se describe adicionalmente. De esta manera, las composiciones farmacéuticas multivalentes se pueden generar y administrar a un sujeto. La generación de composiciones farmacéuticas multivalentes permite la producción de vacunas y agentes terapéuticos "supercargados" o más potentes. Cuando el componente biotinilado comprende un anticuerpo, dicho vacuna muestra una mejora de la actividad para los anticuerpos comercializados.

Cuando la composición farmacéutica es multivalente, los componentes biotinilados a administrar pueden ser cualquier combinación de componentes biotinilados descrita en el presente documento. Por ejemplo, los componentes biotinilados de las mismas identidades o diferentes pueden administrarse junto con una fusión de

proteína de choque térmico como se proporciona en el presente documento, siempre que la proteína de unión a biotina, y a su vez la fusión de proteína de choque térmico, sea multivalente, o capaz de unirse a múltiples componentes biotinilados. Como ejemplo, la proteína de unión a biotina silvestre de avidina tiene cuatro sitios de unión a biotina y, por lo tanto, es capaz de unirse a cuatro componentes biotinilados. En este ejemplo, los cuatro sitios se unirán mediante cuatro componentes biotinilados, y los componentes de unión a biotina se pueden mezclar y emparejar basándose en la identidad en cualquier permutación de uno, dos, tres o cuatro componentes biotinilados idénticos descritos en el presente documento. Cuatro componentes idénticos biotinilados pueden estar unidos a los cuatro sitios de unión a biotina.

Por lo tanto, una cantidad eficaz de un componente biotinilado con una primera identidad puede administrarse a un sujeto junto con una proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina, suficiente para formar una composición farmacéutica que comprende cuatro partes de componente biotinilado de una primera identidad y una parte de proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina. Como alternativa, una cantidad efectiva de componentes biotinilados con una primera y segunda identidad puede administrarse a un sujeto junto con una proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina, suficiente para formar una composición farmacéutica que comprende tres partes de un componente biotinilado de una primera identidad, una parte de componente biotinilado de una segunda identidad, y una parte de fusión de proteína de choque térmico. En otra realización, una cantidad efectiva de componentes biotinilados con una primera y segunda identidad puede administrarse a un sujeto junto con una proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina, suficiente para formar una composición farmacéutica que comprende dos partes de un componente biotinilado de una primera identidad, dos partes de componente biotinilado de una segunda identidad, y una parte de fusión de proteína de choque térmico.

Cuando la composición farmacéutica de autoensamblaje es divalente, una cantidad eficaz de un componente biotinilado de una primera identidad puede administrarse a un sujeto junto con una proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina, suficiente para formar una composición farmacéutica que comprende dos partes de componente biotinilado de una primera identidad y una parte de fusión de proteína de choque térmico. Como alternativa, una cantidad efectiva de componentes biotinilados con una primera y segunda identidad puede administrarse a un sujeto junto con una proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina, suficiente para formar una composición farmacéutica que comprende una parte de un componente biotinilado de una primera identidad, una parte de componente biotinilado de una segunda identidad, y una parte de fusión de proteína de choque térmico.

Un componente biotinilado de una composición farmacéutica multivalente puede incluir una molécula coestimuladora, o un grupo de bloqueo (es decir, biotina en solitario o biotina conjugada con una molécula no funcional). Los ejemplos de moléculas coestimuladoras que pueden administrarse junto con la presente invención incluyen moléculas B7, incluyendo B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), CD28, CD58, LFA-3, CD40, B7-H3, CD137 (4-1BB), e interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2 o IL-12). Como ejemplo, una parte del componente biotinilado que comprende una molécula coestimuladora se puede administrar junto con i) tres partes de otro componente biotinilado que comprende una proteína, célula o virus; y ii) una parte de proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina. En otro ejemplo, dos partes del componente biotinilado que comprende una molécula coestimuladora se puede administrar junto con i) dos partes de otro componente biotinilado que comprende una proteína, célula o virus; y ii) una parte de proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina. En otro ejemplo, tres partes del componente biotinilado que comprende una molécula coestimuladora se puede administrar junto con i) una parte de otro componente biotinilado que comprende una proteína, célula o virus; y ii) una parte de proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina.

Puede emplearse un mutante de avidina, estreptavidina o neutravidina sensible al pH, por ejemplo, para controlar la interacción no covalente de avidina, estreptavidina o neutravidina a biotina, y de ese modo lograr la estequiometría deseada de la fusión de proteína de choque térmico con las diversas permutaciones y combinaciones de componente biotinilado, como se describe en el presente documento. La elección del tipo silvestre o una forma mutante particular de proteína de unión a biotina, tal como avidina, puede emplearse para controlar la valencia deseada de la composición farmacéutica (por ejemplo, forma monomérica, dimérica o tetramérica de avidina). Las vacunas monovalentes o divalentes pueden producirse de forma similar empleando proteínas de fusión de choque térmico que comprenden otras proteínas mutantes de avidina, estreptavidina o neutravidina que se unen a la biotina pero de forma monovalente o divalente. Un ejemplo de un mutante de avidina se describe en la sección Ejemplificación a continuación. Un ejemplo de un mutante puntual sensible al pH de Avidina que confiere unión a biotina ajustable al pH es Y33H. Otro mutante tiene sustituciones de histidina para Met96, Val 115 e Ile 117, opcionalmente con reemplazo de histidina en Trp110. Dichos enfoques para controlar la unión a biotina-estreptavidina se describen en Laitinen, O. H. (2007), "Brave New (Strept)avidins in Biotechnology", Trends in Biotechnology 25 (6): 269-277 y Nordlund, H. R. (2003), "Introduction of histidine residues into avidin subunit interfaces allows pH-dependent regulation of quaternary structure and biotin binding", FEBS Letters 555: 449-454, cuyo contenido se incorpora expresamente en el presente documento por referencia.

**Métodos de producción de composiciones farmacéuticas de autoensamblaje**

En un caso de la presente invención, las composiciones están compuestas por dos restos: una proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina y un componente biotinilado que se dirige a la respuesta inmune al antígeno al que se desea la respuesta inmune. La presente invención proporciona una producción rápida y fácil de grandes cantidades de composición farmacéutica (por ejemplo, vacuna) porque la producción de antígenos o anticuerpos biotinilados es bien conocida y rápida, lo que, a su vez, permite una mayor capacidad para la producción de vacunas. Debido a que una fusión de proteína de choque térmico de una única identidad puede administrarse junto con cualquiera de diversos componentes biotinilados como se describe en el presente documento, la proteína de fusión por choque térmico no necesita sintetizarse de nuevo cada vez que se identifica un nuevo antígeno diana de interés. Por lo tanto, dichos métodos de producción son particularmente rápidos una vez que se establece y se ha producido la fusión de la proteína de choque térmico a administrar.

También se proporcionan métodos para fabricar la proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina. La proteína de choque térmico puede prepararse, usando técnicas convencionales, a partir de fuentes naturales, por ejemplo, como se describe en Flynn et al., Science 245:385-390 (1989), o usando técnicas recombinantes, tal como la expresión de una construcción génica codificante de choque térmico en una célula huésped adecuada tal como una célula bacteriana, de levadura o de mamífero. Una proteína de fusión que incluye la proteína de choque térmico y la proteína de unión a biotina puede producirse por medios recombinantes. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la proteína de choque térmico puede unirse a cualquiera de los extremos de una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de unión a biotina de tal forma que las dos secuencias codificantes de proteína comparten un marco de lectura traduccional común y se pueden expresar como una proteína de fusión que incluye la proteína de unión a biotina y la proteína de choque térmico. 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 en lo sucesivo en el presente documento, 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. Como alternativa, el vector seleccionado puede añadir una etiqueta a la secuencia de proteína de fusión, por ejemplo, una etiqueta de oligohistidina como se describe en los ejemplos presentados en lo sucesivo en el presente documento, lo que permite la expresión de una proteína de fusión etiquetada que puede purificarse por métodos de afinidad utilizando un anticuerpo u otro material con una afinidad apropiadamente alta para la etiqueta. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Deutscher, M. Guide to Protein Purification Methods Enzymology, 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 analizados a continuación, la fusión de proteínas de choque térmico puede expresarse y purificarse a partir de células de mamífero. Como alternativa, 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 de la proteína de fusión de proteínas de choque térmico en las células del sujeto. Un ácido nucleico que codifica una proteína de choque térmico 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.

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 realiza 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 otro caso, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Como alternativa, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede realizarse 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 et al., John Wiley & Sons: 1992). Por consiguiente, se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende un gen de fusión de un gen que codifica una proteína de choque térmico fusionada a un gen que codifica una proteína de unión a biotina.

El ácido nucleico puede proporcionarse en un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una fusión de proteínas de choque térmico, y unida operativamente al menos a una secuencia reguladora. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de dichos 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. Dichos 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 víricos, incluyendo retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus de la inmunodeficiencia humana, y virus del herpes simple 1 recombinantes, o plásmidos bacterianos o eucariotas

recombinantes. Los vectores víricos se pueden utilizar para transfectar células directamente; se puede administrar ADN plasmídico solamente con la ayuda de, por ejemplo, liposomas catiónicos (lipofectina) o derivatizados (por ejemplo, conjugado con anticuerpo), conjugados de polilisina, gramicidina S, envolturas víricas artificiales u otros de dichos vehículos intracelulares. Los ácidos nucleicos también pueden inyectarse directamente. Como alternativa, se puede realizar la precipitación con fosfato de calcio para facilitar la entrada de un ácido nucleico en una célula.

Los ácidos nucleicos en cuestión pueden usarse para causar la expresión y la sobreexpresión de una proteína de fusión de proteínas de choque térmico en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas de fusión.

También se proporciona una célula huésped transfectada con un gen recombinante con el fin de expresar la fusión de proteínas de choque térmico. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, puede expresarse una fusión de proteínas de choque térmico en células bacterianas, tales como *E. coli*, células de insecto (baculovirus), levadura, células de insecto, planta, o 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. Adicionalmente, la célula huésped puede complementarse con moléculas de ARNt que no se encuentran normalmente en el huésped con el fin de optimizar la expresión del polipéptido. Otros métodos adecuados para maximizar la expresión del polipéptido de fusión serán conocidos por los expertos en la técnica.

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. Como alternativa, 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 aislarse de un medio de cultivo celular, células huésped, o ambos usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis y purificación por inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítomos particulares de una fusión.

Por lo tanto, se puede utilizar una secuencia de nucleótidos que codifica toda o parte de una fusión de proteínas de choque térmico 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 procariota (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 invención objeto.

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 procariotas, tales como *E. coli*.

En otra realización, el ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión de proteínas de choque térmico está unido operativamente a un promotor bacteriano, por ejemplo, el promotor NirB de *E. coli* anaeróbico o el promotor *llp* de lipoproteína de *E. coli*, que se describen; por ejemplo, en Inouye et al. (1985) Nucl. Acids Res. 13:3101; *Salmonella pagC* promoter (Miller et al., *supra*), *Shigella ent* promoter (Schmitt y Payne, J. Bacteriol. 173:816 (1991)), el promotor *teten* Tn10 (Miller et al., *supra*), o el promotor *ctxd* de *Vibrio cholera*. Se puede utilizar cualquier otro promotor. El promotor bacteriano puede ser un promotor constitutivo o un promotor inducible. Un promotor inducible ejemplar es un promotor que es inducible por hierro o en condiciones limitativas de hierro. De hecho, se cree que algunas bacterias, por ejemplo, organismos intracelulares, encuentran condiciones limitativas de hierro en el citoplasma huésped. Los ejemplos de promotores regulados por hierro de *FepA* y *TonB* se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en las siguientes referencias: Headley, V. et al. (1997) Infection & Immunity 65:818; Ochsner, U.A. et al. (1995) Journal of Bacteriology 177:7194; Hunt, M.D. et al. (1994) Journal of Bacteriology 176:3944; Svinarich, D.M. and S. Palchaudhuri. (1992) Journal of Diarrhoeal Diseases Research 10:139; Prince, R.W. et al. (1991) Molecular Microbiology 5:2823; Goldberg, M.B. et al. (1990) Journal of Bacteriology 172:6863; de Lorenzo, V. et al. (1987) Journal of Bacteriology 169:2624; and Hantke, K. (1981) Molecular & General Genetics 182:288.

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.

En otra realización, se añade una secuencia de péptido señal a la construcción, de manera que el polipéptido de fusión se secreta de las células. Dichos péptidos señal se conocen bien en la técnica.

En un caso, el potente promotor T5 de fago, que se reconoce 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.

5 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, donde el ADN que codifica la primera polimerasa está unido operativamente a un segundo promotor. En un caso preferido, 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.) e InVitrogen (San Diego, Calif.), o pueden obtenerse directamente a partir del bacteriófago usando 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. et al. (1996) *Gene* 168:37; Cheng, X. et al. (1994) *PNAS USA* 91:4034; Dubendorff, J.W. y F.W. Studier (1991) *Journal of Molecular Biology* 219:45; Bujarski, J.J. y P. Kaesberg (1987) *Nucleic Acids Research* 15:1337; y Studier, F.W. et al. (1990) *Methods in Enzymology* 185:60). Dichos plásmidos pueden modificarse adicionalmente de acuerdo con la realización específica de la fusión de proteínas de choque térmico a expresar.

20 En otro caso, la bacteria comprende además un ADN que codifica una segunda polimerasa que es capaz de mediar la transcripción del segundo promotor, donde 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.

30 En general, se introduce un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión en una célula huésped, tal como mediante transfección, y la célula huésped se cultiva en condiciones que permiten la expresión de la proteína de fusión. Los métodos para introducir ácidos nucleicos en células procariotas y eucariotas se conocen bien en la técnica. Los medios adecuados para el cultivo de células huésped de mamífero y procariotas se conocen bien en la técnica. Generalmente, el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión objeto está bajo el control de un promotor inducible, que se induce 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 de aproximadamente  $DO_{600}$  0,45-0,60. El cultivo se desarrolla a continuación durante algo más de tiempo para dar tiempo a la célula huésped para sintetizar la proteína. A continuación, habitualmente los cultivos se congelan y se pueden almacenar congelados durante algún tiempo, antes del aislamiento y la purificación de la proteína.

45 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.

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 de la proteína expresada; un origen de replicación, por ejemplo, ColE1; y el gen de beta-lactamasa, que confiere resistencia a la ampicilina.

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.*, *Wisteria spp.*, *Rickettsia spp.*, *Yersinia spp.*, *Escherichia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Bordetella spp.*, *Neisseria spp.*, *Aeromonas spp.*, *Franciesella spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Citrobacter spp.*, *Chlamydia spp.*, *Hemophilus spp.*, *Brucella spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Legionella spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Helicobacter spp.*, *Vibrio spp.*, *Bacillus spp.*, y *Erysipelothrix spp.* La mayor parte de estas bacterias se puede obtener de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209).

60 Existe un conjunto de vectores para la expresión de proteínas recombinantes en levadura. Por ejemplo, YEP24, YIP5, YEP51, YEP52, pYES2, e YRP17 son vehículos de clonación y expresión útiles en la introducción de construcciones genéticas en *S. cerevisiae* (véase, por ejemplo, Broach et al., (1983) in *Experimental Manipulation of Gene Expression*, ed. M. Inouye Academic Press, pág. 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 micrómetros. Además, se pueden utilizar marcadores de resistencia a fármacos, tales como ampicilina.

En ciertos casos, 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 pc ADN I/amp, pc ADN DNI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de 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. Como alternativa, 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 métodos empleados en la preparación de los plásmidos y la transformación de organismos huésped se conocen bien 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, 2ª Ed., ed. de 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. Los ejemplos de dichos 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 (tal como el  $\beta$ -gal que comprende pBlueBac III).

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 diversidad de sistemas de traducción in vitro se conoce bien en la técnica e incluyen kits comercialmente disponibles. Los ejemplos de sistemas de traducción in vitro incluyen lisados eucariotas, tales como lisados de reticulocitos de conejo, lisados de ovocitos 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, N.Y. 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. Dichos 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 métodos 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.

Cuando se desea la expresión de un fragmento carboxi terminal de una proteína, 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. Se conoce bien 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 se ha clonado a partir de *E. coli* (Ben-Bassat et al., (1987) J. Bacterial. 169:751-757) y *Salmonella typhimurium* su actividad *in vitro* se ha demostrado sobre proteínas recombinantes (Miller et al., (1987) PNAS USA 84:2718-1722). Por lo tanto, la eliminación de una metionina N-terminal, si se desea, puede lograrse in vivo mediante la expresión de dichas proteínas 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 et al.).

En los casos en que se utilizan vectores de expresión de plantas, la expresión de una fusión de proteínas de choque térmico puede impulsarse por cualquiera de varios promotores. Por ejemplo, se pueden utilizar promotores víricos, tales como los promotores 35S ARN y 19S ARN de CaMV (Brisson et al., 1984, Nature, 310:511-514), o el promotor de proteína de cubierta de TMV (Takamatsu et al., 1987, EMBO J., 6:307-311); como alternativa, se pueden usar promotores vegetales, tales como la subunidad pequeña de RUBISCO (Coruzzi et al., 1994, EMBO J., 3:1671-1680; Broglie et al., 1984, Science, 224:838-843); o promotores de choque térmico, por ejemplo, Hsp 17.5-E o Hsp 17.3-B de soja (Gurley et al., 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 véanse, por ejemplo, Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, Nueva York, Sección VIII, págs. 421-463; y Grierson & Corey, 1988, Plant Molecular Biology, 2ª Ed., Blackie, Londres, Cap. 7-9.

Un sistema de expresión alternativo que puede utilizarse para expresar un marcador de proteínas o proteína de fusión que comprende un marcador de proteínas 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 dará como resultado 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, véase, Smith et al., 1983, J. Virol., 46:584, Smith, Pat. de Estados Unidos N.º 4.215.051).

5 En un caso específico de un sistema de insectos, el ADN que codifica la proteína de fusión de proteínas de choque térmico se clona en el vector de transferencia recombinante pBlueBacIII (Invitrogen, San Diego, Calif.) aguas abajo 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 un virus recombinante. Después de la purificación de placas del virus recombinante, se preparan poblaciones víricas de título elevado que a su vez se  
10 usarán para infectar células de insecto Sf9 o High Five™ (células BTI-TN-5B1-4 derivadas de homogenados de ovocitos de *Trichoplusia ni*; disponible en Invitrogen, San Diego, Calif), para producir grandes cantidades de proteína objeto modificada apropiadamente después de la traducción.

15 En otros casos, la fusión de proteínas de choque térmico y la proteína de unión a biotina se pueden producir por separado y a continuación unirse, por ejemplo, covalentemente entre sí. Por ejemplo, una fusión de proteínas de choque térmico y proteína de unión a biotina se producen por separado in vitro, se purifican, y se mezclan conjuntamente bajo condiciones en las que la etiqueta será capaz de unirse a la proteína de interés. Por ejemplo, la proteína de choque térmico y/o la proteína de unión a biotina 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  
20 expresión de un gen que codifica la fusión de proteínas de choque térmico deseada, o se pueden sintetizar químicamente. Además, una secuencia de ácido nucleico que codifica la fusión de proteína de choque térmico deseada se puede sintetizar químicamente. Dichas mezclas de proteínas conjugadas pueden tener propiedades diferentes de las proteínas de fusión individuales.

25 Los enlazadores (también conocidos como "moléculas de enlazador" o "agentes de reticulación") pueden utilizarse para conjugar una proteína de choque térmico y una proteína de unión a biotina. 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 las proteínas 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 fotoreactivos (que comprenden grupos que se convierten en reactivos con la luz).

35 Las moléculas de enlazador 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 conjugada para su diana (moléculas de superficie celular y similares). Por lo tanto, los enlazadores más largos pueden 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  
40 molécula para la reacción óptima con una diana. Un enlazador con geometría flexible puede permitir que las proteínas reticuladas adapten su conformación al unirse a otras proteínas. La naturaleza del enlazador puede alterarse para otros fines diversos. Por ejemplo, la estructura de arilo de MBuS se encontró que era menos inmunógena que el espaciador aromático de mBs. Además, la hidrofobicidad y la funcionalidad de las moléculas de enlazador pueden controlarse por las propiedades físicas de las moléculas componentes. Por ejemplo, la hidrofobicidad de un enlazador polimérico puede controlarse 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.

50 La química de la preparación y la utilización de una amplia diversidad de enlazadores moleculares se conoce bien en la técnica y muchos enlazadores prefabricados para su uso en la conjugación de moléculas están disponibles comercialmente en proveedores tales como Pierce Chemical Co., Roche Molecular Biochemicals, United States Biological, y similares.

55 La proteína de choque térmico preparada y/o aislada fusionada a una proteína de unión a biotina debe administrarse a un sujeto junto con los componentes biotinilados deseados, suficiente para formar una asociación no covalente del resto de biotina con la proteína de unión a biotina. La fusión de proteína de choque térmico y el componente o componentes biotinilados se pueden administrar simultánea o secuencialmente. Si se administra simultáneamente, la fusión de proteína de choque térmico y el componente o componentes biotinilados se pueden administrar como una mezcla o como un complejo no covalente. Si se administra como un complejo no covalente, una proteína de  
60 choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina puede unirse no covalentemente a los componentes biotinilados deseados ya sea in vitro o in vivo una vez preparados y/o aislados.

65 El complejo no covalente puede producirse poniendo en contacto la proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina con los componentes biotinilados, en condiciones suficientes para promover la unión de la proteína de unión a biotina con biotina, condiciones que son conocidas en la técnica.

Los genes para diversas proteínas de choque térmico se han clonado y secuenciado, y que se pueden usar para obtener una fusión de proteína de choque térmico, incluyendo, pero sin limitación, gp96 (humano: Acceso al Genebank N.º X15187; Maki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:5658-5562 (1990); ratón: Acceso al Genebank N.º M16370; Srivastava et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:3807-3811 (1987)), BiP (ratón: Acceso al Genebank N.º U16277; Haas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2250-2254 (1988); humano: Acceso al Genebank N.º M19645; Ting et al., ADN 7:275-286 (1988)), hsp70 (ratón: Acceso al Genebank N.º M35021; Hunt et al., Gene 87:199-204 (1990); humano: Acceso al Genebank N.º M24743; Hunt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:6455-6489 (1995)), y hsp40 (humano: Acceso al Genebank N.º D49547; Ohtsuka K., Biochem. Biophys. Res. Commun. 197:235-240 (1993)).

La proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina puede estar unida de forma no covalente al componente biotinilado.

El componente a administrar junto con la proteína de choque térmico que comprende la proteína, célula o virus puede conjugarse con biotina por medios tales como los conocidos en la técnica. Antes de la conjugación con biotina, la proteína, célula o virus puede producirse y/o aislarse usando métodos conocidos en la técnica. Se pueden emplear técnicas recombinantes de forma muy similar a la descrita en el presente documento para la fusión de proteína de choque térmico. Una vez que el componente se produce y/o se aísla, una molécula o moléculas de biotina se pueden conjugar directamente a una proteína, célula o virus. La biotina también se puede conjugar indirectamente a través de un enlazador a dicha proteína, célula o virus. La biotina se conjugará a una región que permite estéricamente la interacción de biotina con la proteína de unión a biotina. Los kits y reactivos de biotinilación pueden adquirirse en Pierce (Rockford, IL) y usarse para generar los componentes biotinilados descritos en el presente documento.

Las secuencias de muchos antígenos diferentes se pueden clonar y caracterizar mediante análisis de la secuencia de ADN e incluirse en las composiciones proporcionadas en el presente documento. Los vectores bacterianos que contienen genomas o antígenos celulares o víricos completos o parciales se pueden obtener a partir de diversas fuentes que incluyen, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Los antígenos adicionales que pueden usarse pueden aislarse y tipificarse mediante los métodos previamente establecidos para este fin, métodos que se conocen bien en la técnica.

#### **Métodos de uso de la fusión de proteínas de choque térmico y componentes biotinilados**

La fusión de proteínas de choque térmico y componentes biotinilados que se describen en el presente documento pueden administrarse a un sujeto para inducir o potenciar la respuesta inmune de ese sujeto, en particular una respuesta citolítica mediada por células, contra una célula que expresa un antígeno contra el que están dirigidos los componentes biotinilados. La proteína de fusión puede simplemente aumentar la respuesta inmune (sirviendo así como composición inmunógena), o conferir inmunidad protectora (sirviendo así como una vacuna).

Por lo tanto, la fusión de proteínas de choque térmico y los componentes biotinilados producidos como se ha descrito anteriormente se pueden purificar hasta una pureza adecuada para su uso como una composición farmacéutica. Generalmente, las composiciones purificadas tendrán una especie que comprende más de aproximadamente el 85 por ciento de todas las especies presentes en la composición, más de aproximadamente el 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más de todas las especies presentes. La especie objeto 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 una proteína de choque térmico y componentes biotinilados, o un complejo no covalente de los mismos, 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 del presente documento. La pureza de una proteína puede determinarse por varios métodos 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.

Por consiguiente, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden la fusión de proteínas de choque térmico y componentes biotinilados, o un complejo no covalente de los mismos. En un aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, que se formulan junto con uno o más vehículos (aditivos) y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. En otro aspecto, en ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar como tal o en mezclas con vehículos farmacéuticamente aceptables y también se pueden administrar junto con otros agentes. Por lo tanto, la terapia conjunta (de combinación) incluye la administración secuencial, simultánea y separada, o coadministración de tal forma que los efectos terapéuticos del primero administrado no hayan desaparecido por completo cuando se administra el siguiente.

La fusión de proteínas de choque térmico y componentes biotinilados, o un complejo no covalente de los mismos, como se describe en el presente documento, se pueden administrar a un sujeto en una diversidad de maneras. Las

vías de administración incluyen sistémica, periférica, parenteral, entérica, tópica y transdérmica (por ejemplo, polímeros de liberación lenta). 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 el presente documento pueden contener y administrarse 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.

Además, una proteína de fusión de proteínas de choque térmico puede administrarse mediante la expresión in vivo de un ácido nucleico que codifica tales secuencias de proteína en un sujeto humano. La expresión de tal ácido nucleico y el contacto con componentes biotinilados 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 proteínas de fusión de proteínas de choque térmico se pueden seleccionar entre la gran diversidad de vectores que se utilizan actualmente en el campo. Son preferibles 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 et al., *Gene Therapy* 1:367-84 (1994)); Berkner K. L., *Biotechniques* 6:616-24 (1988), los vectores de adenovirus de segunda generación DE1/DE4 (Wang and Finer, *Nature Medicine* 2:714-6 (1996)), o el vector vírico adeno-asociado AAV/Neo (Muro-Cacho et al., *J. Immunotherapy* 11:231-7 (1992)). Además, pueden emplearse vectores retrovíricos recombinantes MFG (Jaffee et al., *Cancer Res.* 53:2221-6 (1993)) o LN, LNSX, LNCX, LXSX (Miller y Rosman, *Biotechniques* 7:980-9 (1989)). Los vectores basados en virus del herpes simple, tal como pHSV1 (Geller et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 87:8950-4 (1990)) o vectores víricos de vaccinia, tal como MVA (Sutter y Moss, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 89:10847-51 (1992)) pueden servir como alternativas.

Las unidades de expresión específica utilizadas con frecuencia que incluyen secuencias de promotor y 3' son las encontradas en el plásmido CDNA3 (Invitrogen), plásmido AH5, pRC/CMV (Invitrogen), pCMU II (Paabo et al., *EMBO J.* 5:1921-1927 (1986)), pZip-Neo SV (Cepko et al., *Cell* 37:1053-1062 (1984)) y pSRa (ADN X, Palo Alto, CA). La introducción de genes en las unidades de expresión y/o vectores puede conseguirse utilizando técnicas de manipulación genética, como se describe en los manuales como *Molecular Cloning and Current Protocols in Molecular Biology* (Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Press (1989)); Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (1989)). Un ácido nucleico expresable resultante se puede introducir en células de un sujeto humano mediante cualquier método capaz de colocar el ácido nucleico en células en una forma expresable, por ejemplo, como parte de un vector vírico 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, N.R. et al., *Science*. 265:1401-1404 (1994)). Los métodos de transducción incluyen la inyección directa en tejidos y tumores, la transfección liposómica (Fraley et al., *Nature* 370:111-117 (1980)), endocitosis mediada por receptores (Zatloukal et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 660:136-153 (1992)), y la transferencia de genes mediada por bombardeo de partículas (Eisenbraun et al., *ADN & Cell. Biol.* 12:791-797 (1993)).

La cantidad de fusión de proteínas de choque térmico y componentes biotinilados, o un complejo no covalente de los mismos, 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 fusión de proteínas de choque térmico y componentes biotinilados, o un complejo no covalente de los mismos, administrada al sujeto variará dependiendo de una diversidad de factores, incluyendo la fusión de proteínas de choque térmico y el componente biotinilado 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 fusión de proteínas de choque térmico, componentes biotinilados, o un complejo no covalente de los mismos, 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 la composición farmacéutica. Además, la cantidad de vector de expresión administrado al sujeto variará dependiendo de una diversidad de factores, incluyendo la fusión de proteínas de choque térmico expresada, el tamaño, edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto, así como de 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 realiza con un vector vírico que contiene un ácido nucleico que codifica una fusión de proteínas de choque térmico, la cantidad eficaz 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 mucho más preferiblemente en el intervalo de  $10^6$  a  $10^{10}$  de virus por kg de peso corporal.

La determinación de una cantidad eficaz de proteína de fusión y componentes biotinilados, o un complejo no covalente de los mismos, 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.

5 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 la técnica. Un experto en la técnica 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, al usarse como una vacuna, las proteínas y/o cepas de la invención se pueden administrar en aproximadamente 1 a 3 dosis durante un período de 1-36 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. Pueden ser apropiados protocolos alternativos para pacientes individuales. Una dosis adecuada es una cantidad de proteína 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 afección o infección durante al menos 1-2 años.

Las composiciones también pueden incluir adyuvantes para mejorar la respuesta inmune. Además, dichas proteínas pueden suspenderse adicionalmente en una emulsión en 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 técnica.

Se pueden emplear cualquiera de una diversidad de adyuvantes en las vacunas de esta invención para mejorar la respuesta inmune. La mayoría de los adyuvantes contiene 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, N.J.). Otros adyuvantes adecuados incluyen alumbre, microesferas biodegradables, monofosforil lípido A, quil A, SBAS1c, SBAS2 (Ling et al., 1997, Vaccine 15:1562-1567), SBAS7, Al(OH)<sub>3</sub> y el oligonucleótido (documento WO96/02555).

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-MLP y la saponina QS21 como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica donde 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-MLP 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-MLP y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210 y puede comprender una formulación.

### **Kits**

La presente descripción proporciona kits para la expresión o administración de una proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina. Dichos kits pueden comprender ácidos nucleicos que codifican una proteína de choque térmico condensada a una proteína de unión a biotina. Los ácidos nucleicos pueden estar incluidos en un plásmido o un vector, por ejemplo, un plásmido bacteriano o vector vírico. Otros kits comprenden una proteína de choque térmico condensada a una proteína de unión a biotina. Además, la presente descripción proporciona kits para la producción y/o purificación de una proteína de choque térmico condensada a una proteína de unión a biotina. Dichos kits pueden incluir opcionalmente componentes biotinilados o reactivos de biotinilación como se describe en el presente documento.

La presente descripción proporciona kits para prevenir o tratar una enfermedad infecciosa, inflamatoria o neoplásica en un paciente. Por ejemplo, un kit puede comprender una o más composiciones farmacéuticas como se ha descrito 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 realizar la administración de dichas composiciones.

Los componentes del kit se pueden envasar, ya sea para la práctica manual, o parcial o totalmente automatizada de los métodos anteriores. En otros casos que implican los kits, se pueden proporcionar instrucciones para su uso.

### **EJEMPLIFICACIÓN**

La invención que se describe ahora en general, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos que se incluyen meramente con fines de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y no están destinados a limitar la invención de ninguna manera.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se describen en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª Ed., ed. de Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); *ADN Cloning*, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. Patente de Estados Unidos N.º 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 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); el tratado, *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*, Vol. 154 y 155 (Wu et al. eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

### **Ejemplo 1**

#### **i) Producción de MTBhsp70**

MTBhsp70 se subclonó en el vector de expresión pET45b(+) modificando primero el vector para introducir el sitio de restricción deseado SfiI. Esta modificación permite la introducción de la proteína MTBhsp70 en el sitio NotI/XhoI y otras proteínas tales como scFv, antígenos, Avidina, etc. en el sitio SfiI/NotI (FIGURA 1). Este enfoque particular puede modificarse para introducir las proteínas deseadas en el extremo C-terminal de MTBhsp70. Usando el plásmido MTBhsp70 proporcionado por el Dr. Richard Young, se introdujeron los sitios de restricción NotI y XhoI en los extremos 5' y 3', respectivamente, como se describe en la FIGURA 2.

La digestión del fragmento amplificado de MTBhsp70 mostrado en el carril 1 de la FIGURA 2 con las enzimas de restricción NotI y XhoI reveló inesperadamente 2 bandas (FIGURA 3). Los análisis de secuenciación revelaron que MTBhsp70 contiene sitios de restricción internos NotI y SfiI. Estos se eliminaron usando la estrategia representada en la FIGURA 4. La construcción MTBhsp70 pET-45b(+) resultante se usó a continuación para transformar las bacterias BL21(DE3) competentes. La expresión de MTBhsp70 se indujo añadiendo IPTG 1 mM. Las células se cultivaron en medio LB a 37 °C hasta una DO<sub>600</sub> de 0,5. Las células se centrifugaron y se suspendieron en medio LB que contenía IPTG 1 mM y el crecimiento continuó durante 4 horas a la temperatura indicada. Las células se fraccionaron y se realizaron alícuotas en SDS-PAGE, y las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie. Cuando las células inducidas se cultivaron a 37 °C, la mayor parte de la proteína MTBhsp70 se encontró en cuerpos de inclusión insolubles. Al reducir la temperatura de crecimiento posterior a la inducción a 30 °C, se produjeron grandes cantidades de MTBhsp70 soluble. La proteína MTBhsp70 encontrada en las fracciones solubles y periplásmicas de BL21(DE3) cultivadas a 30 °C se purificó satisfactoriamente mediante cromatografía de afinidad metálica (MAC) usando columnas de centrifugación de cobalto. Las células se cultivaron a 37 °C hasta una DO<sub>600</sub> de 0,5 y luego se centrifugaron. Las células se suspendieron en medio de crecimiento que contenía IPTG 1 mM y se dejaron crecer durante 4 horas a 30 °C. Las células se fraccionaron según los métodos estándar que consisten en la solubilización con reactivo B-PER de Pierce.

#### **ii) Producción de proteínas de fusión MTBhsp70**

Con el fin de demostrar las propiedades inmunoestimuladoras de las proteínas de fusión MTBhsp70, se construyeron un péptido de Ovoalbúmina-MTBhsp70 y dos productos de fusión scFv-MTBhsp70.

- a. Proteína de fusión Ova-257-264-MTBhsp70.** El grupo del Dr. Young estableció que el péptido inmunodominante de la Ovoalbúmina consistía en los residuos 257-264 (SIINFEKL). Este péptido se fusionó a la región N-terminal de MTBhsp70 digiriendo el plásmido MTBhsp70 pET-45b(+) con SfiI y NotI e introduciendo un enlazador que codifica el péptido inmunodominante que también se digiere con SfiI y NotI (FIGURA 5). Tras la ligación, se obtuvieron varias colonias, y sus identidades se confirmaron por secuenciación (FIGURA 6). Como se observó con MTBhsp70, la inducción de Ova-257-264-MTBhsp70 es óptima cuando la temperatura de crecimiento, inducción post-IPTG, se mantiene a 30 °C. La expresión exitosa de Ova254-264-MTBhsp70 se obtuvo en la fracción soluble de BL21(DE3).
- b. Proteínas de fusión scFv-MTBhsp70.** scFv se fusionaron al extremo N-terminal de MTBhsp70. Se construyó una biblioteca de presentación de fagos scFv combinatoria humana y se usó para seleccionar scFv específicos de Ovoalbúmina. El otro scFv, MOV18, es específico para el receptor de folato de alta afinidad expresado en células de cáncer de ovario. El método de clonación es similar al enfoque utilizado para la introducción del péptido Ova<sub>254-264</sub> en el N-terminal de MTBhsp70. La porción SfiI/NotI scFv se purificó a partir de sus plásmidos respectivos, seguido de ligación en el vector de expresión digerido con SfiI/NotI MTBhsp70 pET-45b(+). Los scFv anti-Ovoalbúmina tenían varias mutaciones sin sentido que debían eliminarse mediante mutagénesis de sitio dirigido. Sin embargo, tras la inducción de bacterias que portaban ambas construcciones, se descubrió que la inducción con IPTG daba como resultado que las proteínas de fusión se expresaran en cuerpos de inclusión.

**iii) Producción de Avidina-Enlazador-MTBhsp70**

Se puede usar una fusión de Avidina con un elemento de enlazador y con MTBhsp70 para la producción de una vacuna de autoensamblaje. Esto se ilustra en la FIGURA 7, donde la porción de enlazador se ilustra como una línea entre Avidina y proteínas de choque térmico. La avidina es una proteína glicosilada homotetramérica con un peso molecular de 68.000 (por lo tanto, cada subunidad es de 17.000 dalton). La forma de tipo silvestre (tetramérica) o monomérica descrita por el Dr. Markku S. Kulomaa se puede producir y usar como se proporciona en el presente documento. Estas moléculas se describen de acuerdo con el esquema de la FIGURA 8. La forma monomérica de avidina difiere del tipo silvestre en posiciones de 5 aminoácidos. Esto se ilustra en la FIGURA 9. Se usó una serie de cebadores y enlazadores para ensamblar cada construcción de Avidina.

Las mutaciones menores se corrigieron mediante mutagénesis basada en PCR. Esto se ilustra en la FIGURA 10, que muestra dos cambios que se realizaron en la avidina monomérica (clon M1). Ambas construcciones monoméricas y de tipo salvaje de Avidina-enlazador-MTBhsp70 se obtuvieron con éxito como se muestra en la FIGURA 11. Ambas construcciones conducen a una abundante producción de proteínas tras la inducción con IPTG en *E. coli* BL21(DE3). Sin embargo, las proteínas Avidina-enlazador-MTBhsp70 inducidas se encuentran principalmente en cuerpos de inclusión, que pueden solubilizarse, desnaturalizarse y replegarse.

Después de la desnaturalización con clorhidrato de guanidinio y DTT, las proteínas se diluyen en 4 tampones de replegamiento diferentes (1) Tween 40, cistina; 2) Tween 60, cistina; 3) CTAB, cistina; 4) SB3-14, cistina) que contiene cistina para inactivar el exceso de DTT. Después de la adición de una solución de CA al 3 %, las proteínas se vuelven a plegar durante la noche a temperatura ambiente. Para evaluar el nivel de replegamiento, se añadieron alícuotas de proteína replegadas a los pozos revestidos con biotina. Por lo tanto, las proteínas Avidina-enlazador-MTBhsp70 replegadas adecuadamente se unirán estrechamente al fondo de esos pocillos. La cantidad de proteínas unidas a placa se determinó usando un anticuerpo monoclonal contra MTBhsp70 seguido de la detección de anti-MTBhsp70 unido usando anticuerpos de cabra anti-ratón (H + L) marcados con Peroxidasa de rábano picante (HRP). La densidad óptica se registró a 450 nm y expresó los resultados como la señal máxima porcentual. Los resultados se representan en la FIGURA 12. El replegamiento apropiado de cada proteína puede incluir someter a cada proteína a diferentes condiciones. Con el fin de evaluar la actividad biológica de la porción de MTBhsp70 replegada de estas proteínas, se puede medir su capacidad para hidrolizar ATP. Además, se pueden determinar los efectos quimiotácticos de MTBhsp70 en células THP-1.

**Ejemplo 2**

El autoensamblaje y las actividades biológicas de las proteínas m/wAvidina-Enlazador-N-MTBhsp70 se pueden determinar de la siguiente manera:

1. 1) Determinación de la actividad de ATPasa. La porción N-terminal de MTBhsp70 es conocida por hidrolizar ATP bajo ciertas condiciones de ensayo. El replegamiento apropiado de nuestras proteínas m/wAvidina-Enlazador-N-MTBhsp70 puede evaluarse comparando su actividad de ATPasa con la de una preparación comercial y nuestra propia MTBhsp70.
2. 2) Determinación de la actividad quimiotáctica/inducción de la producción de quimiocinas. Otro ensayo de replegamiento apropiado de la porción MTBhsp70 de estas proteínas m/wAvidina-Enlazador-N-MTBhsp70 es su inducción exitosa de quimiocinas CC de la línea celular THP-1. Se sabe que la exposición de la línea celular de monocitos THP-1 a MTBhsp70 induce la producción de RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ . A su vez, estas quimiocinas deberían estimular la actividad quimiotáctica.
3. 3) Autoensamblaje. Las proteínas replegadas m/wAvidina-Enlazador-N-MTBhsp70 se unen a la biotina. Para demostrar el autoensamblaje, se puede demostrar la capacidad de estas proteínas para formar un complejo estable con moléculas biotinizadas. Se puede demostrar la unión a Ovalbúmina biotinizada y eGFP biotinizada. El ensamblaje exitoso se evalúa mediante inmunoprecipitación con anti-MTBhsp70 y antígeno anti-biotinilado.
4. 4) Inducción in vivo de inmunidad. La actividad inmunoestimuladora de las vacunas autoensambladas puede demostrarse midiendo la activación de los linfocitos T CD8 tras la inmunización de ratones C57BL/6 con Ovalbúmina-m/wAvidina-Enlazador-N-MTBhsp70 biotinizado y Ova<sub>257-264</sub>-m/wAvidina-Enlazador-N-MTBhsp70 biotinizado.

**Ejemplo 3**

Una construcción de MTBHSP70 con avidina autoensamblada con HRP biotinizada y anticuerpos anti-OVA biotinizados

**Procedimientos****i) Construcciones plasmídicas**

Se subclonó MTBHSP70 en el vector de expresión pET45b(+) y luego se unió el péptido de Ovalbúmina específico de CD8 (Ova<sub>257-264</sub>) en el extremo N-terminal. La avidina y la avidina monomérica basadas en secuencias

publicadas se ensamblaron y se unieron en el extremo N-terminal de MTBHSP70 en el vector de expresión pET45b(+).

## ii) Expresión y purificación de proteínas

Se transformó *E. coli* BL21(DE3) con las diversas construcciones y se indujo la expresión mediante la adición de IPTG. Las proteínas se purificaron por IMAC en presencia de TritonX-114 (Sigma) para eliminar endotoxinas.

## iii) Inmunizaciones

Se inmunizaron ratones machos C57BL/6 con Ovoalbúmina u Ova<sub>257-264</sub>-L-MTBHSP70 por vía subcutánea y se sacrificaron el día 30.

## iv) Mediciones de resultado

1. **a. Interferón- $\gamma$ .** Después de 2 inmunizaciones subcutáneas, se sacrificaron los ratones el día 30 y se prepararon esplenocitos. Los esplenocitos ( $2 \times 10^6$  por pocillo) se incubaron a 37 °C durante 4 horas en presencia de brefeldina A (tapón de Golgi) y péptido Ova<sub>257-264</sub> o un péptido irrelevante. La incubación se detuvo lavando las células con FBS al 5 % en PBS seguido de tinción de CD3, CD4, CD8 e Interferón- $\gamma$  después de que las células se permeabilizaron con la solución Cytofix/Cytoperm de BD. La tinción celular se evaluó mediante citometría de flujo y se analizó utilizando FlowJo.
2. **b. Tinción de pentámero.** Las células se trataron como se ha descrito anteriormente con la adición de que se trataron inicialmente con MHC Pentamer H-2Kb SIINFEKL murino recombinante conjugado con R-PE (de PROIMMUNE).
3. **c. Autoensamblaje.** Se utilizó un ensayo basado en ELISA. Se mezclaron diversas concentraciones de peroxidasa de rábano picante (HRP) biotinilada y avidina-MTBHSP 70 purificada y replegada. La mezcla se añadió a placas His-Grab (ThermoScientific) y se eliminó la HRP biotinilada no unida mediante lavado con PBS al 0,1 % Tween 20 seguido de la adición de TMB. La reacción se detuvo después de 20 minutos y los resultados se leyeron a 450 nm.

## Resultados

Se expresaron proteínas de fusión 6 x His-MTBHSP 70 y 6 x His-Ova (257-264) -MTBHSP 70 en células *E. coli* BL21(DE3). En cada caso, se usaron fragmentos NotI-XhoI MTBHsp70 en las construcciones de fusión. La expresión de proteína se indujo mediante la adición de IPTG. Las células se lisaron y se fraccionaron en fracciones solubles (n.º 1 y n.º 4), periplásmicas (n.º 2 y n.º 5) y cuerpos de inclusión. Se sometieron alícuotas de cada una de las fracciones a SDS-PAGE desnaturalizante sobre el 4-12 % de geles de Bis-Tris NUPAGE (Invitrogen).

### i) Expresión de avidina y avidina monomérica unida a MTBHSP70 en *E. coli*

Se ensamblaron Avidina de tipo silvestre (wAvidina) y Avidina monomérica y se clonaron en pET45b(+). Se prepararon construcciones de fusión que consistían en 6 x His-Avidina unidas en el extremo N-terminal de MTBHSP 70. Cada construcción de plásmido se usó para transformar *E. coli* BL21(DE3) y la expresión se indujo con IPTG.

### ii) Inmunización n.º 1

Se inmunizaron ratones machos C57BL/6 por vía subcutánea los días 1 y 17 y se sacrificaron el Día 30 de la siguiente manera:

- Ovoalbúmina + CFA
- Ovoalbúmina
- Ovoalbúmina + MTBhsp70
- Ova<sub>péptido</sub>-MTBhsp70

### iii) Medición del resultado

Se midió la producción de interferón gamma tras la estimulación de esplenocitos con el péptido CD8 SIINFEKL (Ova<sub>257-264</sub>), y los resultados se muestran en la FIGURA 16 y la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Porcentaje de esplenocitos CD+8 que producen interferón- $\gamma$  tras la estimulación con Ova<sub>257-264</sub>

	Porcentaje de CD8 <sup>+</sup> Ifn $\gamma$ <sup>+</sup> (menos no estimulado)
CFA	0,39
Ovoalbúmina	0,09
Ovoalbúmina + MTBhsp70	0,23
Ovapéptido-MTBhsp70	0,22

**iv) Inmunización n.º 2**

Se inmunizaron ratones C57BL/6 (macho) por vía subcutánea como se describe para la inmunización n.º 1. Los grupos de inmunización fueron los siguientes:

- Grupo A CFA + ovoalbúmina (3 ratones)
- Grupo B CFA + Ovipéptido (257-264) (3 ratones)
- Grupo C fusión de Ovipéptido-MTBhsp70 (3 ratones)
- Grupo D Ovipéptido + MTBhsp70 (3 ratones)
- Grupo E MTBhsp70 (3 ratones)
- Grupo F solución salina 1 ratón

**v) Medición del resultado**

Se recogieron esplenocitos y se tiñeron con CD3, CD4, CD8 y H-2Kb/Pentámero SIINFEKL (OVA) de ProImmune.

**vi) Conclusión**

Las construcciones de proteína de fusión HSP se desarrollaron y expresaron en *E. coli*. La fusión de Ovipéptido 257-264 al extremo N-terminal de MTBHSP 70 dio como resultado una expansión exitosa de linfocitos T específicos de antígeno según se midió mediante la producción de Interferón- $\gamma$  y la tinción con H-2Kb/SIINFEKL (OVA).

**Ejemplo 4**

Construcciones modificadas para incluir Avidina en el extremo N o C-terminal de MTBHSP 70.

**i) Medición del autoensamblaje**

Se evaluó el autoensamblaje de la proteína de fusión Avidina-MTBHSP 70 con peroxidasa de rábano picante biotinilada (HRP) usando ELISA de placa His-Grab. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron con cloruro de guanidinio y se dializaron lentamente frente a tampón que contenía concentraciones decrecientes de guanidinio. La proteína parcialmente replegada se incubó con diferentes cantidades de HRP biotinilada antes de ser añadida a una placa His-Grab. La placa se leyó a 450 nm.

**ii) Evaluación del direccionamiento de una vacuna autoensamblada**

El direccionamiento de la vacuna autoensamblada se evaluó mediante citometría de flujo. La proteína Avidina MTBHSP 70 parcialmente replegada se incubó con anticuerpos anti-Ovoalbúmina biotinilados y el complejo se capturó en perlas magnéticas específicas de His. Después de eliminar el exceso de anticuerpos, se añadió Ovoalbúmina marcada con Alexa Fluor 555. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo en el canal R-PE. Se observó una diferencia muy débil en comparación con las perlas solos. El autoensamblaje dirigido se confirmó por análisis estadísticos.

**iii) Conclusión**

Las proteínas de fusión que consisten en antígenos peptídicos o avidina en el extremo N de MTBHSP 70 se han expresado con éxito. La inmunización con Ovipéptido (257-264) fusionada en el marco del extremo N-terminal de MTBHSP 70 condujo a la inducción de una respuesta inmune específica de antígeno medida por la producción de interferón gamma y la expansión de linfocitos T CD8+ (tinción de pentámero). También se diseñaron construcciones que expresan avidina en el extremo N o C-terminal de MTBHSP 70, permitiendo así el autoensamblaje de esta construcción con anticuerpos biotinilados clínicamente relevantes. Las proteínas de fusión de avidina se expresaron con éxito en *E. coli*, pero se encontraron en cuerpos de inclusión. El replegamiento de estas proteínas fue parcialmente exitoso y actualmente se está optimizando. El autoensamblaje de baja eficacia de MTBHSP70-avidina con anticuerpo monoclonal biotinilado se demostró en experimentos preliminares.

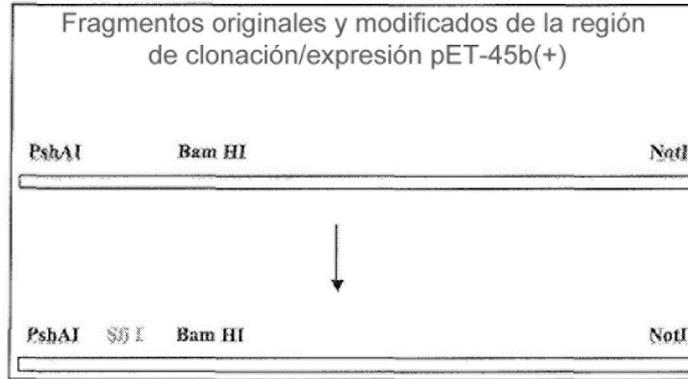
**Bibliografía**

- Chen, W., U. Syldath, et al. (1999). "Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system." *J Immunol* 162(6): 3212-9.
- Laitinen, O. H., H. R. Nordlund, et al. (2007). "Brave new (strept)avidins in biotechnology." *Trends Biotechnol* 25(6): 269-77.
- Nordlund, H. R., V. P. Hytonen, et al. (2005). "Tetavalent single-chain avidin: from subunits to protein domains via circularly permuted avidins." *Biochem J* 392(Pt 3): 485-91.
- Srivastava, P. K. and R. G. Maki (1991). "Stress-induced proteins in immune response to cancer." *Curr Top Microbiol Immunol* 167: 109-23.
- Zugel, U. and S. H. Kaufmann (1999). "Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases." *Clin Microbiol Rev* 12(1): 19-39.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina, donde la proteína de unión a biotina es avidina, estreptavidina, neutravidina, o la proteína de unión a biotina es una proteína que es al menos un 80 % idéntica a avidina o estreptavidina; y la proteína de unión a biotina se une de forma no covalente a un anticuerpo manipulado monoclonal biotinilado, o cuatro componentes biotinilados, donde al menos dos de los cuatro componentes biotinilados no son idénticos.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, donde la proteína de unión a biotina se selecciona del grupo que consiste en avidina, estreptavidina y neutravidina.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, donde la proteína de choque térmico es una proteína de choque térmico de mamífero o una proteína de choque térmico bacteriana.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, donde la proteína de choque térmico se selecciona del grupo que consiste en una proteína de choque térmico MTBhsp70 y una proteína de choque térmico humana.
5. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es una vacuna.
6. Un método para producir una composición farmacéutica de autoensamblaje de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende poner en contacto una proteína de choque térmico fusionada a una proteína de unión a biotina con un anticuerpo manipulado monoclonal biotinilado, o cuatro componentes biotinilados, donde al menos dos de los cuatro componentes biotinilados no son idénticos, suficiente para formar un complejo no covalente de la proteína de choque térmico, y el anticuerpo manipulado monoclonal biotinilado o los cuatro componentes biotinilados.
7. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en terapia.
8. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en la inducción de una respuesta inmune en un sujeto.
9. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en el aumento de la potencia de un producto terapéutico en un sujeto.
10. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 7 a 9, donde la proteína de unión a biotina es avidina, estreptavidina, neutravidina, o la proteína de unión a biotina es una proteína que es al menos un 90 % idéntica a avidina o estreptavidina.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, donde la proteína de unión a biotina es avidina, estreptavidina, neutravidina, o la proteína de unión a biotina es una proteína que es al menos un 95 % idéntica a avidina o estreptavidina.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, donde la proteína de unión a biotina es avidina, estreptavidina, neutravidina, o la proteína de unión a biotina es una proteína que es al menos un 99% idéntica a avidina o estreptavidina.
13. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 7 a 12, donde la proteína de unión a biotina está unida de forma no covalente a un anticuerpo manipulado monoclonal biotinilado.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, donde el anticuerpo manipulado monoclonal biotinilado es un fragmento de anticuerpo monoclonal biotinilado que comprende un sitio de unión a antígeno.

A.



B.

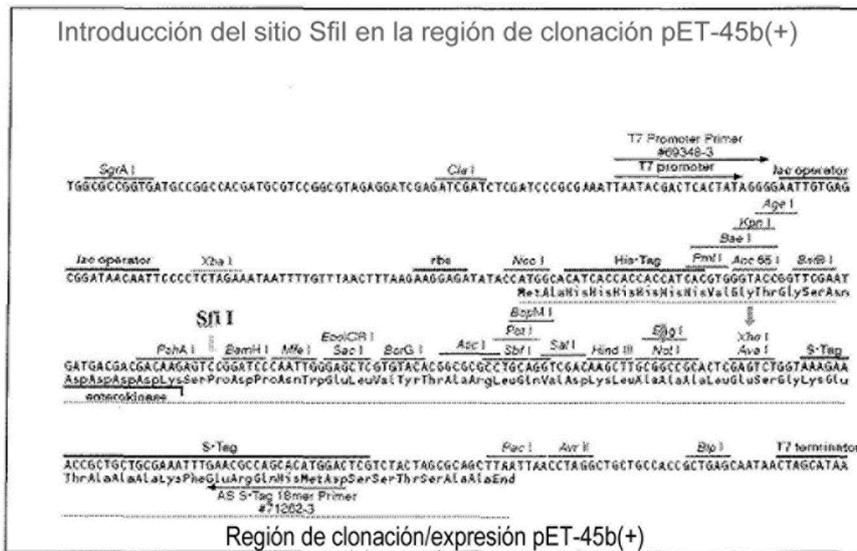


Figura 1

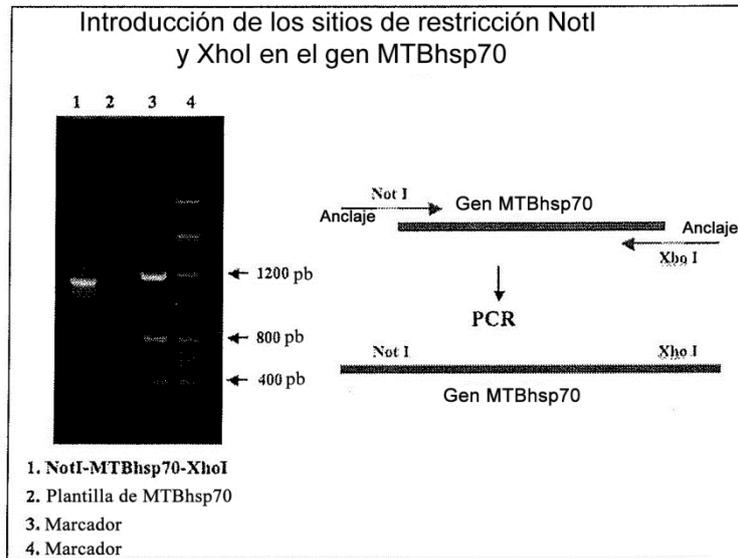


Figura 2

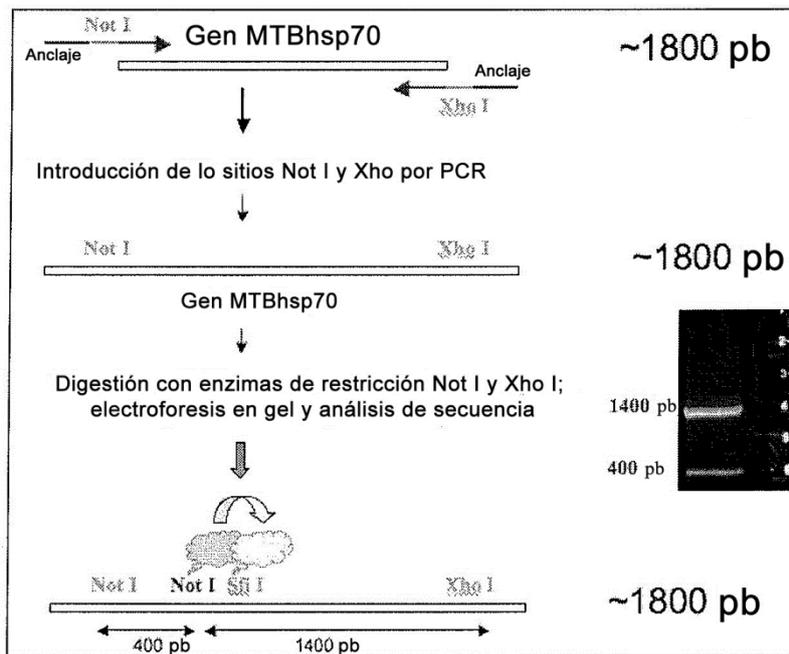


Figura 3

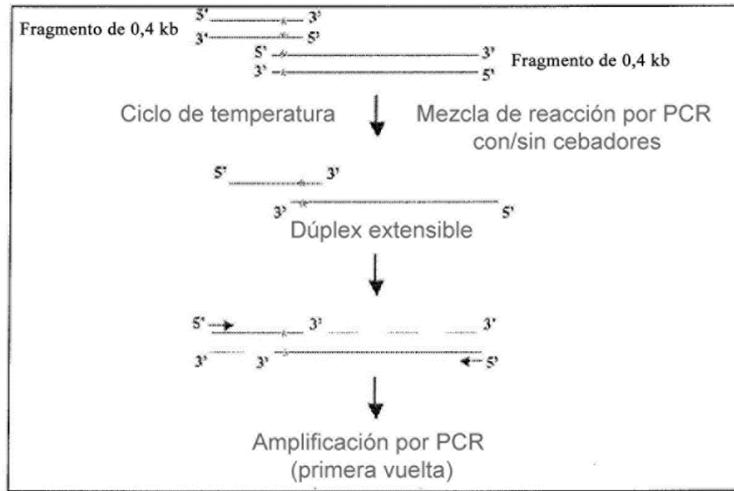


Figura 4

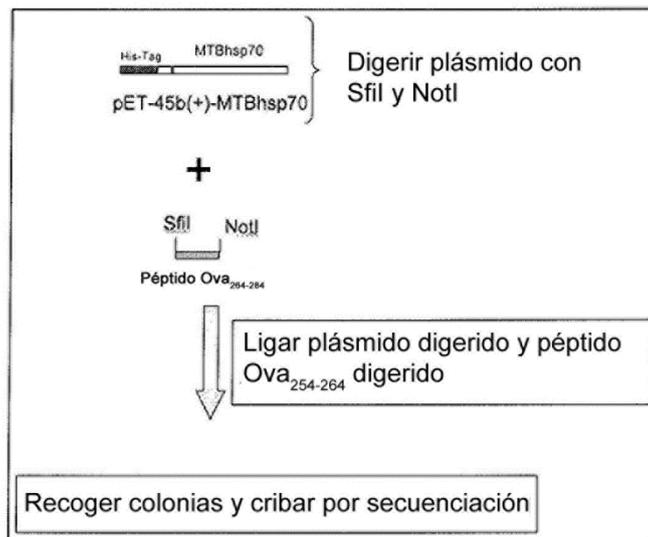


Figura 5

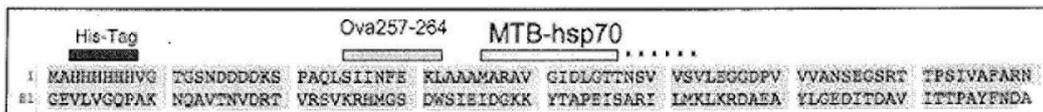


Figura 6

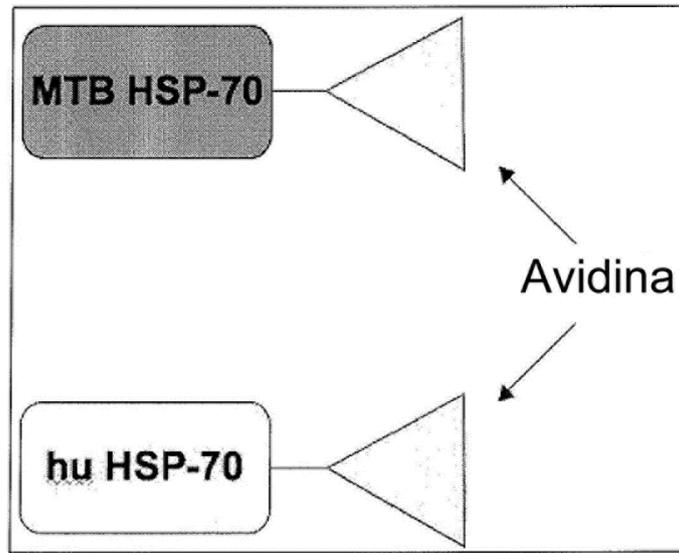


Figura 7

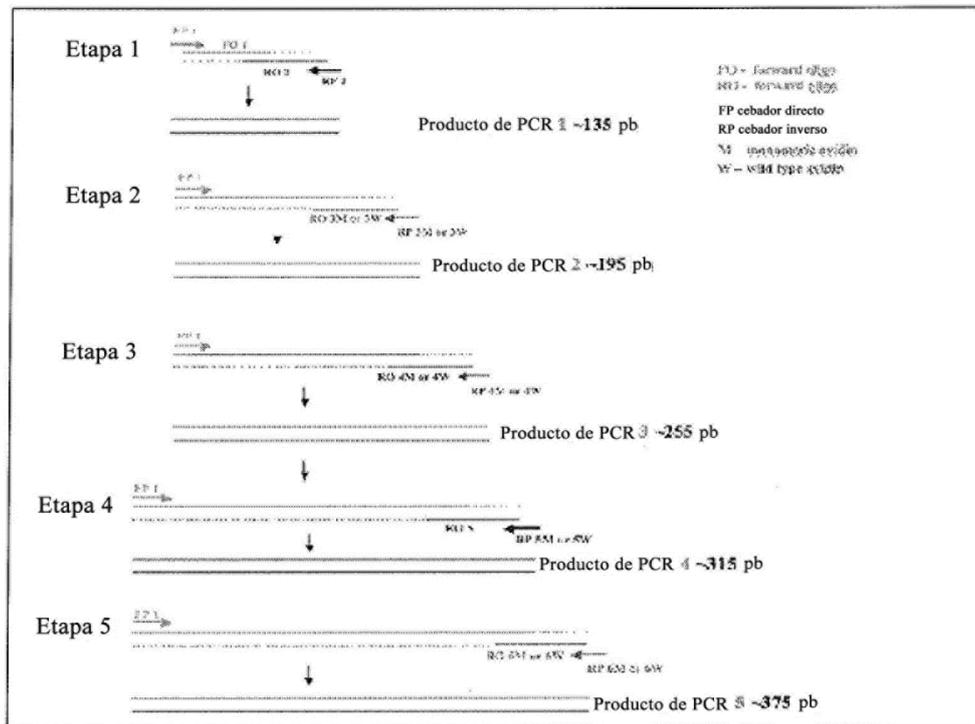


Figura 8

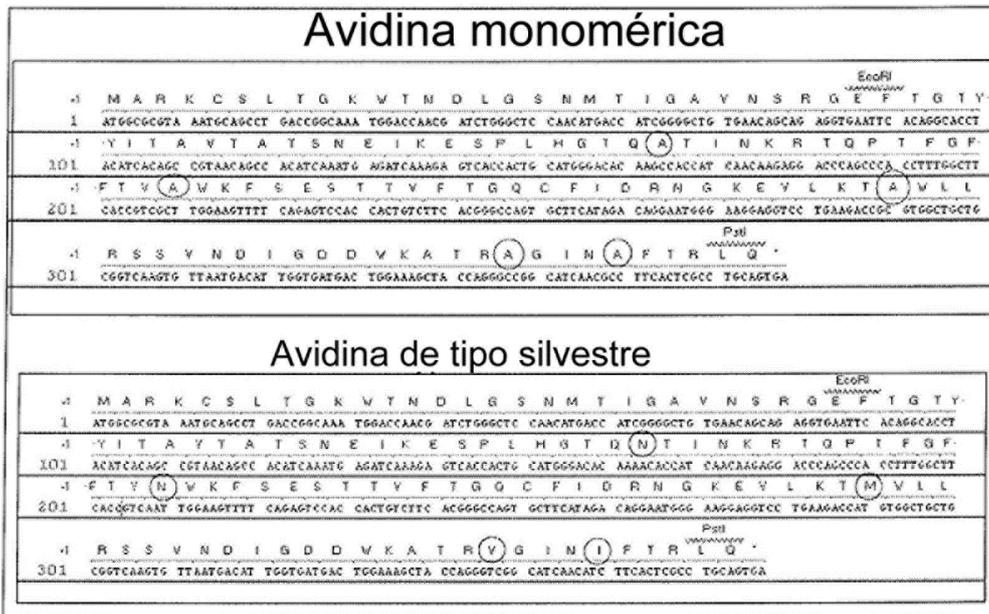


Figura 9

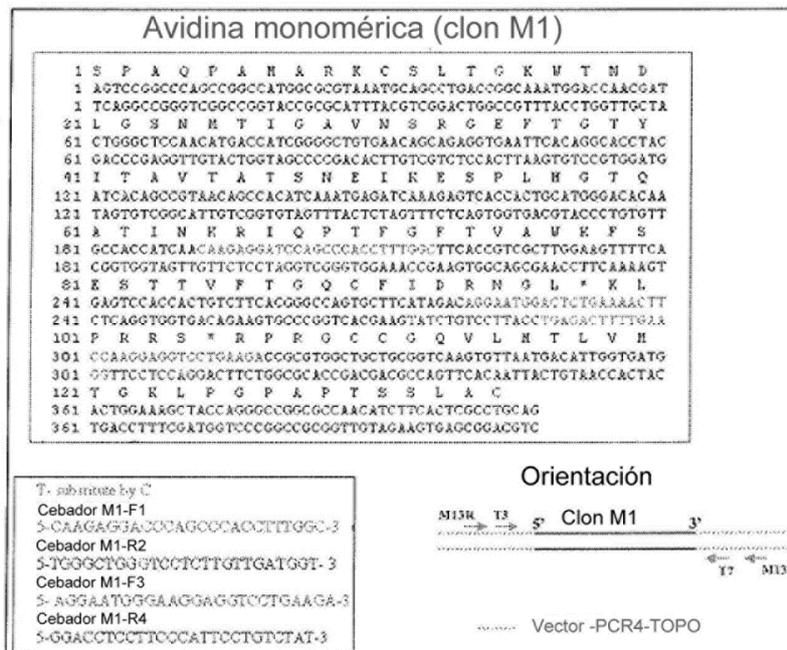


Figura 10



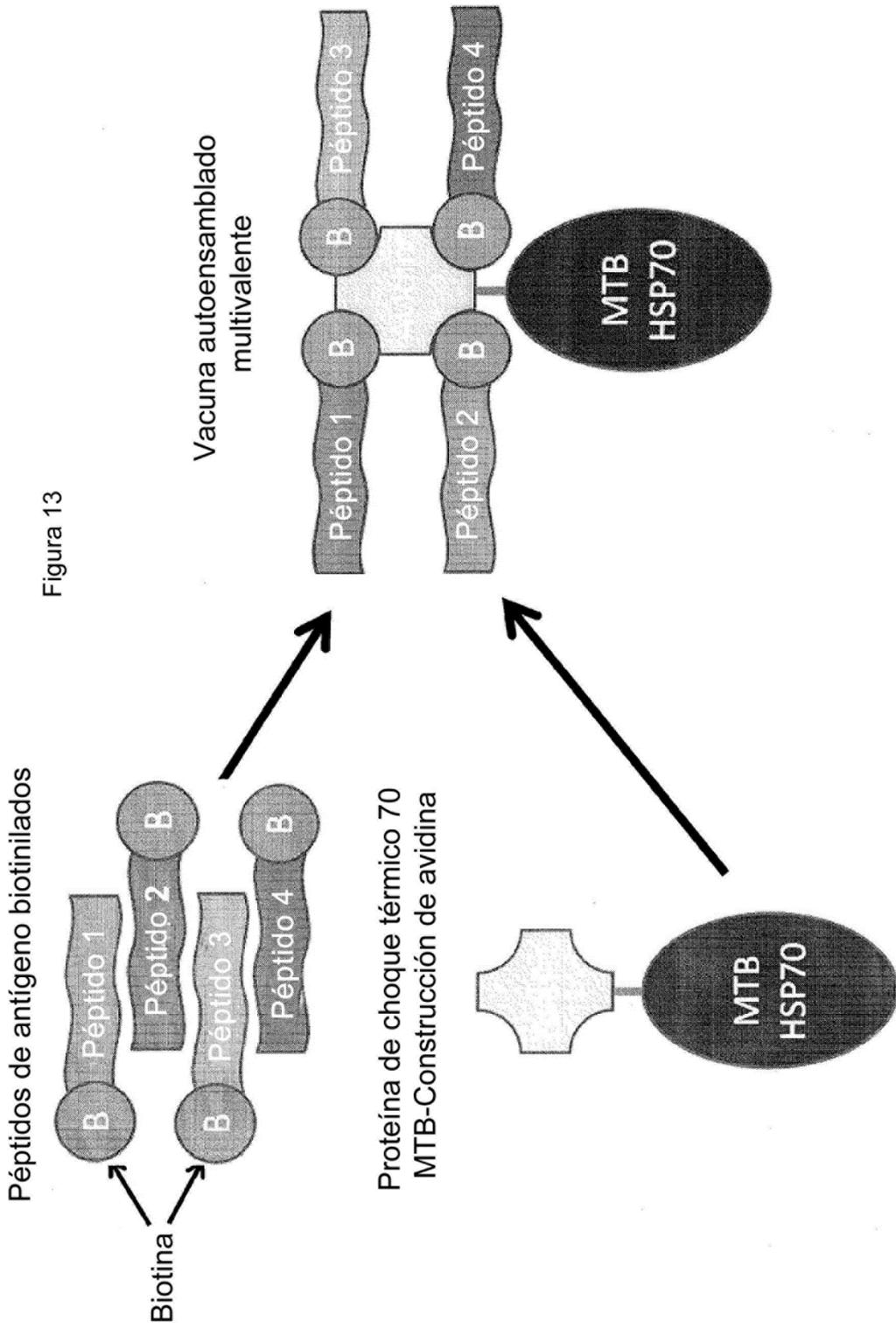


Figura 13

Figura 14

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

```

1  maravgidlg ttnsvvsvle ggdpvvvans egsrttpsiv afarngevlv ggpaknqavt
61  nvdrtvrsvk rhmgsdwsie idgkkytape isarilmklk rdaeaylged itdavittpa
121 yfndaqrqat kdagqiagln vlrivnepta aalaygldkg ekeqrilvfd lgggtfdvsl
181 leigegvvev ratsgdnhlg gddwdqrvvd wlvdkfkgts gidltkdkma mqrlreaaek
241 akielsssqts sinlpyitv dadknplfld eqltraefqr itqdldrtr kpfqsviadt
301 gisvseidhv vlvggstrmp avtdlvkelt ggkepnkgvn pdevvavгаа lqagvlkgev
361 kvllldvtp lslgietkkg vmtrliernt tiptkrsetf ttaddnqpsv qiqvyggere
421 iaahnkllgs feltgippap rgipqievtf didangivhv takdkgtgke ntiriqegsg
481 lskedidrmi kdaeahaeed rkrreeadvr nqaetlvyqt ekfvkeqrea eggskvpedt
541 lnkvdaavae akaalggsdi saiksamekl ggesqalgqa iyeaaqaasq 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 ggdpvvvans egsrttpsiv afarngevlv ggpaknqavt
61  nvdrtvrsvk rhmgsdwsie idgkkytape isarilmklk rdaeaylged itdavittpa
121 yfndaqrqat kdagqiagln vlrivnepta aalaygldkg ekeqrilvfd lgggtfdvsl
181 leigegvvev ratsgdnhlg gddwdqrvvd wlvdkfkgts gidltkdkma mqrlreaaek
241 akielsssqts sinlpyitv dadknplfld eqltraefqr itqdldrtr kpfqsviadt
301 gisvseidhv vlvggstrmp avtdlvkelt ggkepnkgvn pdevvavгаа lqagvlkgev
361 kvllldvtp lslgietkkg vmtrliernt tiptkrsetf ttaddnqpsv qiqvyggere
421 iaahnkllgs feltgippap rgipqievtf didangivhv takdkgtgke ntiriqegsg
481 lskedidrmi kdaeahaeed rkrreeadvr nqaetlvyqt ekfvkeqrea eggskvpedt
541 lnkvdaavae akaalggsdi saiksamekl ggesqalgqa iyeaaqaasq atgaahpgge
601 pggahpgsad dvvdaevvdd greak
    
```

Figura 15

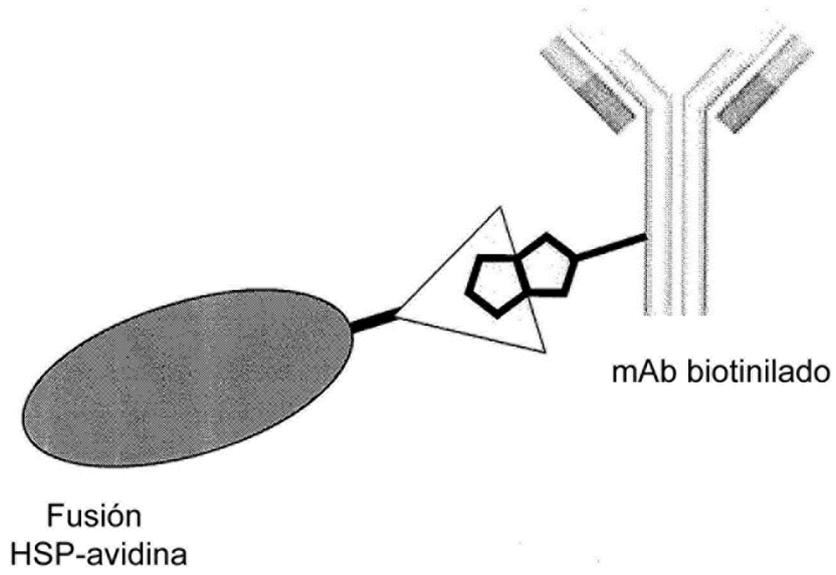


Figura 16

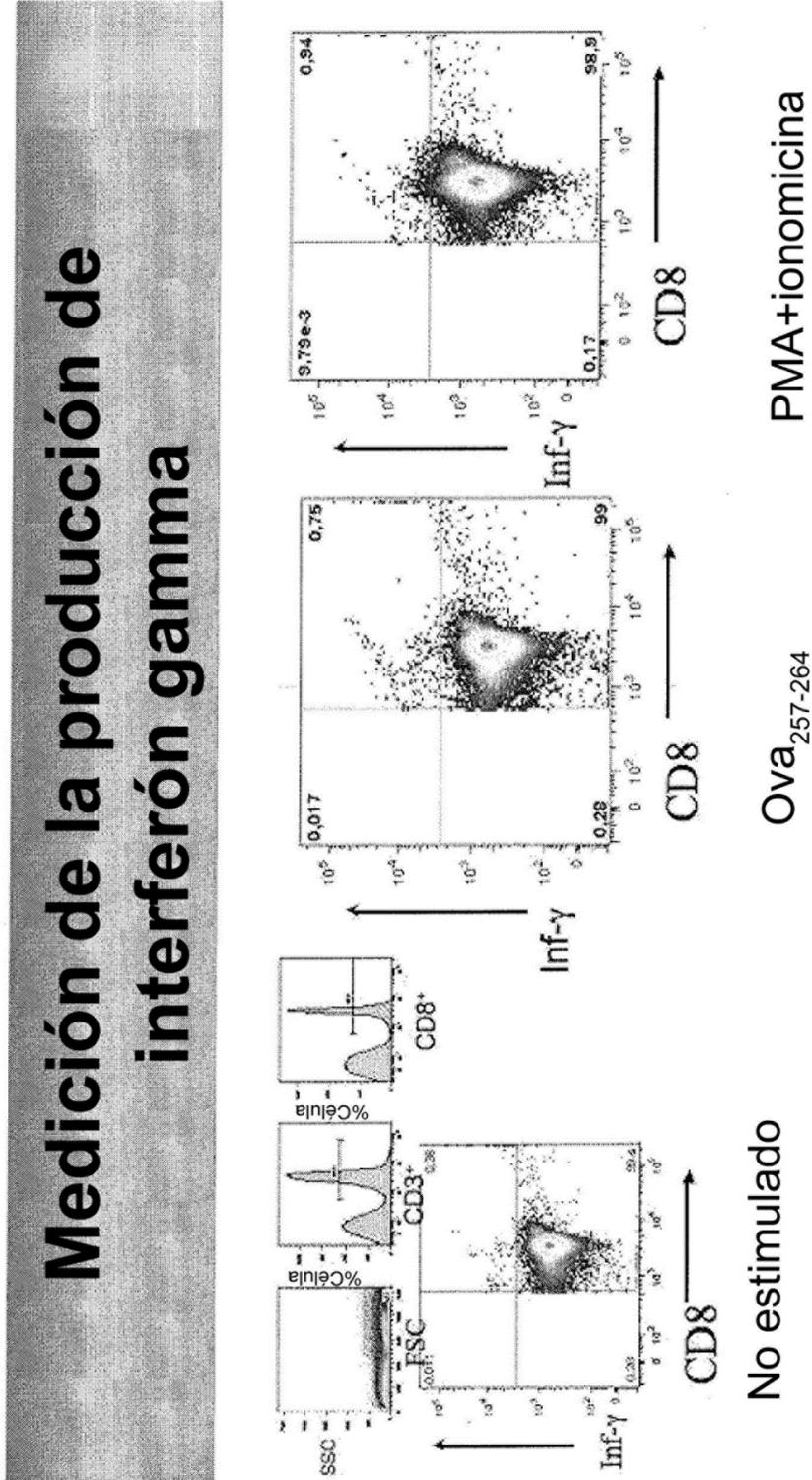


Figura 17

