



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 845**

51 Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07711100 .3**
96 Fecha de presentación : **23.02.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1992638**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2008**

54 Título: **Péptidos inmunomodulares y antitumorales.**

30 Prioridad: **24.02.2006 CU 472006**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2011

73 Titular/es: **CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**
Avda. 31 Entre 158 y 190 Cubanacán Playa
Ciudad de La Habana 10600, CU

72 Inventor/es: **Guerra Vallespi, Maribel;**
Torréns Madrazo, Isis del Carmen;
Reyes Acosta, Osvaldo;
Garay Pérez, Hilda, Elisa;
Guillén Nieto, Gerardo, Enrique;
Acevedo Castro, Boris, Ernesto y
Ubieta Gómez, Raimundo

74 Agente: **Justo Bailey, Mario de**

ES 2 358 845 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

Péptidos inmunomoduladores y antitumorales

5 **Campo de la técnica**

La presente invención está incluida en el campo de la inmunoterapia contra el cáncer. Más precisamente, los péptidos derivados de la secuencia 32-51 de la proteína factor anti-LPS de *Limulus* o sus combinaciones, que no pueden unirse a lipopolisacáridos y útiles para tratar el cáncer y la metástasis.

10

Antecedentes

Recientemente se ha notificado el uso de modificadores de la respuesta biológica para tratar el cáncer principalmente combinados con las terapias actuales para potenciar el beneficio del tratamiento (documento US 2004/0101511). Por otra parte, se ha desarrollado el uso de secuencias CpG, el agonista del receptor de tipo Toll 9 (TLR9), como nuevos fármacos para tratar, controlar y prevenir el cáncer como partes de múltiples indicaciones de tratamiento, es decir cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma y carcinoma renal (Klinman D. M., *et al.* (2004) Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol.* 4: 249-258). En la actualidad, se somete a prueba un agonista del receptor de tipo Toll 7 (TLR7) en ensayos clínicos de fase I para activar el sistema inmunitario, con resultados prometedores como un nuevo fármaco para tratar el melanoma y otros tumores (Dudek A. Z., *et al.* (2005) ASCO Annual Meeting). Los agonistas anteriormente mencionados de los TLR 7 y 9 también se están evaluando en infecciones virales, basándose en su capacidad para promover una respuesta inmunitaria eficaz en el huésped. Además, se han desarrollado y fabricado las denominadas proteínas de choque térmico (Hsp) que se unen al TLR4, como una proteína de fusión para la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano (VPH). Este nuevo enfoque inmunoterapéutico también se conoce como vacunas terapéuticas, con (Chu N. R. *et al.* (2000) Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin (BCG) hsp65 and HPV16 E7. *Clin Exp Immunol* 121: 216-225) una amplia perspectiva para tratar enfermedades relacionadas con el virus del papiloma humano. Los receptores de tipo Toll son moléculas de receptor presentes en las células del sistema inmunitario, que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos, como LPS, ácido lipoteicoico, secuencias CpG no metiladas y ARN viral mono y bicatenario. El reconocimiento del patógeno invasor por los TLR ayuda al sistema inmunitario a dirigir una respuesta inmunitaria Th1/Th2 equilibrada para erradicar de manera eficaz la infección fuera del organismo. El uso de los agonistas de TLR como fármacos para tratar el cáncer se basa en la activación de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo, activando una respuesta inmunitaria Th1 mediada por interferones de tipo I (por ejemplo IFN α y β) e interleucina 12 (IL-12) como el principal mecanismo. Por tanto, se consigue una respuesta inmunitaria altamente específica y sostenida (Switaj T., Jalili A., *et al.* (2004) CpG Immunostimulatory oligodeoxynucleotide 1826 enhances antitumor effect of interleukin 12 gene-modified tumor vaccine in a melanoma model in mice. *Clinical Cancer Research*, Vol. 10:4165-4175). Esta activación doble del sistema inmunitario contrasta con varios enfoques inmunoterapéuticos distintos que no pueden generar un efecto sostenido en la respuesta inmunitaria adaptativa y tampoco activar de manera inespecífica el sistema inmunitario innato con posteriores efectos no deseados (Speiser D. E., *et al.* (2005) Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, y CpG oligodeoxynucleotide 7909. *The Journal of Clinical Invest.* Vol. 115 (3)).

Las células dendríticas (CD) son células presentadoras de antígenos profesionales que unen respuestas inmunitarias innata y adaptativa mediante interacciones célula a célula y producción de citocinas. Las CD se clasifican en mieloides y linfoides según su origen, basándose en la expresión diferencial de una serie de marcadores moleculares de superficie y también los TLR. Las CD linfoides, también conocidas como CD plasmocitoides, son la principal fuente de interferones de tipo I. Considerando estas propiedades, las CD se han manipulado como adyuvantes celulares prometedores para desarrollar vacunas terapéuticas contra el cáncer e infecciones virales crónicas (Santini S.M., *et al.* (2003) A new type I IFN-mediated pathway for rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells. *Stem Cells*, 21:357-362). Sin embargo, ésta es una técnica muy cara y difícil, con otras estrategias terapéuticas más prácticas y menos caras en desarrollo (Van Epps H.L. (2005) New hope for tumor vaccines. *The Journal of Experimental Medicine*, Vol.202:1615).

Descritos al principio por su actividad antiviral, recientemente se ha demostrado que los interferones de tipo I (IFN α , β) ejercen efectos importantes sobre el sistema inmunitario, promoviendo respuestas inmunitarias celulares y humorales mediante sus efectos adyuvantes sobre las CD (Bogdan, C. (2000) The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr. Opin Immunol.* 12: 419-424). Trabajos recientes han sacado a la luz el papel crítico de los interferones de tipo I endógenos en los procesos que median la regresión de un sarcoma murino singénico altamente inmunogénico, y que protegen al huésped contra la aparición de tumor carcinogénico primario (Gavin P. Dunn, *et al.* (2005) A critical function for type I interferons in cancer immunoeediting. *Nature Immunology*, 12 de junio). Además, el IFN- α desempeña un papel importante en la iniciación de la respuesta antiviral de linfocitos T mediante la activación directa de linfocitos T CD4+ o CD8+ en infecciones virales como la gripe (Fonteneau J.F., *et al.* (2003) Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Immunobiology*, 101: 3520-3526).

Hoess (documento WO 95/05393) se refiere en su invención a sustancias que se unen a LPS con alta afinidad, útiles

5 para prevenir o tratar infecciones como septicemia mediada por bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, infecciones bacterianas en general e infecciones fúngicas. Sustancias de este tipo son péptidos de unión a LPS que portan un dominio de unión a endotoxina (Hoess A., *et al*, (1993) Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, Limulus anti-LPS factor, at 1.5Å^o resolution. The EMBO J. 12:3351-3356). La estructura cristalina de la proteína factor anti-LPS de *Limulus* (LALF) original revela un bucle similar a polimixina B, cargado de manera positiva, anfipático y que contiene residuos hidrófobos y aromáticos expuestos. Basándose en este principio, se documentó la capacidad de las secuencias correspondientes a los aminoácidos 31 a 52 en la proteína LALF para unirse y neutralizar los efectos asociados a heparina, como anticoagulación, angiogénesis e inhibición de la proliferación de células tumorales y endoteliales. Sin embargo, no existe ningún dato experimental que soporte esta declaración en la patente mencionada anteriormente. De hecho, las reivindicaciones concedidas hacen referencia a un dispositivo para eliminar LPS en disolución, comprendiendo dicho dispositivo péptidos inmovilizados en un soporte sólido (documento US 6.384.188).

15 Por otra parte, Vallespi (documento US 6.191.114) se refiere en su invención al efecto antiviral del péptido LALF₃₁₋₅₂ sobre células Hep-2 y MDBK, mediado por la producción de los interferones α y γ , refiriéndose también su invención al uso de este péptido para tratar infecciones virales y trastornos relacionados con la inmunosupresión. Además, el mismo autor ha demostrado el efecto antiinfeccioso de este péptido en modelos animales de septicemia (Vallespi M.G., *et al*. (2003) A Limulus anti-LPS factor-derived peptide modulates cytokine gene expression and promotes resolution of bacterial acute infection in mice. International Immunopharmacology, 3:247-256).

20 Existen varias terapias dirigidas contra el cáncer, incluyendo quimioterapia, radiaciones y terapia génica. La toxicidad es una principal desventaja de todas estas terapias, habiéndose administrado altas dosis durante periodos de tiempo prolongados para lograr finalmente algún efecto terapéutico beneficioso. Por tanto, aún se requiere el desarrollo de nuevos fármacos para obtener tratamientos más eficaces.

25 Basándose en el papel esencial del sistema inmunitario para detectar y dirigir una respuesta eficaz contra tumores, fármacos diseñados para activar los mecanismos de defensa innato y adaptativo del huésped pueden convertirse en herramientas poderosas para agentes terapéuticos contra el cáncer.

30 No existe ninguna sustitución de aminoácidos anterior descrita para la secuencia HYRIKPTFRRLKWKKYKGF_W de la proteína LALF, que elimine su capacidad de unión a LPS y que potencie el efecto inmunomodulador, confiriendo también efectos antitumorales *in vivo* contra varios tumores.

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención resuelve los problemas mencionados anteriormente, proporcionando péptidos derivados de la región 32-51 de la secuencia de la proteína LALF HYRIKPTFRRLKWKKYKGF_W (SEQ. ID. NO: 13), en la que se han sustituido aminoácidos para erradicar la capacidad de unión a LPS y potenciar el efecto antitumoral e inmunomodulador.

40 Péptidos análogos, derivados de dicha secuencia mediante sustituciones que prohíben la unión a LPS o heparina y que también proporcionan efectos antitumorales e inmunomoduladores aumentados en comparación con el péptido original, consisten en las siguientes secuencias:

45 HARIKPTFRRLKWKKYKGF_W (SEQ. ID. NO: 1)
 HYRIKPTARRLKWKKYKGF_W (SEQ. ID. NO: 2)
 HYRIKPTFRRLAWKKYKGF_W (SEQ. ID. NO: 3)
 HYRIKPTFRRLKWKKYKGF_A (SEQ. ID. NO: 4)

50 Los péptidos de unión a LPS descritos por Hoess y Vallespi son desventajosos porque desvían un perfil de Th1/Th2 mixto hacia un perfil de Th2 predominante, perjudicial para los pacientes con cáncer. Estos pacientes presentan comúnmente infecciones concomitantes debido a inmunodepresión, sin descartar la presencia de partículas de LPS en la sangre. La administración de un péptido que induce un perfil de Th2 predominante en presencia de LPS daría como resultado efectos no deseados, deteriorando adicionalmente el estado inmunológico del paciente y empeorando la respuesta del huésped contra el tumor. Además, la unión a LPS del péptido descrito por Vallespi minimizaría el efecto inmunomodulador de este péptido.

55 Por otra parte, la falta de unión a heparina de los péptidos descritos en la presente invención los hace superiores a aquéllos descritos anteriormente por Hoess y Vallespi. En paciente críticos como aquéllos que padecen cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular, enfermedad tromboembólica venosa (trombosis venosa profunda y embolia pulmonar) e isquemia de extremidades posteriores, se indica la heparina como tratamiento (D. Cabestrero Alonso, *et al* (2001) Heparinas de bajo peso molecular en pacientes críticos: usos, indicaciones y tipos. Medicina Intensiva, Vol.95:18-26). Posteriormente, en este contexto podría estar contraindicada la administración de un péptido de unión a heparina, debido a la interferencia con el efecto de este fármaco. La asociación del cáncer y las enfermedades tromboembólicas es un fenómeno bien descrito que puede contribuir significativamente a la morbimortalidad en pacientes con cáncer, como trombosis venosa profunda y embolia pulmonar. Basándose en las razones anteriormente mencionadas, la disponibilidad de los péptidos que no pueden unirse a heparina y que muestran un efecto antitumoral e inmunomodulador en el tratamiento de pacientes con cáncer es ventajosa, un porcentaje significativo de estos pacientes

sometidos comúnmente a cirugía y que presentan otros trastornos como hipercoagulación (Castelli R., *et al* (2004) The heparin and cancer: Review of clinical trials and biological properties. Vascular Medicine, Vol.9:1-9).

5 La invención también incluye péptidos con dos o más aminoácidos sustituidos por alanina, que comprenden las siguientes secuencias de aminoácidos:

HYRIKPTARRLAWKYKGKFW (SEQ. ID. NO: 8)
 HARIKPTARRLKWYKGKFW (SEQ. ID. NO: 9)
 HARIKPTFRRLAWKYKGKFW (SEQ. ID. NO: 10)
 10 HARIKPTARRLAWKYKGKFW (SEQ. ID. NO: 11)
 HARIKPTARRLAWKYKGKFA (SEQ. ID. NO: 12)

15 y cualquier otra variante homóloga o mimética de estos péptidos anteriores, obtenida mediante procedimientos sintéticos o recombinantes, y como parte de cualquier péptido de fusión. La variante homóloga hace referencia a cualquier péptido desprovisto de capacidad de unión a LPS o heparina y que porta un efecto antitumoral e inmunomodulador. De manera similar, dicha variante mimética hace referencia a cualquier molécula de origen químico (no proteico) cuya estructura está desprovista de la capacidad de unión a LPS o heparina y que mantiene un efecto antitumoral e inmunomodulador.

20 En una realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica contiene uno o más péptidos y compuestos químicos o sus sales farmacéuticamente aceptables respectivas, así como excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

25 En otra realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica contiene adicionalmente un antígeno seleccionado del grupo que comprende un antígeno bacteriano, viral o de cáncer.

30 De manera similar, los péptidos de la presente invención podrían usarse en combinación con tratamientos convencionales contra el cáncer, como quimioterapia, cirugía, radiación, etc. La presente invención también comprende el uso de estos péptidos y compuestos químicos para preparar una composición farmacéutica para tratar y/o prevenir trastornos inmunológicos que requieren una respuesta inmunitaria Th1 eficaz; tratamiento o prevención del cáncer y para desarrollar una respuesta inmunitaria eficaz contra infecciones de origen bacteriano o viral.

35 Los péptidos descritos se definieron por estar desprovistos de la capacidad de unión a LPS, en lugar de la secuencia HYRIKPTFRRLKWYKGKFW original, descrita anteriormente como un dominio óptimo consenso para la unión a LPS (Hoess *et al.*, (1993) Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, Limulus anti-LPS factor, at 1.5Å^o resolution. The EMBO J. 12:3351-3356). De la misma manera, los péptidos descritos en la presente invención potencian el efecto inmunomodulador, mediado por la secreción de IFN- γ , en comparación con el péptido derivado de la proteína LALF que comprende los aminoácidos 31 a 51 a los que Vallespi hace referencia en su patente (documento US 6.191.114) como un péptido antiviral e inmunomodulador.

40 De manera similar, los péptidos descritos en la invención pueden administrarse a pacientes inmunosuprimidos y a aquéllos que requieren una activación de su estado inmunológico, como pacientes que padecen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y pacientes sometidos a cirugía compleja.

45 Datos experimentales *in vivo* demostraron la eficacia de péptidos análogos en tumores implantados en ratones, derivados estos tumores de células B16 de melanoma murino; células epiteliales pulmonares malignas de ratones C57Bl/6 y células 3LL-D122 obtenidas de cáncer de pulmón de ratones.

50 En otra realización, pueden administrarse péptidos para minimizar los acontecimientos metastásicos.

Otros resultados de la presente invención indican que los péptidos descritos muestran efectos antiproliferativos sobre líneas celulares tumorales de origen histológico variado, lo que demuestra un efecto citotóxico directo sobre las células cancerosas.

55 En principio, los péptidos descritos pueden usarse solos o combinados con terapias actuales para tratar el cáncer, como cirugía, radiación o quimioterapia.

60 De manera similar, los péptidos descritos en la presente invención, cuando se administran de manera profiláctica, generan una respuesta inmunitaria innata rápida contra el tumor, desarrollando posteriormente una respuesta inmunitaria específica de antígeno adaptativa, que pone de relieve su uso en vacunas profilácticas o terapéuticas contra el cáncer.

Breve descripción de las figuras:

65 Figura 1: Efecto de los péptidos sobre la capacidad de unión a lipopolisacáridos (LPS) bacterianos.

Figura 1A, se realizaron estos experimentos por triplicado; se muestran las curvas de inhibición de un experimento. Los porcentajes de inhibición mostrados en la figura 1B representan la media de tres experimentos independientes.

5 Figura 2: Efectos de los péptidos sobre la capacidad para unir el compuesto aniónico heparina. Se muestra la media de tres experimentos independientes.

Figura 3: Efectos de los péptidos sobre la producción de interferones α y γ e IL-12 en células mononucleares humanas. Se realizaron tres experimentos con diferentes donantes, se muestran los resultados de uno de ellos.

10 Figura 4: Efecto antitumoral de los péptidos en el modelo de tumor TC-1.

Figura 5: Efecto antitumoral del péptido L-2 en el modelo de melanoma.

15 Figura 6: Efecto antitumoral del péptido L-2 análogo en un programa de administración profiláctica del modelo de tumor TC-1.

Figura 7: Efecto antitumoral del péptido L-2 análogo en un programa de doble exposición con células tumorales TC-1.

20 Figura 8: Capacidad antimetastásica del péptido L-2 análogo.

Figura 9: Efecto del péptido L-2 análogo sobre la proliferación de células TC-1, H125 y L929.

EJEMPLOS

25 Ejemplo 1. Síntesis de péptidos

Se sintetizan los péptidos de la invención siguiendo un procedimiento en fase sólida. Se extrae el péptido bruto con una disolución de ácido acético al 30%, se liofiliza y se purifica adicionalmente mediante RP-HPLC. Se controlan los pesos moleculares de los péptidos purificados usando un espectrómetro de masas JEOL JMS-HX110HF con una pistola FAB. La preparación resultante es no antigénica, no pirogénica y farmacéuticamente aceptable para la administración en animales y seres humanos. Se llevaron a cabo sustituciones introduciendo el aminoácido alanina en cada posición de la secuencia original del péptido HYRIKPTFRRLKWKYKGF_W.

35 Ejemplo 2. Selección de péptidos análogos desprovistos de capacidad de unión a lipopolisacáridos (LPS).

Este ensayo consiste en una sistema ELISA de competición ELISA (Hardy E., *et al* (1994) Enhanced ELISA sensitivity using TCA for efficient coating of biologically active LPS o Lipid A to the solid phase. J. Immunol. Meth. Vol:176:111-116). Se recubrieron placas de poliestireno (Costar, EE.UU.) con LPS de *E.coli* 0111:B4 (1 μ g/ml) con ácido tricloroacético (TCA) al 0,2%. Se incubaron las placas durante la noche a 37°C y se lavaron adicionalmente diez veces con solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS 1X) más Tween 20 al 0,1% (disolución de lavado). Se evaluó la unión de péptidos análogos al LPS fijado a la superficie sólida mediante un ELISA de competición con el péptido LALF₃₂₋₅₁ biotinilado a 0,2 μ M, obteniendo un 90% de la unión a LPS máxima. Para estimar las curvas de inhibición, se usaron diferentes concentraciones de los péptidos análogos, desde 10 μ M hasta 0,01 μ M y la curva del péptido LALF₃₂₋₅₁ como control experimental. Se incubó el LALF₃₂₋₅₁ biotinilado en presencia de los péptidos análogos durante 2 h a 37°C y se lavaron las placas 5 veces tras ese tiempo con disolución de lavado. Se detectó el LALF₃₂₋₅₁ biotinilado unido a LPS incubando durante 45 min. a 37°C con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa a una dilución de 1:2.000. Se lavaron las placas 5 veces con disolución de lavado y se añadió la disolución de sustrato (tampón citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,5, 1 comprimido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno al 0,025%). Tras 15 min. de incubación, se detuvo la reacción añadiendo ácido sulfúrico 2 M. Se cuantificó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Sensident Scan). Existe una correlación entre los valores de densidad óptica y la capacidad de unión a LPS de péptidos análogos. Los péptidos análogos con mayor capacidad de unión a LPS muestran curvas de inhibición de D.O inferior en comparación con la curva de inhibición del péptido LALF₃₂₋₅₁.

55 Los péptidos análogos con menor capacidad de unión a LPS presentan curvas de inhibición con valores de D.O., en comparación con la curva de inhibición del péptido LALF₃₂₋₅₁. En la figura 1A se muestran resultados, que demuestran que los péptidos denominados L-2, L-8, L-12 y L-20 pierden la capacidad para unirse a LPS, conservando los péptidos L-9 y L-19 esa capacidad, similar al péptido LALF₃₂₋₅₁. Por otra parte, el péptido L-3 muestra una mayor capacidad de unión a LPS.

60 La figura 1B representa los porcentajes de inhibición de péptidos análogos, a una concentración 0,5 M fija, según su capacidad para desplazar la unión del LALF₃₂₋₅₁ biotinilado (0,2 μ M) al LPS adsorbido en la superficie sólida.

$$\% \text{ de inhibición} = \{1 - (([D.O.]_{\text{muestra}} - [D.O.]_{\text{min}}) / ([D.O.]_{\text{max}} - [D.O.]_{\text{min}}))\} \times 100$$

65 [D.O.]_{muestra}: valor de la densidad óptica en presencia de una concentración fija de péptidos análogos;

[D.O.]_{min}: fondo de ELISA;

[D.O.]_{max}: valor de la densidad óptica sin péptidos análogos.

5

Tabla 1. Secuencia de péptidos usados en los ejemplos

Péptido	Secuencias de aminoácidos
L-2	³² HARIKPTFRRLKWKYKGGFW ₅₁ (SEQ. ID. NO: 1)
L-3	³² HYAIKPTFRRLKWKYKGGFW ₅₁ (SEQ. ID. NO: 5)
L-8	³² HYRIKPTARRLKWYKGGFW ₅₁ (SEQ. ID. NO: 2)
L-9	³² HYRIKPTFARLKWYKGGFW ₅₁ (SEQ. ID. NO: 6)
L-12	³² HYRIKPTFRRLAWKYKGGFW ₅₁ (SEQ. ID. NO: 3)
L-19	³² HYRIKPTFRRLKWKYKGGAW ₅₁ (SEQ. ID. NO: 7)
L-20	³² HYRIKPTFRRLKWKYKGGFA ₅₁ (SEQ. ID. NO: 4)

10

Como resultado de estos análisis, se llevaron a cabo mutaciones dobles, triples y cuádruples, partiendo de péptidos desprovistos de la capacidad de unión a LPS:

HYRIKPTARRLAWKYKGGFW (SEQ. ID. NO: 8)
 HARIKPTARRLKWYKGGFW (SEQ. ID. NO: 9)
 HARIKPTFRRLAWKYKGGFW (SEQ. ID. NO: 10)
 HARIKPTARRLAWKYKGGFW (SEQ. ID. NO: 11)
 HARIKPTARRLAWKYKGGFA (SEQ. ID. NO: 12)

15

Ejemplo 3: Evaluación de la capacidad de unión a heparina de péptidos análogos L-2, L-8, L-12 y L-20.

20

Este ensayo consiste en un sistema ELISA de competición, similar al descrito anteriormente. Se adsorbió el péptido LALF₃₂₋₅₁ biotinilado en placas de poliestireno (Costar, EE.UU.) en PBS 1X y se incubaron durante la noche a 4°C. Se mezclaron los péptidos análogos L-2, L-8, L-12 y L-20 a 2 µM con 250 unidades de heparina (Heparina sódica, 5.000 U/ml, Liorad) en PBS 1X más albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1%. Después, se añadieron mezclas a una placa de ELISA que contenía 0,02 µM del péptido LALF₃₂₋₅₁ biotinilado adsorbido en la superficie sólida. Tras una incubación de 1 h a temperatura ambiente, se lavaron las placas cinco veces con disolución de lavado y se detectó el péptido LALF₃₂₋₅₁ biotinilado fijado en la superficie sólida incubando durante 45 min. a 37°C con conjugado estreptavidina-peroxidasa a 1:2.000. Después, se lavaron las placas cinco veces con disolución de lavado y se añadió la disolución de sustrato. Tras una incubación adicional durante 15 min., se detuvieron las reacciones con disolución de ácido sulfúrico 2 M. La falta de unión de la heparina a los péptidos análogos se correlaciona con la densidad óptica disminuida, porque no pueden desplazar la heparina unida al péptido LALF₃₂₋₅₁ biotinilado adsorbido a la superficie sólida. Se usó el péptido LALF₃₂₋₅₁ no marcado en un exceso molar de 100 X como control del ensayo. Se demuestra la unión a heparina del péptido LALF₃₂₋₅₁ no marcado mediante los valores de densidad óptica aumentados, porque el exceso de péptido frío compite por la unión a heparina. Tal como se muestra en la figura 2, los resultados indican que el péptido L-2, L-8, L-12 y L-20 descritos en la presente invención no pueden unirse a heparina.

25

30

35

Ejemplo 4. Efecto de los péptidos análogos L-2, L-8, L-12 y L-20 sobre la expresión de IFN-α, IFN-γ e IL-12 en células mononucleares humanas.

Para este ensayo, se aislaron células mononucleares humanas mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque de un concentrado de leucocitos o "capa leucocitaria" de un donante. Se sembraron hasta 5x10⁶ en placas de 24 pocillos en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal de ternero al 10%. Se añadió adicionalmente cada péptido a 40 µg/ml en un volumen de 0,1 ml de medio RPMI y se cultivaron las células durante 18 h a 37°C y un 5% de CO₂. Se extrajo el ARN total usando el método TriReagent. Después, se determinaron las expresiones de los genes de IFN-α, IFN-γ e IL-12 mediante la reacción de transcripción inversa y amplificación por PCR (kit de RT-PCR, Perkin Elmer). Los resultados se muestran como cantidades relativas de ARN mensajero normalizadas frente a los niveles de expresión del gen de mantenimiento de la β-actina. Los resultados obtenidos en este ensayo demostraron que los péptidos L-2, L-8, L-12 y L-20 descritos en esta invención pueden inducir la expresión de los genes de IFN-α, IFN-γ e IL-12, tal como se muestra en la figura 3A. Los péptidos análogos L-2, L8 y L-12 son particularmente más eficaces al inducir la expresión del gen de IFN-α que el péptido LALF₃₂₋₅₁, tal como se muestra en la figura 3B. Este ejemplo demuestra que las sustituciones de aminoácidos en la secuencia LALF₃₂₋₅₁ original eliminan la capacidad para unirse a LPS, potenciando posteriormente el efecto inmunomodulador del péptido resultante.

40

45

50

Ejemplo 5. Efecto antitumoral de los péptidos análogos L-2, L-8, L-12 y L-20 en el modelo de tumor TC-1.

Para este ensayo, se usaron ratones hembra C57Bl/6 de ocho a diez semanas de edad (n=10 animales por grupo experimental). Para el injerto de tumor, se usaron células tumorales TC-1 derivadas de células epiteliales pulmonares malignas de C57Bl/6, que se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se inoculó una cantidad de 50.000 células en un volumen de 200 µl en ratones por vía subcutánea en la extremidad posterior derecha. Se llevó

55

a cabo la primera administración del péptido por vía subcutánea en el flanco derecho una vez que el tumor alcanzó un volumen de 100 mm³, y se llevó a cabo la segunda tras 10 días. En este ensayo, se evaluó una dosis de 4 mg por kg de peso (80 µg/ratones). La supervivencia de los animales y la masa tumoral fueron los parámetros evaluados para medir el efecto antitumoral de los péptidos de interés, tal como se muestra en las figuras 4A y 4B. Los péptidos análogos L-2, L-8, L-12 y L-20 fueron eficaces para inhibir el desarrollo del tumor y prolongar la supervivencia de los ratones, respectivamente. Estos resultados manifiestan la eficacia antitumoral de los péptidos análogos en un modelo de tumor sólido en ratones. Se usó el método del rango logarítmico como análisis estadístico para detectar diferencias significativas entre los grupos. Los resultados manifestaron que los péptidos análogos L-2, L-8, L-12 y L-20 aumentan significativamente la supervivencia de los animales, en comparación con el péptido LALF₃₂₋₅₁ (p< 0,05). Estos resultados demuestran que las sustituciones de aminoácidos en la secuencia 32-51 original de la proteína LALF podrían aumentar significativamente la capacidad antitumoral del péptido.

Ejemplo 6. Efecto antitumoral del péptido L-2 análogo en un modelo de melanoma.

Para este ensayo, se usaron ratones hembra C57Bl/6 de ocho a diez semanas de edad (n=10 animales por grupo experimental). Para el injerto de tumor, se usaron células tumorales MB16-F10, que se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se inoculó una cantidad de 15.000 células en un volumen de 200 µl por vía subcutánea en la extremidad posterior derecha. Tras 4 días, se administró el péptido L-2, administrándose la segunda inyección 7 días después, y se administró la tercera inmunización 14 días después. En este ensayo se evaluó una dosis de 4 mg del péptido por kg de peso animal. Los parámetros evaluados para medir el efecto antitumoral del péptido administrado durante este ensayo fueron el tiempo de injerto de tumor y la supervivencia de los animales. Tal como se muestra en la figura 5A, el péptido L-2 análogo retrasó significativamente el injerto de tumor (p< 0,05, método del rango logarítmico). El análisis de la supervivencia mediante el método del rango logarítmico demostró que el péptido L-2 aumentaba significativamente la supervivencia de los animales (p< 0,05), siendo más eficaz que el péptido LALF₃₂₋₅₁, tal como se muestra en la figura 5B. Estos resultados manifiestan la eficacia antitumoral del péptido L-2 no sólo contra células cancerosas epiteliales de pulmón, sino también contra células cancerosas de otras partes histológicas y anatómicas del organismo, como melanoma.

Ejemplo 7. Efecto antitumoral del péptido L-2 análogo en un programa de tratamiento profiláctico, en el modelo de tumor TC-1.

Se usaron ratones hembras C57Bl/6 de ocho a diez semanas para este ensayo (n=10 animales por grupo experimental). Para el injerto de tumor, las células tumorales TC-1, que se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS). En primer lugar se inyectaron los ratones con el péptido L-2 (4 mg de péptido/kg de peso corporal). Tras 7 días, recibieron una segunda inyección de la misma dosis; tras 14 días de la primera inyección del péptido, se inocularon los animales con 50.000 células en un volumen de 200 µl por vía subcutánea en la extremidad posterior derecha. Los parámetros evaluados para medir el efecto antitumoral del péptido incluyeron el tiempo para el injerto de tumor (figura 6A) y la supervivencia de los animales (figura 6B). Los resultados obtenidos en este ensayo demostraron que el péptido L-2 de esta invención era eficaz para impedir el desarrollo del tumor y también aumentaba la supervivencia de los animales. Estos resultados manifiestan que el péptido de la presente invención muestra un efecto profiláctico que impide el establecimiento del tumor.

Ejemplo 8. Efecto antitumoral del péptido L-2 análogo en un programa de doble exposición.

Se expusieron adicionalmente los animales sin tumores establecidos en el programa del ejemplo anterior (n=6) por segunda vez con 50.000 células TC-1 en un volumen de 200 µl en PBS por vía subcutánea en la extremidad posterior izquierda (día 49 tras la primera exposición). Se inoculó la misma cantidad de células tumorales a ratones "sin tratamiento previo" de la misma camada como grupo control del experimento, para garantizar la homogeneidad en la edad, y se mantuvieron en las mismas condiciones sin recibir el péptido (n=10 animales). Los parámetros evaluados para medir el efecto antitumoral del péptido L-2 incluyeron el tiempo del injerto de tumor y la supervivencia de los animales. Los resultados obtenidos en este ensayo demuestran que el péptido L-2 puede proteger a los ratones de una segunda exposición con células tumorales, lo que retarda el establecimiento del tumor (figura 7A) y aumenta la supervivencia de los animales (figura 7B). Este resultado manifiesta que el péptido de la invención puede inducir una respuesta antitumoral sostenida, aún funcional contra una segunda exposición con células tumorales, lo que manifiesta el desarrollo de una respuesta inmunitaria adaptativa específica de antígeno.

Ejemplo 9. Efecto antitumoral del péptido L-2 análogo en el modelo de metástasis de carcinoma de Lewis.

Para este ensayo se usaron ratones hembra C57Bl/6 de ocho a diez semanas de edad (n=8 animales por grupo experimental). Se inocularon estos animales en la pata derecha posterior con 250.000 células 3LLD122 cancerosas de pulmón de ratones. Tras 7 días, se inyectó por vía subcutánea una dosis de 4 mg/kg de peso corporal del péptido L-2 análogo. Cuando los tumores alcanzaron 8 mm de diámetro, se extrajo de manera quirúrgica el tumor primario de la pata portadora. Se sacrificaron los ratones 21 días tras este procedimiento quirúrgico. Se pesaron los pulmones para indicar la cantidad de metástasis en ellos. Los resultados mostrados en la figura 8 indican que el péptido L-2 análogo de esta invención puede reducir los acontecimientos tumorales metastásicos.

Ejemplo 10. Efecto del péptido L-2 análogo sobre el crecimiento de células tumorales.

5 Para este ensayo, se sembraron células TC-1, H-125 (células de cáncer de pulmón humano no pequeñas) y L929 (fibroblasto murino) en placas de cultivo de 96 pocillos (Costar) a 2×10^4 células/ml en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) complementado con suero fetal de ternero (Gibco). Tras 24 h, se añadieron los péptidos al cultivo en un intervalo de 9 μ M a 300 μ M. Se incubaron las placas durante 72 h con CO₂ al 5% y tras ese tiempo, se reveló el ensayo con violeta cristal. Se lavaron las placas exhaustivamente con agua del grifo y se leyeron las placas a 562 nm. Los resultados se muestran en la figura 9. Se empleó un péptido proapoptótico con un efecto antiproliferativo marcado *in vitro* como control positivo (Perea, S., *et al* (2004) Antitumor Effect of a Novel Proapoptotic Peptide that Impairs the Phosphorylation by the Protein Kinase 2. Cancer Research 64: 7127-7129). Los resultados obtenidos demostraron que el péptido L-2 produce un efecto antiproliferativo dependiente de la dosis sobre las células TC-1 y H-125. Sin embargo, no se detectó ningún efecto con el péptido de la presente invención en la línea celular L929 de fibroblastos murinos. Este resultado demuestra que el péptido de la presente invención muestra un efecto citotóxico selectivo sobre células tumorales *in vitro*.

15 **LISTA DE SECUENCIAS**

<110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

20 <120> PÉPTIDOS INMUNOMODULADORES Y ANTITUMORALES

<130> Documento P85705EP00

25 <150> Documento PCT/CU2007/000006

<151> 23-02-2007

<150> Documento CU 2006-0047

<151> 24-02-2006

30 <160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

35 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <221> PÉPTIDO

<222> (1)..(20)

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido desde el a.a. 32 hasta el 51 de la proteína LALF, modificado sustituyendo el a.a. 33 por alanina

<400> 1

His Ala Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys
 1 5 10 15

45 Gly Lys Phe Trp
 20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(20)

55 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido desde el a.a. 32 hasta el 51 de la proteína LALF, modificado sustituyendo el a.a. 39 por alanina

<400> 2

His Tyr Arg Ile Lys Pro Thr Ala Arg Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys
 1 5 10 15

Gly Lys Phe Trp
 20

- <210> 3
- <211> 20
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <221> PÉPTIDO
- 10 <222> (1)..(20)
- <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido desde el a.a. 32 hasta el 51 de la proteína LALF, modificado sustituyendo el a.a. 43 por alanina

<400> 3

His Tyr Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Ala Trp Lys Tyr Lys
 1 5 10 15

Gly Lys Phe Trp
 20

- 15 <210> 4
- <211> 20
- <212> PRT
- 20 <213> Secuencia artificial

- <220>
- <221> PÉPTIDO
- 25 <222> (1)..(20)
- <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido desde el a.a. 32 hasta el 51 de la proteína LALF, modificado sustituyendo el a.a. 51 por alanina 51

<400> 4

His Tyr Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys
 1 5 10 15

Gly Lys Phe Ala
 20

- 30 <210> 5
- <211> 20
- <212> PRT
- 35 <213> Secuencia artificial

- <220>
- <221> PÉPTIDO
- 40 <222> (1)..(20)
- <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido desde el a.a. 32 hasta el 51 de la proteína LALF, modificado sustituyendo el a.a. 34 por alanina

<400> 5

His Tyr Ala Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys
 1 5 10 15

Gly Lys Phe Trp
 20

- 45 <210> 6
- <211> 20
- <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> PÉPTIDO

5 <222> (1)..(20)

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido desde el a.a. 32 hasta el 51 de la proteína LALF, modificado sustituyendo el a.a. 40 por alanina

<400> 6

His Tyr Arg Ile Lys Pro Thr Phe Ala Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys

1 5 10 15

Gly Lys Phe Trp
20

10

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(20)

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido desde el a.a. 32 hasta el 51 de la proteína LALF, modificado sustituyendo el a.a. 50 por alanina

<400> 7

His Tyr Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys
1 5 10 15

Gly Lys Ala Trp
20

25

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(20)

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido desde el a.a. 32 hasta el 51 de la proteína LALF, modificado sustituyendo los a.a. 39 y 43 por alanina

35

<400> 8

His Tyr Arg Ile Lys Pro Thr Ala Arg Arg Leu Ala Trp Lys Tyr Lys
1 5 10 15

Gly Lys Phe Trp
20

40

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(20)

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido desde el a.a. 32 hasta el 51 de la proteína LALF, modificado sustituyendo los a.a. 33 y 39 por alanina

<400> 9

His Ala Arg Ile Lys Pro Thr Ala Arg Arg Leu Lys Trp Lys Tyr Lys
 1 5 10 15
 Gly Lys Phe Trp
 20

5 <210> 10
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(20)
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido desde el a.a. 32 hasta el 51 de la proteína LALF, modificado sustituyendo los a.a. 33 y 43 por alanina
 <400> 10

His Ala Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Ala Trp Lys Tyr Lys
 1 5 10 15
 Gly Lys Phe Trp
 20

15 <210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(20)
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido desde el a.a. 32 hasta el 51 de la proteína LALF, modificado sustituyendo los a.a. 33, 39 y 43 por alanina
 25 <400> 11

His Ala Arg Ile Lys Pro Thr Ala Arg Arg Leu Ala Trp Lys Tyr Lys
 1 5 10 15
 Gly Lys Phe Trp
 20

30 <210> 12
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(20)
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido desde el a.a. 32 hasta el 51 de la proteína LALF, modificado sustituyendo los a.a. 33, 39, 43 y 51 por alanina
 40 <400> 12

His Ala Arg Ile Lys Pro Thr Ala Arg Arg Leu Ala Trp Lys Tyr Lys
 1 5 10 15
 Gly Lys Phe Ala
 20

45 <210> 13
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Limulus polyphemus*

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(21)

<223> Péptido desde el a.a. 32 hasta el 52 de la proteína LALF

5

<400> 13

His Tyr Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys Trp Lys Lys Tyr
1 5 10 15
Lys Gly Lys Phe Trp
20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Péptidos con capacidad antitumoral e inmunomoduladora derivados de la región 32-51 de la proteína LALF, región que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, péptidos que están desprovistos de capacidades de unión a LPS y unión a heparina, comprendiendo dichos péptidos las secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO. 1 a 4 y 8 a 12, y variantes homólogas de estos péptidos, teniendo dichas variantes la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID. NO: 1-4 y SEQ. ID. NO: 8-12.
- 10 2. Composición farmacéutica que comprende uno o más de los péptidos según la reivindicación 1, y que comprende también excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 15 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, comprendiendo dicha composición adicionalmente un inmunógeno.
- 20 4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, en la que dicho inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en inmunógenos de naturaleza peptídica, gangliosídica o proteica, siendo partículas de tipo virus o vesículas proteicas de origen bacteriano.
- 25 5. Uso de péptidos según la reivindicación 1, para fabricar una composición farmacéutica para tratar y/o prevenir trastornos inmunológicos y cáncer.
6. Uso según la reivindicación 5, en el que los péptidos están en una cantidad eficaz para estimular la respuesta inmunitaria innata en un ser humano.
7. Uso según la reivindicación 5, en el que los péptidos son adecuados para inhibir la metástasis.

Figura 1A

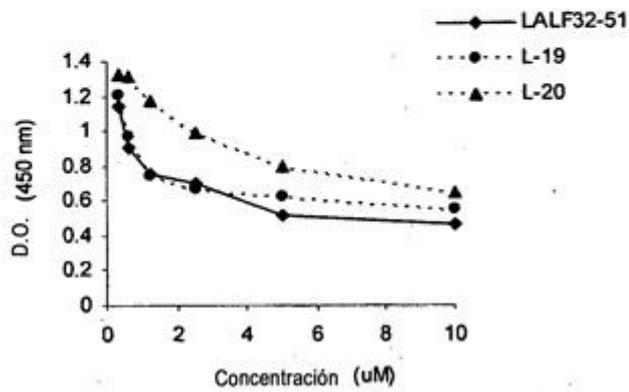
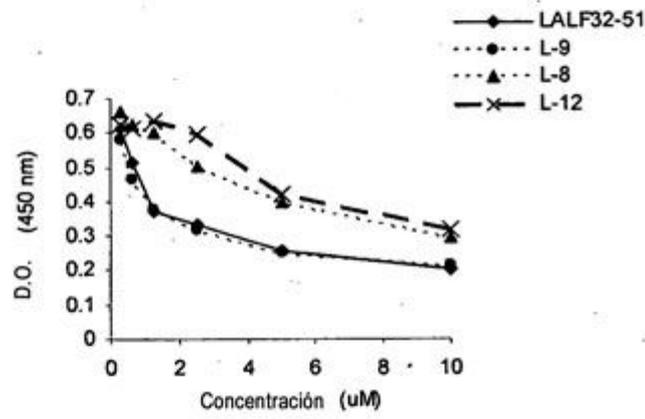
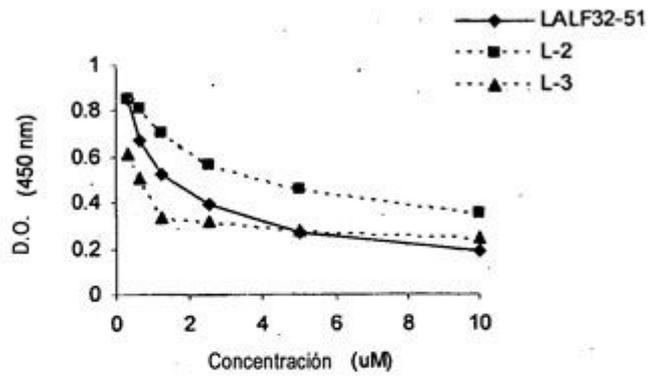


Figura 1B

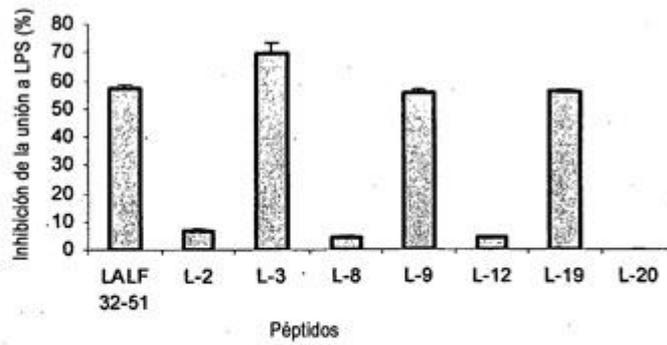


Figura 2

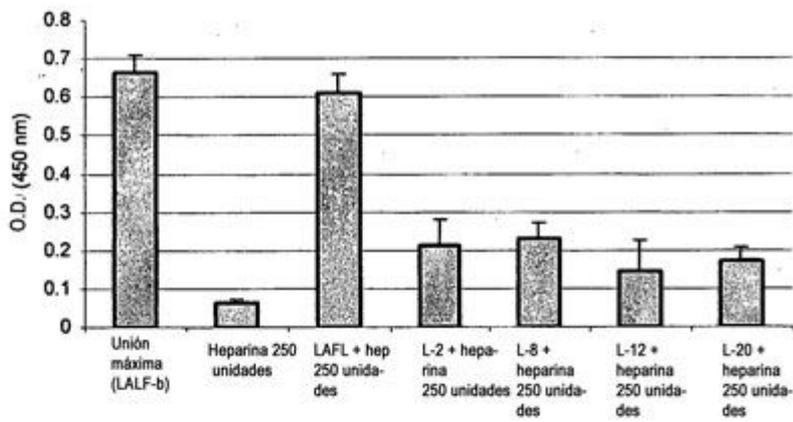


Figura 3A

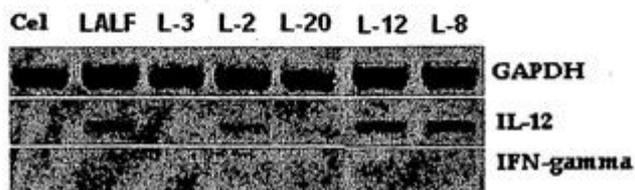


Figura 3B

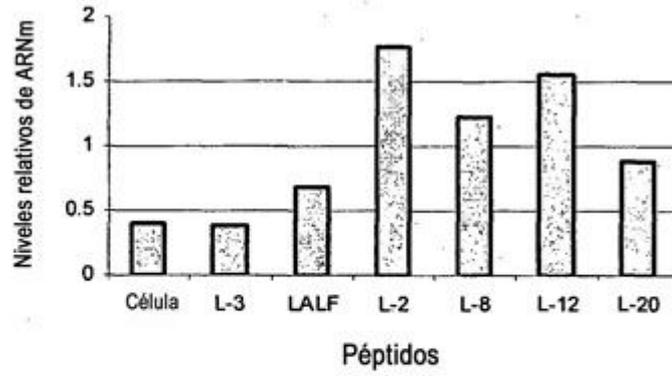


Figura 4A

Funciones de supervivencia

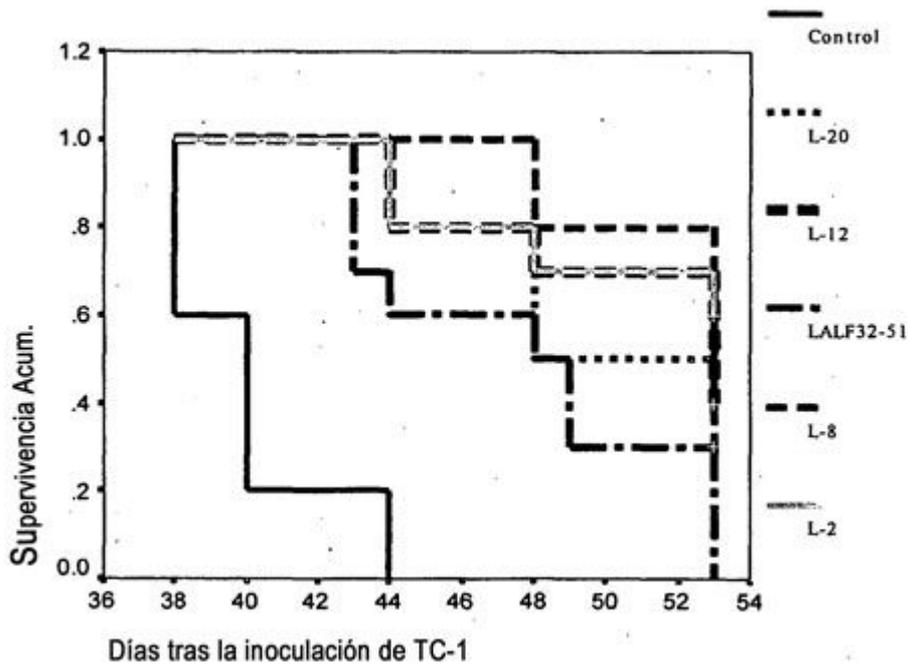


Figura 4B

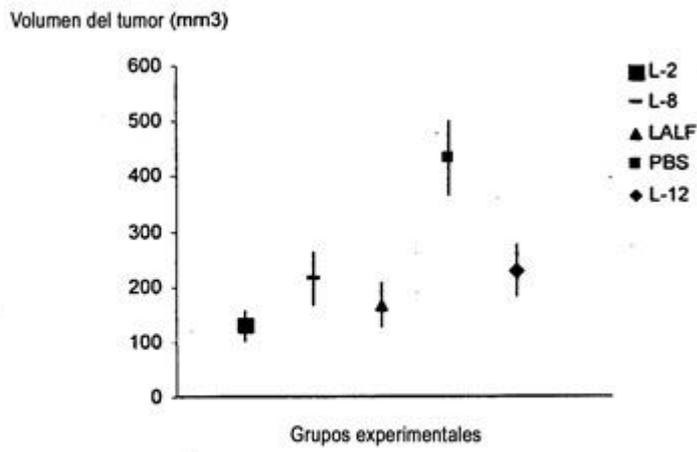


Figura 5A

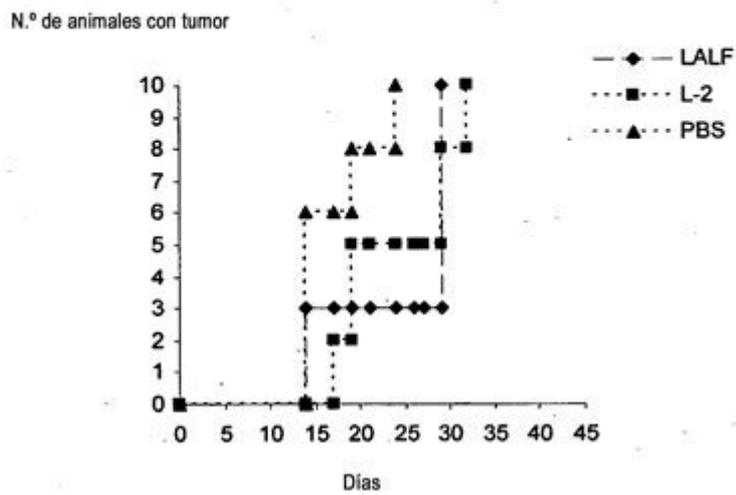


Figura 5B

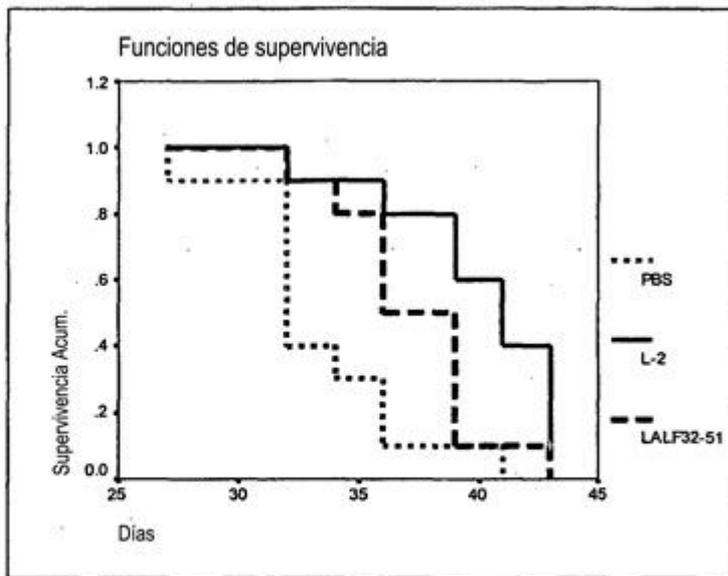


Figura 6A

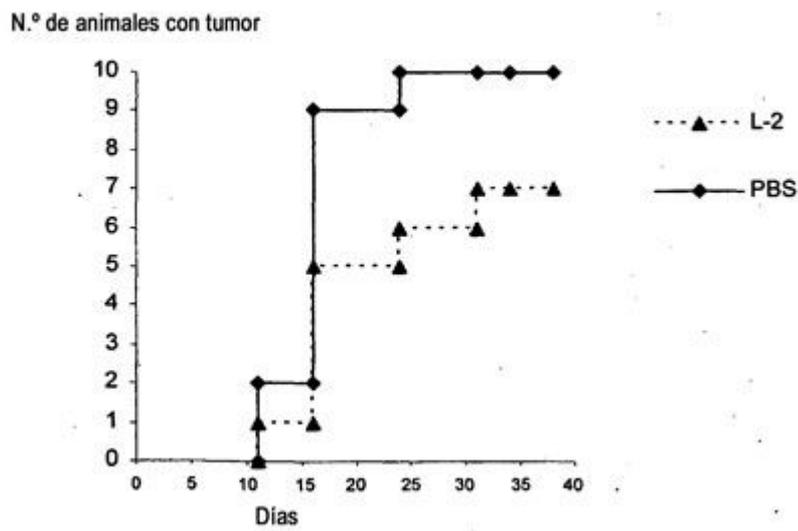


Figura 6B

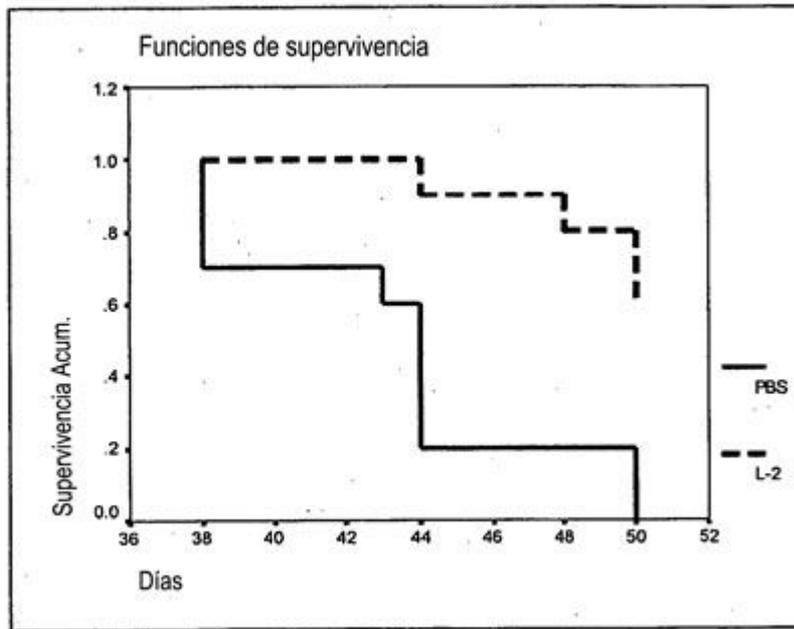


Figura 7A

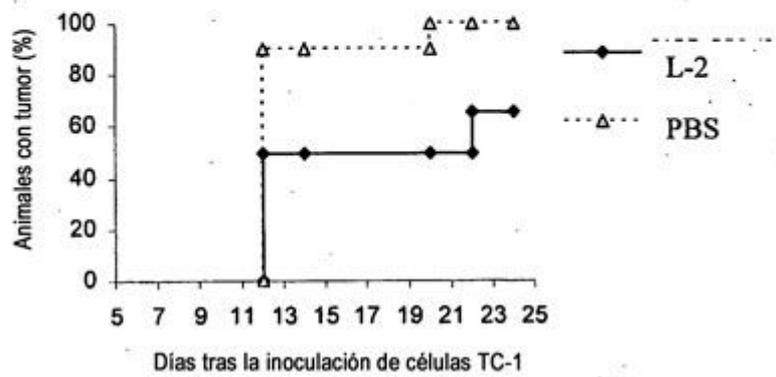


Figura 7B

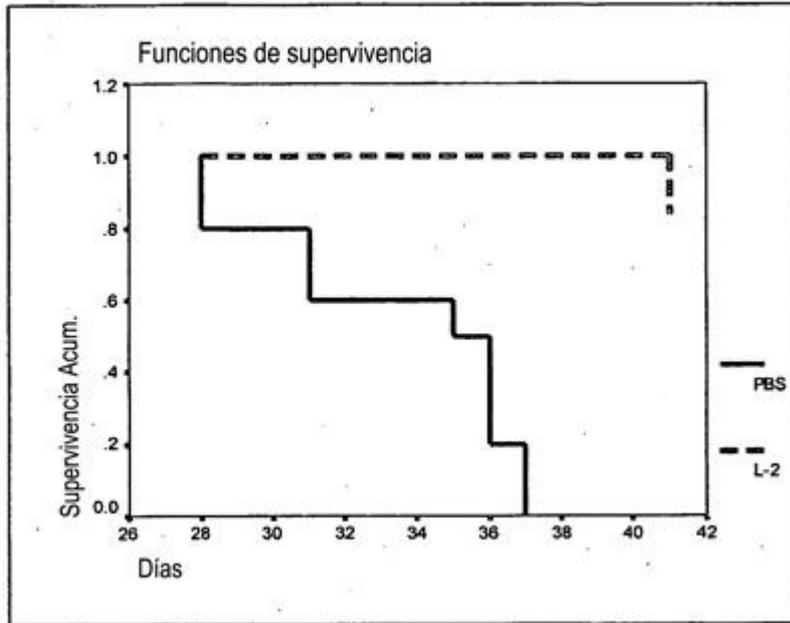


Figura 8

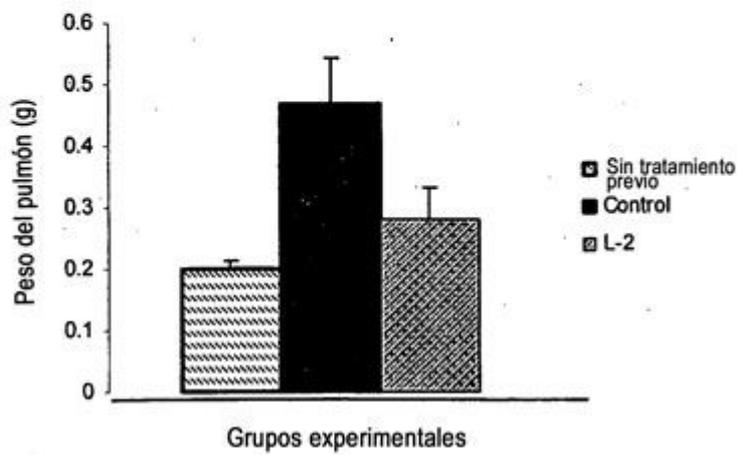


Figura 9

