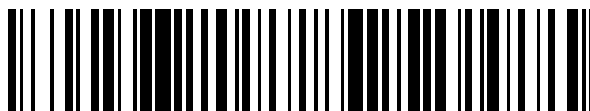


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 094**

51 Int. Cl.:

C07K 14/52 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2005** **E 05798542 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014** **EP 1809660**

54 Título: **Proteína específica del timo**

30 Prioridad:

25.10.2004 US 621086 P

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

14.10.2014

73 Titular/es:

IMMUNE SYSTEM KEY LTD. (100.0%)
ROZENBLAT 318/7 ST.
97460 JERUSALEM, IL

72 Inventor/es:

DEVARY, YORAM y
SANDLER, UZIEL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 507 094 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

Proteína específica del timo

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una nueva proteína específica del timo.

5 Técnica anterior

Las siguientes publicaciones anteriores se consideran relevantes para ilustrar la técnica anterior de la presente invención

- [1] Maurer, HR, Eckert, K, Stange, R: Einfluss der Therapie mit Thymoject auf die antitumorale Immunotoxizität der Leukozyten von Mamma-Tumorpacientinnen. Pers. Mitt. (1999).
- 10 [2] Mustacchi, G, Paves, L, Milani, S et al: High-dose folinic acid and fluouracil plus or minus thymostimulin for the treatment of metastatic colorectal cancer: results of a randomised multicentered trial. Anticancer Res. (1994) 14: 617-619.
- [3] Schulof, RS, Loyd, MJ, Cleary, PA, et al: A randomized trial to evaluate the immunorestorative properties of synthetic thymosin-alpha1 in patients with lung cancer. J Biol Resp Modif (1985) 4: 147-158.
- 15 [4] Azizi A, Brenner HJ, Shoham J: Postoperative adjuvante Behandlung von Patienten mit malignem Melanom durch den Thymusfaktor Thymostimulin. Arzneim-Forsch/Drg Res (1984) 34(II): 1043-1046.
- [5] Massimo F, Gobbi P, Moretti G, Avanzini P, Italian Lymphoma Study Group: Effects of Thymostimulin with combination Chemotherapy in patients with aggressive non-Hogkins lymphoma. Am J Clin Oncol (CCT) (1995) 18(1): 8-14.
- 20 [6] Peretti P, Tonelli F, Mazzei T, Ficari F, Italian study group on antimicrobial prophylaxis in abdominal surgery. J Chemotherapy (1993) 5(1): 37-42.
- [7] Gonelli S, Petrioli R, Cepollaro C, Palmieri R, Aquino A, Gennari C: Thymostimulin in association with chemotherapy in breast cancer patients with bone metastases. Clin Drug Invest (1995) 9(2): 79-87.
- 25 [8] Iaffaioli RV, Frasci G, Tortora G, Ciardiello F, Nuzzo F, Scala S, Pacelli R, Bianco AR: Effect of thymic extract Thymostimulin on the incidence of infections and myelotoxicity during adjuvant chemotherapy for breast cancer. Thymus (1988) 12: 69-75. Kluwer Academic Publishers.

Se hará referencia a estas publicaciones de la lista anterior en el siguiente texto, indicando su número entre corchetes.

Antecedentes de la invención

- 30 En la actualidad se han identificado muchos modificadores de la respuesta biológica (MRB). Los ejemplos incluyen interleucinas y citocinas. El timo también desempeña un papel importante en la inmunomodulación general. Se podría decir que el timo es el cerebro del sistema inmunológico. Se considera que el timo tiene una función clave en el desarrollo y función del sistema inmunológico y los mecanismos de defensa biológica contra el cáncer y células infectadas de forma crónica.
- 35 El tejido del timo es responsable de la transformación seleccionada de células precursoras en diferentes linfocitos T: es decir, linfocitos T colaboradores (CD4+), que ayudan a la diferenciación de otros linfocitos; células asesinas (células NK); células citotóxicas y linfocitos T supresores (citotóxicos) (CD8+) (1-3). Una vez liberados en la circulación sanguínea y los tejidos intestinal y periféricos, los linfocitos se caracterizan por tener antígenos bien definidos o marcadores de activación en su superficie. Sus actividades son extratímicas.
- 40 Existe una delicada interacción entre el timo y la médula ósea activa. Existe una correlación directa y positiva entre la hipofunción del timo y la disminución de la producción de factores estimulantes de colonias (CSF). Por tanto, en los casos en los que existe una producción insuficiente de CSF, la aplicación terapéutica de péptidos del timo puede ser útil.
- 45 La hepatitis B crónica (HBC), el VIH, la hepatitis C crónica (HCC) y el paludismo son enfermedades crónicas que en la actualidad sufren decenas de millones de personas sin ninguna cura. La rama celular de la inmunidad es responsable de la vigilancia contra estas infecciones crónicas por virus, hongos, levaduras y parásitos, así como contra neoplasias y los síntomas del envejecimiento. Los extractos de timo se han usado clínicamente de varias formas en algunas de estas afecciones. Se han usado por vía oral y como inyectables, solos o en combinación con otras sustancias terapéuticas. Los extractos de timo se han usado para tratar alergias graves y crónicas que afectan a las vías respiratorias y a la piel, así como en enfermedades infecciosas graves agudas y crónicas. Se ha demostrado que los extractos reducen las infecciones posquirúrgicas y disminuyen los daños de la quimioterapia y radiación y también se han usado como adyuvantes de la terapia principal para el tratamiento de neoplasias. Todas estas afecciones se han tratado con éxito con extractos de timo bovino.
- 50
- 55 En un estudio aleatorizado en pacientes con melanoma maligno, los péptidos del timo produjeron un incremento del periodo sin tumor, un tiempo de supervivencia mayor y una mayor calidad de vida (4). En otro estudio aleatorizado

en pacientes con linfoma no Hodgkin de grado intermedio y alto se trató a los pacientes con péptidos del timo además de con la quimioterapia convencional. Los pacientes tratados toleraron los péptidos del timo bastante bien y tuvieron una tasa de respuesta completa significativamente mayor que los pacientes que no recibieron péptidos del timo (5). En un estudio aleatorizado adicional en pacientes sometidos a cirugía colorrectal se mostró que en los

5 pacientes que habían recibido péptidos del timo además de cefotetán, la tasa de abscesos abdominales y las infecciones de las vías respiratorias altas disminuyeron significativamente (6). Un estudio aleatorizado realizado en mujeres con cáncer de mama avanzado documentó que las mujeres que habían recibido péptidos del timo además de su régimen quimioterapéutico toleraron la quimioterapia significativamente mejor y presentaban una tasa reducida de infecciones secundarias (7,8).

10 En línea con los hallazgos anteriores, parece que los péptidos del timo se pueden usar para potenciar la función de la médula ósea y proteger al paciente frente a la mielosupresión que produce la quimioterapia convencional; para soportar la recuperación de la médula ósea tras radioterapia y quimioterapia; para prevenir las infecciones secundarias debido a la inmunosupresión causada por la quimioterapia convencional y las intervenciones quirúrgicas; para aumentar la tasa de respuesta completa y parcial a las terapias anticancerosas y para mejorar la

15 función linfocitaria y los mecanismos de defensa biológica.

El sistema inmunológico está compuesto por muchas células diferentes, incluidos linfocitos T, linfocitos B, células NK etc. El origen de estas diferentes células varía. Los linfocitos T prematuros se originan en la médula ósea y después pasan al timo. En el timo se producen diferentes procesos que conducen a la producción de linfocitos T maduros y a la secreción de varios péptidos que controlan la respuesta inmunitaria. Los linfocitos T se pueden dividir en varios

20 subgrupos, por ejemplo linfocitos T colaboradores, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T de memoria y células reguladoras T. Cada subpoblación tiene su propia función durante la respuesta inmunitaria. Estos subgrupos se caracterizan por los diferentes antígenos presentados en sus membranas. Por ejemplo, los linfocitos T colaboradores presentan el antígeno CD4 en su membrana, mientras que los linfocitos T citotóxicos presentan el antígeno CD8 en su membrana.

25 Los linfocitos T CD4+ desempeñan un papel regulador y se cree que están relacionados con la autotolerancia periférica. Inicialmente se sugirió la existencia de los linfocitos T derivados del timo mediante el inicio de enfermedades autoinmunitarias en ratones tras timectomía al 3^{er} día de vida. Se encontró que estos trastornos se debían a la pérdida de linfocitos T CD4+ periféricos que expresan de forma constitutiva IL-2R alfa (CD25), que aparece más tarde en la periferia tras el nacimiento. Las células CD4+CD25+ generadas fisiológicamente inhiben

30 una amplia gama de trastornos autoinmunitarios e inflamatorios, por ejemplo colitis.

A pesar de numerosos estudios, el mecanismo por el cual los linfocitos T CD4+CD25+ ejercen su función reguladora no está claro. En algunos estudios se ha demostrado que la regulación *in vivo* depende de la producción de citocinas supresoras, tales como IL-10 y TGF- β y moléculas de la superficie celular, tales como CTLA-4. En estudios *in vivo* se ha demostrado que el efecto supresor no está mediado por citocinas sino por contacto celular.

35 Se ha indicado que los linfocitos T CD8+ son esenciales *in vivo* para prevenir la encefalomielitis autoinmunitaria experimental y para participar en la tolerancia oral. Los linfocitos T CD8+CD28- reguladores se pueden generar y expandir *in vitro* mediante múltiples rondas de estimulaciones por CPA alogénicas, pero no se sabe si esta población existe *in vivo*. En un nuevo estudio se reveló una nueva población reguladora de linfocitos CD8+ que también expresan de forma constitutiva CD25 y que poseen características similares a las de las células CD4+CD25+.

40 Estas células producían IL-10, Foxp3 y CTLA-4 e inhiben la respuesta de los linfocitos T CD25 a la estimulación anti-CD3 a través de contactos celulares con una eficiencia similar a la de CD4+CD25+.

Se cree que estas 2 subpoblaciones de células CD4+CD25+ y CD8+CD25+, participan en la regulación de la respuesta inmunitaria.

Sumario de la invención

45 Es un objeto de la invención proporcionar una proteína específica de tejido del timo humano.

Usando PCR se realizó la detección selectiva de bibliotecas de ADNc humano de una mujer de 20 años de edad de 16 tejidos diferentes y se identificó un ADNc único para el timo humano. El péptido codificado por el ADNc se ha denominado T101. Los bancos EST de seres humanos, ratón y rata se sometieron a detección selectiva y no se halló similitud alguna del ADNc de T101 con ningún gen conocido. Se obtuvieron resultados similares con bancos de

50 proteínas y de ADN genómico total. El ADNc y la correspondiente secuencia de aminoácidos son secuencias nuevas no descritas anteriormente.

El péptido codificado por el ADNc tiene una longitud de 84 aminoácidos e incluye un péptido señal de 33 aminoácidos en su extremo N (véase la Fig. 1). A continuación se proporcionan la secuencia de ADNc (SEC ID N° 1) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 2) de T101:

atgatggcactcagaagccaggggtcatgttaccaccaga
 gctgcccacaactggctttcctcaccctaagtgccttggc
 agcagtgtctttttcagctctgcatctctggttagtgagg
 gagccagtccagagctctggaacaaaggacatgagatcca
 aatccgattccaagcgagtgagtgacaagcagctaatttc
 caaagctgtgtggtggacattttttcttccttcaaccctc
 tgggagagaaaaatga SEC ID N° 1)

MMALRSQGLMLPQSCPQLAFLTLSALAAVSFSALHLWLSG

EPVQSSGTKDMRSKSDSKRVSDKQLISKAVVWTFFLPSTL

WERK (SEC ID N° 2)

En el presente documento se describe una molécula de ácido nucleico de SEC ID N° 1 y un péptido de SEC ID N° 2. Un polipéptido de SEC ID N° 2 se denominará en el presente documento el “*péptido T101 completo*”.

- 5 El péptido T101 completo también incluye una secuencia señal de 33 aminoácidos. Por tanto, la invención también proporciona un péptido que comprende la secuencia del péptido T101 completo sin dicho péptido señal, que consiste en la secuencia siguiente (SEC ID N° 4):

LHLWLSGEPVQSSGTKDMRSKSDSKRVSDKQLISKAVVWT

FFLPSTLWERK (SEC ID N° 4)

- 10 El péptido T101 que está desprovisto de la secuencia señal (SEC ID N° 4) se denominará en el presente documento el “*péptido T101*”.

En el presente documento también se describe una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el péptido T101. Esto incluye la secuencia siguiente (SEC ID N° 3):

catctctggttagtgaggagccagtccagagctctggaacaaag
 gacatgagatccaaatccgattccaagcgagtgagtgacaagcag
 ctaattttccaaagctgtgtggtggacattttttcttccttcaacc
 ctctgggagagaaaaatga (SEC ID N°3)

- 15 En el presente documento también se describen moléculas de ácido nucleico modificadas de SEC ID N° 1 o SEC ID N° 3 y péptidos modificados de SEC ID N° 2 o SEC ID N° 4, en los que uno o más nucleótidos, o restos de aminoácidos, respectivamente, se añaden, delecionan o sustituyen sin que ello afecte significativamente a las características biológicas de la molécula modificada en comparación con la molécula sin modificar.

- 20 El término “*péptido*” se usa en el presente documento para indicar un péptido, polipéptido o proteína. El péptido se puede obtener sintéticamente, mediante procedimientos de ingeniería genética, expresión en una célula huésped o mediante cualquier otro medio adecuado.

- La expresión “*características biológicas*”, con respecto a una molécula peptídica, hace referencia a la capacidad del péptido para ejercer al menos uno de los efectos *in vitro* or *in vivo* que puede ejercer el péptido T101 completo o el péptido T101, incluyendo, entre otros, las actividades biológicas indicadas más adelante en los Ejemplos. La expresión “*características biológicas*”, con respecto a una molécula de ácido nucleico, hace referencia a la propiedad de codificar un péptido que tienen características biológicas similares a las del péptido T101 completo o el péptido T101, incluyendo, en particular: (i) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia diferente a la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 3, pero debido a la redundancia del código genético, codifica el péptido T101 completo o el péptido T101, respectivamente; y (ii) una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ácido nucleico con una secuencia diferente a la del péptido T01 completo o el péptido T01 pero que tiene características biológicas similares a las del péptido T01 completo o el péptido T01, respectivamente.

La expresión “*sin que ello afecte significativamente a las características biológicas de la molécula modificada en comparación con la molécula sin modificar*” significa que la molécula modificada conserva una actividad biológica

cuantitativamente similar a la de la molécula sin modificar. Con respecto a un péptido modificado, esto significa que conserva una o más de las características biológicas de un péptido de SEC ID N° 2 o SEC ID N° 4, incluidas, entre otras, sus utilidades diagnósticas y terapéuticas, como se especifica más adelante, así como sus actividades *in vitro* y *in vivo* indicadas en los Ejemplos más adelante. Con el fin de determinar si un péptido conserva una actividad biológica cuantitativamente similar a la de la molécula sin modificar, se pueden llevar a cabo uno o más ensayos, tales como, por ejemplo, un experimento *in vitro*, *in vivo* o clínico en el que se compara un péptido modificado con el correspondiente sin modificar (específicamente el del péptido T101 completo o el péptido T101) que se analiza en paralelo; o un experimento en el que se analiza el péptido modificado para comprobar si tiene un efecto biológico similar al del péptido sin modificar según lo conocido por experimentos realizados por separado. Dicho experimento se puede llevar a cabo, por ejemplo, del modo descrito en los Ejemplos más adelante. Con respecto a una molécula de ácido nucleico modificado, la expresión "*sin que ello afecte significativamente a las características biológicas de la molécula modificada en comparación con la molécula sin modificar*" indica la propiedad de codificar un péptido modificado de cualquiera de las características anteriores,

Un péptido modificado puede ser un péptido que incluye una secuencia contigua de al menos 8, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o al menos 45 restos de aminoácidos que tiene un grado de identidad a una secuencia correspondiente de al menos 8, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o al menos 45 restos de aminoácidos incluidos en el péptido T101, siendo el grado de identidad de al menos 70%, preferentemente de al menos 80%, más preferentemente de al menos 90% y, en particular, de al menos 95%.

En el presente documento también se describe un péptido que comprende una secuencia contigua parcial del péptido T101 completo, incluidos al menos 8 restos de aminoácidos, secuencia contigua que está incluida como secuencia contigua en dicho péptido T101 completo. Dicho péptido se denominará en el presente documento "*péptido T101 parcial*". En una realización, la invención proporciona un péptido T101 parcial que comprende una secuencia contigua de 13 residuos de aminoácidos a partir del extremo N del péptido T101 (número de aminoácidos de 39 a 51) del siguiente modo:

WTFFLPSTLWERK (SEC ID N° 5).

En el presente documento también se describe una proteína o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos del péptido T101 completo, el péptido T101, un péptido modificado o un péptido T101 parcial (dicha proteína o polipéptido se denominará en el presente documento "*proteína que comprende T101*"). La proteína que comprende T101 puede ser, por ejemplo, una proteína de fusión que comprende el péptido T101 completo, el péptido T101, un péptido modificado o un péptido T101 parcial; puede ser un conjugado de una proteína u otro péptido o polipéptido con el péptido T101 completo, el péptido T101, el péptido modificado o el péptido T101 parcial; etc.

En el presente documento se describe adicionalmente un oligonucleótido de al menos 24 nucleótidos, es decir: (i) un oligonucleótido que codifica una secuencia contigua parcial del péptido T101, incluidos al menos 8 restos de aminoácidos, que puede incluir una secuencia de ácido nucleico de 24 contiguos incluidos en la SEC ID N° 1; (ii) una secuencia nucleotídica que puede hibridar con una secuencia nucleotídica de SEC ID N° 1 en condiciones de hibridación rigurosas; (iii) un oligonucleótido que tiene una secuencia de al menos 24 nucleótidos contiguos con un grado de identidad con una secuencia contigua correspondiente de nucleótidos incluidos en la SEC ID N° 1 de al menos 70%, preferentemente al menos 80%, más preferentemente al menos 90% y particularmente al menos 95%.

En el presente documento se describe una molécula de ácido nucleico, por ejemplo un vector de transferencia o un vector de expresión, que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente.

Se proporcionan péptidos T101 parciales adicionales del siguiente modo:

SGEPVQSSGTKDMRSKSDSKRVS (SEC ID N° 6)

DKQLISKAVWWTFFLPSTLWERK (SEC ID N° 7)

PSTLWERK (SEC ID N° 8)

AVWWTFFLPSTLW (SEC ID N° 9)

KREWLTSPLFFTWWVA (SEC ID N° 10)

WTFFL (SEC ID N° 11)

La SEC ID N° 6 consiste en los aminoácidos 6 a 28 del péptido T101; la SEC ID N° 7 consiste en los aminoácidos 29 a 51 del péptido T101; la SEC ID N° 8 consiste en los aminoácidos 44 a 51 del péptido T101; la SEC ID N° 9 consiste en los aminoácidos 36 a 48 del péptido T101; la SEC ID N° 10 consiste en los aminoácidos 36 a 51 del péptido T101 en orden inverso; la SEC ID N° 11 consiste en los aminoácidos 39 a 43 del péptido T101.

Los péptidos modificados se pueden derivar de cualquiera de los péptidos definidos anteriormente, en los que uno o más aminoácidos se han sustituido por otros aminoácidos mediante sustitución conservadora. Como se usa en el presente documento, "*sustitución conservadora*" hace referencia a la sustitución de un aminoácido de una clase por un aminoácido de la misma clase, en la que una clase viene definida por las propiedades fisicoquímicas comunes de la cadena lateral de aminoácidos y altas frecuencias de sustitución en las proteínas homólogas de origen natural. Se han clasificado seis clases generales de cadenas laterales de aminoácidos e incluyen: Clase I (Cys); Clase II (Ser,

Thr, Pro, Ala, Gly); Clase III (Asn, Asp, Gln, Glu); Clase IV (His, Arg, Lys); Clase V (Ile, Leu, Val, Met); y Clase VI (Phe, Tyr, Trp). Por ejemplo, la sustitución de una Asp por otro residuo de la clase III, tal como Asn, Gln, or Glu, es una sustitución conservadora.

- 5 El número máximo de sustituciones no deberá superar el número de aminoácidos que deja al menos un 70%, deseablemente al menos un 80%, preferentemente al menos un 90%, lo más preferentemente al menos un 95% de los aminoácidos en la secuencia sin sustituir. Las sustituciones que incluyen hasta 3, a veces hasta 6 restos de aminoácidos sustituidos por otros, son sustituciones conservadoras.

Uno o más aminoácidos se pueden sustituir por D-aminoácidos, preferentemente los correspondientes D-aminoácidos.

- 10 También se describen en el presente documento las secuencias del orden inverso de las secuencias anteriores.

Los péptidos T101 completos de la SEC ID N° 2 o, preferentemente, los péptidos T101 de la SEC ID N° 4 o las secuencias parciales de T101 de los mismos se pueden modificar mediante una o más sustituciones conservadoras.

La subsecuencia de 24 aminoácidos de SEC ID N° 4 (aminoácidos 24 a 47):

SKRVSDKQLISKAVWWTFFLPSTL (SEC ID N° 12),

- 15 corresponde estrechamente a las secuencias siguientes de otras especies de mamífero:

Perro: **SKQVSDKQLISKAVQRIFFFLQPS** (SEC ID N° 13); y

Rata: **SKFMSDKQLISKAVQRIFFLSSTL** (SEC ID N° 14).

Cuando se comparan las SEQ ID N°: 12 a 14, aparece la siguiente secuencia consenso para las tres especies (mostrada en letras mayúsculas):

- 20 **SKrvSDKQLISKAVwwtFFLpSTL** (SEC ID N° 12)

SKqvSDKQLISKAVQRIFFFlqps (SEC ID N° 13)

SKfmSDKQLISKAVQRIFFLsSTL (SEC ID N° 14)

Un péptido que comprende dicha secuencia consenso (que en el presente documento se denominará el "péptido consenso") tiene una de las fórmulas siguientes:

- 25 **SKx₁x₂SDKQLISKAVx₃x₄x₅FFLx₆STL** (SEC ID N° 15);

SKx₁x₂SDKQLISKAVx₃x₄x₅FFLx₆ (SEC ID N° 16);

SKx₁x₂SDKQLISKAVQRIFF (SEC ID N° 17); o

SKx₁x₂SDKQLISKAVQRIFFLx₆STL (SEC ID N° 18);

en las que:

- 30 x₁ representa R, Q o F o, como alternativa, como resultado de la sustitución conservadora H, K, N, D, E, Y o W;
 x₂ representa V o M, o, como alternativa, como resultado de la sustitución conservadora I o L;
 X₃ representa W o Q, o, como alternativa, como resultado de la sustitución conservadora F, Y, N, D o E;
 X₄ representa W o R, o, como alternativa, como resultado de la sustitución conservadora F, Y, H o K;
 x₅ representa T o I, o, como alternativa, como resultado de la sustitución conservadora, S, P, A, G, L, V o M; y
 35 x₆ representa P, L o S, o, como alternativa, como resultado de la sustitución conservadora, T, A, G, I, V o M.

T101 es soluble en una solución acuosa. Este factor y las características biológicas que se describirán más adelante, su especificidad de tejido y las características físicas de una hormona peptídica, hacen del péptido T101, el péptido T101 completo, el péptido T101 parcial o cualquier péptido modificado de los mismos útiles como agentes terapéuticos para inducir la respuesta inmunitaria celular y para otras varias afecciones clínicas, tales como infección por VIH, hepatitis B, hepatitis C, cáncer y paludismo.

- 40 Como también se mostrará más adelante en los Ejemplos, se ha hallado que el péptido T101 y varios péptidos modificados derivados del mismo son capaces de modular el sistema inmunológico. Esta modulación se expresa mediante la activación del sistema inmunológico (como se muestra mediante, por ejemplo, un incremento de la proliferación de linfocitos de sangre periférica (PBL), así como mediante la supresión del sistema inmunológico (como se muestra, por ejemplo, por un incremento en la producción de IL-10 y disminución de los PBL). Por tanto, T101 tiene actividad de inmunoactivación y actividad de inmunosupresión. Sin desear quedar ligado a teoría alguna y, de este modo, limitar el alcance de la invención, los tipos de efectos de T101 1 sobre el sistema inmunológico pueden depender de la concentración.

- 50 En el presente documento también se describen composiciones farmacéuticas que usan el péptido T101, el péptido T101 completo, el péptido T101 parcial, el péptido modificado o la proteína que comprende T10 o cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente. Las posibles aplicaciones diagnósticas y terapéuticas del péptido T101 incluyen las siguientes:

1. T101 puede servir como herramienta diagnóstica de falta de inmunocompetencia tras la inyección subdérmica de toxinas de diferentes organismos.
2. El análisis de los niveles T101 en sangre puede servir como indicador de la función alta o baja del timo y puede servir como indicador de la actividad del sistema inmunológico.
3. Los niveles de T101 pueden servir como indicador de enfermedades autoinmunitarias.
4. T101 puede servir como estimulador del sistema inmunológico. Por ejemplo, T101 se puede usar para tratar una falta de inmunocompetencia frente a bacterias, parásitos y toxinas virales.
5. T101 pueden usarse como herramienta terapéutica para disminuir la recurrencia de las infecciones. Por ejemplo, en las vías respiratorias, T101 debería disminuir la recurrencia de las infecciones.
6. T101 puede usarse como herramienta terapéutica para disminuir las respuestas alérgicas e inflamatorias. Por ejemplo, T101 puede usarse para disminuir la aparición de asma o síntomas del mismo.
7. T101 puede usarse para tratar enfermedades virales tales como tuberculosis, herpes, hepatitis B aguda y crónica, hepatitis C aguda y crónica, hepatitis colestática crónica, cirrosis, estomatitis.
8. T101 puede usarse como herramienta terapéutica para tratar enfermedades de inmunodeficiencia tales como SIDA e inmunodeficiencia combinada.
9. T101 puede usarse como herramienta terapéutica para tratar enfermedades de la piel tales como eccema atópico y psoriasis.
10. T101 puede usarse para tratar otras diversas enfermedades. Por ejemplo, T101 puede servir como supresor del sistema inmunológico para tratar enfermedades autoinmunitarias tales como EII, miastenia gravis, esclerosis múltiple, diabetes de tipo I, artritis reumatoide, lupus eritematoso, anemia hemolítica autoinmunitaria crónica, colitis y enfermedad de Crohn, etc.
11. T101 puede servir como estimulante del sistema inmunológico para tratar enfermedades cancerosas tales como cáncer de pulmón, carcinoma de la laringe, carcinoma de cabeza y cuello, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama, cáncer hepatocelular, melanoma.
12. T101 puede usarse para disminuir la aparición de infecciones tras cirugía e implantes. T101 puede usarse después de los trasplantes con el fin de inhibir el rechazo de injertos.
13. T101 puede reforzar la respuesta inmunitaria de personas mayores o más jóvenes o personas con sistemas inmunológicos inmunocomprometidos.
14. T101 puede usarse para tratar infecciones de la piel después de quemaduras.
15. T101 puede usarse como herramienta terapéutica para tratar la infertilidad masculina.
16. T101 puede mejorar la actividad cardíaca.
17. T101 puede usarse en un procedimiento para identificar células del timo. T101 puede también servir como marcador del timo y su condición metabólica. Por ejemplo, T101 puede usarse en ensayos de ELISA o en otros ensayos para medir la condición metabólica del timo.
18. T101 puede servir como herramienta para desarrollar un pigmento fluorescente para subpoblaciones específicas de glóbulos blancos con el fin de separar diferentes subpoblaciones de glóbulos blancos de tejidos diferentes.
19. T101 puede servir como estimulante o inhibidor general de diferentes reacciones inmunitarias y también puede afectar directa o indirectamente a otros órganos como el corazón y los pulmones, etc.
20. T101 puede modular las funciones neurológicas tales como la memoria, la regeneración del sistema neural, el alivio del dolor y neuropatologías tales como enfermedad de Parkinson y de Alzheimer.
21. T101 puede servir como sonda para identificar células específicas del sistema inmunológico y usarlas para terapia celular.

Para las aplicaciones diagnósticas y terapéuticas anteriores, también se pueden usar el péptido T101 completo, un péptido T101 parcial o una proteína que comprende T101 o un péptido modificado del mismo.

Breve descripción de las figuras

Con el fin de entender la invención y de conocer como se puede poner en práctica, se describirán los resultados de los experimentos de acuerdo con la invención y con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La **Fig. 1** muestra la secuencia completa del ADNc de T101 y el péptido T101 completo codificado. El péptido T101 "completo" consiste en un péptido señal (indicado por las letras normales) y el péptido T101 (indicado por las letras en negrita). El ADNc que codifica el péptido señal se indica de un modo similar:

La **Fig. 2** es una fotografía de un gel de PCR que muestra el péptido T101. El gel contiene 12 columnas y se realizó con dos matrices de muestras: una matriz comienza en la parte superior del gel y la otra matriz comienza en el medio del gel (indicado por las líneas en ambos lados del gel).

La **Fig. 3** es un gráfico que muestra la incorporación de BrdU en PBL humanos incubados con el péptido T101 en comparación con el control. El eje Y muestra la densidad óptica a 450 nm, una DO más alta significa una incorporación de BrdU mayor.

La **Fig. 4** es un gráfico que muestra la incorporación de BrdU en timocitos Balb/c incubados con el péptido T101 en comparación con el control. El eje Y muestra la densidad óptica a 450 nm, una DO más alta significa una incorporación de BrdU mayor.

La **Fig. 5** es una micrografía de fluorescencia de linfocitos tras la incubación con el péptido T101 botilado.

La **Fig. 6** es un gráfico de barras que muestra los resultados de un experimento que implica marcaje mediante bT101 y/o CD25 de esplenocitos de ratón a través del antígeno CD25. El eje Y muestra el % de células

marcadas.

La **Fig. 7** es un gráfico de barras que muestra el recuento celular por microlitro de diferentes poblaciones de glóbulos blancos humanos, monocitos (MONO), linfocitos (linf) y población de glóbulos blancos enteros (WBC), tras la incubación de las células en solución salina que contiene el péptido T101 (T101) o solución salina sola (salina). El número de monocitos se dividió por 1.000 con el fin de incluir todos los resultados en un gráfico.

La **Fig. 8** es un gráfico de barras que muestra el recuento celular por microlitro de glóbulos rojos humanos tras la incubación de las células en solución salina que contiene el péptido T101 (T101) o solución salina sola (salina).

La **Fig. 9** es un gráfico de barras que ilustra el recuento celular de diferentes poblaciones de células sanguíneas Balb/C: monocitos (Mono), linfocitos (linf), neutrófilos (neut), glóbulos rojos (RBC) y glóbulos blancos enteros (WBC) tras el tratamiento de los animales con el péptido T101 o con solución salina (control).

La **Fig. 10** es un gráfico de barras que muestra el recuento celular de células CD4 y CD8 en linfocitos de bazo de Balb/C tras la inyección en los animales de solución salina que contiene T101 o solución salina sola. El eje Y muestra el % de WBC.

La **Fig. 11** es un gráfico de barras que muestra los niveles de IL-10 en ratones en los que se ha inyectado T101 en solución salina en comparación con el control de inyecciones de solución salina en días alternos. Un grupo experimental recibió inyección del péptido T101 una vez en días alternos (Ens nº 1), un segundo grupo una vez al día (Ens nº 2) y un tercer grupo dos veces al día (Ens nº 3).

La **Fig. 12** es un gráfico de barras que muestra el aumento en veces del tamaño del tumor en ratones Balb/C en los que se ha inducido carcinoma de mama y tratados con solución salina con el péptido T101 o con solución salina sola.

La **Fig. 13** es un gráfico que muestra la tasa de crecimiento (en %) del tumor al que se hace referencia en la Fig. 12.

La **Fig. 14** es un gráfico de barras que muestra la longitud del colon de ratones que han recibido DSS a través del agua de bebida y que fueron tratados después. Se analizaron cuatro grupos de animales: un grupo no recibió DSS ni tratamiento (control); un segundo grupo recibió DSS en el agua de bebida y fue tratado con inyección de solución salina (DSS); los dos grupos restantes recibieron DSS en el agua de bebida y fueron tratados con inyecciones de solución salina que contenían 52 y 13 microgramos/ml (DSS + BTL1 y DSS + BTL2, respectivamente).

La **Fig. 15** es un gráfico de barras que muestra el peso corporal de los ratones de la Fig. 14 que recibieron DSS al final del experimento (fin) frente al peso al comienzo (comienzo).

Ejemplos

Ejemplo 1

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del péptido T101 completo se muestran en la Fig. 1. La secuencia de aminoácidos se sometió a análisis mediante la herramienta de predicción del péptido señal Phobius (disponible en www.phobius.cgb.ki.se) para la predicción de la topología transmembrana y la secuencia del péptido señal.

Phobius predijo que la secuencia de 33 aminoácidos en el extremo C del péptido T101 completo era un dominio del péptido señal transmembranal hidrófobo. El péptido señal se indica en la Fig. 1 en letras normales.

Asimismo, usando herramientas de bioinformática convencionales, se descubrió que una subsecuencia de 24 aminoácidos de SEC ID Nº 4,

SKRVSDKQLISKAVWWTFFLPSTL (SEC ID Nº 12),

corresponde estrechamente a las secuencias siguientes de otras especies de mamífero:

Perro: **SKQVSDKQLISKAVQRIFFFLQPS** (SEC ID Nº 13); y

Rata: **SKFMSDKQLISKAVQRIFFLSSTL** (SEC ID Nº 14).

Cuando se comparan las SEQ ID Nº: 12 a 14, emergen las siguientes restos de aminoácidos consenso (los aminoácidos consenso se muestran en mayúsculas).

SKrvSDKQLISKAVwwtFFLPSTL (SEC ID Nº 12)

SKqvSDKQLISKAVQRIFfflqps (SEC ID Nº 13)

SKfmSDKQLISKAVQRIFflsSTL (SEC ID Nº 14)

Ejemplo 2

Las bibliotecas de ADNc de 16 tejidos diferentes se usaron para la detección selectiva de T101. Las bibliotecas, adquiridas de Clontech incluían leucocitos, testículos, colon, próstata, intestino delgado, timo, ovarios, bazo, hígado, riñón, cerebro, pulmón, páncreas, huesos, placenta, corazón.

Se realizó la detección selectiva de las bibliotecas de ADNc mediante PCR usando oligos específicos de T101. Las secuencias de los oligos se dedujeron de la secuencia de T101.

En el experimento de PCR se usaron 3 microlitros de cada una de las bibliotecas de ADNc, 5 microlitros de los oligos específicos (total), 20 microlitros de la polimerasa Readymix Taq y 17 microlitros de ADI.

Se usó el siguiente procedimiento de PCR:

- 5 - 1 min a 95 °C
- 30 ciclos de
 - 1 min a 95 °C;
 - 1 min a 52 °C;
 - 1 min a 72 °C;
- Después de finalizar los ciclos, las muestras se mantuvieron a 72 °C durante 10 minutos.

10 Las secuencias de los oligos que se usaron fueron;

- (i) OLIGO nº 5- el marcador es: H10(180)E1P
5'-**atggcactcagaagccaggg**-3' (SEQ. ID. NO: 19)
- (ii) OLIGO nº 6- el marcador es: H10(180)E1C
5'-**cactcgcttggatcggtt**-3' (SEC ID N° 20)

15 Los resultados de la PCR se muestran en la Fig. 2. El gel de agarosa mostrado en la Fig. 2 contiene 12 columnas y se realizó con dos matrices de muestras. La primera matriz comienza en la parte superior del gel y la segunda matriz comienza en el medio del gel (como indicad la localización de las líneas en ambos lados del gel). Las muestras en las columnas en la primera matriz fueron las siguientes: 1 y 12. marcadores de PM (pesos moleculares indicados en el lado derecho del gel); 2. hormona de crecimiento; 3. leucocitos; 4. testículos; 5. colon; 6. próstata; 7. intestino delgado; 8. timo; 9. ovarios; 10. bazo; 11. hígado. Las muestras en las columnas en la segunda matriz fueron las siguientes: 1. Marcador del PM; 2. riñón; 3. cerebro; 4. pulmón; 5. páncreas; 6. músculo esquelético; 7. placenta; 8. corazón.

25 En el gel se puede ver que la secuencia específica de T101 solo se encontraba en el tejido del timo y no en ningún otro tejido analizado. También se encontró que la hormona de crecimiento, usada en el presente documento como control positivo, era positiva para T101.

Ejemplo 3

30 Se analizó el péptido T101 para determinar su capacidad para activar la proliferación de los esplenocitos o los timocitos de ratón (se usaron dos cepas de ratón: CD1 y Balb/C), así como linfocitos de sangre periférica (PBL) humanos. La actividad de la proliferación se midió mediante la incorporación de 5-bromo-2'desoxi-uridina (BrdU) en estas células.

Procedimiento

35 Los esplenocitos o los timocitos de ratón se aislaron de bazo o timo de ratones Balb/C. Se sembraron en placas de 96 pocillos usando una concentración de 10^7 células/pocillo. Medio RPMI 1640 + 10 % de FCS y se añadió Pen/Estr. Las células se trataron con diferentes concentraciones del péptido T101 (0,1 o 0,01 µg/pocillo) o con solución salina (conc.) y, tras 48 horas, se marcaron durante 6 horas con BrdU y se analizó la incorporación de BrdU en sus núcleos.

Se aislaron PBL humanos en un gradiente de Ficoll de sangre extraída de voluntarios y después se sembraron en placas de 96 pocillos, de nuevo usando RPMI 1640 + 10% FCS + Pen/Estr.

40 Las células se trataron con diferentes concentraciones del péptido o con solución salina (como anteriormente) y, tras 48 horas, se marcaron durante 6 horas con BrdU y se analizó la incorporación de BrdU en sus núcleos.

Resultados

Como se muestra en las Figs. 3 y 4, respectivamente, tanto en PBL humanos como en timocitos de Balb/C, T101 pudo aumentar la incorporación de BrdU, lo que significa que T101 podía inducir el incremento de la tasa de proliferación de las células.

Ejemplo 4

En el siguiente experimento se construyeron y se sintetizaron varios mutantes de delección del péptido T101. En estos mutantes se analizó su capacidad para estimular la proliferación en PBL humanos. La columna de la derecha indica el incremento de la proliferación sobre la proliferación en las células sin tratar.

TABLA 1: Estimulación de la proliferación en PBL humanos

Incremento en veces	Secuencia de aminoácidos	Péptido
2	LHLWLSGEPVQSSGTKDMRSKSDSKRV SDKQLISKAVWWTFFLPSTLWERK (SEC. ID. Nº 3)	ST
2,5-3	WTFFLPSTLWERK (SEC ID Nº 5)	Mut nº 1
1,4-1,6	SGEPVQSSGTKDMRSKSDSKRVS (SEC ID Nº 6)	Mut nº 2
2,2-2,8	DKQLISKAVWWTFFLPSTLWERK (SEC ID Nº 7)	Mut nº 3
1,1-1,3	PSTLWERK (SEC ID Nº 8)	Mut nº 4
2-2,2	AVWWTFFLPSTLW (SEC ID Nº 9)	Mut nº 5
2-2,4	KREWLTSPLFFTWWVA (SEC ID Nº 10)	Mut nº 6

Según los resultados anteriores se pueden extraer las conclusiones siguientes:

1. El mutante nº 1 consiste en los 13 aminoácidos en el extremo N del péptido T101 y era muy activo. Parece que esta secuencia (o una porción de la misma) es esencial para la actividad estimulante de la proliferación medida.
2. El mutante nº 2 consiste en 23 aminoácidos cadena arriba del mutante nº 1 y tenía una actividad relativamente baja. Parece que esta porción del péptido T101 es menos importante para esta actividad biológica.
3. El mutante nº 3 consiste en los 23 aminoácidos en el extremo N del péptido T101 y, en contraste con el mutante nº 2, era muy activo. Por tanto, se puede ver que algunas porciones del péptido T101 son más importantes que otras con respecto a la actividad de estimulación.
4. El mutante nº 4 consiste en los 8 aminoácidos en el extremo N del péptido T101 y casi no tenía actividad. Esto indica que los cinco aminoácidos del extremo C del mutante nº 1 son cruciales para su actividad.
5. El mutante nº 5 consiste en 13 aminoácidos que parcialmente solapan los del mutante nº 1. Tenía una actividad similar a la del péptido T101, pero menor que la actividad del mutante nº 1.
6. El mutante nº 6 consiste en la secuencia de aminoácidos del mutante nº 5 en orden inverso. Sorprendentemente tenía una actividad similar a la del mutante nº 5.

Por tanto, se puede ver que no toda la secuencia de aminoácidos T 101 1 es necesaria para la actividad de estimulación de la proliferación.

Ejemplo 5

Se sintetizó el péptido T101 biotinilado y su unión a los PBL humanos se determinó usando un microscopio de fluorescencia.

Procedimiento

- Se añadieron diferentes concentraciones del péptido T101 biotinilado a 10^6 células/tubo (PBL humanos). También se preparó un control sin péptido T101. En la etapa siguiente se añadieron concentraciones saturantes del anticuerpo anti-biotina fluorescente y las células se lavaron 3 veces con PBS. Después se observaron las células con un microscopio de fluorescencia.

Resultados

- Los resultados, mostrados en la Fig.. 5, indican que el anticuerpo anti-biotina se unía a las células tratadas con T101 biotinilado. Se descubrió que las concentraciones crecientes del péptido T101 biotinilado producían un incremento de la fluorescencia (resultados del FACS no mostrados). Cuando el péptido T101 biotinilado se unió primero al anticuerpo y después se incubó con las células, no se detectó fluorescencia. Las células control no tenían fluorescencia (resultados no mostrados en la Figura).

- En la mayoría de los casos, se observaron agrupaciones de las células marcadas con el péptido T101 biotinilado.

Este experimento proporciona pruebas directas de que T101 se puede unir a PBL humanos. Dado que el anticuerpo no puede penetrar en las células y las células no marcadas con T101 no estaban marcadas con el anticuerpo anti-biotina, la conclusión es que solo las células que se unían externamente a T101 se habían marcado.

Se obtuvieron resultados similares con esplenocitos de ratón.

Ejemplo 6

Con el fin de encontrar qué subpoblación de linfocitos se une al péptido T101, se realizó un análisis FACS usando células de bazo o de timo de ratón. Para el análisis se usaron varios anticuerpos: (1) CD3 anti-ratón, (2) CD4 anti-ratón, (3) CD8 anti-ratón y (4) CD25 anti-ratón.

Procedimiento

10^6 esplenocitos se marcaron con el péptido T101 biotinilado y PE-estreptavidina y un CD25 antirratón-FIT. Para cada anticuerpo se usó su anticuerpo isotipo como control.

Resultados

Los resultados de un análisis FACS se presentan en la Fig. 6 (el eje Y muestra el porcentaje de células marcadas). Se pueden extraer las conclusiones siguientes:

- (1) La adición del péptido T101 biotinilado produjo la aparición de células fluorescentes grandes, mientras que en el experimento control no se detectaron dichas células (resultados no mostrados).
- (2) También se marcaban todas las células CD25+ con el péptido biotinilado.
- (3) Parte de las células CD3+, CD4+ y CD8+ se marcaban con el péptido biotinilado (resultados no mostrados).

T101 se une a las células CD25+, las células CD4+ y las células CD8+. Las células CD25+ también son, probablemente, CD4+ y CD8+. Por tanto, T101 se une a las células que regulan la respuesta inmunitaria.

Ejemplo 7

La finalidad del experimento era analizar cómo los péptidos T101 influyen sobre la respuesta inmunitaria en ratones y si el péptido T101 puede influir sobre cualquiera de los componentes del sistema inmunológico con respecto a los niveles de los diferentes tipos celulares y en la proporción entre diferentes subpoblaciones.

Procedimiento

Se inyectaron 50 microgramos/kg del péptido T101 o solución salina (dos veces al día durante 8 días) en ratones Balb/C hembra de 7 a 8 semanas de edad (10 ratones por grupo). Se realizó un análisis CDC de la sangre y se analizó el porcentaje de diferentes subpoblaciones de glóbulos blancos (WBC) (monocitos (MONO), linfocitos (LIN) y WBC total (WBC)). Las plaquetas y los RBC se usaron como controles.

Resultados

Como se muestra en la Fig. 7, en ratones Balb/C hembra de 7-8 semanas de edad se produjo un incremento de aproximadamente un 30% en los WBC totales tras la inyección del péptido T101 en comparación con la inyección de solución salina. Cuando se analizaron las subpoblaciones de WBC, se produjo un incremento de aproximadamente un 30% en los linfocitos y monocitos en el grupo experimental en comparación con el grupo control en el que se inyectó solución salina.

Como control también se analizaron los niveles de plaquetas y de glóbulos rojos (RBC). Se halló que la diferencia entre la solución salina y el péptido T101 era inferior al 5%, como se muestra en la Fig. 8 (resultados para plaquetas no mostrados).

En cuanto a la población de CD4+ y CD8+ no reveló ninguna diferencia significativa entre ratones tratados con T101 y ratones tratados con solución salina (resultados no mostrados).

Este experimento se repitió en ratones Balb/C de 3-4 semanas de edad (7 ratones en un grupo). Se inyectó a los ratones 72 microgramos/Kg dos veces al día. Los resultados se ilustran en la figura 9.

En este experimento, distinto del anterior, el péptido T101 indujo alguna supresión del sistema inmunológico expresada en el nivel de los diferentes tipos celulares. La magnitud de la supresión fue de aproximadamente 30%.

Ejemplo 8

El nivel de diferentes subpoblaciones de células en linfocitos de bazo se analizó en ratones Balb/C de 3 a 4 semanas de edad en los que se inyectó una vez al día T101 (72 microgramos/kg de peso). Los resultados se resumen en la Figura 10.

Como se muestra en la Fig. 10, T101 disminuyó los niveles de las células CD4+ y CD8+ en el bazo de los ratones. En las células de timo no se observaron diferencias en los niveles de las células CD4+ and CD8+ (resultados no mostrados). En los ganglios linfáticos de los ratones se observó una disminución del intervalo de 35-50% de los niveles de las células CD4+, pero no se produjeron cambios en las células CD8+ (resultados no mostrados).

Ejemplo 9

La IL-10 es una interleucina que puede suprimir el sistema inmunológico (interleucina de TH2). Los niveles de IL-10 se analizaron en tres grupos de 3 ratones cada uno: (1) en un grupo de ratones se inyectó T101 dos veces al día (Ensayo nº 3); (2) en otro grupo se inyectó la misma concentración de T101 una vez al día (Ensayo nº 2), (3) en el tercer grupo de ratones se inyectó una vez en días alternos (Ensayo nº 1). Todas las dosis inyectadas eran iguales (72 microgramos/kg de peso). Los ratones a los que se inyectó solución salina sirvieron como control (Con). Los resultados se muestran en la figura 11.

Como se ha mostrado, los niveles de IL-10 aumentaron en todos los grupos tras la inyección del péptido T101 en estos ratones. El mejor régimen de inyecciones fue una vez en días alternos.

Estos resultados avalan el uso de T101 como supresor inmunológico en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

Ejemplo 10

En ratones Balb/C adultos, usando concentraciones menores de T10, se observó algún incremento de los niveles de las células inmunitarias. Este experimento tenía la finalidad de analizar si este incremento se puede aplicar a la inmunoterapia del cáncer.

Procedimiento

En ratones Balb/C de ocho semanas de edad se inyectaron células EMT6/CTX de carcinoma de mama y una vez que el tamaño del tumor alcanzó los 4 mm², se inyectó a los ratones el péptido T101 (50 microgramos/kg) dos veces al día durante 8 días. El tamaño del tumor se midió en días alternos, así como al finalizar el experimento.

Resultados

Los resultados con respecto al tamaño del tumor el día 14 se resumen en la Fig. 12. En los ratones tratados con el péptido T101, el incremento en veces del tamaño del tumor fue de 4,3 en comparación con el tamaño original del tumor antes de la inyección. En ratones tratados con solución salina, el incremento en veces del tamaño del tumor fue 6,7. Por tanto, T101 era capaz de reducir significativamente el crecimiento del tumor.

La tasa de crecimiento del tumor se muestra en la Fig. 13. Se puede ver que T101 era capaz de disminuir significativamente la tasa de crecimiento del tumor.

Estudios patológicos de estos tumores revelaron que en algunos de los ratones tratados con T101 se produjo un incremento significativo del número de linfocitos y neutrófilos en el tumor en comparación con el control (resultados no mostrados).

Estos resultados indican que T101 se puede usar terapéuticamente para el tratamiento del cáncer.

Ejemplo 11

Con el fin de analizar la capacidad de T101 para tratar las enfermedades autoinmunitarias se usó un modelo de ratón para la colitis/enfermedad de Crohn.

Ratones Balb/c hembra de ocho semanas de edad recibieron DSS (sulfato de dextrano) en el agua de bebida (5 %) durante 14 días. Durante ese tiempo, se inyectó a los ratones solución salina o solución salina que contenía T101, de acuerdo con lo siguiente. Se vigiló la aparición de sangre en heces, el peso corporal y la consistencia de las heces. Al final del experimento se sacrificó a los ratones, se extirpó el colon y se midió su longitud.

Los ratones se dividieron en 4 grupos a 3 ratones por grupo:

Grupo 1 Control - recibieron agua de bebida normal (sin DSS) y sin tratamiento.

Grupo 2 - DSS - recibieron agua de bebida que contenía 5% de DSS y se inyectó solución salina

Grupo 3 - DSS+BTL1 - recibieron agua de bebida que contenía 5% de DSS y se inyectó T101 una vez cada 3 días (a una dosis de T101 de 52 microgramos/kg).

Grupo 4 - DSS+BTL2 - recibieron agua de bebida que contenía 5% de DSS y se inyectó T101 una vez cada 3 días (a una dosis de T101 de 13 microgramos/kg).

Los resultados se resumen en las Figs. 14 y 15. Se puede ver que el péptido T101 ejercía un profundo efecto sobre la disminución de los síntomas de la enfermedad en estos animales en comparación con los ratones tratados con DSS y con solo solución salina.

Estos resultados muestran que el péptido T101 puede servir como inmunosupresor en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como colitis/enfermedad de Crohn.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 o de SEC ID N° 4.
2. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia contigua de los 13 restos de aminoácidos de la SEC ID N° 5.
- 5 3. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia seleccionada de la SEC ID N° 5, la SEC ID N° 7, la SEC ID N° 9, la SEC ID N° 10 y la SEC ID N° 12, y que tiene una característica biológica seleccionada de la inducción de la proliferación de esplenocitos y timocitos de ratón, la unión a PBL humanos, la modulación del número de glóbulos blancos en ratones, el incremento del nivel de IL-10 *in vivo* o la reducción del crecimiento tumoral y los síntomas de colitis/enfermedad de Crohn en un modelo de ratón.
- 10 4. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia modificada de la SEC ID N° 2 o la SEC ID N° 4, en el que hasta tres restos están cada uno sustituido por otro resto de aminoácido mediante sustitución conservadora.
- 15 5. Una secuencia polipeptídica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que los aminoácidos están en orden inverso y que tiene una característica biológica seleccionada de la inducción de la proliferación de esplenocitos y timocitos de ratón, la unión a PBL humanos, la modulación del número de glóbulos blancos en ratones, el incremento del nivel de IL-10 *in vivo* o la reducción del crecimiento tumoral y de los síntomas de colitis/enfermedad de Crohn en un modelo de ratón.
- 20 6. Una secuencia polipeptídica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que uno o más aminoácidos están sustituidos por el correspondiente D-aminoácido y que tiene una característica biológica seleccionada de la inducción de la proliferación de esplenocitos y timocitos de ratón, la unión a PBL humanos, la modulación del número de glóbulos blancos en ratones, el incremento del nivel de IL-10 *in vivo* o la reducción del crecimiento tumoral y de los síntomas de colitis/enfermedad de Crohn en un modelo de ratón.
7. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 25 8. Una cantidad eficaz del polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno.
9. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la enfermedad o trastorno es seleccionada de una afección inflamatoria o alérgica, un trastorno de la piel, una enfermedad de cáncer y una enfermedad autoinmunitaria.

5002 atgatggcactcagaagccagggggctcatgttaccacagagctgc
M M A L R S Q G L M L P Q S C
5047 ccacaactggctttcctcacccctaagtgccttggcagcagtgctct
P Q L A F L T L S A L A A V S
5092 ttttcagctctgcacatctctggttagtggggagccagtcagagc
F S A L H L W L S G E P V Q S
5137 tctggaacaaggacatgagatccaaatccgattccaagcgagtg
S G T K D M R S K S D S K R V
5182 agtgacaagcagctaatccaaagctgtgtggtggacattttt
S D K Q L I S K A V W W T F F
5227 cttccttcaaccctctctgggagagaaaaatga 5256
L P S T L W E R K *

FIG.1

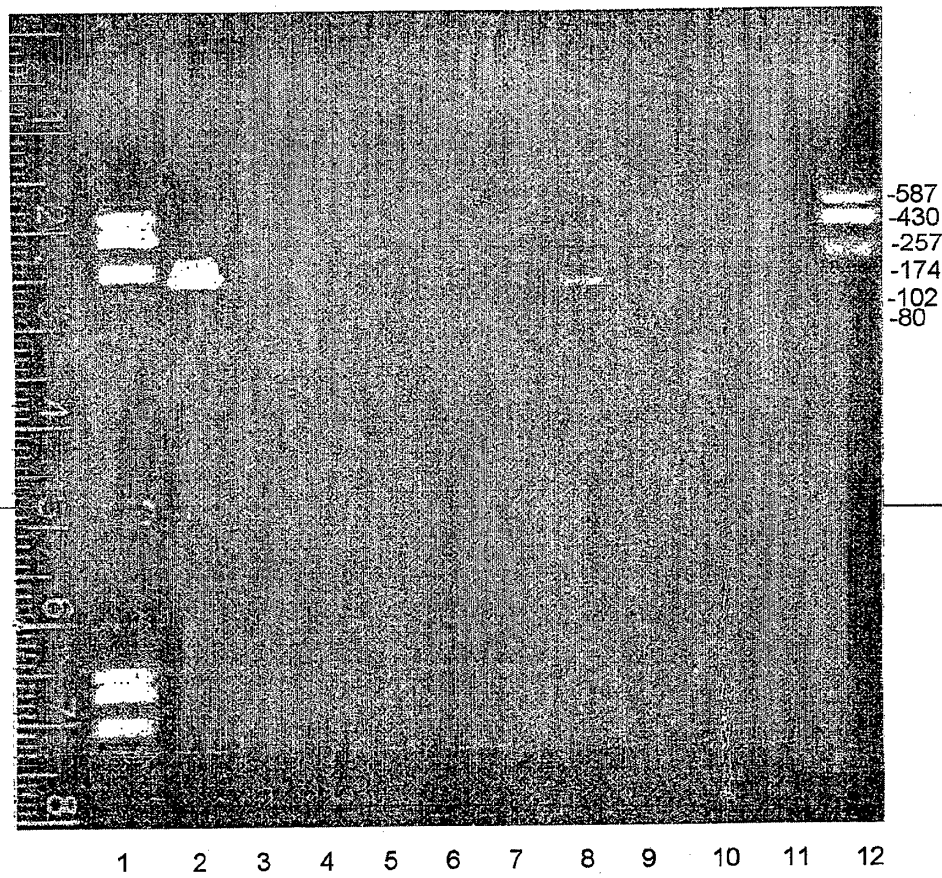


FIG. 2

FIG. 3

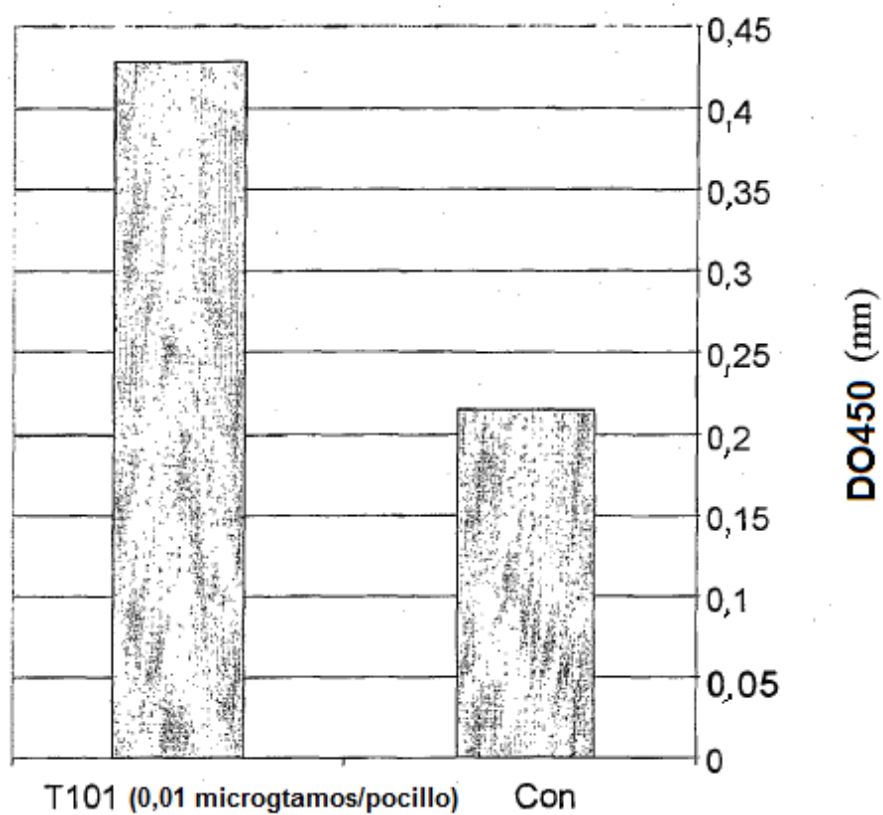
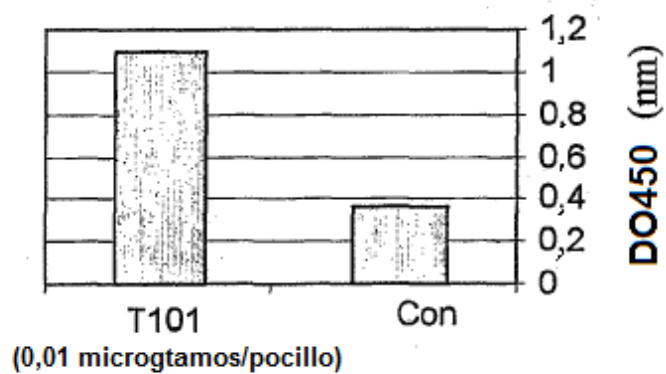


FIG. 4



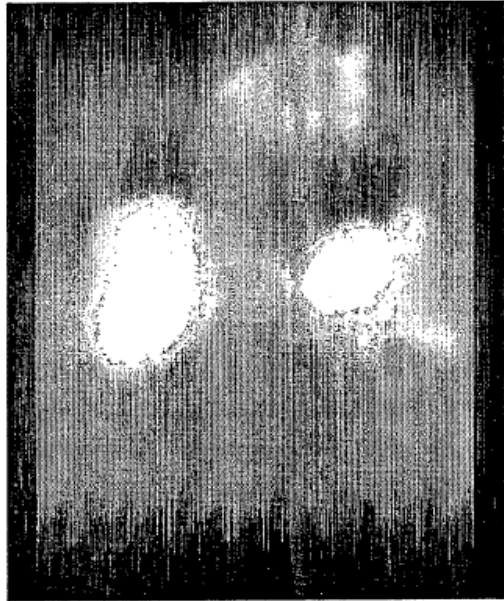


FIG. 5

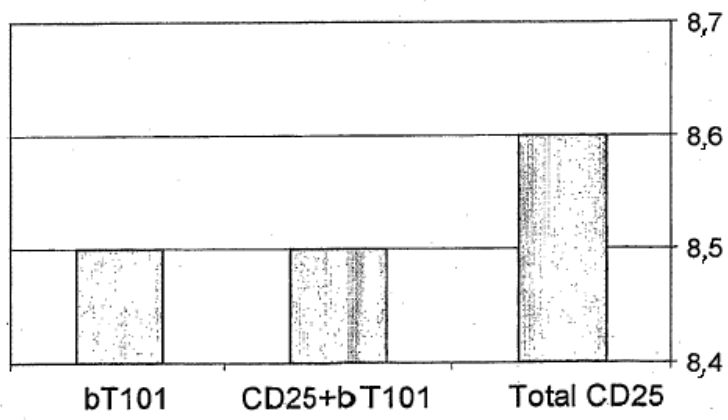


FIG. 6

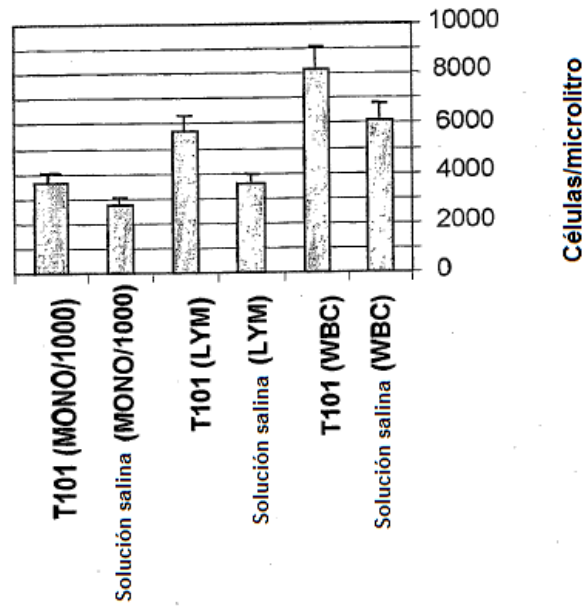


FIG. 7

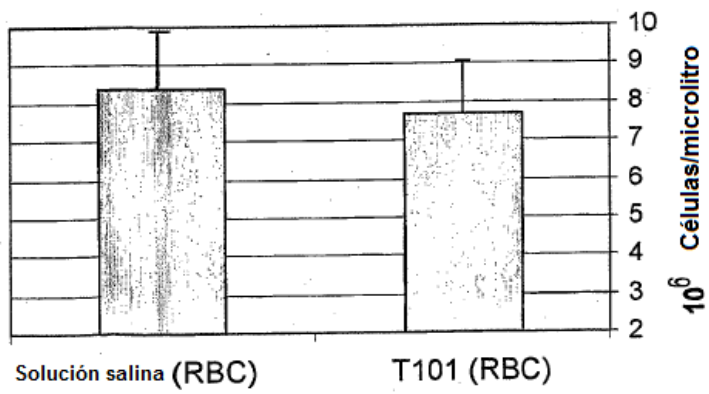


FIG. 8

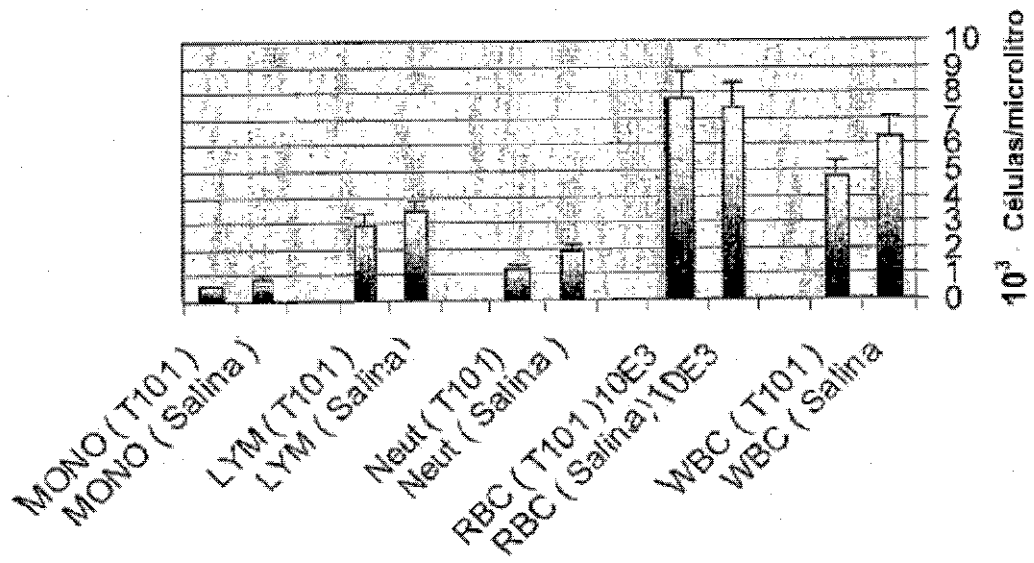


FIG. 9

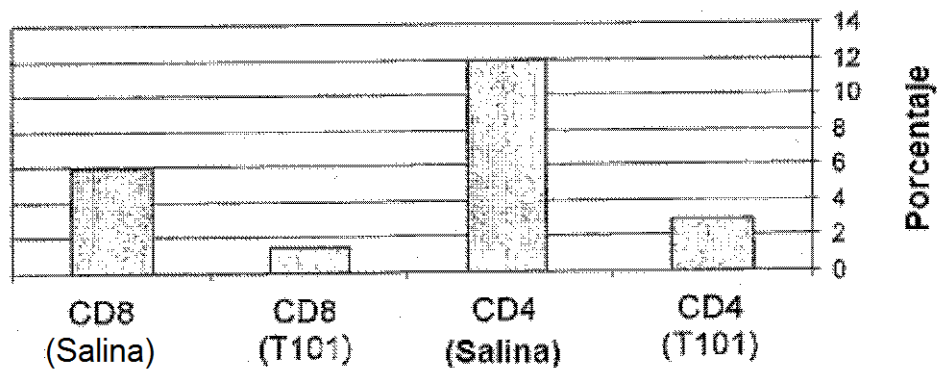


FIG. 10

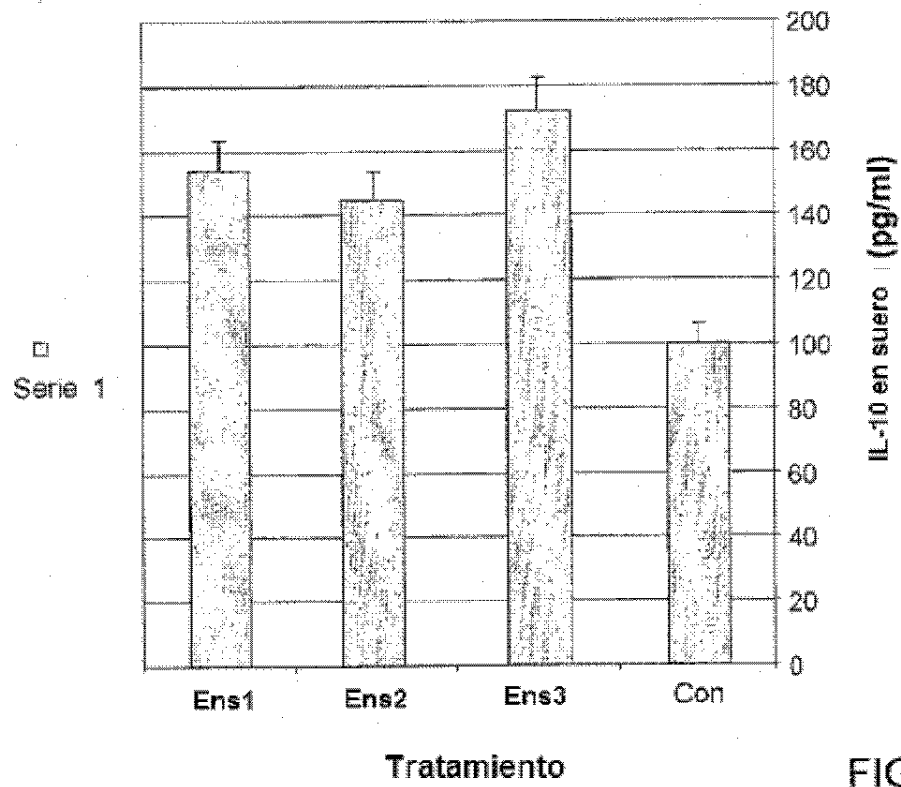


FIG. 11

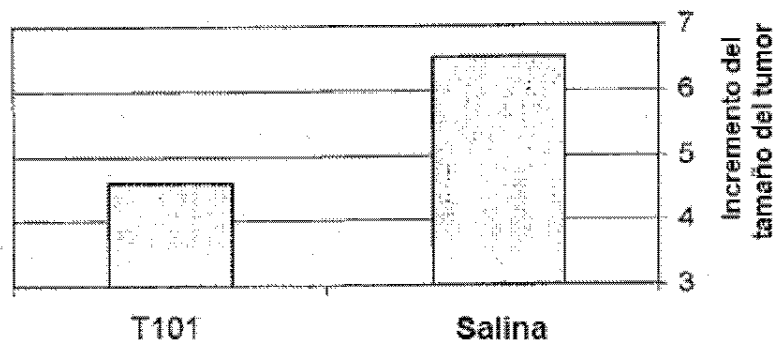


FIG. 12

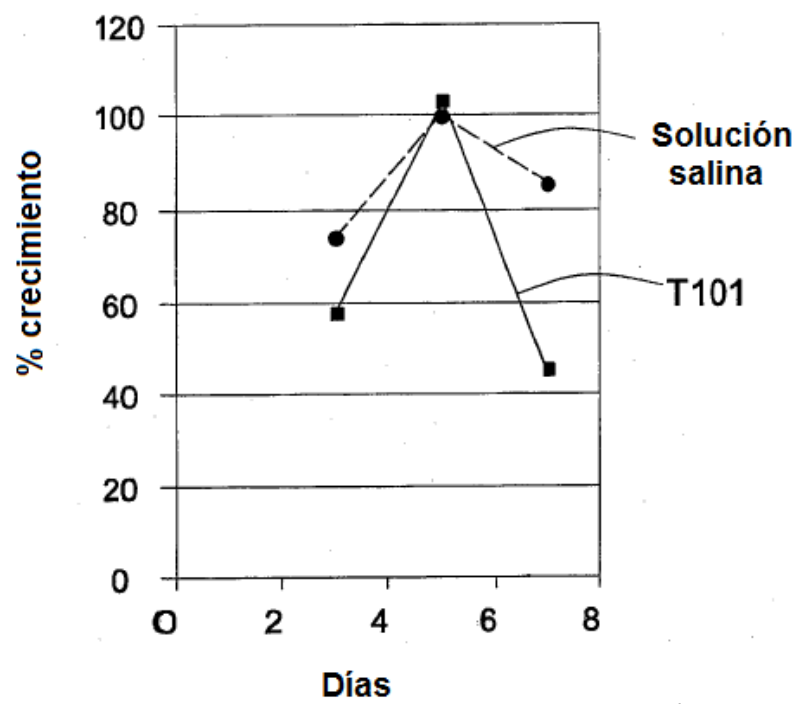


FIG. 13

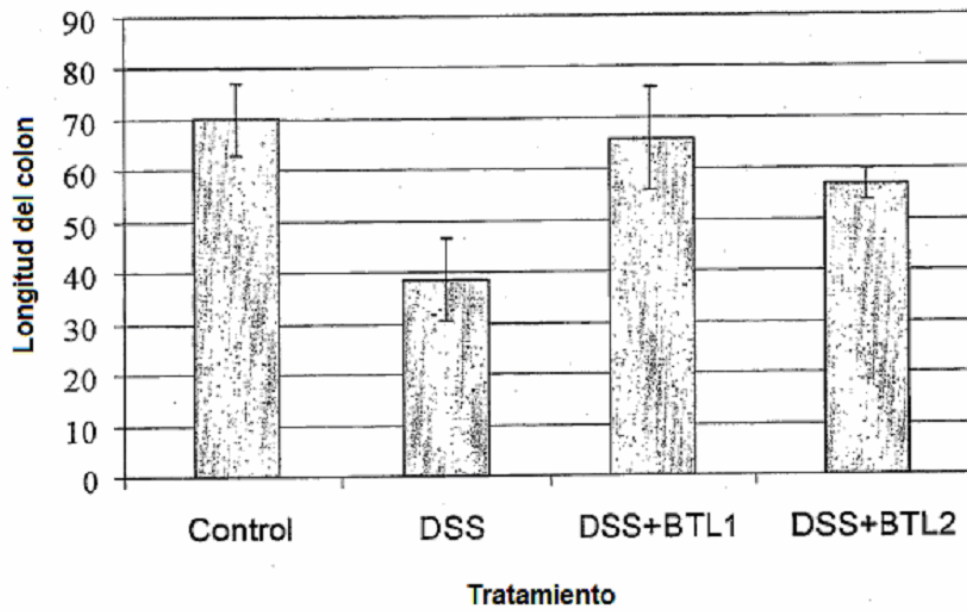


FIG.14

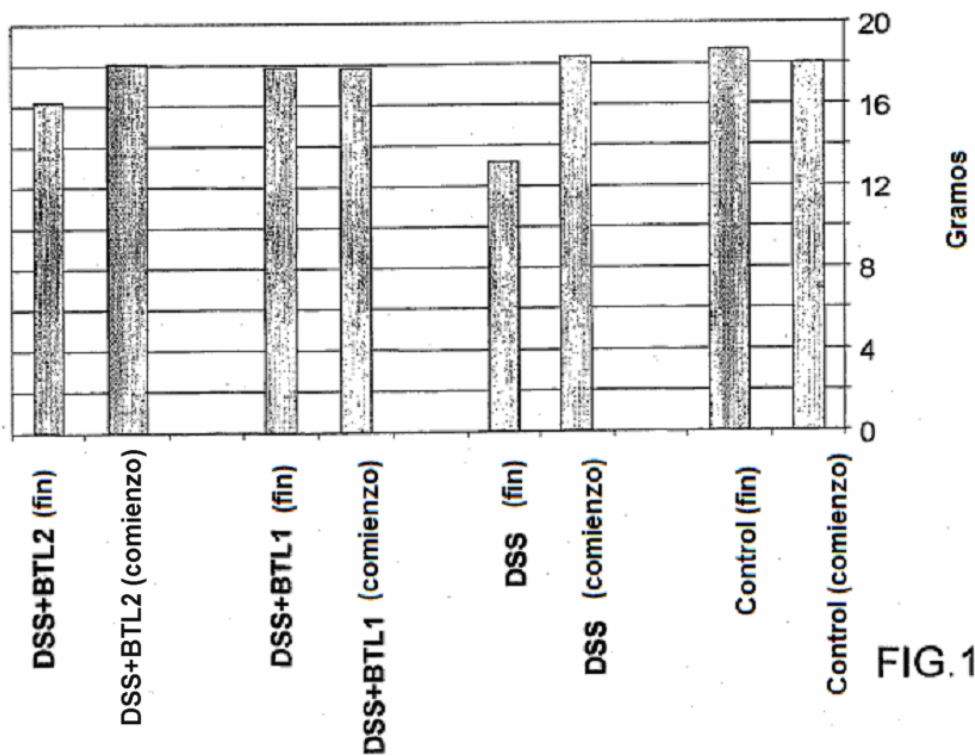


FIG.15