

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 377**

51 Int. Cl.:
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 2/00 (2006.01)
C07K 4/00 (2006.01)
C07K 5/00 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02775191 .6**
96 Fecha de presentación: **15.10.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1469869**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.10.2004**

54 Título: **PÉPTIDO ÚTIL EN LA INMUNOMODULACIÓN.**

30 Prioridad:
15.10.2001 IL 14592601

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.02.2012

73 Titular/es:
**CURE TECH LTD.
HAYARKON STREET 42
81227 YAVNE, IL y
MOR-RESEARCH APPLICATIONS LTD.**

72 Inventor/es:
**HARDY, Britta;
RAITER, Annat y
KLAPPER, Leah**

74 Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 373 377 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

Péptido útil en la inmunomodulación

5 CAMPO DE LA INVENCION

10 **[0001]** La presente invención se refiere al campo de las vacunas inmunoterapéuticas y particularmente a la identificación y al uso de péptidos reconocidos por los anticuerpos monoclonales inmunomoduladores designados BAT, a polinucleótidos codificando estos péptidos, a composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos o los polinucleótido y el uso de los mismos en la inmunomodulación, especialmente en la terapia contra el cáncer, y para fines diagnósticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 **[0002]** El cáncer en sus diferentes formas es una causa principal de muerte en humanos. Los tratamientos terapéuticos más ampliamente usados del cáncer son la terapia local, como la cirugía y la radiación, o la quimioterapia. El rápido aumento del conocimiento en años recientes sobre las bases moleculares y celulares de la regulación inmune, particularmente al nivel de respuestas de las células-T, proporciona un nuevo arsenal de enfoques inmunoterapéuticos incluyendo el desarrollo de vacunas tumorales. La vacuna tumoral se administra para propósitos terapéuticos o preventivos. Esto puede incluir la administración de agentes inmuno-potenciadores así como modificadores de la respuesta biológica como los interferones e interleucinas, para estimular el sistema inmunológico.

25 **[0003]** La vacunación con una molécula antigénica, como un péptido o una proteína, generalmente lleva a una respuesta de anticuerpos o una respuesta de las Células T ayudantes CD4+ (Raychaudhuri y otros, 1993 Immunol Today 14:344). Esta respuesta inmune es iniciada por el enlace del antígeno a las moléculas principales histocompatiblemente complejas (MHC) de o de la Clase I o de la Clase II. Las últimas moléculas están expresadas primariamente en células involucradas en la iniciación y el mantenimiento de las respuestas inmunes como los linfocitos T, linfocitos B y macrófagos. Las moléculas de Clase II son reconocidas por las Células T ayudantes CD4+ e inducen su proliferación e la amplificación de la respuesta inmune al epítipo que se muestra. Las moléculas MHC Clase I se encuentran en la mayoría de las células nucleadas y son reconocidas por los linfocitos T citotóxicos (CTLs) que destruyen las células que portan el antígeno. La repuesta CTL es un componente principal del sistema inmunológico, activo en la vigilancia inmunológica y la destrucción de células infectadas o malignas y en invadir organismos que expresan antígenos extraños en su superficie. El ligando del receptor linfocito T específico del antígeno es un complejo formado de un fragmento péptido de un antígeno extraño de 8 a 10 aminoácidos de longitud, presentado en el canal de las moléculas MHC clase I. Al contrario que las células B, las células T no reconocen las moléculas de antígeno nativo intactas. En general la activación de las células T citotóxicas requiere que el antígeno sea procesado endógenamente y escindido en fragmentos de péptido específicos que están presentes en la superficie de las células procesadoras de antígeno en asociación con las moléculas MHC clase I.

40 **[0004]** Por consiguiente, una vacuna exitosa para la inmunoterapia del cáncer requiere la identificación de un antígeno objetivo y la producción de una respuesta de las células T citotóxicas. Además, la identificación de los antígenos de la superficie de las células expresados exclusivamente o preferencialmente en ciertos tumores permite la formación de estrategias de tratamiento selectivas.

45 **[0005]** Existen numerosas divulgaciones concernientes a los péptidos inmunomoduladores. La WO 94/20127 revela medios y métodos para seleccionar péptidos inmunogénicos capaces de enlazar específicamente el alelo HLA-A2.1 e inducir la activación de las células T. La WO 95/19783 se refiere a péptidos basados en un epítipo derivado del producto del tumor asociado con el gen MAGE-3. LA WO 97/11715 revela un péptido con MUC1 imitadores u otros péptidos del cáncer. La WO 00/06723 revela péptidos antígenos específicos de tumores y usa los mismos como vacunas anti tumorales. La US 6.406.700 revela métodos para aislar complejos inmunogénicos usando la librería de cADN del ARN celular del cáncer.

55 **[0006]** Las solicitudes de patente internacionales WO 95/20605 y WO 00/58363 describen un nuevo anticuerpo monoclonal designado BAT-1, también designado en la presente BAT, que induce a la proliferación de linfocitos y a la actividad citolítica contra las células objetivo tumorales. Una sola administración intravenosa del BAT en ratones que portan varios tumores resultó en efectos anti-tumorales notables manifestados por la regresión de los tumores y la prolongación de la supervivencia. El BAT también indujo la regresión de xenoinjertos de tumores humanos trasplantados en ratones SCID que fueron injertados con linfocitos de sangre periférica humana. La actividad anti-tumoral del BAT es mediada por sus propiedades estimuladoras inmunes como fue evidente de los experimentos de transferencia adoptiva en los que los esplenocitos de ratones tratados con BAT inyectados en ratones portadores de tumores indujeron la regresión de los tumores. La membrana determinante reconocida por el BAT todavía no ha sido identificada o caracterizada.

65 **[0007]** Annar Raitier y otros ("CD4+ T lymphocytes as a primary cellular target for BAT mAb stimulation", Intern. Immunol., Vol 12, N° 11, p. 1623-1628), informa sobre los linfocitos CD4+ como un objetivo celular primario para la

estimulación mAB del BAT. Se demuestra que el BAT enlaza selectivamente a una proteína 48kDa en las células Daudi, en las células CD4+ y CD8+ , y estimuló las células CD4+, com ose evaluó por la proliferación y secreción de IFN-γ.

5 **[0008]** Britta Hardy y otros (“Selection of novel peptides-based cancer vaccines by BAT monoclonal antibody”, Interm. J. Molecular Medicine, Vol. 10, Suplemento N° 1, p. S46) revela la selección de vacunas contra el cáncer basadas en péptidos usando anticuerpos monoclonales del BAT.

10 **[0009]** Varios métodos alternativos de identificar los epítomos péptidos enlazados por anticuerpos monoclonales son reconocidos en la técnica. Estos métodos incluyen el uso de librerías de representación de fagos como las reveladas en las Patentes US N° 5.223.409; 5.403.484, 5.571.698; 5.837.500 y continuaciones de las mismas. LA representación de fagos consiste en una técnica de selección que permite la identificación y el aislamiento de una proteína contra un objetivo elegido. El proceso de selección se basa en las moléculas de ADN cada una codificando una proteína y una señal estructural llamando para la representación de la proteína en la superficie exterior de un bacteriófago. La proteína es expresada y el dominio de enlace potencial es representado en la superficie exterior del fago. Las células o virus portadores los dominios enlazantes que reconocen la molécula objetivo se aíslan, por un proceso de selección repetitivo llamado biopanning, y se amplifican. Los dominios enlazantes exitosos son entonces caracterizados.

20 **[0010]** Las librerías de epítomos también se pueden filtrar para las secuencias de epítomos que imitan al epítomo, es decir, secuencias que no identifican una secuencia nativa lineal continua que tiene lugar necesariamente dentro de la secuencia de la proteína natural. Estos péptidos imitadores son llamados mimotopos. En la mayoría de los casos los mimotopos son péptidos cortos que pueden ser fácilmente sintetizados en grandes cantidades. Se han encontrado mimotopos de varios sitios enlazantes. Por ejemplo, la US 5.877.155 proporciona un péptido aislado que imita funcionalmente un sitio enlazante para un anticuerpo monoclonal, el anticuerpo monoclonal reconociendo un epítopo dentro del complejo Ib/IX de glicoproteína plaquetaria humano.

25 **[0011]** Hay una necesidad médica no satisfecha de péptidos capaces de provocar o estimular una respuesta inmune anti-tumoral in vivo.

30 **RESUMEN DE LA INVENCION**

[0012] Es un objeto de algunos aspectos de la presente invención proporcionar péptidos que son útiles como agentes inmunomoduladores, por ejemplo, al estimular respuestas inmunes e inhibición en el crecimiento tumoral.

35 **[0013]** Es otro objeto de algunos aspectos de la presente invención proporcionar péptidos que son útiles en el tratamiento del cáncer y en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

40 **[0014]** Es un objeto adicional de algunos aspectos de la presente invención proporcionar péptidos que son reconocidos por el anticuerpo monoclonal BAT.

[0015] Es todavía un objeto adicional de algunos aspectos de la invención proporcionar péptidos que comprenden epítomos o mimotopos reconocidos por el anticuerpo inmunomodulador designado como BAT-1.

45 **[0016]** Es un objeto adicional de algunos aspectos de la presente invención proporcionar un anticuerpo que reconoce al menos un epítopo abarcado dentro de cualquiera de los péptidos de la invención.

50 **[0017]** El término “epítopo” referido en la presente, se refiere a la parte de una molécula antigénica que es reconocida y enlazada por un receptor de células T o por un receptor de células B (es decir, un determinante en una molécula grande contra el que se puede producir un anticuerpo y al que este se enlazará). El término como se usa en la presente se pretende que incluya determinantes antigénicos de moléculas de origen natural o moléculas sintéticas que pueden imitar naturalmente determinantes antigénicos naturales. Se puede hacer referencia también a las moléculas que imitan los determinantes antigénicos naturales como “mimotopos”, y estos términos pueden ser usados indistintamente en referencia a epítomos que no están formados por un segmento contiguo de la secuencia primaria o un antígeno.

55 **[0018]** Los péptidos de la invención son reconocidos por el anticuerpo monoclonal BAT-1, también indicado en la presente como BAT, que es revelado en la WO 95/20605 y en la WO 00/58363. Los péptidos de la invención son además reconocidos por los anticuerpos modificados genéticamente que mantienen la actividad biológica del BAT, incluyendo quimeras o anticuerpos CDR-injertados. Un anticuerpo BAT humano-ratón quimérico, que contiene regiones variables de ratón unido a regiones constantes humanas, se revela en la WO 00/58363.

60 **[0019]** Se ha mostrado anteriormente que el anticuerpo monoclonal BAT es beneficioso para tratar una variedad de tumores incluyendo, pero no estando limitado a: melanoma, carcinoma pulmonar, cáncer de próstata, cáncer de pecho, linfomas y leucemias, carcinoma de colon, y fibrosarcomas. Los péptidos y polinucleótidos de la presente invención son útiles para provocar una respuesta inmune que evitará la necesidad de tratar un individuo con los

mismos anticuerpos. En consecuencia, los péptidos y polinucleótidos pueden ser usados para obtener anticuerpos que comparten los atributos del anticuerpo BAT previamente conocido.

5 **[0020]** Además, los péptidos de la invención son inmunomoduladores. Los péptidos de la invención pueden servir como agentes inmunoestimuladores para provocar una actividad anti-tumoral o pueden servir como agentes para la inmunoterapia o como inmuno-estimuladores contra infecciones, incluyendo los procesos de inmunización. A la inversa, pueden servir para inhibir respuestas inmunes no deseadas como respuestas inmunes que están involucradas en condiciones inflamatorias, incluyendo pero no limitado a enfermedades autoinmunes. Como inmunomoduladores, estos péptidos pueden inducir cambios en el sistema inmunológico de respuestas no deseadas a respuestas beneficiosas. Así, por ejemplo los péptidos de la invención podrían ser usados para inducir cambios de las respuestas del ayudante T1 (the) al ayudante T2 (TH2) que se ha postulado que tienen valor terapéutico para suprimir o prevenir enfermedades o desordenes autoinmunes.

10 **[0021]** Se proporciona por lo tanto, de acuerdo a una realización de la presente invención, un péptido que comprende al menos un epítipo reconocido por un anticuerpo monoclonal BAT, seleccionado de un péptido que tiene una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO 1 a 10 o una sal de las mismas que mantiene la actividad biológica del péptido.

15 (SEQ ID NO 1) Pro Arg Arg Ile Lys Pro Arg Lys Ile Met Leu Gln
 20 (SEQ ID NO 2) Pro Arg Arg Ile Lys Pro Arg Lys Ile Met Leu Gln-amide
 (SEQ ID NO 3) Pro Arg Arg Phe Lys Pro Arg Lys Ile Asn/Asp Leu Gln
 (SEQ ID NO 4) Pro Arg Arg Ile Lys Pro Arg Lys Ile Asn/Asp Phe Gln
 (SEQ ID NO 5) Pro Arg Arg Ile Lys Pro Arg Lys Ile Asn/Asp Leu Gln
 25 (SEQ ID NO 6) Pro Arg Arg Ile Lys Ala Arg Lys Ile Met Leu Gln
 (SEQ ID NO 7) Pro Arg Lys Ile Lys Pro Arg Lys Ile Met Leu Gln
 (SEQ ID NO 8) - - Arg Ile Lys Pro Arg Lys Ile Met Leu Gln
 (SEQ ID NO 9) Pro Arg Arg Ile Lys Pro Arg Lys Ile Met - -
 (SEQ ID NO 10) acetyl-Pro Arg Arg Ile Lys Pro Arg Lys Ile Met Leu Gln

30 **[0022]** De acuerdo a ciertas realizaciones actualmente preferidas, la presente invención proporciona un péptido seleccionado de un péptido que tienen una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO 1, 6, 8, 9, 10 o una sal de las mismas que mantiene la actividad biológica del péptido.

35 **[0023]** De acuerdo a otra realización particular, la presente invención proporciona un polinucleótido codificando al menos un péptido reconocido por un anticuerpo monoclonal BAT, el polinucleótido teniendo una de cuencia seleccionada de las SEQ ID NO 18 a 25.

40 (SEQ ID NO 18) CCTCGACGAATAAAGCCCAGGAAGATCATGCTGCAA
 (SEQ ID NO 19) CCTCGACGATTYAAGCCCAGGAAGATCRAYCTGCAA
 (SEQ ID NO 20) CCTCGACGAATAAAGCCCAGGAAGATCRAYTTYCAA
 (SEQ ID NO 21) CCTCGACGAATAAAGCCCAGGAAGATCRAYCTGCAA
 (SEQ ID NO 22) CCTCGACGAATAAAGGCXAGGAAGATCATGCTGCAA
 (SEQ ID NO 23) CCTCGAAAYATAAAGCCCAGGAAGATCATGCTGCAA
 (SEQ ID NO 24) CGAATAAAGCCCAGGAAGATCATGCTGCAA
 45 (SEQ ID NO 25) CCTCGACGAATAAAGCCCAGGAAGATCATG

(en donde Y = T o C; R = A o G; X = T o C o A o G)

50 **[0024]** De acuerdo a otra realización particular, la presente invención proporciona un polinucleótido que tiene una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 18, 22, 24, 25.

55 **[0025]** En otra realización la presente invención proporciona un constructo que comprende un polinucleótido codificando al menos un péptido reconocido por el anticuerpo monoclonal BAT, en donde el polinucleótido comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 18 a 25.

[0026] En una realización preferida la presente invención proporciona un constructo en donde el polinucleótido comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 18, 22, 24, 25.

60 **[0027]** También se proporciona de acuerdo a una realización de la presente invención un vector que comprende un polinucleótido codificando al menos un péptido reconocido por un anticuerpo monoclonal BAT, en donde el polinucleótido comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 18 a 25.

[0028] De acuerdo a una realización preferida de la presente invención el vector comprende un polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 18, 22, 24, 25.

65 **[0029]** En una realización preferida, el vector es un plásmido o un virus.

[0030] También se proporciona de acuerdo a una realización de la invención una célula huésped que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica al menos un péptido reconocido por un anticuerpo monoclonal BAT, el polinucleótido teniendo una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 18 a 25.

5 **[0031]** En una realización actualmente preferida la célula huésped comprende un polinucleótido que tiene una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 18, 22, 24, 25.

[0032] En una realización preferida adicional el huésped es capaz de expresar al menos un epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal BAT.

10 **[0033]** También se proporciona de acuerdo a una realización de la invención una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo al menos un péptido que comprende al menos un epítipo reconocido por un anticuerpo monoclonal BAT, seleccionado de un péptido que tiene la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO 1 a 10 o una sal del mismo que mantiene la actividad biológica del péptido, o que tiene una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO 1, 6, 8, 9, 10 o una sal del mismo que mantiene la actividad biológica del péptido, y un portador farmacéuticamente aceptable.

15 **[0034]** También se proporciona de acuerdo a una realización de la invención una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo un polinucleótido codificando al menos un péptido reconocido por un anticuerpo monoclonal BAT, el polinucleótido teniendo una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 18 a 25 o teniendo una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 18, 22, 24, 25, y un portador farmacéuticamente aceptable.

20 **[0035]** De acuerdo a una realización de la presente invención se proporciona el uso de tal composición en la preparación de una composición farmacéutica para tratar el cáncer.

25 **[0036]** De acuerdo a otra realización de la presente invención se proporciona una vacuna inmunomodulatoria que comprende al menos un péptido reconocido por un anticuerpo monoclonal BAT y un adyuvante farmacéuticamente aceptable, en donde el péptido comprende una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO 1 a 10.

30 **[0037]** En una realización preferida el adyuvante de la vacuna es seleccionado del grupo de una sal de aluminio y una emulsión de aceite en agua.

35 **[0038]** También se proporciona de acuerdo a una realización de la invención un agente diagnóstico para detectar cáncer que comprende un péptido que comprende al menos un epítipo reconocido por un anticuerpo monoclonal BAT, seleccionado de un péptido que tienen la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO 1 a 10 o una sal del mismo que mantiene la actividad biológica del péptido o un péptido seleccionado de un péptido que tiene la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO 1, 6, 8, 9, 10 o una sal del mismo que mantiene la actividad biológica del péptido.

40 **[0039]** Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones añadidas.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

45 **[0040]**

La **Figura 1** muestra la inhibición del anticuerpo monoclonal BAT que enlaza al fago inmovilizado portando el inserto de la SEQ ID NO 1 (Péptido A) por tres péptidos libres.

50 La **Figura 2** muestra los resultados de un experimento de citometría de flujo en el que se determina la inhibición del Péptido A del mAb del BAT que enlaza a las células B-linfoblastoides.

La **Figura 3** es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento del tumor de melanoma subcutáneo, por la inmunización con el Péptido A sintético.

55 La **Figura 4** es un gráfico que muestra el enlace del suero de los ratones inmunizados con el Péptido A con placas cubiertas con el Péptido A.

La **Figura 5** muestra en el enlace del anticuerpo monoclonal BAT a los péptidos seleccionados, de la librería de fagos, en el segundo experimento.

La **Figura 6** presenta la inhibición del crecimiento de tumores pulmonares por el Péptido A y sus análogos.

La **Figura 7** presenta la inhibición del crecimiento de tumores pulmonares por el Péptido B y sus análogos.

60 La **Figuras 8A, 8B y 8C** muestran la actividad citolítica en los esplenocitos de ratones inmunizados con los Péptidos A y B.

Las **Figuras 9A-9D** muestran la inhibición del anticuerpo monoclonal BAT que enlaza las células Daudi por los anti-Péptidos A y los anticuerpos B.

65 La **Figura 10** presenta la inducción de la proliferación de los linfocitos humanos por los anti-Péptidos A y los anticuerpos B.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0041] La presente invención se refiere a péptidos, polinucleótidos y composiciones farmacéuticas y de vacunas incluyendo las que son útiles en la modulación de las respuestas inmunes, en la inhibición del crecimiento tumoral, tanto tumores primarios y metástasis, en el tratamiento del cáncer y de desordenes inflamatorios incluyendo enfermedades autoinmunes por medio de la prevención y de la cura. Específicamente, la presente invención proporciona vacunas que incluyen péptidos reconocidos por el anticuerpo monoclonal BAT inmunomodulador que está revelado en las anteriormente mencionadas Solicitudes de Patente Internacionales WO 95/20605 y WO 00/58363.

a. Modos preferidos de realizar la invención

[0042] De acuerdo a un primer aspecto de la presente invención se proporcionan péptidos reconocidos por el anticuerpo monoclonal BAT. Son conocidos en la técnica varios métodos para identificar péptidos que son capaces de enlazarse al anticuerpo BAT. Por ejemplo, aumentar los péptidos contra el anticuerpo BAT mientras los péptidos pueden ser seleccionados de las librerías de péptidos, tales como, la librería de bacteriófagos, la librería química, la librería de células hibridoma; células preferiblemente linfocitos B y células T y más preferiblemente células Daudi y células Jurkat; síntesis químicas que pueden producir un conjunto o subconjunto de moléculas que tienen una alta afinidad con la secuencia del anticuerpo monoclonal BAT; diseñar moléculas destinadas a tener una alta afinidad con las secuencias BAT usando asistencia por ordenador u otros enfoques teóricos; usar la evolución in-vitro de ácidos nucleicos capaces de enlazar con la secuencia del BAT.

[0043] De acuerdo a las realizaciones preferidas de la presente invención se emplea una librería de epítipo fago para identificar péptidos que enlazan el anticuerpo monoclonal BAT y para preparar una modalidad de inmunoterapia. Más preferiblemente, se usa una librería péptida del 12-mer-fago construida usando el fago M13 para identificar péptidos como el anticuerpo putativo que enlaza el epítipo y consecuentemente para identificar la secuencia de polinucleótido codificando los péptidos.

[0044] pesar de que el péptido preferiblemente estará sustancialmente libre de otras proteínas o fragmentos de proteínas de la célula huésped naturales, en algunas realizaciones los péptidos pueden ser conjugados sintéticamente a fragmentos o partículas nativas.

[0045] De acuerdo a ciertas realizaciones preferidas, el péptido 12-mer de la presente invención es:

Q ID NO 1, también denominada de aquí en adelante Péptido A:
o Arg Arg Ile Lys Pro Arg Lys Ile Met Leu Gln

[0046] El término "variante" como se usa en la presente se refiere a una secuencia péptida que posee al menos una propiedad estructural modificada en comparación al péptido original mientras que sustancialmente retiene la actividad biológica del péptido resultante en comparación con el péptido original o el anticuerpo monoclonal BAT. Por ejemplo, uno o más de los residuos de aminoácido de los péptidos originales son reemplazados por residuos de aminoácidos diferentes, o son eliminados, o uno o más de los residuos de aminoácidos son añadidos a los péptidos originales, un enlace péptido es modificado, la ciclización es introducida en la estructura del péptido original, una estructura se modifica. Una variante puede haber alterado el enlace a un anticuerpo monoclonal BAT que el péptido original. Una variante puede tener al menos un 70% de identidad con el péptido original, preferiblemente un 80% o un 90% de identidad. Una variante puede ser también referida como un "análogo" o un "homólogo", y estos términos pueden ser usados indistintamente.

[0047] En una realización, la presente invención comprende una sal del péptido de la invención. El término "sal" incluye sales de adición de ácido que son formadas con ácidos inorgánicos como, por ejemplo, ácidos hidroclicóricos o fosfóricos, o con ácidos orgánicos como el acético, el oxálico, el tartárico, el mandélico, y similares. El término también incluye sales de adición básicas que se forman de bases inorgánicas como, por ejemplo, el sodio, el potasio, el amonio, y el calcio, y de bases inorgánicas como la isopropilamina, la trimetilamina, la histidina, y similares.

[0048] También se revela un derivado de un péptido de la invención. El término "derivado" de un péptido como se usa en la presente se refiere a un péptido que contiene fracciones químicas adicionales que no son normalmente una parte del péptido. Tales modificaciones pueden ser introducidas en la molécula reaccionando los residuos de aminoácido objetivos del péptido con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con las cadenas laterales seleccionadas o los residuos terminales. Ejemplos de derivados químicos, a modo de ilustración y no a modo de limitación, incluyen un péptido en el que el término C o el término-N de los péptidos de la presente invención, o ambos, son sustituidos con grupo protector de ácido carboxílico o un grupo protector amino, respectivamente. Los grupos de protección adecuados se describen en Green y Wuts, "Protecting Groups in organic Synthesis", John Wiley e Hijos, Capítulos 5 y 7, 1991. Ejemplos de grupos protectores N-terminales incluyen los grupos acilo (-CO-R₁) y los grupos ariloxi carbonilo o alcoxi carbonilo (-CO-O-R₁), en donde R₁ es un alifático, un alifático sustituido, un bencilo, un bencilo sustituido, in grupo aromático o aromático sustituido. Ejemplos de grupos

acilo incluyen el acetilo, (etilo)-CO-, n-propilo-CO-, iso-propilo-CO-, n-butilo-CO-, sec-butilo-CO-, t-butilo-CO- y fenilo-CO-. Ejemplos de grupos alcoxi carbonilo y ariloxi carbonilo incluyen CH₃-O-CO-, (etilo)-O-CO-, iso-propilo-O-CO-, n-butilo-O-CO-, sec-butilo-O-CO-, t-butilo-O-CO-, fenilo-O-CO-. El grupo carboxilo en el término-C puede ser protegido, por ejemplo, como una amida (es decir, el grupo hidroxilo en el término-C es reemplazado con -NH₂, -NHR₂, y -NR₂R₃) o un éster (es decir, el grupo hidroxilo en el término-C se reemplaza con -OR₂). R₂ y R₃ son independientemente un alifático, un alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, arilo o un grupo arilo sustituido.

[0049] Una variante, derivado o sal de un péptido de la invención puede ser ventajoso, en comparación con el péptido original, si posee al menos una de las siguientes propiedades; solubilidad mejorada, duración de la acción prolongada, actividad biológica superior, estabilidad aumentada a la degradación por enzimas y por lo tanto vidas útiles in vivo aumentadas, efectos secundarios eliminados o atenuados y similares.

[0050] El término "actividad biológica" como se usa en la presente, incluye al menos una de las siguientes actividades; inducción de efecto antitumoral, modificación de la respuesta inmune, estimulación de la respuesta inmune contra células tumorales, inhibición del enlace del anticuerpo monoclonal BAT a las células del linfoma – particularmente células Daudi o Jurkat, detección del cáncer, detección de un desorden inflamatorio o enfermedad autoinmune o, prevención del desarrollo tumoral.

[0051] El término "efecto antitumoral" como se usa en la presente, se refiere a un efecto biológico que puede estar manifestado por una disminución en el volumen del tumor, una disminución en el número de células tumorales, una disminución en el número de metástasis, un aumento en la esperanza de vida, o mejora de varios síntomas fisiológicos asociados con la condición cancerosa. Un "efecto antitumoral" puede también estar manifestado por la capacidad de los péptidos, polinucleótidos, y anticuerpos de la invención en prevención de la aparición del tumor en el primer lugar.

[0052] El péptido o variante puede ser generado a través de tecnologías de ADN recombinante, bien conocidas para aquellos expertos en la materia, siguiendo la clonación en un vector de expresión, la transfección en células huésped y la recogida de proteínas de acuerdo a los métodos conocidos en la técnica. En una realización preferida los péptidos y variantes son preparados por técnicas de síntesis de péptidos conocidas.

[0053] Las realizaciones actualmente preferidas de la invención son variantes obtenidas por modificaciones conservadoras introducidas en la SEQ ID NO 1 (Péptido A). Actualmente las realizaciones más preferidas incluyen las siguientes variantes:

(SEQ ID NO 2) Pro Arg Arg Ile Lys Pro Arg Lys Ile Met Leu Gln-amida
 (SEQ ID NO 3) Pro Arg Arg Phe Lys Pro Arg Lys Ile Asn/Asp Leu Gln
 (SEQ ID NO 4) Pro Arg Arg Ile Lys Pro Arg Lys Ile Asn/Asp Phe Gln
 (SEQ ID NO 5) Pro Arg Arg Ile Lys Pro Arg Lys Ile Asn/Asp Leu Gln
 (SEQ ID NO 6) Pro Arg Arg Ile Lys Ala Arg Lys Ile Met Leu Gln
 (SEQ ID NO 7) Pro Arg Lys Ile Lys Pro Arg Lys Ile Met Leu Gln
 (SEQ ID NO 8) - - Arg Ile Lys Pro Arg Lys Ile Met Leu Gln
 (SEQ ID NO 9) Pro Arg Arg Ile Lys Pro Arg Lys Ile Met - -
 (SEQ ID NO 10) acetil-Pro Arg Arg Ile Lys Pro Arg Lys Ile Met Leu Gln

[0054] También son reveladas variantes obtenidas por modificaciones conservadoras introducidas en el SEQ ID NO 11 (Péptido B).

[0055] Las realizaciones más preferidas actualmente incluyen las siguientes variantes:

(SEQ ID NO 12) Gln Arg Ile Leu Gln Gln Ile Asn Leu Ala Arg Ile
 SEQ ID NO 13) Gln Arg Ile Leu Gln Glu Ile Asn Leu Pro Arg Ile
 SEQ ID NO 14) Gln Arg Ile Leu Gln Gln Ile Asn Leu Pro Lys Ile
 SEQ ID NO 15) - - Ile Leu Gln Gln Ile Asn Leu Pro Arg Ile
 SEQ ID NO 16) Gln Arg Ile Leu Gln Gln Ile Asn Leu Pro - -

[0056] La actividad biológica de las variantes es monitorizada y comprada con la de los péptidos seleccionados y con la del anticuerpo monoclonal BAT como se ejemplifica de aquí en adelante.

[0057] Sin querer estar limitado por ninguna teoría, es posible que los péptidos de la invención provoquen una respuesta inmune similar a la obtenida por el anticuerpo monoclonal BAT.

[0058] Así, los métodos preferidos para monitorizar la actividad biológica de los péptidos y las variantes incluyen: la inhibición competitiva con el anticuerpo monoclonal BAT a determinantes reconocidos por el BAT, por ejemplo, células Daudi y células Jurkat; la inhibición competitiva a determinantes reconocidos por el BAT, por ejemplo, células Daudi y células Jurkat, entre el suero de sujetos inmunizados y el anticuerpo monoclonal BAT; inmunizar con péptidos animales portadores de tumores y monitorizar el crecimiento tumoral; inmunizar con los péptidos animales

no tratados y monitorizar el desarrollo tumoral en el momento de la inducción del cáncer; monitorizar la respuesta inmune en el momento de la inmunización, preferiblemente monitorizar la actividad citolítica de las células NK y CTL en el momento de la inmunización con los péptidos; monitorizar la proliferación de linfocitos en el momento de la inmunización con anticuerpos antipéptidos.

5 **[0059]** De acuerdo a un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un constructo que comprende un polinucleótido de codificación para los péptidos reconocidos por el anticuerpo monoclonal BAT.

10 **[0060]** En varias realizaciones preferidas los polinucleótidos de la invención son aislados de los clones del fago expresando péptidos reconocidos por el anticuerpo monoclonal BAT, y son seleccionados de: SEQ ID NO 18, codificando el péptido de SEQ ID NOS 1 (Péptido A). De acuerdo a otras realizaciones generales, los polinucleótidos de la invención están derivados de secuencias de aminoácidos de los péptidos de la invención, incluyendo variaciones debidas a codones redundantes siempre que la actividad biológica del péptido trasladado se mantenga. Así, son reveladas además las secuencias:

15 SEQ ID NO 19 codificando el péptido de la SEQ ID NO 3;
 SEQ ID NO 20 codificando el péptido de la SEQ ID NO 4;
 SEQ ID NO 21 codificando el péptido de la SEQ ID NO 5;
 20 SEQ ID NO 22 codificando el péptido de la SEQ ID NO 6;
 SEQ ID NO 23 codificando el péptido de la SEQ ID NO 7;
 SEQ ID NO 24 codificando el péptido de la SEQ ID NO 8;
 SEQ ID NO 25 codificando el péptido de la SEQ ID NO 9;
 SEQ ID NO 26 codificando el péptido de la SEQ ID NO 10;
 25 SEQ ID NO 27 codificando el péptido de la SEQ ID NO 12;
 SEQ ID NO 28 codificando el péptido de la SEQ ID NO 13;
 SEQ ID NO 29 codificando el péptido de la SEQ ID NO 14;
 SEQ ID NO 30 codificando el péptido de la SEQ ID NO 15;
 SEQ ID NO 31 codificando el péptido de la SEQ ID NO 16;

30 **[0061]** Los constructos que comprenden los polinucleótidos que codifican los péptidos de la invención pueden además incluir promotores, potenciadores y otras secuencias regulatorias necesarias para la expresión, transcripción y traslación, como son bien conocidos en la técnica. Los constructos pueden además ser provistos con conectores y pueden estar ligados en vectores de expresión disponibles en la técnica. Los vectores pueden ser usados para transformar huéspedes adecuados para producir los péptidos deseados. Los vectores pueden incluir sitios de
 35 enzimas de restricción para la inserción de genes adicionales y para la selección de marcadores, así como elementos necesarios para la propagación y mantenimiento de los vectores dentro de las células.

40 **[0062]** Las células que presentan péptidos reconocidos por el anticuerpo monoclonal BAT también están incluidas en la presente invención, por ejemplo, las células que presentan antígenos incluyendo las células dendríticas o macrófagos que también son conocidos como inmunógenos útiles.

[0063] Se proporciona además en la presente invención un anticuerpo que reconoce un epítipo dentro de cualquiera de las SEQ ID NOS 1 a 17.

45 **[0064]** El término "anticuerpo" se usa en la presente en el sentido más amplio y cubre los anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos monoclonales de longitud completa) y fragmentos de anticuerpo mientras muestren la actividad biológica deseada. Los "Fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente el antígeno que enlaza o la región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de
 50 anticuerpos de una única cadena; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo.

[0065] Los métodos para la producción de anticuerpos son bien conocidos en las técnicas, incluyendo obtener anticuerpos del suero de sujetos inmunizados con el determinante objetivo de los mencionados anticuerpos, así como técnicas recombinantes.

55 b. Farmacología

60 **[0066]** La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que incluye al menos un epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal BAT como el ingrediente farmacéuticamente activo. El ingrediente farmacéuticamente activo es seleccionado del grupo que contiene: un péptido que comprende al menos un epítipo, un polinucleótido que codifica al menos un epítipo, un polinucleótido que codifica al menos uno del péptido mencionado, un constructo que comprende al menos uno del polinucleótido mencionado, un vector que comprende al menos uno del mencionado constructo.

65 **[0067]** El péptido de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede ser mezclado con un excipiente, un portador, un diluyente, y opcionalmente, un conservante o similar, vehículos

farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica. Ejemplos de excipientes incluyen, la glucosa, el manitol, el inositol, la sacarosa, la lactosa, la fructosa, el almidón, la maicena, la celulosa microcristalina, la hidroxipropilcelulosa, la hidroxipropilmetilcelulosa, la polivinilpirrolidona y similares. Opcionalmente, se puede añadir un espesante, como una goma natural, un derivado de la celulosa un polímero acrílico o de vinilo, o similares. La composición farmacéutica que incluye el péptido puede además comprender un polímero biodegradable seleccionado de succinato de poli-1,4-butileno, succinato de poli-2,3-butileno, fumarato de poli-1,4-butileno y succinato de poli-2,3-butileno, incorporando el péptido de la invención como el pamoato, el tanato, el estearato o el palmitato del mismo. Tales composiciones son conocidas en la técnica como se describe, por ejemplo, en la Patente U.S. 5.439.688.

[0068] El ingrediente farmacéuticamente activo de la composición puede estar conjugado a una matriz o a un portador proteínico, por ejemplo los toxoides tetánicos o diftéricos o KLH oxidado, para estimular la ayuda de las células T, o a otros agentes inmunopotenciadores así como a modificadores de la respuesta biológica como los interferones, interleucinas, etc., para estimular el sistema inmunológico. Las composiciones para la administración a humanos pueden además comprender adyuvantes que sean adecuados para el uso humano, como el alumbre, que está aprobado para el uso humano, o emulsiones de submicron que están destinadas para el uso humano como se revela por ejemplo en la WO 95/11700. Los intervalos apropiados de ingredientes para preparar las composiciones con o sin diluyentes, portadores o adyuvantes adicionales son conocidas en la técnica.

[0069] La preparación de composiciones farmacéuticas que comprenden péptidos es bien conocida en la técnica, como se revela por ejemplo en las Patentes U.S. 5.736.516, 5.733.877, 5.418.219, 5.354.900, 5.298.246, 5.164.372, 4.900.549 y 4.457.917. Los medios para procesar las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, sin limitaciones, procesos de mezclado convencional, disolución, granulado, molienda, pulverizado, fabricación de grageas, levigación, emulsionado, encapsulamiento, atrapado o liofilización.

[0070] De acuerdo a otro aspecto de la presente invención se proporciona una vacuna péptida. Los dos tipos principales de vacuna péptida son: péptidos mezclados con sustancias adyuvantes y péptidos que son introducidos junto con una célula que presenta un antígeno (APC; Mayordomo y otros, Nature Med. 1:1297, 1995). Las células más comunes usadas para el último tipo de vacunas son células dendríticas derivadas de la médula ósea y la sangre periférica, ya que estas células expresan moléculas coestimuladoras que ayudan a la activación del CTL. La WO 00/06723 revela una composición de vacuna celular que incluye un antígeno que presenta una célula que presenta un tumor asociado con péptidos antígenos. Se puede llevar a cabo presentar el péptido cargando el APC con un polinucleótido (por ejemplo ADN, ARN) que codifica el péptido o cargando el APC con el mismo péptido.

[0071] De acuerdo con el primer tipo de vacuna péptida, las sustancias adyuvantes que estimulan la inmunogenicidad se mezclan con el péptido para mejorar la respuesta inmune al péptido. Los adyuvantes inmunológicos se han dividido generalmente en dos tipos básicos: sales de aluminio y emulsiones de aceite. Los adyuvantes de fosfato de aluminio e hidróxido (alumbre) inducen elevados niveles de anticuerpos contra los antígenos en las vacunas basadas en alumbre por encima de los obtenidos con las correspondientes vacunas acuosas. Se desarrollaron numerosas vacunas basadas en alumbre, incluyendo métodos para la preparación de las mismas, como se revela, por ejemplo, en las Patentes US 5.747.653, 6.013.264, 6.306.404 y 6.372.223. Sin embargo, los compuestos de aluminio no han mejorado siempre la inmunogenicidad de las vacunas.

[0072] Los componentes principales de los adyuvantes basados en aceite son: aceite, emulsionantes, e inmunoestimulantes. Los primeros tipos de adyuvantes basados en aceite emulsionados son el Adyuvante Incompleto de Freund (IFA), que consiste de aproximadamente un 50:50 de emulsión de agua en aceite, y el adyuvante completo de Freund (CFA), una preparación similar con la inclusión de micobacterias muertas. El potente efecto estimulador de los anticuerpos del CFA no ha sido superado por cualquier otro adyuvante. Sin embargo, debido a severas reacciones tóxicas el CFA sólo puede ser usado para propósitos experimentales y no en vacunas humanas o veterinarias. El uso del IFA en humanos ha estado limitado a aquellas situaciones clínicas en las que las vacunas acuosas son relativamente impotentes y los compuestos de aluminio no han proporcionado suficiente actividad adyuvante. Ejemplos de emulsiones mejoradas como adyuvantes de vacuna, mejorando la inmunogenicidad del antígeno, incluyen las emulsiones de submicrones como se revela en la Patente US 5.961.970 y las nanoemulsiones de grasa sólida como se revela en la 5.716.637 por ejemplo.

[0073] Los medios preferidos para la administración de péptidos son a través de la administración intravenosa, intramuscular o subcutánea. Se espera que la administración oral sea menos efectiva, porque un péptido puede ser digerido antes de ser absorbido. La descomposición en el tracto digestivo puede ser reducida por el uso de ciertas composiciones, por ejemplo, confinando el péptido de la invención en microcápsulas como los liposomas. La composición farmacéutica de la invención puede también ser administrada en otras membranas acuosas, La composición farmacéutica es entonces proporcionada en forma de un supositorio, un espray nasal o una pastilla sublingual.

[0074] La absorción de un péptido de la invención puede ser facilitada por un número de métodos. Por ejemplo, un derivado no tóxico de la subunidad B de la toxina del cólera, o la subunidad B estructuralmente relacionada de la

enterotoxina cura-lábil de la *Eschericia coli* enterotóxica pueden ser añadidas a la composición, como se revela en la Patente U.S. 5.554.378.

5 [0075] Los péptidos pueden ser administrados por liposomas, partículas de liberación lenta, y similares, como se conoce en la técnica, para aumentar la inmunogenicidad de los péptidos.

10 [0076] Una composición de acuerdo a una realización de la invención puede ser administrada directamente a un individuo para inmunizar al individuo. Alternativamente, de acuerdo con una realización de la invención, los péptidos pueden ser usados para generar nuevos anticuerpos con los atributos y actividades de los anticuerpos monoclonales BAT conocidos. La activación ex-vivo de las células T por estos péptidos puede también provocar la actividad deseada de inmunestimulación. Así, la composición puede ser usada para inducir anticuerpos en un sistema ex-vivo y los anticuerpos inducidos pueden ser después administrados a un individuo para tratar una enfermedad autoinmune, una infección o un cáncer. La composición puede también ser usada en un sistema ex-vivo para estimular las células T a ser administradas en un proceso de inmunoterapia adoptiva, como se describe en la técnica.

15 [0077] También se revela el uso del péptido o del polinucleótido como un agente diagnóstico para diagnosticar el cáncer en un individuo. Se puede poner en contacto una muestra de un individuo, como una muestra de sangre o una muestra de los fluidos del tracto GI del paciente, o del fluido cerebroespinal o cualquier otra muestra relevante, in vivo o in vitro, con un péptido o un polinucleótido de acuerdo a la invención y se puede determinar el grado de enlace del péptido o el polinucleótido a la muestra, como por ELISA, para proporcionar información referida a la aparición del BAT en la muestra. Por ejemplo se pueden usar los anticuerpos a los péptidos de la invención para diagnosticar el cáncer o para monitorizar su progresión si está presente en un fluido corporal especialmente el suero o el plasma. A la inversa, en los nódulos linfáticos del paciente especialmente al drenar los nódulos linfáticos en proximidad a la sospecha de un tumor, puede ser posible filtrar las células T usando los péptidos de la invención.

20 [0078] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para conseguir el propósito pretendido. Todas las formulaciones para la administración deben estar en dosificaciones adecuadas para la vía elegida de administración. Más específicamente, una dosis "terapéuticamente efectiva" significa una cantidad de un compuesto efectiva para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una enfermedad del sujeto que está siendo tratado. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de aquellos expertos en la materia, especialmente a la luz de la revelación detallada proporcionada en la presente.

25 [0079] La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones descritas en la presente puede ser determinada por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o animales de experimentación, por ejemplo, determinando el IC₅₀ (la concentración que proporciona un 50% de inhibición) y la dosis máxima tolerada para un compuesto en cuestión. Los datos obtenidos de estos análisis de cultivos de células y estudios de animales pueden ser usados para formular un intervalo de dosificación para su uso en humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual en vista de la condición del paciente. Dependiendo de la severidad y sensibilidad de la condición a ser tratada, la dosificación puede también ser una administración única de una composición de liberación lenta, con el curso del tratamiento durando de varios días a varias semanas o hasta que se efectúe la cura o se consiga la disminución del estado de la enfermedad. La cantidad de una composición a ser administrada dependerá, por supuesto, del sujeto que está siendo tratado, la severidad de la afección, la manera de administración, el juicio del médico que prescribe, y de todos los otros factores relevantes.

30 [0080] La presente invención será descrita en más detalle y ejemplificada por los siguientes ejemplos no limitativos.

50 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación del anticuerpo monoclonal BAT

55 [0081] El BAT fue generado, purificado y caracterizado como se ha revelado anteriormente en la WO 95/20605, la WO 00/58363 y publicaciones posteriores. En resumen, se inmunizaron ratones BALB-C con membranas de células Daudi. Se fusionaron células del bazo con células NCS de mieloma. Los clones que producen BAT fueron seleccionados por la capacidad de los sobrenadantes de enlazar células Daudi e inducir al proliferación de células mononucleares de la sangre periférica. Se cultivaron células de hibridoma en RPMI 1640 suplementadas con un 10% de suero de ternera fetal (para el Experimento 1 en el Ejemplo 2) o con un medio proteico libre de suero PFHM (GIBCO; para el Experimento 2 en el Ejemplo 2), piruvato de sodio, glutamina, y antibióticos y se incubaron a 37° C en una atmosfera humidificada que contenía un 5% de CO₂. El BAT fue purificado en una columna de sefarsa de proteína G de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Pharmacia Corp. NJ, USA). La biotilación fue realizada como sigue: se incubaron 100 µg de la fracción de inmunoglobulina del anticuerpo monoclonal BAT en 1 ml de 0,1 M NaHCO₃, pH 8,6 durante 2 horas a temperatura ambiente con 5 µg de éster de N-hidroxisuccinimida

amidocoproate (SIGMA, Israel) de una solución madre de 1 mg/ml en dimetilformamida y se dializó a 4° C contra el salino potenciado con fosfato pH 7,4.

5 Ejemplo 2. Aislamiento de péptidos por análisis de visualización de fagos

Experimento 1

Materiales y Métodos

10 a. Aislamiento del epítipo que presenta fago de una librería de epítipo fago

15 **[0082]** La librería de péptidos de visualización de fagos se baso en una librería combinatoria de péptidos 12-mer aleatorios fusionados a una proteína de cubierta menor (pIII) del fago M13. Una muestra de la librería que contenía 4×10^{10} partículas de fago infecciosas fue sometida a 6 ciclos de panning y amplificación. Por cada ciclo de selección se usaron 100 µg de anticuerpo monoclonal BAT biotinilado. El fago fue preincubado con el anticuerpo biotinilado a temperatura ambiente durante 1 hora. Las mezclas de la reacción fueron después estratificadas en 1 ml de TBS 0,5% de Tween en fuentes Petri de poliestireno de 60mm cubiertas de estreptavidina y bloqueadas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los fagos no enlazados fueron retirados por lavados de 10 veces en TBS 0,5% de Tween. Los fagos restantes fueron eluidos con 1 ml de 0,2M Glicina -HCl (pH 2,2), 1 mg/ml de BSA. El eluido fue neutralizado y usado para infectar la cepa E. coli ER2537. Tras cada ciclo de panning el fago fue titulado en placas LB/IPTG/Xgal. El último ciclo no amplificado fue titulado y las placas se usaron para la secuenciación.

25 b. Fago-ELISA

30 **[0083]** Los pocillos de placas microtituladas fueron cubiertas con 100µl de una dilución 1:1000 (0,1M de NaHCO₃, pH 8,6) de suero M13 de antifago de conejo por incubación durante la noche a 4° C. Las placas cubiertas fueron lavadas 3 veces con PBS 0,05% de Tween 20 y 100 µl de clones de fago enriquecidos, conteniendo 10^9 partículas de fago, fueron después añadidos a los pocillos e incubados durante 1 hora a 37° C. Los pocillos fueron bloqueados con un 1% de BSA en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, lavados e incubados con el anticuerpo durante la noche a 4° C. Para los experimentos de inhibición, los péptidos fueron preincubados con el anticuerpo durante 30 minutos, antes de su adición a los pocillos que contienen los fagos. Tras el lavado, el anticuerpo enlazado fue detectado por incubación con Peroxidasa IgG anti-ratón conjugada (Fab específica) durante 45 minutos. Tras el lavado con diamina o-fenileno (OPD), el sustrato fue añadido y el color desarrollado fue determinado por un lector ELISA a 450 nm.

35 c. Análisis FACS de experimentos de inhibición de péptidos.

40 **[0084]** El BAT mAb biotinilado (20 µg/ml) fue incubado con diferentes concentraciones del péptido seleccionado del análisis de visualización de fagos (0,01-40 µg/ml) durante toda la noche a 4° C. Las células Daudi ($0,5 \times 10^6$) fueron incubadas con el anticuerpo o con la combinación de anticuerpo y péptido durante 2 horas en hielo. Tras el lavado se añadió estreptavidina FITC durante 30 minutos. Las células fueron analizadas con un FACScan (Becton Dickinson & Co., NJ, USA).

45 d. Efecto in vivo del péptido seleccionado del análisis de visualización de fagos

50 **[0085]** Los ratones C57BL fueron inyectados en la pata con 20 µg del péptido en CFA (adyuvante de Freund completo). Los ratones de control fueron inyectados sólo con CFA. Tras siete días se dio un potenciador con 20 µg del péptido en PBS, se inocularon las células de melanoma B16 ($0,5 \times 10^6$ células/ratón), subcutáneamente (s.c.) en el día 1 o en el día 8 tras la inyección del péptido y el volumen del tumor fue medido cada dos días. Se tomo sangre de los ratones en los días 14, 21 y 28 tras la inyección del péptido para probar el anticuerpo anti-péptido específico en suero usando el método ELISA.

Resultados

55 a. Aislamiento del Péptido A (SEQ ID NO 1)

60 **[0086]** Se observó el enriquecimiento aumentado en el número de unidades formadoras de placas (pfu) de fagos que fueron positivos al enlazar con el BAT mAb tras cada panning. Tras el 4° panning el pfu era de 2×10^4 y tras el 6° panning se observo un número de $1,5 \times 10^5$ pfu. El número de fagos usados en cada panning fue de 1×10^9 . Tras el sexto panning, el 100% de los fagos fueron positivos al enlazar con el BAT mAb. Se secuenció el ADN de 40 clones positivos. Los 40 clones fago mostraron la secuencia de aminoácido:

(Péptido A, SEQ ID NO 1) PRRIKPRKIMLQ

Y la secuencia de ácido nucleico:

65 (SEQ ID NO 18) CCTCGACGAATAAAGCCCAGGAAGATCATGCTGCAX

El enlace del fago fue altamente específico. Por otra parte, no se observó el enlace a los anticuerpos de control incluyendo los anticuerpos no relacionados como el IgG-3 mAb.

b. Inhibición del BAT que enlaza con los fagos seleccionados por el péptido sintético.

[0087] Para asegurar que la interacción entre los fagos seleccionados y el BAT mAb es causada por las secuencias insertadas, los péptidos que abarcan esta región fueron sintetizados (es decir Péptido A) y se evaluó su capacidad para competir con el BAT mAb que enlaza con el fago. El fago inmovilizado en las placas ELISA microtitulado cubierto con suero M13 anti-fago de conejo fue incubado con 6 µg/ml del anticuerpo. El BAT mAb fue pre-incubado con una cantidad cada vez mayor de Péptido sintético A. El Péptido A inhibió el enlace del anticuerpo de una manera dependiente de la dosis con un valor (IC_{50}) de concentración de inhibición de $6,6 \times 10^{-7}$ M (Fig. 1).

c. Análisis FACS de los experimentos de inhibición del péptido

[0088] Los BAT mAb mostraron enlazarse con una membrana determinante en las células Daudi. Por lo tanto, se evaluó la capacidad del Péptido A sintético para inhibir este enlace. Se pre-incubó BAT biotinilado (20 µg/ml) con cantidades aumentadas del Péptido A. La mezcla fue añadida a las células Daudi y el anticuerpo enlazado fue teñido con la estreptavidina FITC. El Péptido A (1 a 40 µg/ml) inhibió el enlace del BAT mAb a las células Daudi de una manera dependiente de la dosis (Figura. 2).

d. Efecto anti tumoral in vivo de los péptidos seleccionados

[0089] Los ratones C57BL (n=4) inoculados subcutáneamente con células de melanoma B16 fueron inmunizados con 20 µg de los péptidos. Los animales de control fueron inyectados sólo con CFA. Se detectó que el volumen del tumor de melanoma medio disminuyó en los ratones inmunizados con los péptidos (Fig. 3).

[0090] Las muestras de sangre fueron retiradas de los ratones de control e inmunizados en los días 21 y 28 tras la inmunización. Se incubó suero de los ratones de control 4 y 4 ratones inmunizados en placas ELISA microtituladas con péptido inmovilizado. Los resultados ELISA indicaron que se observaron mayores concentraciones de anticuerpos de anti-Péptido A en el suero de los ratones inmunizados en comparación con el suero de los ratones de control (Fig. 4). Estos resultados explican la inhibición del crecimiento tumoral en los ratones tratados (ver Fig. 3).

Experimento 2

Materiales y Métodos

a. Aislamiento del epítipo que presenta fago de una librería de epítipo fago

[0091] La librería de péptidos de visualización de fagos se basa en una librería combinatoria de péptidos 12-mer aleatorios fusionados a una proteína de cubierta menor (pIII) del fago M13. Una muestra de la librería que contenía 2×10^{10} partículas de fago infecciosas fue sometida a 3 ciclos de panning y amplificación. Para los ciclos de selección biopanning ciclo de selección se usaron 20 µg de anticuerpo monoclonal BAT biotinilado. El fago fue preincubado con el anticuerpo biotinilado a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de la reacción fueron después estratificada en 1 ml de TBS 0,5% de Tween en fuentes Petri de poliestireno de 60mm cubiertas de estreptavidina y bloqueadas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los fagos no enlazados fueron retirados por lavados de 10 veces en TBS 0,5% de Tween. Los fagos restantes fueron eluidos con 1 ml de 0,2M de Glicina -HCl (pH 2,2), 1 mg/ml de BSA. El eluido fue neutralizado y usado para infectar la cepa E. coli ER2537. Tras cada ciclo de panning el fago fue titulado en placas LB/IPTG/Xgal. El último ciclo no amplificado fue titulado y las placas se usaron para secuenciar el ADN.

b. Fago-ELISA

[0092] Los pocillos de placas microtituladas fueron cubiertas con 100µl de una dilución 1:1000 (0,1M de NaHCO₃, pH 8,6) de suero M13 de antifago de conejo por incubación durante toda la noche a 4° C. Las placas cubiertas fueron lavadas 3 veces con PBS 0,05% de Tween. Después, 100 µl de clones de fago enriquecidos, conteniendo 10^9 partículas de fago, fueron entonces añadidos a los pocillos e incubados durante 1 hora a 37° C. Tras la incubación, los pocillos fueron bloqueados con un 1% de BSA en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, lavados e incubados con el anticuerpo durante la noche a 4° C. Tras el lavado con (OPD), el sustrato fue añadido y el color desarrollado fue determinado por un lector ELISA a 450 nm.

Resultados

a. Aislamiento del Péptido B (SEQ ID NO 11) y el Péptido C (SEQ ID NO 17)

[0093] En vista del efecto antitumoral del BAT mAb, se tenía por objetivo seleccionar un péptido que enlazase específicamente con el anticuerpo de una librería epítipo fago aleatoria 12-mer. Tras cada panning se observó el

enriquecimiento en el número de unidades formadoras de placa (pfu). Resultando del 1^{er} panning se obtuvo un número de $5,6 \times 10^6$ pfu, del 2^o, 2×10^2 pfu, tras la amplificación el número de pfu fue 2×10^8 y tras el último ciclo de biopanning se contaron 1×10^3 pfu (Tabla 1).

5

Tabla 1: Screening para el BAT que enlaza con el péptido.

10

	Panning 1	Panning 2	Panning 3
Número de fagos	2×10^{10}	$5,6 \times 10^6$	2×10^8
PFU obtenido	$5,6 \times 10^6$	2×10^2	2×10^3 (52 secuenciados)
Porcentaje (%)	0,028	0,004	0,0005

[0094] Se secuenció el ADN de 42 clones positivos. El ADN de 31 de los clones de fago mostró la secuencia:

15

CAGAGGATACTGCAGCAAATTAATCTTCCCAGGATC (SEQ ID NO 28) codificando para un péptido de SEQ ID NO 11, también denominado Péptido B.

[0095] El ADN de 3 de los clones de fago mostró la secuencia:

20

AACCGAATCAGGACAAATACTAAGCTCATGAACAGC (SEQ ID NO 34) codificando para un péptido de SEQ ID NO 17, también denominado Péptido C.

El resto de los 8 clones positivos mostraron diferentes secuencias.

25

b. Fago ELISA en placas anti-M13

30

[0096] Para asegurar que la interacción entre los fagos seleccionado y el BAT mAb es causado por las secuencias insertadas, se realizó un ELISA en placas anti M13 enlazantes. Se evaluó la capacidad del fago positivo de enlazar con el BAT mAb ($5 \mu\text{g/ml}$). Se incubaron 1×10^9 fagos del pfu positivo en placas anti-M13 y se evaluó el enlace con el BAT mAb. El ELISA detectó solo fagos con el péptido B en el inserto (Fig. 5, fagos N51 y N52), Los fagos con otras secuencias no enlazaron con el anticuerpo monoclonal BAT (Fig. 5, fagos N40, N6, N7, y N37).

Ejemplo 3. Efecto in vivo de los péptidos

35

Materiales y Métodos

[0097] Péptidos: el Péptido A y el Péptido B y las variantes, se muestran en la Tabla 2 (SEQ ID NO 1-17). Los Péptidos fueron producidos por síntesis de aminoácidos como es conocido en la técnica.

40

Ratones: Ratones femeninos C57BL, de 6-8 semanas de edad.

Tumores: Se inocularon células de melanoma singénico B16 para inducir la formación de metástasis de pulmón. Las células fueron inoculadas intravenosamente en el día 1 siguiendo la inyección del primer péptido. Las metástasis fueron localizadas en el pulmón por su coloración oscura, como resultado de la producción de melanina en las células. El crecimiento del tumor fue monitorizado por el peso del pulmón comparado con los ratones de control.

45

Composición de la vacuna y dosis: Una inmunización de vacuna compuesta: $10 \mu\text{g}$ de un péptido y $100 \mu\text{l}$ del adyuvante de Freund completo (CFA) o PBS.

Protocolo de vacunación: los ratones C57BL fueron inyectados con la dosis anterior de la vacuna péptida en el CFA en las patas, seguido de dos refuerzos de la dosis anterior en el PBS en el 7^o y el 14^o día tras la primera inmunización. Los ratones de control fueron inyectados sólo con el vehículo. El anticuerpo monoclonal BAT ($10 \mu\text{g}$) fue inyectado en el día 10 tras la inoculación del tumor como un control positivo. El peso del pulmón fue medido en el día 24 tras la inoculación del tumor.

50

Resultados:

55

[0098] EL Péptido A (SEQ ID NO 1) y varias de las variantes basadas en la secuencia del Péptido A (SEQ ID NOS 6 y 8-10; Fig. 6) y en la secuencia del Péptido B (SEQ ID NOS 14 y 16; Fig. 7) mostraron actividad antitumoral similar a la del anticuerpo monoclonal BAT. La actividad antitumoral como una medida del peso del pulmón fue aproximadamente dos veces más alta en comparación con el control (tumores no tratados). Otros péptidos se encontraron menos efectivos que el anticuerpo monoclonal BAT.

TABLA 2: Análogos péptidos

	Péptido SEQ ID NO	Secuencia Péptida	DNA SEQ ID NO
5	1 (Péptido A)	PRRIKPRKIMLQ	18
	2	PRRIKPRKIMLQ-amida	18
	3	PRRFKPRKIBLQ	19
	4	PRRIKPRKIBFQ	20
10	5	PRRIKPRKIBLQ	21
	6	PRRIKARKIMLQ	22
	7	PRKIKPRKIMLQ	23
	8	--RIKPRKIMLQ	24
15	9	PRRIKPRKIM--	25
	10	acetil-PRRIKPRKIMLQ	18
	11 (Péptido B)	QRILQQINLPRI	26
	12	QRILQQINLARI	27
20	13	QRILQEINLPRI	28
	14	QRILQQINLPKI	29
	15	--ILQQINLPRI	30
	16	QRILQQINLP--	31
25	17 (Péptido C)	NRIRTNTKLMNS	32

Ejemplo 4. Actividad citolítica NK y CTL en ratones péptido inmunizados

30 Materiales y Métodos

[0099] LA citotoxicidad fue examinada midiendo la liberación de cromo radiomarcado de las células objetivo. Las células (2-4x10⁶ YAC, B16 o 3LL) fueron marcadas con 200 µCi [⁵¹Cr]-cromato, en medio libre de suero durante 1 h a 37° C. Tras tres lavados, las células fueron suspendidas en medio completo y puestas en placas a 10⁴ células/pocillo. Los esplenocitos de ratones fueron retirados en los días indicados (YAC – día 7, B16 y 3LL –día 21) tras la inmunización péptida. El régimen de vacunación fue idéntico al usado en los experimentos de inhibición tumoral (ver Ejemplo 3). Los esplenocitos fueron mezclados con las células objetivo a las tasas indicadas e incubados durante 12 h a 37° C. Los sobrenadantes fueron monitorizados para radioactividad. La citotoxicidad fue determinada como sigue,

$$\% \text{ Lisis} = 100 \times (\text{Re} - \text{Rs}) / (\text{Rmax} - \text{Rs}).$$

45 Donde Re es la liberación medida, Rs es la liberación espontanea en la presencia de sólo el medio y Rmax representa la liberación máxima obtenida incubando las células objetivo con Triton x100. La liberación de ⁵¹Cr fue determinada a tasas de efector a célula objetivo de 1:5, 1:25 y 1:50.

Resultados

50 [0100] La inhibición tumoral por vacunas péptidas puede depender de tanto los efectos humorales como los celulares provocados por la inmunización. Para examinar si los péptidos A y B inducen la toxicidad celular, los ratones inmunizados con los péptidos fueron estudiados por su capacidad de aumentar la lisis tumor-celular in vitro. Siguiendo un régimen de inmunización que provoca una respuesta antitumoral, se observó una citotoxicidad de esplenocitos contra una variedad de células tumorales (Fig. 8.). Interesantemente, esta actividad fue inducida contra las células sensibles NK (YAC; FIG. 8A) así como contra las células insensibles NK (B16 y 3LL; FIG. 8B y FIG. 8C, respectivamente), lo que sugiere la participación de ambas poblaciones en la respuesta. Característicamente, la lisis NK dependiente puede ser observada tan pronto como 7 días tras la inmunización, de acuerdo con la estimulación temprana de las células NK. A la lisis NK independiente de las células B16 y 3LL siguió una respuesta de tiempo clásica de eficacia máxima alrededor del día 21.

60 [0101] Los efectos anteriores podrían ser inducidos en una medida similar tanto por el péptido A como el B, alcanzando una actividad impresionante de hasta un %80 de lisis. El Péptido N, un péptido de control no relevante no pudo provocar una respuesta similar, de acuerdo con su incapacidad de inhibir el crecimiento tumoral.

Ejemplo 5. Anticuerpos Anti-Péptido A y B compiten con el anticuerpo monoclonal BAT que enlaza con las células DaudiMateriales y Métodos

5 a. Purificación del anticuerpo

10 **[0102]** Para examinar la capacidad de las vacunas péptidas del BAT seleccionado de provocar anticuerpos similares al BAT, se recogió suero de los ratones péptido inmunizados y se purificó en cuentas de sefaroza de proteína G de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Pharmacia Corp. Nj, USA).

b. Inhibición del enlace BAT:

15 **[0103]** Las células Daudi ($0,5 \times 10^6$) fueron pre incubadas con, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de cada anticuerpo purificado, durante 2 horas en hielo. Se añadió el anticuerpo monoclonal BAT biotinilado (40 $\mu\text{g/ml}$) y las células fueron incubadas durante un periodo adicional de 2 h a 4° C. Tras un lavado extensivo se añadió FITC de estreptavidina durante 30 minutos. Las células fueron analizadas por FACScan (Becton Dickinson & Co., NJ, USA). En enlace de solo los anticuerpos anti-péptidos (20 $\mu\text{g/ml}$) fue determinado de una manera similar, sin embargo, la detección fue realizada por la incubación con un anticuerpo secundario contra IgG de ratón conjugado al FITC. En una muestra de control, las células fueron expuestas sólo al anticuerpo secundario.

Resultados

25 **[0104]** Es plausible que los péptidos que imitan el sitio antigénico del anticuerpo monoclonal BAT pueden provocar la producción de anticuerpos en el suero con características de enlace similares a las del BAT original. Para examinar esta posibilidad, los anticuerpos purificados del suero de los ratones péptido-inmunizados fueron estudiados por su capacidad para inhibir el enlace del BAT de su antígeno (FIG. 9). El enlace de los anticuerpos Anti-A y Anti-B a las células Daudi fue verificado (FIG. 9b) respecto al control (FIG. 9A), sugiriendo el reconocimiento del antígeno BAT.

30 **[0105]** La determinación del enlace del BAT en la presencia de anticuerpos anti-A (FIG. 9c) y anti-B (FIG. 9D) reveló un epítipo común. Ambos péptidos indujeron anticuerpos de ratón capaces de inhibir significativamente el enlace del BAT de sus células objetivo, como se demostró por la disminución en el marcado fluorescente por el BAT. Esta observación se explica por el hecho de que en presencia de anticuerpos anti-péptido purificados, el anticuerpo BAT pudo ocupar menos determinantes antigénicos en la superficie de las células que expresan antígenos.

Ejemplo 6: Anticuerpos Anti-Péptido A y B inducen la proliferación de linfocitos humanosMateriales y Métodos

40 a. preparación de PBL-Humano (linfocitos de sangre periférica)

45 **[0106]** Se diluyó sangre de donante humano normal 1:1 en PBS. Se añadió Histopaque (1077-1 SIGMA) (1:2 v/v) y la solución fue centrifugada durante 30 min, 1600 rpm a 4° C. El anillo de interfase del linfocito fue recogido, las células lavadas e incubadas en medio completo durante una hora a 37° C para remover las células adherentes. El PBL fue recogido del sobrenadante.

b. Incorporación de Timidina

50 **[0107]** Se dispensó PBL a una concentración de 2×10^6 células/ml (200 μg) en placas de fondo plano de 96 pocillos en medio completo. Se añadieron el BAT o los anticuerpos anti-péptido (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 5 días seguido por la incubación en presencia de ^3H Timidina (1 $\mu\text{Ci/pocillo}$) durante 16 h a 37° C. Las células fueron recogidas y se determinó la radioactividad usando un contador de B-centelleo líquido.

Resultados

60 **[0108]** El PBL humano incubado en presencia de anticuerpos purificados de ratones péptido-inmunizados, demostró una proliferación aumentada, similar a la inducida por el BAT (Fig. 10). Estos anticuerpos fueron efectivos a una concentración similar e intervalos de tiempo como los del anticuerpo BAT, sugiriendo un parecido en la eficacia y quizás en el mecanismo. Los resultados sugieren que la estimulación de linfocitos está correlacionada con la capacidad de la vacuna de la invención de provocar un efecto antitumoral. Los resultados además indican que el epítipo antígeno reconocido por el BAT está involucrado en la activación de los linfocitos.

65 **[0109]** La capacidad de los anticuerpos péptido-inducidos para estimular la proliferación de linfocitos es, más probablemente, el mecanismo que es la razón de su capacidad de activar al citotoxicidad antitumoral (como se muestra en el Ejemplo 4). En el ámbito de la enfermedad, los linfocitos anti cáncer que están presentes pero por

debajo de un umbral requieren una respuesta inmune eficiente como la estimulación que es representada por el péptido de la invención en el presente ejemplo.

Ejemplo 7. Vacunación de péptidos en pacientes con cáncer.

5 **[0110]** La vacunación de sujetos humanos con péptidos reconocidos por el anticuerpo monoclonal BAT está probada en varios estudios. La población objetivo de estos estudios es, en el primer caso, los pacientes de cáncer. En estos pacientes, se espera que la vacuna provoque una respuesta inmune antitumoral, permitiendo aliviar, reducir, curar o al menos detener parcialmente la enfermedad.

10 Fase I – Estudio de seguridad: Doble ciego, aumentar la dosis, Placebo-controlado.

Fase II – Estudio de Seguridad y Eficacia: Doble ciego, aumentar la dosis, Placebo-controlado.

15 **[0111]** Los pacientes que firman el consentimiento informado y cumplen los criterios de inclusión se asignaron al azar en una tasa 1:1 para recibir la vacuna péptida o el placebo (sólo el vehículo o el adyuvante). La vacuna péptida y el placebo son diluidos en una solución salina estéril para generar la forma de dosificación administrada. La medicación se administra por una vía adecuada de administración, por ejemplo, una infusión intravenosa de goteo rápido o bomba peristáltica o subcutáneamente.

20 **[0112]** Los criterios de valoración de la eficacia primaria de la prueba son: la reducción en el tamaño del tumor, la activación NK y CTL, la proliferación de linfocitos y las respuestas inmunes humoral y celular a los antígenos tumorales, la evaluación de la concentración del péptido en la sangre (farmacocinéticas).

25 **[0113]** El tratamiento de los pacientes con cáncer puede incluir exclusivamente la vacuna péptida o puede incluir otra vacuna que comprende un anticuerpo monoclonal BAT. En el último tipo de tratamiento las dos vacunas pueden ser administradas separadamente en puntos de tiempo similares o en puntos de tiempo diferentes del tratamiento.

[0114] La seguridad es evaluada comparando la tasa de sucesos adversos, clasificados de acuerdo al sistema corporal, severidad y relación con el tratamiento, entre los dos grupos.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un péptido que comprende al menos un epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal BAT, seleccionado de un péptido que tiene la secuencia de cualquiera de las SEQ ID Nos 1 a 10 o una sal del mismo que mantiene la actividad biológica del péptido.
- 10 **2.** EL péptido de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el péptido es seleccionado de un péptido que tiene la secuencia de cualquiera de las SEQ ID Nos 1, 6, 8, 9, 10 o una sal del mismo que mantiene la actividad biológica del péptido.
- 15 **3.** Un polinucleótido que codifica al menos un péptido reconocido por el anticuerpo monoclonal BAT, el polinucleótido tiene una secuencia seleccionada de las SEQ ID Nos 18 a 25.
- 20 **4.** El polinucleótido de acuerdo a la reivindicación 3, que tiene una secuencia seleccionada de las SEQ ID Nos 18, 22, 24, 25.
- 25 **5.** Un constructo que comprende un polinucleótido que codifica por lo menos un péptido reconocido por un anticuerpo monoclonal BAT en donde el polinucleótido comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID Nos 18 a 25.
- 30 **6.** El constructo de acuerdo a la reivindicación 5, en donde el polinucleótido comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID Nos 18, 22, 24, 25.
- 35 **7.** Un vector que comprende un polinucleótido que codifica a Lemnos un péptido reconocido por un anticuerpo monoclonal BAT, en donde el polinucleótido comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID Nos 18 a 25.
- 40 **8.** El vector de acuerdo a la reivindicación 7, en donde el polinucleótido comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID Nos 18, 22, 24, 25.
- 45 **9.** El vector de acuerdo a la reivindicación 7, en donde el vector es un plásmido o un virus.
- 50 **10.** Una célula huésped que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica al menos un péptido reconocido por un anticuerpo monoclonal BAT, el polinucleótido tiene una secuencia seleccionada de las SEQ ID Nos 18 a 25.
- 55 **11.** La célula huésped de acuerdo a la reivindicación 10, que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia seleccionada de las SEQ ID Nos 18, 22, 24, 25.
- 60 **12.** La célula huésped de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, capaz de expresar al menos un epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal BAT.
- 13.** Una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo al menos un péptido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 14.** Una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo un polinucleótido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 15.** El uso de una composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 en la preparación de una composición farmacéutica para tratar el cáncer seleccionado de la lista consistente de melanoma, carcinoma pulmonar, cáncer de próstata, cáncer de pecho, linfomas y leucemias, carcinoma de colon, y fibrosarcomas.
- 16.** Una vacuna inmunomodulatoria que comprende al menos un péptido reconocido por un anticuerpo monoclonal BAT y un adyuvante farmacéuticamente aceptable, en donde el péptido comprende una secuencia de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 2.
- 17.** La vacuna de acuerdo a la reivindicación 16, en donde el adyuvante es seleccionado del grupo de una sal de aluminio y una emulsión de aceite en agua.
- 18.** Un agente diagnóstico para detectar el cáncer, seleccionado de la lista consistente de melanoma, carcinoma pulmonar, cáncer de próstata, cáncer de pecho, linfomas, leucemias, carcinoma de colon, y fibrosarcomas, que comprende un péptido reconocido por un anticuerpo monoclonal BAT, de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 2.

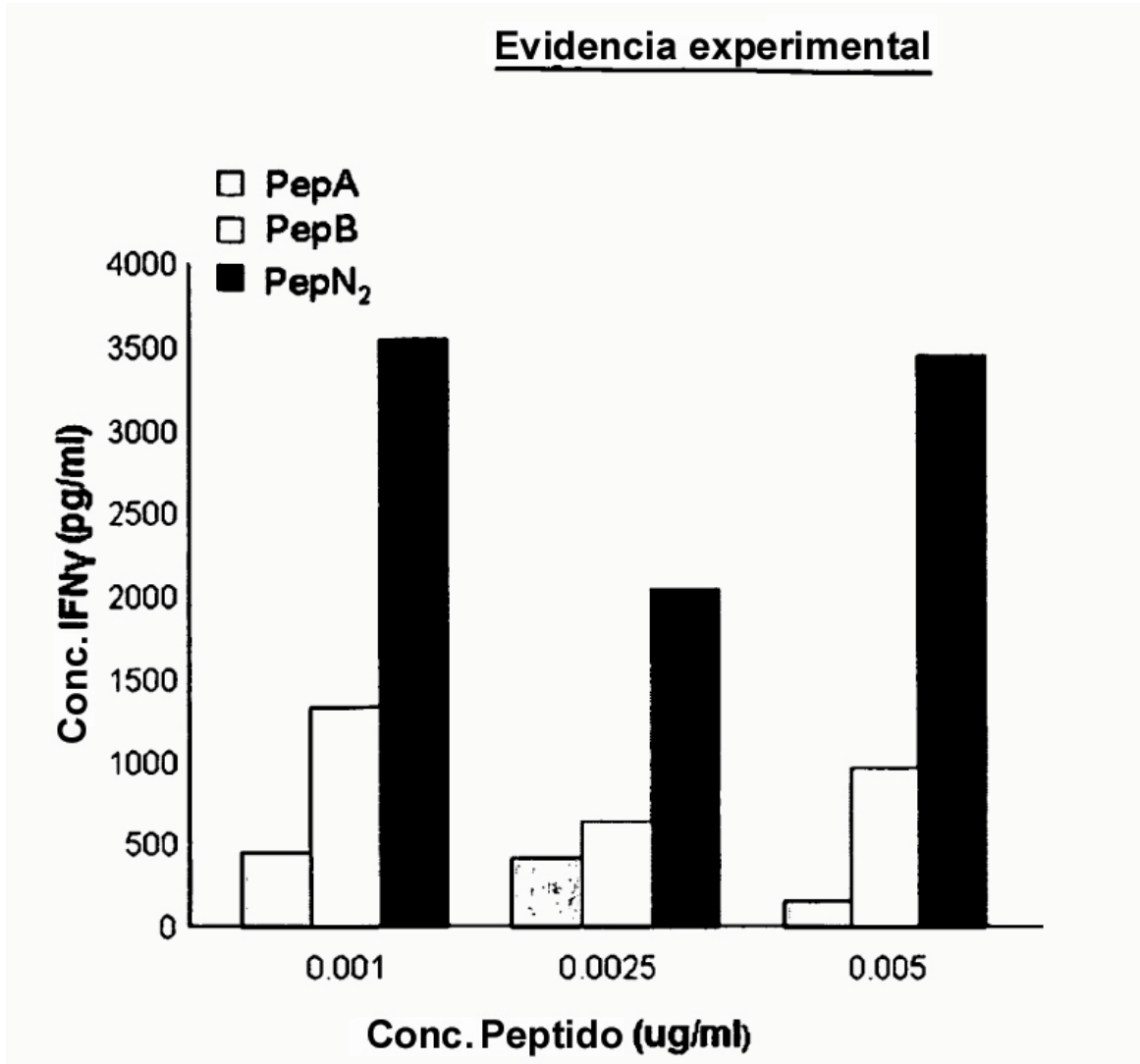


Fig 1: EL Péptido A y el Péptido B inhiben la secreción IFN γ en cultivos de linfocitos CD8* activados.

La **Figura 1** muestra el efecto del Péptido A (barras grises) y el Péptido B (barras blancas) en un ensayo basado en la secreción de Interferon gamma por los linfocitos CD8+ activados de ratón, cuando se añaden a cultivos en 2 concentraciones ascendentes de 0,001, 0,0025 y 0,005 ug/ml concomitantemente con anticuerpos CD3 y CD28 (a 0,01 ug/pocillo y 0,5 ug/ml, respectivamente) e incubados durante 48 horas. El efecto del Péptido A y del Péptido B se comparó con el del péptido N2 no relevante añadido a los cultivos en los mismos niveles de dosificación (barras negras). Los niveles de IFN γ en los sobrenadantes de los cultivos fueron determinados por un equipo estándar comercialmente disponible. Las concentraciones de péptido se indican en el eje x. Los niveles de interferon gamma se indican en el eje y.

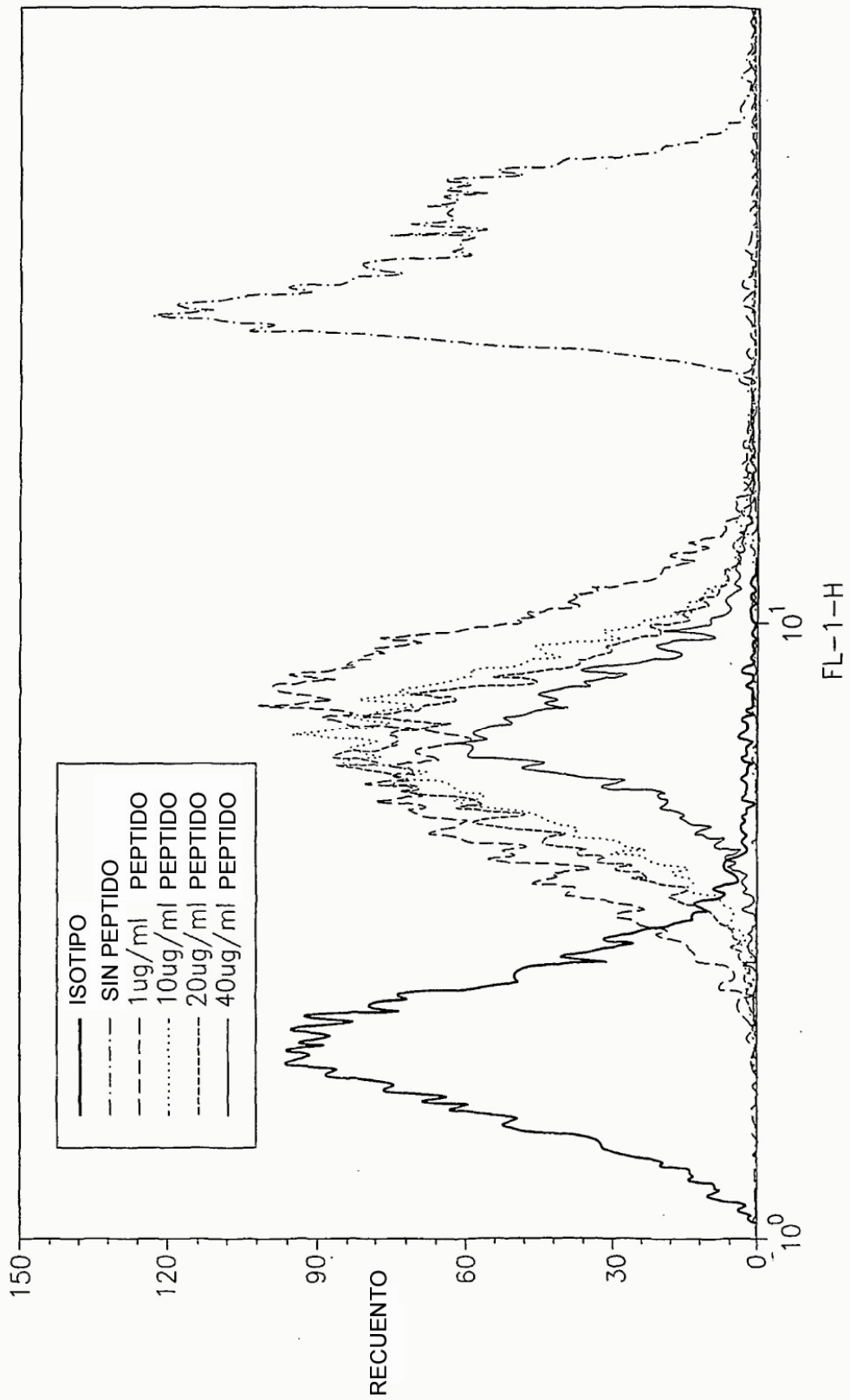


FIG. 2

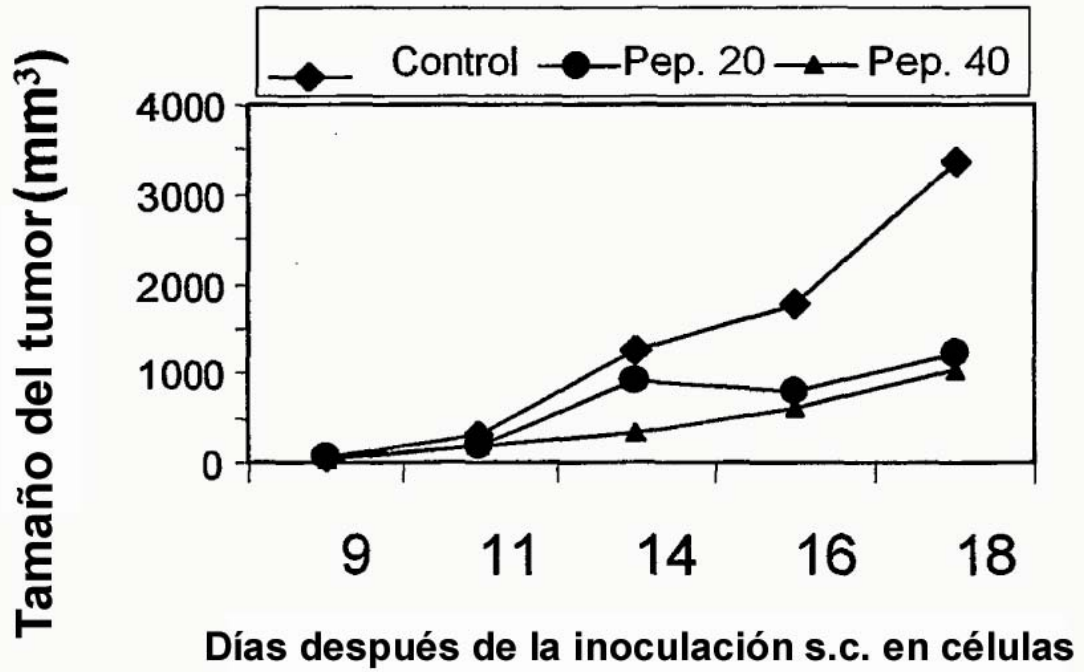


FIG. 3

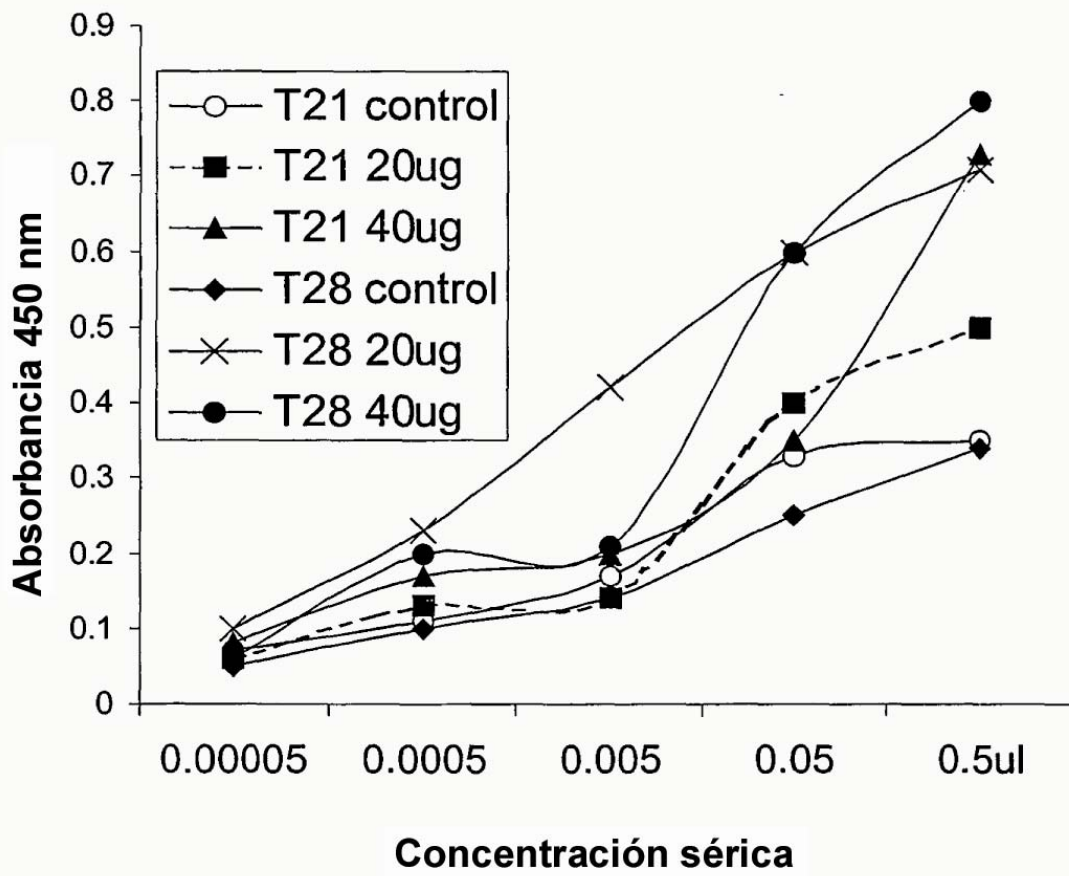


FIG. 4

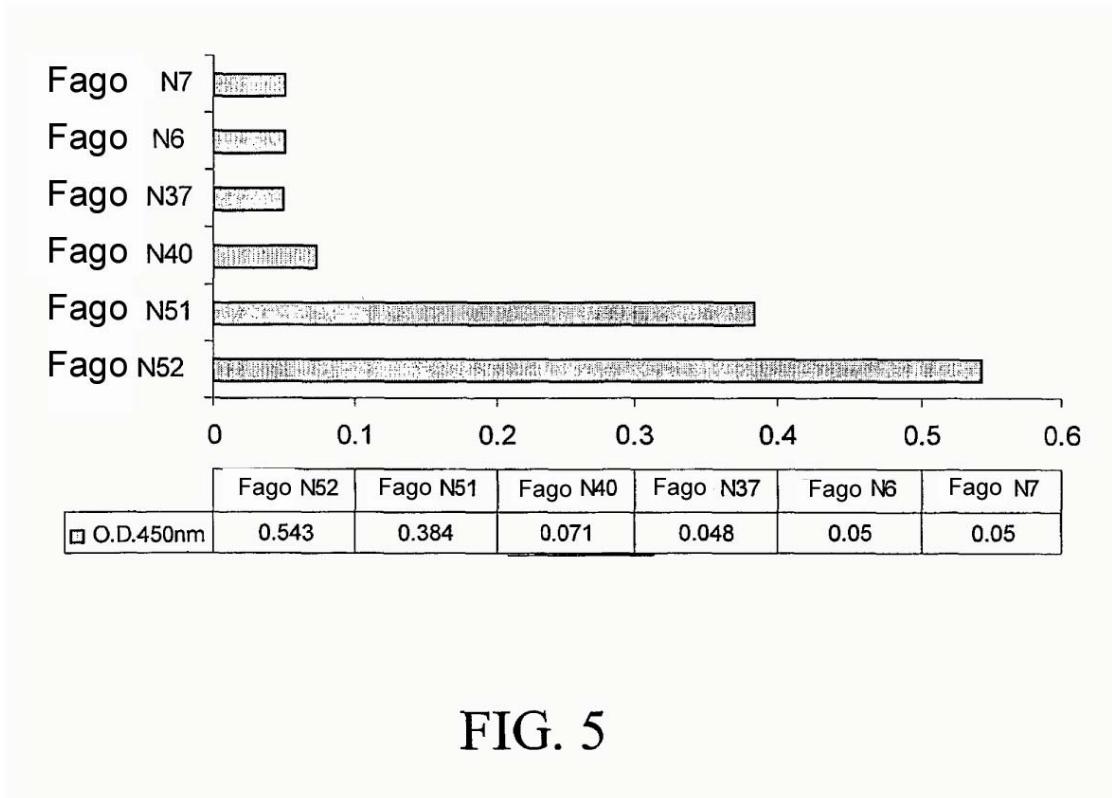
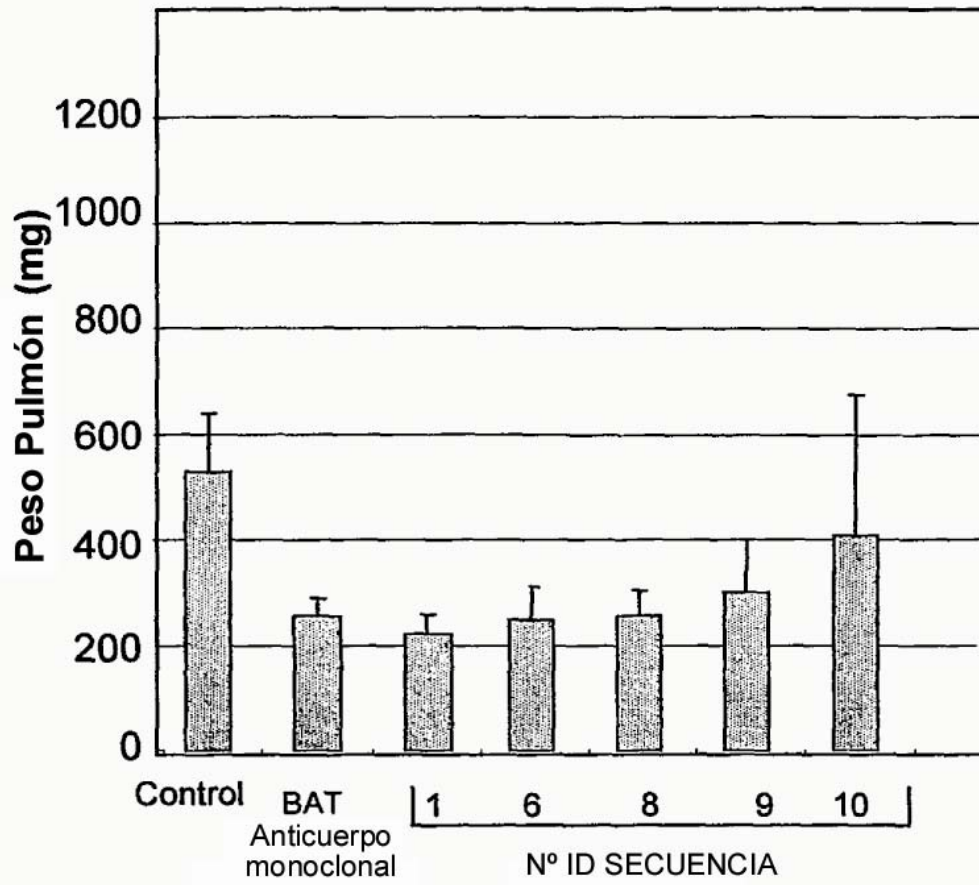


FIG. 5



Tratamiento

FIG. 6

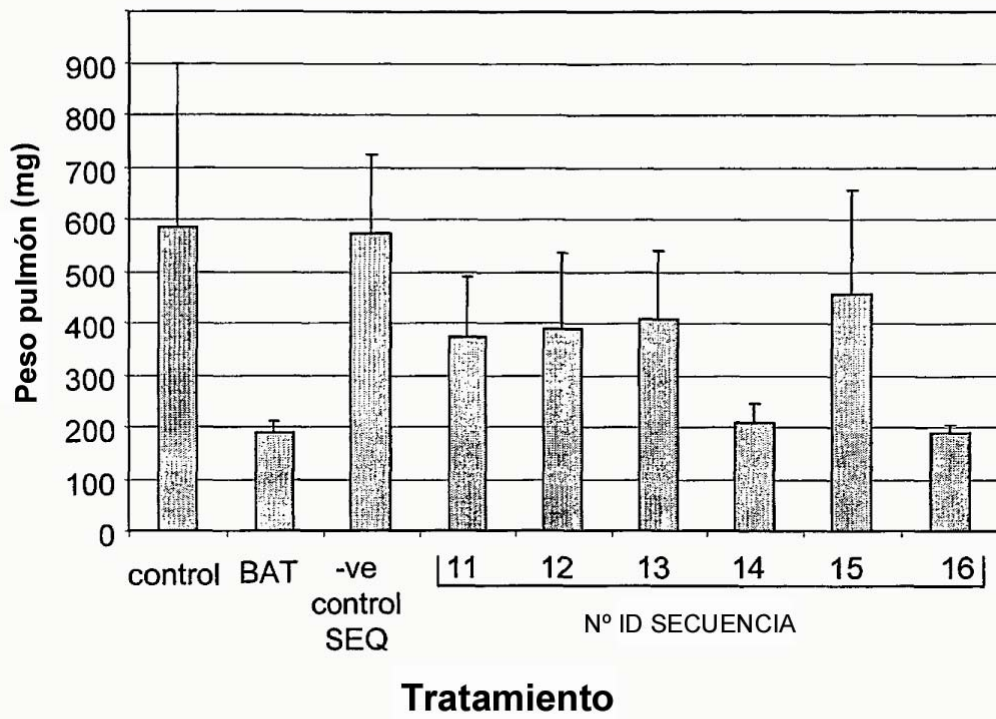


FIG. 7

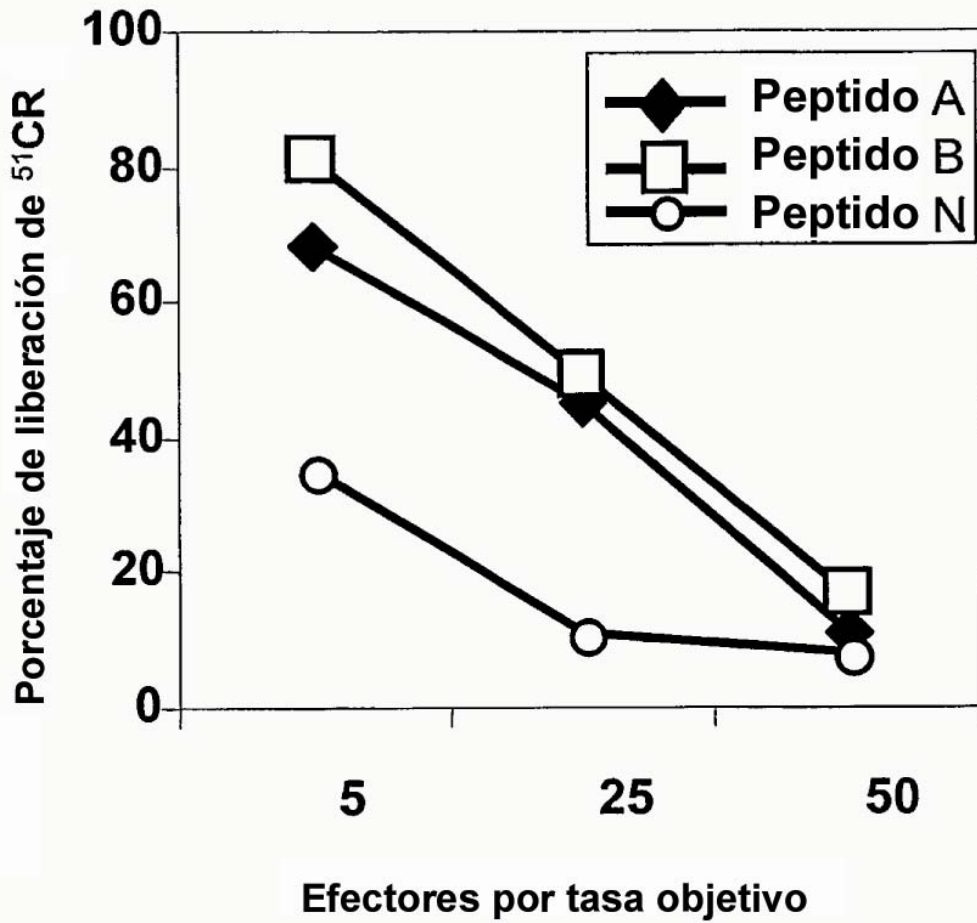


FIG. 8A

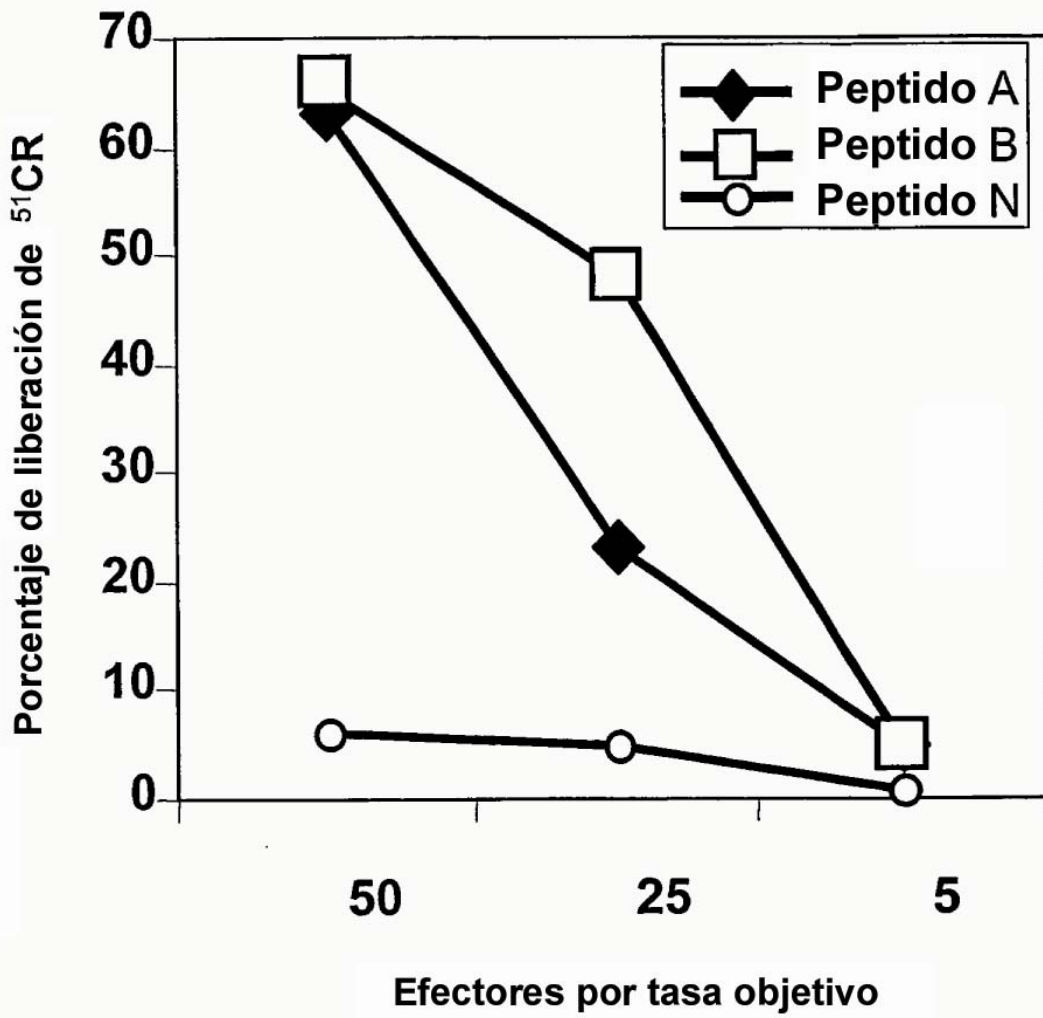


FIG. 8B

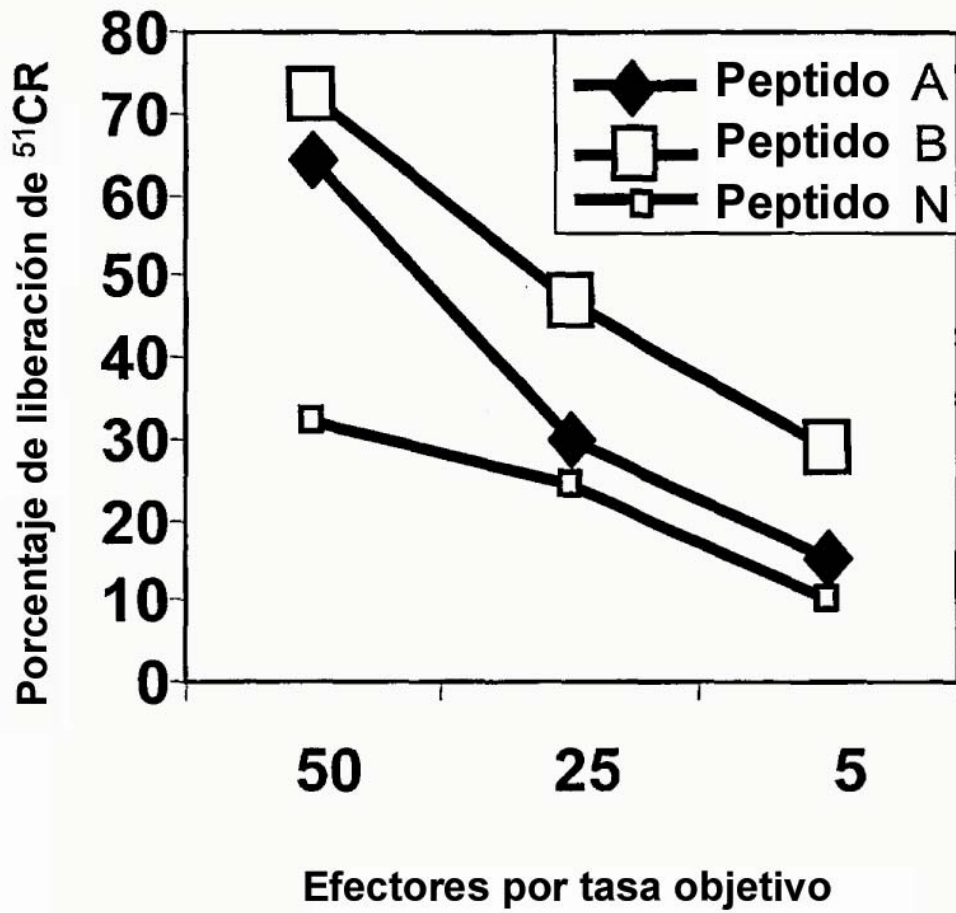


FIG. 8C

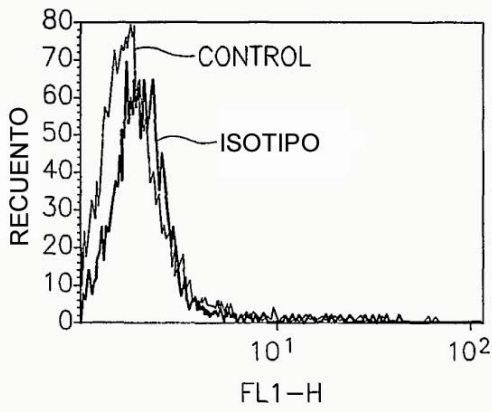


FIG. 9A

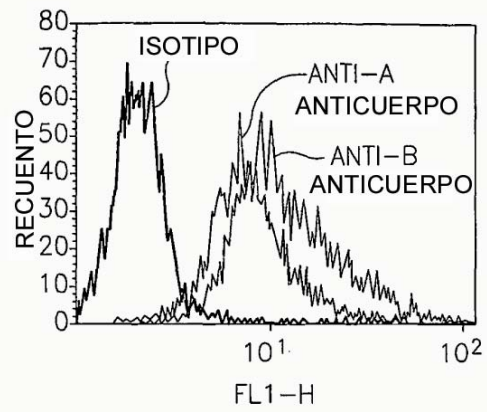


FIG. 9B

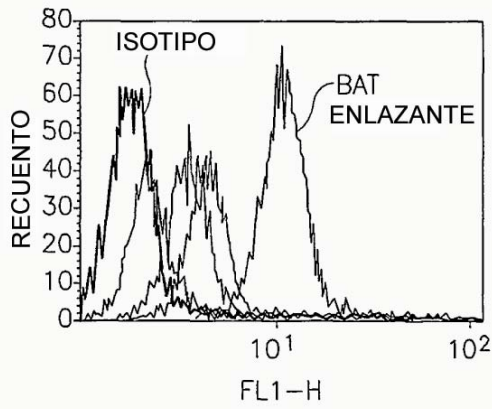


FIG. 9C

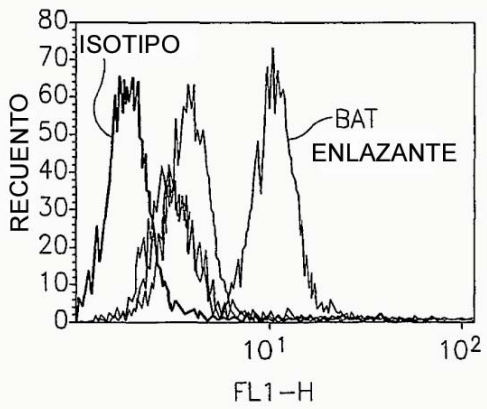


FIG. 9D

