

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 803**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/765** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

**A61P 37/02** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2008 E 12164229 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2487186**

54 Título: **Estructuras inmunorreguladoras procedentes de proteínas naturales**

30 Prioridad:

**08.05.2007 SE 0701099**

**08.05.2007 SE 0701100**

**15.11.2007 SE 0702520**

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

**17.04.2017**

73 Titular/es:

**CANIMGUIDE THERAPEUTICS AB (100.0%)**

**Domkyrkvägen 23**

**236 37 Höllviken, SE**

72 Inventor/es:

**HAKANSSON, LEIF y**

**CLINCHY, BIRGITTA**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 608 803 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

Estructuras inmunorreguladoras procedentes de proteínas naturales

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a ciertas secuencias de proteínas identificadas con un efecto inmunorregulador, así como a los anticuerpos dirigidos contra dichas secuencias de proteínas y a los métodos para la identificación de las mismas.

10

**Antecedentes de la invención**

Aunque los datos indican que el sistema inmunitario tiene una importancia fundamental en el control del cáncer, los tumores malignos continúan creciendo, y la eficacia de la inmunoterapia es más bien baja, con una tasa de remisión objetivo del 15-30 %. Puede haber varias razones para esta aparente paradoja:

15

- los tumores evitan el reconocimiento por parte del sistema inmunitario al no expresar apropiadamente los antígenos asociados al tumor
- los antígenos asociados al tumor (a menudo autoantígenos), que son demasiado débiles para desencadenar una respuesta inmunitaria adecuada
- una inducción de tolerancia
- una inmunosupresión relacionada con el cáncer, que impide una respuesta inmunitaria adecuada

20

Estas alternativas requieren unas estrategias terapéuticas completamente diferentes, bien una estimulación apropiada del sistema inmunitario o bien el control de los mecanismos inmunosupresores relacionados con el cáncer.

25

La inmunosupresión en el cáncer se caracteriza fundamentalmente por: una reducción en la capacidad proliferativa y citotóxica de los linfocitos, en particular de los linfocitos infiltrantes de tumores, una migración escasa de las células inflamatorias, una reducción en la producción y en la respuesta de la IL-2, dificultades para desencadenar una respuesta inmunitaria mediante vacunas, también frente a otros antígenos distintos a los relacionados con tumores, y una producción patológica de citocinas. Esta desregulación del sistema inmunitario da como resultado un mal control del cáncer mediado por el sistema inmunitario y un síndrome paraneoplásico (febrícula, fatiga, anorexia, pérdida de peso y deterioro de los parámetros de laboratorio).

30

35

Durante varias décadas se han intentado estrategias terapéuticas inmunoestimulantes mediante el uso de citocinas (por ejemplo, interferones, interleucinas) o de vacunas, con objeto de aumentar la reactividad inmunitaria frente a los tumores, pero hasta la fecha solo han tenido un éxito limitado. Esto indica que la inmunoestimulación con objeto de superar una baja respuesta inmunitaria en pacientes con cáncer podría estar suprimida por otros mecanismos aún no identificados.

40

Algunos ejemplos de la técnica relacionada pueden encontrarse en el documento WO 2004/082617, que se refiere a marcadores polipeptídicos para la artritis reumatoide y a anticuerpos contra dichos marcadores para su uso en el diagnóstico, el tratamiento, la monitorización de la progresión de la enfermedad y a su uso en el cribado de fármacos.

45

Lindh C. et al., Rapid Comm. Masa Spectr., 2005, 19 (18), páginas 2488-2496, se refieren a la digestión con tripsina de la HSA en péptidos modificados con THB, en los que el péptido T50-51 es idéntico a la SEQ ID NO: 80 de la presente invención.

50

El documento WO 2006/043891, se refiere a un anticuerpo monoclonal A capaz de unirse a, y de bloquear, la actividad inmunosupresora de las estructuras relacionadas con la HSA en pacientes con cáncer, entre otros.

El documento WO 2006/068440 se refiere a la identificación de genes supresores tumorales humanos y a sus proteínas codificadas, así como a su uso en el diagnóstico y la prevención y el tratamiento de cánceres humanos. El gen GIG20 codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de proteínas de la SEQ ID NO: 80 de la presente invención.

55

En dos solicitudes de patente anteriores hemos descrito dos mecanismos inmunorreguladores fundamentales de relevancia para todos los tipos de tumores malignos. En la primera de estas solicitudes se demostró la importancia de la modulación del receptor Fc y formas para superar esta inmunosupresión relacionada con el cáncer mediante la modulación de la reticulación del receptor Fc. En esta solicitud de patente también se demostró que fragmentos proteolíticos de proteínas naturales inducían una producción patológica de las monocinas. En la segunda solicitud de patente se encontró que algunas de estas neo-estructuras se unían a / bloqueaban la integrina, y su aparición y actividad inmunorreguladora fue analizada adicionalmente mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra neo-estructuras derivadas de la albúmina. En la última solicitud de patente también se describe la aparición y

60

65

la importancia de auto-anticuerpos contra estas neo-estructuras.

### Sumario de la presente invención

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo o a un fragmento del mismo con especificidad frente a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 80 para su uso en el tratamiento de un tumor maligno.

10 La invención también se refiere a un anticuerpo policlonal contra un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 80 para su uso en el diagnóstico de un tumor maligno, a un anticuerpo policlonal de conejo contra un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 80 para su uso en el ensayo del efecto inmunomodulador del anticuerpo sobre la producción inducida por la IL-2 de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), y a un método *in vitro* para el diagnóstico de un tumor maligno, mediante la determinación de la presencia de un fragmento de un péptido o de una proteína mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 80.

### Descripción detallada de la presente invención

20 En el presente documento se divulga la secuencia proteica de unión a células inmunitarias de una proteína que aparece de forma natural en el suero, tal como a un péptido de unión a células aislado, a un fragmento de un péptido, a una neo-estructura y/o a un neo-epítipo de una proteína que aparece de forma natural en el suero, que está presente en un tejido humano, en el que dicho péptido, fragmento de péptido, neo-estructura y/o neo-epítipo tiene una actividad inmunorreguladora y dicho péptido, fragmento de péptido, neo-estructura y/o neoepítipo es el resultado de un aumento en la actividad proteolítica y/o de la desnaturalización en un tumor maligno. Un ejemplo específico de dicha secuencia proteica de unión a células inmunitarias son las secuencias de aminoácidos indicadas como la SEQ.ID.NO: 80.

25 La presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo con especificidad frente a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 80 para uso en el tratamiento de un tumor maligno.

30 La presente invención también proporciona un método *in vitro* para el diagnóstico de un tumor maligno, mediante la determinación de la presencia de un fragmento de un péptido o de una proteína mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 80 y dichos anticuerpos para dicho uso.

35 En una realización actualmente preferida, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal dirigido contra las secuencias proteicas establecidas en la SEQ.ID.NO: 80.

40 Otra realización igualmente preferida de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal de conejo anti-3028, que se muestra en el presente documento, así como un anticuerpo policlonal de conejo anti-3218 o anti-3315, es decir, un anticuerpo policlonal de conejo que está dirigido contra las secuencias proteicas que se corresponden con la SEQ.ID.NO: 80. Dicho anticuerpo normalmente se usa en diferentes métodos diagnósticos y/o de investigación.

45 La invención también facilita un método para el diagnóstico de la presencia de un tumor maligno mediante la determinación de la respuesta a un anticuerpo como se ha descrito anteriormente.

50 La invención facilita adicionalmente un compuesto que inhibe la actividad de una secuencia proteica de unión a células inmunitarias de una proteína que aparece de forma natural en el suero, tal como a un péptido de unión a células aislado, a un fragmento de un péptido, a una neo-estructura y/o a un neo-epítipo, que está presente en un tejido humano, en el que dicho péptido, fragmento de péptido, neo-estructura y/o neo-epítipo tiene una actividad inmunorreguladora y dicho péptido, fragmento de péptido, neo-estructura y/o neoepítipo es el resultado de un aumento en la actividad proteolítica y/o de la desnaturalización en un tumor maligno.

55 Adicionalmente, la invención facilita un método para el tratamiento de cualquier tumor maligno mediante la administración de un compuesto que inhibe la aparición de una secuencia proteica de unión a células inmunitarias de una proteína que aparece de forma natural en el suero, tal como a un péptido de unión a células aislado, a un fragmento de un péptido, a una neo-estructura y/o a un neo-epítipo, según la presente invención, en el que dicho péptido, fragmento de péptido, neo-estructura y/o neo-epítipo tiene una actividad inmunorreguladora y es el resultado de un cáncer o de un tumor maligno.

60 Por lo tanto, la invención facilita un método que consiste en que se administra un anticuerpo creado contra dicho péptido de unión a células, fragmento de péptido, neo-estructura y/o neo-epítipo en una cantidad suficiente para desencadenar una respuesta inmunitaria contra cualquier tumor maligno.

65

5 El péptido, el fragmento de péptido, la neo-estructura y/o el neo-epítipo de la albúmina sérica normal pueden tener, por ejemplo, un primer ácido glutámico a una distancia de entre 3 y 7 aminoácidos de cualquier lisina presente en dicha secuencia, preferentemente de entre 4 y 6 aminoácidos de cualquier lisina presente en dicha secuencia, más preferentemente de entre 5 y 6 aminoácidos de cualquier lisina presente en dicha secuencia, y tiene una actividad inmunorreguladora.

Preferiblemente dicha secuencia contiene un ácido glutámico adicional a una distancia de entre 2 y 3 aminoácidos de dicho primer ácido glutámico.

10 El péptido, el fragmento de péptido, la neo-estructura y/o el neo-epítipo de la albúmina sérica normal pueden tener, por ejemplo, una secuencia de péptidos seleccionada entre la secuencia de aminoácidos indicada como la SEQ.ID.NO: 80.

15 Dicha secuencia puede contener adicionalmente un aminoácido ácido a una distancia de  $-12 \pm 1$  aminoácidos del primer ácido glutámico, y a una distancia de  $+3 \pm 1$  aminoácidos de la lisina.

20 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal dirigido contra una o más de una secuencia proteica, tal como un péptido, un fragmento de un péptido, una neo-estructura y/o un neoepítipo de la albúmina sérica normal que tiene un primer ácido glutámico a una distancia de entre 3 y 7 aminoácidos de cualquier lisina presente en dicha secuencia, preferentemente de entre 4 y 6 aminoácidos de cualquier lisina presente en dicha secuencia, más preferentemente de entre 5 y 6 aminoácidos de cualquier lisina presente en dicha secuencia, y tiene una actividad inmunorreguladora.

25 En una realización preferida de la presente invención el anticuerpo está dirigido contra un péptido, un fragmento de péptido, una neo-estructura y/o un neo-epítipo de la albúmina sérica normal que se corresponde con la secuencia de péptidos establecida en la SEQ.ID.NO: 80.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de la presencia opcional de un cáncer o de un tumor maligno inmunosupresor, mediante la determinación de la presencia de un péptido, de un fragmento de un péptido, de una neo-estructura y/o de un neo-epítipo de la albúmina sérica humana normal que tiene la secuencia de péptidos establecida en la SEQ.ID.NO: 80 en dicho péptido, fragmento de péptido, neo-estructura y/o neo-epítipo, y que tiene una actividad inmunorreguladora, según se muestra en una o más de las pruebas inmunitarias rutinarias / pruebas rutinarias de la función inmunitaria, tal como la producción de citocinas, la proliferación de linfocitos, el bloqueo de la unión de un anticuerpo anti-integrina a su receptor.

35 **El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso según la presente invención tiene especificidad frente a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 80, cuya secuencia se indica a continuación:**

40 VFDEFKPLVEEPQNLK SEQ. ID. NO. 80

45 En lo sucesivo, el término “tejido” según se usa en el presente documento debe significar sangre completa, suero, plasma, linfa, saliva, orina, heces, ascitis, derrame pleural, pus, así como cualquier tejido, incluyendo músculo, grasa, tejido conectivo, incluyendo células inflamatorias.

50 En el presente contexto, el término “secuencia proteica” se usa para describir uno más de una proteína, un polipéptido, un péptido, un fragmento de un péptido, una neo-estructura y/o un neo-epítipo que se genera como resultado de una fragmentación proteolítica, de una desnaturalización y/o de cambio(s) conformacional(es) de una proteína que aparece de forma natural en el suero. Como comprenderá fácilmente la persona experta en la materia, un cambio conformacional en una proteína no dará siempre lugar necesariamente, por supuesto, a su fragmentación, pero podría también dar simplemente como resultado la formación y/o la presentación de una nueva estructura y/o epítipo. En el presente contexto se divulgan varias nuevas estructuras y/o epítipos que todavía están unidos a, y son presentados por, la proteína original que aparece de forma natural en el suero.

55 Un fragmento de una proteína que aparece de forma natural en el suero se define, en el presente contexto, incluyendo fragmentos de proteínas, de polipéptidos y o de péptidos, sin ninguna referencia a la longitud específica de dicha secuencia proteica.

60 En el presente contexto, “desnaturalizaron” significa cualquier cambio en la estructura de una proteína con respecto a la estructura normal, natural, tal como, por ejemplo, el producido por un estrés oxidante.

65 Las proteínas son macromoléculas biológicas constituidas por residuos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Las proteínas, como polímeros lineales de aminoácidos, también se denominan polipéptidos. Normalmente, las proteínas tienen 50-800 residuos de aminoácidos, y por lo tanto unos pesos moleculares en el intervalo de entre aproximadamente 6.000 y aproximadamente varios cientos de miles de Dalton o más. Las proteínas pequeñas se denominan a péptidos, oligopéptidos o polipéptidos. En el contexto de la presente invención,

un "péptido" o un "fragmento de un péptido", se refiere a un polipéptido que puede tener, pero no se limita a, 5-50 aminoácidos de longitud, tal como 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 47, 48, 49 o 50 aminoácidos. Dichos péptidos también pueden tener más de 50 aminoácidos.

- 5 Por péptido, fragmento de péptido, neo-estructura y/o neo-epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, se entiende que la secuencia de aminoácidos de, por ejemplo, el péptido, es idéntica a la secuencia de referencia, excepto porque la secuencia de aminoácidos puede incluir hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un
- 10 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia: hasta un 5 % de los aminoácidos de la secuencia de referencia pueden estar delecionados o sustituidos por otro aminoácido, o pueden estar insertados varios aminoácidos, hasta un 5 % de los aminoácidos totales de la secuencia de referencia, en la secuencia de referencia. Estas mutaciones en la secuencia referencia pueden producirse en las posiciones amino y/o carboxi terminal de la secuencia de aminoácidos de referencia, o en cualquier sitio entre esas posiciones terminales, intercaladas bien
- 15 individualmente entre aminoácidos de la secuencia de referencia, o bien en uno o más grupos contiguos de la secuencia de referencia.

- Lo más adecuado para determinar la identidad es un programa de algoritmo local. Los programas de algoritmo locales (tales como Smith Waterman) comparan una subsecuencia de una secuencia con una subsecuencia de una
- 20 segunda secuencia, y encuentran la combinación de subsecuencias y la alineación de esas subsecuencias, que produce la mayor puntuación de similitud global. Los huecos internos, si están permitidos, están penalizados. Los algoritmos locales trabajan bien en la comparación de dos proteínas multidominio, que tienen un único dominio o simplemente un sitio de unión en común.

- 25 Los métodos para la determinación de la identidad y de la similitud están codificados en programas disponibles al público. Algunos métodos de programas informáticos preferidos para la determinación de la identidad y de la similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas GCG (Devereux, J et al (1994)) BLASTP, BLASTN y PASTA (Altschul, S.F. et al (1990)). El programa BLASTX está disponible al público en el NCBI y en otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S.F. et al, Altschul, S.F. et al (1990)). Cada programa de
- 30 análisis de secuencias tiene una matriz de puntuación por defecto y unas penalizaciones de hueco por defecto. En general, se espera que el biólogo molecular utilice los ajustes por defecto establecidos por el programa informático usado.

### Resultados

- 35 *Cartografiado de epítipos con espectrometría de masas de un anticuerpo monoclonal de ratón específico para la albúmina sérica humana desnaturalizada (dHSA)*

- Se demostró que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la HSA desnaturalizada tenían una actividad
- 40 inmunomoduladora. Se investigó adicionalmente la estructura del epítipo de uno de estos AcMc.

#### *Dos metodologías similares para el cartografiado de epítipos con un láser asistido por matriz*

- Se usó una espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización (MALDI-TOF ms) con objeto de
- 45 definir los posibles sitios de la albúmina sérica humana a los que se une un anticuerpo monoclonal de ratón específico para la albúmina desnaturalizada. Una metodología aprovecha el hecho de que los péptidos trípticos a los que se une un anticuerpo no generarán un espectro de masas característico en la MALDI, ya que están "ocultos" en el análisis (3). Otra metodología aprovecha el hecho de que los sitios de una proteína a los que se ha unido un anticuerpo están protegidos de la proteólisis (1, 2).

- 50 *Unión de los péptidos generados mediante la tripsinización de la dHSA por un anticuerpo monoclonal A (AcMc A)*

- Se desnaturalizó albúmina sérica humana purificada (HSA) con urea, se redujo con DTT y se alquiló según se ha descrito (4). Después, la HSA desnaturalizada se sometió a un tratamiento con tripsina a una baja concentración
- 55 (0,02-2 ng/ml) de tripsina. Sin embargo, los espectros obtenidos con la MALDI no eran satisfactorios, ya que no se encontraron las masas de los péptidos típicas de la albúmina. Tomando como base una electroforesis en gel, se encontró que esta preparación (digerida con 0,02 ng/ml de tripsina) contenía unas cantidades sustanciales de albúmina sin digerir. Por lo tanto, se continuó la digestión con tripsina a una concentración mayor (5 µg/ml) con objeto de obtener los espectros de masas que se usan habitualmente para la identificación de proteínas mediante una MALDI.
- 60

- Parte de la ahora completamente escindida solución de albúmina se incubó con el AcMc A. Se llevó a cabo la MALDI-TOF ms y se compararon los espectros de la albúmina desnaturalizada tratada con la enzima en presencia o
- 65 en ausencia del AcMc A. Había catorce masas de albúmina ausentes o reducidas después de la incubación con el AcMc A (Tabla 1 A, Columna D). La secuencia de aminoácidos de estos péptidos se muestra en la Tabla 1B. Los espectros representan múltiples áreas que engloban los residuos 66 hasta 508 de la molécula de albúmina.

**Tabla 1 A. Residuos de los péptidos de la HSA que se unen al AcMc A Columna C: área del pico de los péptidos antes de la adsorción con el AcMc A. Columna D: área del pico de los péptidos después de la adsorción con el AcMc A. Columna E: área del pico de los péptidos cuando la digestión de la dHSA estaba protegida por la unión al AcMc A**

5

A	B	C	D	E
MH+ (m/z)	Residuo	Área del pico antes de la incubación del anticuerpo 2 espectros	Área del pico después de la incubación del anticuerpo 5 espectros	Área del pico trips. albúmina + antic. 6 espectros
1149,67	066-075	1970, 4092	0, 0, 0, 0, 0,	0, 0, 0, 0, 0, 0,
1017,59	089-097	1695, 5089	0, 0, 0, 0, 0,	0, 0, 0, 0, 0, 0,
933,56	098-105	1862, 4869	0, 0, 132, 0, 0	0, 0, 0, 0, 0, 0,
1434,65	106-117	809, 1010	0, 0, 0, 0, 0,	0, 0, 0, 0, 0, 0,
927,55	162-168	6036, 13066	504, 118, 473, 281, 288	448, 895, 216, 724, 2346, 1.571
1074, 63	206-214	3064, 7917	0, 0, 0, 0, 0,	0, 0, 0, 0, 0, 0,
1443, 74	287-298	583, 1394	0, 0, 0, 0, 0,	0, 0, 53, 0, 0, 0,
1546, 91	299-310	2283, 4675	0, 0, 0, 0, 0,	0, 0, 0, 0, 0, 0,
1311,84	362-372	1036, 1482	0, 0, 0, 0, 0,	0, 0, 51, 0, 407 (1312), 226 (1312)
1552, 71	384-396	2186, 3327	0, 0, 0, 0, 0,	0, 0, 0, 0, 0, 0,
1657, 87	414-426	2519, 2978	0, 0, 0, 0, 0,	0, 0, 0, 0, 0,212 (1656,64)
960,62	427-434	15276, 32846	267, 315, 931, 494, 309	591, 1284, 199, 1015, 2963, 1998
1138,56	500-508	1360, 4659	0, 0, 0, 0, 0,	0, 258, 0, 0, 0,204 (1139)
1342, 72	570-581	2720, 3758	0, 0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0, 0, 0

**Tabla 1B. Secuencia de aminoácidos de los residuos de los péptidos de la HSA unidos por el AcMc A.**

MH+ ( m/z)	Residuo	Secuencia
1149,67	066-075	LVNEVTEFAK
1017,59	089-097	SLHTLFGDK
933,56	098-105	LCTVATLR
1434,65	106-117	ETYGEMADCCA K
927,55	162-168	YLYEIAR
1074, 63	206-214	LDELRDEGK
1443, 74	287-298	YICENQDSISSK
1546, 91	299-310	LKECCEKPLLEK
1311,84	362-372	HPDYSVLLLLR
1552, 71	384-396	CCAAADPHECYAK
1657, 87	414-426	QNCELFEQLGEYK
960,62	427-434	FQNALLVR
1138,56	500-508	CCTESLVNR
1342, 72	570-581	AVM D D FAAFVE K

- 10 Con objeto de confirmar adicionalmente estos resultados, se dejó que el anticuerpo monoclonal AcMc A se uniera a la albúmina desnaturalizada (previamente digerida con tripsina a una concentración de 0,02 ng/ml) con objeto de proteger las secuencias de los péptidos del epítipo. Después, el complejo se trató de nuevo con tripsina. Después se llevaron a cabo las MALDI-TOF ms y se compararon los espectros de masas de los péptidos de la albúmina con los espectros generados a partir de la albúmina desnaturalizada tratada con tripsina en ausencia del anticuerpo. Las mismas catorce masas de las 39 masas de la albúmina desaparecieron completamente o estaban significativamente
- 15

reducidas en la muestra en la que estaba presente el AcMc durante el tratamiento con tripsina (Tabla 1 A, Columna E). Se realizaron múltiples lecturas para verificar los resultados.

5 Los fragmentos de péptidos importantes podrían no ser identificados debido a la posibilidad de que el epítipo de unión del AcMc de la albúmina sea escindido por la tripsina, dando como resultado fragmentos del epítipo con una afinidad de unión demasiado baja como para unirse al AcMc. Por lo tanto, también se usó un método alternativo.

10 Se repitió el cartografiado de los epítipos del AcMc A con la MALDI basada en la protección del anticuerpo frente a la proteólisis. Esta vez se usó una metodología ligeramente diferente. Se incubó la HSA desnaturalizada con el AcMc A. La albúmina no unida por el anticuerpo se retiró de la muestra mediante una exclusión por tamaños con un ultrafiltro. El resto de AcMc libres y los complejos de AcMc-albúmina se digirieron después con tripsina (las secuencias de la molécula de albúmina a las que está unido el AcMc resisten a la digestión con tripsina). Después, los fragmentos pequeños escindidos del AcMc y de la albúmina no protegida se eliminaron de la muestra mediante una ultrafiltración (30 kD). Los complejos del AcMc y los fragmentos de albúmina unidos se disociaron mediante una reducción del pH hasta 2,7. De nuevo, se llevó a cabo una ultrafiltración a 30 kD para separar el AcMc completo de los fragmentos de albúmina menores de 30 kD. El análisis mediante una MALDI TOF de estos fragmentos no identificó los espectros típicos de la albúmina. Razonablemente, debido a que los fragmentos que contienen el epítipo del AcMc A todavía eran demasiado grandes. Después, éste filtrado (< 30 kD) se digirió adicionalmente con tripsina (para la escisión de los sitios previamente protegidos por el AcMc) con objeto de generar masas de péptidos adecuadas para el análisis con la MALDI TOF ms.

25 Después de este segundo tratamiento con tripsina, se detectaron ocho de las 32 masas mediante la MALDI TOF ms, que concordaban con la albúmina (Tabla 2). Por lo tanto, estas secuencias de aminoácidos identificadas ahora comprenden una parte del epítipo, que también contiene secuencias del otro lado del punto de escisión de la tripsina.

**Tabla 2. Péptidos de la albúmina generados mediante la tripsinización de fragmentos mayores eluidos a partir del AcMc A.**

Masa	Residuo de la albúmina	Área del pico	Secuencia de la base de datos
875,49	243-249	481	LSQRFPK
927,47 *	162-168	1035	YLYEIAR
933,51 *	98-105	744	LCTVATLR
940,41	131-138	534	DDPNLPR
960,55 *	427-434	1345	FQNALLVR
1074,52 *	206-214	644	LDELRDEGK
1138,47 *	500-508	119	CCTESLVNR
1149,53 (1149,61)*	66-75	1918	LVNEVTEFAK

30 Seis de las ocho masas de péptidos (indicadas con un \* en la Tabla 2) eran masas de péptidos que también desaparecieron cuando se analizaron previamente, cuando la albúmina completamente escindida se incubó con el AcMc A antes del análisis de la MALDI-TOF (Tablas 1A y B).

35 Los epítipos de este anticuerpo quedaron así establecidos. Es importante destacar que hay múltiples de dichas estructuras presentes en la molécula de albúmina, que pueden causar después la reticulación de los receptores a los que están unidos. Un estudio previo sobre la antigenicidad de la albúmina, basado en 13 anticuerpos monoclonales diferentes, ha demostrado que existe una reactividad cruzada intramolecular entre diferentes dominios de la albúmina humana (5), por lo tanto pueden esperarse múltiples sitios de epítipo para el AcMc A en la albúmina.

40 Tomando como base estos resultados coherentes, se encontró un patrón común. Se encontró un ácido glutámico a una distancia de 5 o 6 aminoácidos de la lisina, bien en las secuencias de péptidos identificadas por la MALDI-TOF o bien en la secuencia adyacente a la secuencia de péptidos identificada mediante esta técnica (esto es, en el otro lado del punto de escisión de la tripsina, en una K (lisina), (Tabla 3)). Es interesante destacar que en 4 de estas secuencias se encontró un ácido glutámico adicional a una distancia de 2 o 3 aminoácidos del primer residuo de ácido glutámico. Estos residuos de ácido glutámico adicionales podrían tener importancia en la afinidad o en la transducción de señales de estos péptidos. La actividad biológica de estos péptidos también podría verse afectada por la aparición de aminoácidos ácidos tanto a una distancia de  $12 \pm 1$  aminoácidos (en la posición -12) desde el primer residuo de ácido glutámico E (en la estructura E5K) como a una distancia de  $3 \pm 1$  aminoácidos (en la posición +3) del residuo de lisina K (en la estructura E5K. Debido a la longitud de los dos aminoácidos importantes, el ácido glutámico (E) y la lisina (K), en el epítipo del AcMc A, la distancia exacta fijada entre estos aminoácidos no es necesariamente para la actividad inmunorreguladora de estos fragmentos. Por lo tanto, una secuencia de E3-7K puede tener una actividad inmunorreguladora similar a la de la secuencia E5K (Tablas 4 A y B).

**Tabla 3. Secuencias de los péptidos que rodean las estructuras E5K y E6K seleccionadas para la síntesis de los péptidos para la prueba de actividad inmunológica. Un péptido con la estructura E6K está incluido en la tabla (secuencia 2).**

Secuencia 1	Residuo 062-078	D	H	V	K	L	V	N	E	V	T	E	F	A	K	T	C	V	A
Masa MH+ (m/z)	1149,67					L	V	N	E	V	T	E	F	A	K				
Motivo E5K									E	V	T	E	F	A	K				
Péptido sintetizado	2604				K	L	V	N	E	V	T	E	F	A	K	T			

5

Secuencia 2	Residuo 103-124	T	L	R	E	T	Y	G	E	M	A	D	C	C	A	K	Q	E	P	E	R	N	E	
Masa MH+ (m/z)	1434,65				E	T	Y	G	E	M	A	D	C	C	A	K								
Motivo E5K									E	M	A	D	C	C	A	K								
Péptido sintetizado	2607								E	M	A	D	C	C	A	K	Q	E	P	E				

Secuencia 3	Residuo 151-171	F	H	D	N	E	E	T	F	L	K	K	Y	L	Y	E	I	A	R	R	H	P	
Masa MH+ (m/z)	927,55												Y	L	Y	E	I	A	R				
Motivo E5K						E	E	T	F	L	K	K											
Péptido sintetizado	2605				N	E	E	T	F	L	K	K	Y	L	Y	E							

Secuencia 4	Residuo 202-219	L	L	P	K	L	D	E	L	R	D	E	G	K	A	S	S	A	K
Masa MH+ (m/z)	1074,63					L	D	E	L	R	D	E	G	K					
Motivo E5K							E	L	R	D	E	G	K						
Péptido sintetizado	2606				K	L	D	E	L	R	D	E	G	K	A	S			

Secuencia 5	Residuo 414-437	Q	N	C	E	L	F	E	Q	L	G	E	Y	K	F	Q	N	A	L	L	V	R	Y	T	K
Masa MH+ (m/z)	960,62														F	Q	N	A	L	L	V	R			
Motivo E5K							E	Q	L	G	E	Y	K												
Péptido sintetizado	2608				E	L	F	E	Q	L	G	E	Y	K	F										

10 Se sintetizaron cinco de estos péptidos (Tabla 3) y se han investigado sus funciones inmunorreguladoras. Tomando como base estos estudios, se postuló que ambas secuencias de péptidos tanto estimulantes como inhibidoras están presentes en la albúmina sérica.

**Conclusión - cartografiado de los epítomos mediante una MALDI-TOF MS**

15

*Se ha identificado el epítomo del AcMc A como la estructura E5-6K*

La estructura biológicamente relevante es por lo tanto la E3-7K, posiblemente con residuos de aminoácidos ácidos adicionales en las posiciones -12 y +3. Tomados conjuntamente, estos resultados indican que el AcMc A puede unirse a múltiples regiones de la molécula de la albúmina. Dado que los experimentos se llevaron a cabo con albúmina desnaturalizada, estos epítomos probablemente no son sitios generados por la combinación de residuos cuando se pliega la molécula.

20

*Actividad de unión de los péptidos E5K - inhibición de la unión del AcMc A a la dHSA*

25

Con objeto de probar la especificidad de los péptidos sintetizados, se probaron en un ELISA en el que se ha analizado la inhibición de la unión del AcMc A a placas recubiertas con dHSA. Una elevada afinidad del anticuerpo por la placa es por lo tanto coherente con ninguna actividad inhibidora, y esta unión se reduce cuando se añade una sustancia inhibidora al sistema. Según se muestra en la Fig. 1, cuatro de los cinco péptidos mostraron una inhibición dependiente de la dosis del anticuerpo en las placas recubiertas con dHSA, confirmando que contienen una estructura que reacciona con el anticuerpo.

30

*Expresión del epítipo E5K en células tumorales - correlación con la supervivencia*

Previamente se ha demostrado, mediante el uso de una tinción inmunohistoquímica con el AcMc A, que el epítipo / la estructura E5K es expresada por varios tipos de células cancerosas (documento WO 06/043891). Se tiñó una serie de 20 biopsias de pacientes con melanoma mediante el uso de esta técnica, y la intensidad de la tinción se puntuó desde + hasta +++ mediante el uso de un microscopio óptico. Se observó una considerable variación en la intensidad de la tinción. Tomando como base las áreas de las secciones teñidas con más intensidad, los pacientes se clasificaron desde altos hasta bajos expresores de E5K. Después se dividió el número de pacientes en dos grupos iguales, altos y bajos expresores, y se analizó la posible diferencia en la supervivencia entre estos grupos según unos análisis de Kaplan Meyer y de rangos logarítmicos. Según se muestra en la Fig. 2 se ha encontrado una diferencia estadísticamente muy significativa en la supervivencia entre los expresores altos y bajos.

*Actividad inmunomoduladora de los péptidos E5K**Efecto de los péptidos sobre la proliferación inducida por la PHA de las PBMC*

Se probó el efecto de dos péptidos de la albúmina, el 2605 y el 2608, sobre la proliferación inducida por la PHA de las PBMC de un paciente sano de control y de dos pacientes con cáncer. Según se muestra en las Figuras 3 A y B, el patrón de respuesta es bastante diferente entre los individuos, debido probablemente al grado de estimulación inmunitaria de las PBMC *in vivo* y posiblemente debido también a la aparición de autoanticuerpos contra las neoestructuras representadas por los péptidos. La importancia del grado de estimulación inmunitaria está demostrada por la comparación del efecto de los péptidos cuando las PBMC son estimuladas con 5 o con 10  $\mu\text{g/ml}$  de PHA (compárense las Fig. 3 A y B). Además de las diferencias interindividuales, también se encontró un patrón de respuesta bifásico, por ejemplo, mediante el uso del péptido 2605 con las PBMC de K92, la concentración más baja era inhibitoria, la concentración intermedia estimulante, y de nuevo a la mayor concentración, se inhibió la respuesta proliferativa. También es interesante apreciar que se encontró una clara actividad estimuladora con la concentración más baja de ambos péptidos en el paciente P46. También hay algunas diferencias en la actividad de los dos péptidos probados, especialmente cuando las PBMC son estimuladas con PHA a una concentración de  $\mu\text{g/ml}$ . Cuando se usa una concentración de PHA de 10  $\mu\text{g/ml}$ , la actividad de los dos péptidos es similar. El modelo de cultivo con el medio grado de estimulación es, por supuesto, más sensible a la variación en la estructura de unión del receptor. Este ejemplo demuestra por lo tanto que, una vez demostrada una secuencia de péptidos biológicamente activa, los cambios en la secuencia de aminoácidos pueden modular su actividad biológica.

Para analizar adicionalmente las diferencias interindividuales en el efecto de estos péptidos, se analizaron las PBMC de 5 controles sanos y de 4 pacientes (Fig. 4). La PHA se usó a una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  y los péptidos a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ . De nuevo se demostró una clara diferencia entre los individuos. El péptido 2605 tenía unos efectos inhibitorios o estimuladores en uno de cada control y en uno de cada paciente. El péptido 2608 tenía un efecto estimulador en 1/4 de los controles, mientras que 3/4 de los pacientes eran estimulados.

*Efecto de la dHSA sobre la proliferación inducida por la PHA de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)*

El efecto de la dHSA sobre la proliferación inducida por la PHA de las PBMC de controles sanos y de pacientes con cáncer es bastante variable (Fig. 5). De nuevo, esto puede ser debido al grado de estimulación de las PBMC *in vivo* y posiblemente también a la presencia de autoanticuerpos contra la dHSA. La adición de la dHSA a estos cultivos puede dar como resultado tanto una estimulación como una inhibición de la tasa proliferativa, pero frecuentemente dio como resultado la estimulación de la tasa proliferativa. Es apreciable que un control no respondió en absoluto, y esta persona tampoco respondió a una mayor concentración de PHA. En un paciente (P41), la adición de dHSA inhibió la proliferación, especialmente a una concentración de PHA de 10  $\mu\text{g/ml}$ . La variación en la respuesta entre los pacientes demostró la necesidad del diagnóstico del estado inmunitario individual en los pacientes con cáncer.

*Efecto de los péptidos sobre la proliferación de las PBMC modulada por la dHSA inducida por la PHA*

A continuación se analizó el efecto de los diferentes péptidos, el 2605 o el 2608, sobre la proliferación potenciada por la dHSA inducida por la PHA. Según se muestra en las Figuras 6 A y B, la adición de dHSA a una concentración de 8  $\mu\text{g/ml}$  aumenta significativamente la tasa proliferativa de las PBMC estimuladas con la PHA procedentes de dos controles sanos diferentes. A las concentraciones más bajas de dHSA, el efecto estimulador disminuyó. De forma interesante, la adición de los péptidos a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  inhibió significativamente la actividad estimulante de las dos concentraciones más altas de dHSA, mientras que a las concentraciones más bajas, los péptidos, por el contrario, estimularon la tasa proliferativa. Por lo tanto, el efecto estimulador de la dHSA a 8  $\mu\text{g/ml}$  fue inhibido mediante la adición de los péptidos, pero la misma concentración de los péptidos estimuló la tasa proliferativa a una concentración más baja de dHSA. De forma razonable, la reticulación del receptor E5K está implicada en la actividad estimuladora de la dHSA, ya que la unión monomérica de los péptidos a este receptor inhibe el efecto estimulador de la dHSA. La misma concentración de los péptidos tenía entonces una actividad bastante diferente en presencia de diferentes concentraciones de dHSA, a 0,8  $\mu\text{g/ml}$  todavía hay una ligera actividad inhibitoria, mientras que a las concentraciones bajas de dHSA la tasa proliferativa está significativamente mejorada. Una explicación razonable para esto es que la actividad estimuladora de los péptidos está bloqueada por una neo-

estructura inhibidora de la albúmina a una concentración de la dHSA de 8 µg/ml.

*Efecto de los péptidos sobre la producción de monocinas por parte de las PBMC*

5 El efecto de los péptidos de la albúmina, 2604-2608, sobre la producción de IL-6 inducida por LPS se muestra en la Figura 7 A-C. De nuevo, se observan unas considerables diferencias interindividuales en la actividad de los péptidos. En el análisis de las PBMC de un control sano, el péptido 2604 era estimulador a la concentración más baja, mientras que los péptidos 2606 y 2608 a esta concentración eran inhibidores (Fig. 7A). La actividad también variaba entre los dos pacientes con melanoma, pero en uno de estos pacientes todos los péptidos tuvieron una actividad estimuladora (Fig. 7C).

Por lo tanto, los cinco péptidos tienen una actividad inmunomoduladora, pero el efecto varía dependiendo del estado inmunitario del individuo investigado.

15 *Efecto de los péptidos de la albúmina sobre la tinción inmunohistoquímica de las PBMC mediante el uso de un anticuerpo anti-integrina*

Se estudió adicionalmente la importancia inmunobiológica de las secuencias de aminoácidos de la albúmina mediante el análisis de su influencia sobre la unión de un anticuerpo monoclonal a la LFA-1 de la integrina β<sub>2</sub> (CD11 a) en células inmunitarias (Fig. 8 A-F). Se eligió esta molécula para estos experimentos ya que se sabe que la unión de ciertos AcMc a esta molécula puede modular / inhibir de forma importante funciones del sistema inmunitario. Se ha demostrado que el anticuerpo en particular elegido para estos experimentos inhibe la unión del LFA-1 a la ICAM-1 y a la ICAM-3.

25 Se prepararon preparaciones en un Cytospin de células mononucleares sanguíneas de controles sanos, de pacientes con cáncer y de una línea celular monocítica, la THP-1 (según se describe en materiales y métodos), se secaron y se almacenaron a -70 °C. En la tinción inmunocitológica, la tinción no específica fue bloqueada mediante la incubación con suero AB humano al 10 %. Algunos de los portaobjetos fueron incubados previamente durante 60 minutos con péptidos de albúmina a una concentración de 40 µg/ml, a esto se añadió suero AB al 10 %, según se indica en la Figura 8 A-F. El procedimiento de tinción se continuó después según se describe en materiales y métodos. La intensidad de la tinción de los portaobjetos teñidos con y sin una incubación previa con los péptidos se registró semicuantitativamente mediante el uso de un microscopio óptico estándar.

35 Según se muestra en la Figura 8 A-F, la unión del AcMc al LFA-1 puede ser inhibida mediante una incubación previa con los péptidos. Según se ha mencionado en otras secciones de este documento, el estado inmunitario del donante de las células sanguíneas podría afectar al resultado de los análisis inmunológicos. Consecuentemente, la susceptibilidad a la tinción de las PBMC de algunos donantes parece no verse afectada por la incubación previa con los péptidos, y en unos pocos casos con una baja susceptibilidad inicial a la tinción incluso cuando se observó una tinción potenciada. La unión del AcMc al LFA-1 de la línea celular monocítica THP-1 estaba claramente potenciada mediante la incubación previa con el péptido 2606 (Fig. 8 A, B). Estos resultados muestran claramente que la estructura de E5K interactúa con la integrina β<sub>2</sub> D de una forma que es importante para la función del sistema inmunitario.

45 *Unión de los péptidos generados mediante la tripsinización de la dHSA por parte de los receptores de la superficie celular*

Tomando como base la observación de que hay presentes secuencias inmunorreguladoras de péptidos en la albúmina sérica, existe la posibilidad de que otras secuencias distintas al epítipo del AcMc A tengan una función inmunorreguladora. Por lo tanto, se preparó una superficie celular artificial (ACS) según se describe en materiales y métodos. La mezcla de péptidos obtenida después de la tripsinización se adsorbió en la ACS, y los péptidos de unión fueron identificados mediante la comparación de las soluciones de péptidos adsorbidos y no adsorbidos mediante el uso de la técnica de MALDI TOF ms. Estos péptidos se muestran en la Tabla 5 A.

55 **Tabla 5 A. Péptidos generados mediante la degradación con tripsina de la dHSA y el grado de adsorción a los receptores de la ACS. Los aminoácidos entre paréntesis muestran el punto de escisión de la proteasa, y no están incluidos en estas masas identificadas.**

Péptidos adsorbidos en la ACS			Péptidos E5K sintetizados		
Porcentaje adsorbido	Secuencia	Inicio Fin	Péptido E5K	Secuencia	Inicio Fin
0,71	(K)KYLYEIAR ( R )	161-168	2605	NEETFLKKYLYE	153-168
0,64	(K)KVPQVSTPTLVEVSR (N)	438-452			
0,60	(K)VFDEFKPLVEEPQNLIK (Q)	397-413			
0,59	(K)VPQVSTPTLVEVSR (N)	439-452			

Péptidos adsorbidos en la ACS			Péptidos E5K sintetizados		
Porcentaje adsorbido	Secuencia	Inicio Fin	Péptido E5K	Secuencia	Inicio Fin
0,42	(R)RPCFSALEVDETYVPK (E)	509-524			
0,41	(K)FQNALLVR (Y)	427-434			
0,36	(K)SLHTLFGDK (L)	89-97			
0,36	(K)LKECCEKPLEK (S)	299-310			
0,35	(K)LCTVATLR (E)	98-105			
0,34	(K)YLYEIAR ( R )	162-168	2605	NEETFLKKYLYE	153-168
0,32	(K)CCAAADPH ECYAK (V)	384-396			
0,29	(K)AAFTECCQAADK (A)	187-198			
0,26	(K)CCTESLVNR ( R )	500-508			
0,26	(K)QEPERNECFLQHK (D)	118-130	2607	EMADCCAKQEPE	110-122
0,23	(K)AVMDDFAAFVEK ( C )	570-581			
0,22	(R)NECFLQHK (D)	123-130			
0,20	(K)QNCELFEQLGEYK (F)	414-426	2608	ELFEQLGEYKF	417-427
0,18	(K)QEPERNECFLQHK (D)	118-130	2607	EMADCCAKQEPE	110-122
0,13	(K)VHTECCHGDLLECADDR (A)	265-281			
0,08	(R)FKDLGEENFK (A)	35-44			
0,03	(K)YICENQDSISSK (L)	287-298			
0,02	(K)LDEL RDEGK (A)	206-214	2606	KLDEL RDEGKAS	205-217
0,01	(K)DDNP NLPR (L)	131-138			
-0,02	(K)LVN EVTEFAK (T)	66-75	2604	KLVNEVTEFAKT	65-76
-0,08	(R)ETYGEMADCCAK (Q)	106-117			
-0,37	(R)YKAAFTECCQAADK (A)	185-198			

Tomando como base su grado de unión y su relación espacial con las estructuras E5K de la albúmina, se seleccionaron cuatro nuevos péptidos para ser sintetizados e investigar su actividad inmunorreguladora (Tabla 5 B).

##### 5 Tabla 5 B.

Péptidos adsorbidos en la ACS				Péptidos de la albúmina sintetizados		
Porcentaje Adsorbido	Secuencia	Inicio	Fin	Péptido	Secuencia	Inicio Fin
0,71	(K)KYLEIAR ( R )	161	168	3026	NEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP	153-176
0,64	(K)KVPQVSTPTLVEVSR (N)	438	452	3029	KVPQVSTPTLVEVSR	438-452
0,60	(K)VFDEFKPLVEEPQNLIK (Q)	397	413	3028	VFDEFKPLVEEPQNLIK	397-413
0,20	(K)QNCELFEQLGEYK (F)	414	426	3027	ELFEQLGEYKFQNALLVR	417-434
Péptido de E5K relacionado 2605 (3026)					NEETFLKKYLYE	153-168
Péptido de E5K relacionado 2608 (3027)					<b>ELFEQLGEYKF</b>	417-427

##### Actividad inmunorreguladora de los péptidos generados por la tripsina

##### 10 Efecto de los péptidos sobre la proliferación de las PBMC inducida por la PHA modulada por la dHSA

Se probaron dos de los péptidos de las nuevas series, el 3026 y el 3028, y se compararon con el péptido 2605 en un análisis de su efecto sobre la proliferación estimulada por la PHA modulada por la dHSA (Fig. 9). La proliferación inducida por la PHA de las PBMC de dos controles sanos fue adicionalmente estimulada por la dHSA. Según se muestra en la Figura 9, todos los péptidos eran inhibidores de la actividad estimuladora de la dHSA a las dos concentraciones usadas de PHA. También en este experimento, el grado de estimulación de las PBMC tiene un impacto sobre los resultados.

##### 15

*Efecto de los péptidos sobre la proliferación de las PBMC inducida por la interleucina-2*

También se probó el efecto de los péptidos de la nueva serie 3026-3029 sobre la proliferación inducida por la IL-2. Según se muestra en la Figura 10 A, 3/4 de los péptidos, el 3026, el 3027 y el 3029, no tuvo ninguna actividad estadísticamente significativa. Por el contrario, el péptido 3028 era muy inhibidor ( $p = 0,005$ ). Es interesante apreciar que este efecto inhibidor era completamente revertido por la modulación de la reticulación del receptor Fc (Figura 10 B) de forma similar a la situación descrita previamente para la inmunosupresión relacionada con la IL-2 en el carcinoma de células renales (documento WO 03/099312 A1).

*Efecto de la nueva serie de péptidos sobre la producción de monocinas por parte de las PBMC*

El efecto de la nueva serie de péptidos mostró una diferencia considerable en el efecto incluso entre los individuos sanos de control (Figura 11). El péptido 3026 no tenía ningún efecto en concreto en uno de los controles (PBMC 2), pero tenía un claro efecto bifásico en el otro (PBMC 1). En el último caso, la producción de IL-6 fue estimulada a las tres concentraciones más altas, y fue claramente inhibida a la concentración más baja. El péptido 3027 era ligeramente estimulador en uno de los controles y tenía un efecto inhibidor en el otro. También se encontraron unos resultados similares con el péptido 3028. El péptido 3029 tenía un ligero efecto estimulador únicamente en uno de los controles, a las dos concentraciones más altas. Es interesante apreciar que todos los péptidos excepto el 3029 tenían un efecto inmunomodulador a una concentración tan baja como de 10 ng/ml. Por lo tanto, todos los péptidos tenían un efecto en al menos uno de los controles analizados.

De forma similar al efecto de la nueva serie de péptidos sobre las PBMC de los controles sanos, también las PBMC de los pacientes con cáncer mostraron unas considerables diferencias interindividuales (Figura 12). Ambos péptidos 3026 y 3027 tenían un efecto estimulador en el paciente con carcinoma de células renales, y además el péptido 3027 también estimulaba en uno de los pacientes con melanoma. Los otros dos péptidos, el 3028 y el 3029, no tenían esencialmente ningún efecto en estas pruebas. Al contrario que la situación con los controles, no se observaron efectos inhibidores.

*Unión de los péptidos generados por la degradación con asparraginasa de la dHSA por parte de los receptores de la superficie celular*

La secuencia de péptidos completa de la albúmina no es recuperada mediante el uso de la técnica de MALDI-TOF después de una degradación con tripsina. Además, algunas secuencias con la capacidad de unirse a los receptores de la superficie celular de las células inmunitarias podrían haber sido degradadas por el tratamiento con tripsina. Por lo tanto, se usó el mismo procedimiento experimental al que se ha descrito anteriormente también para una mezcla de péptidos obtenida mediante una degradación mediante el uso de asparraginasa. Los péptidos de unión a la ACS resultante se muestran en las Tablas 6 A y B.

Además de los péptidos generados por la degradación con tripsina, se encontraron otros seis péptidos con un peso molecular de 700 - 3.600 Da eficazmente adsorbidos ( $> 65\%$ ) por las estructuras de la superficie celular de la columna ACS (Tabla 6A)

**Tabla 6 A. ASP-DHSA adsorbida en ACS**

Porcentaje adsorbido	Secuencia	Inicio Fin
1,00	DHVKLVNEVTEFAKTCVA	62-79
1,00	DDKETCFEEGKKLVAASQAALGL	586-609
0,87	DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEV	495-517 <sub>10</sub>
0,86	DETYVPKEFNAETFTHA	518-535
0,65	DSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEN	293-319
0,65	DKLCTVATLRETYGEM	96-112

Se encontró que siete péptidos con un peso molecular de entre 3.200 y 9.000 Da eran completamente adsorbidos por la ACS, y para uno de los péptidos de este grupo, se unió en un 37 %. En este análisis, otros 9 péptidos no eran unidos en absoluto por la ACS.

**Tabla 6 B. ASP-DHSA adsorbida en ACS**

Porcentaje adsorbido	Secuencia	Inicio Fin
1,00	YSVVLL LRLAKTYETT LEKCCAAADP HECYAKVF	364-398
1,00	KLCT VATLRETYGE MA DCCAQEP ERNECFLQHK	96-130
1,00	ICTLSEKERQIKKQ TALVELVKHK PKATKEQLKA VM	536-572
1,00	LAKYICE NQDSISSKLEK ECCEKPLLEK SHCIAEVEN	283-319
1,00	VF LGMFLYEYAR RHPDYSVLL LRLAKTYETT LEKCCAAA	348-388
1,00	LGE ENFKALVIA FAQYLQQCPF EDHVKLVNEV TEFAKTCVA	37-79
1,00	RVTKC CTESLVNRRP CFSALEV DET YVPKEFNAET FTFHA	495-535
0,37	YLSWLNQLCVLHEK TPVS DRVTKC CTESLVNRRP CFSALEV	475-517

5 Dos péptidos de este grupo no se unieron en absoluto, y para un péptido (SISLKLKECCEKPLLEK SHCIAEVEN DEMPA) se obtuvieron unos resultados contradictorios con respecto a la adsorción por parte de la ACS.

10 Por lo tanto, el tratamiento con asparraginasa genera secuencias de péptidos distintas a las generadas por la tripsina, que se unen eficazmente a las estructuras de la superficie celular de las células inmunitarias. Tomando como base los resultados descritos anteriormente, es muy probable que estas estructuras tengan una actividad inmunomoduladora.

*Aparición de fragmentos de unión a la ACS en la IgG de pacientes con cáncer*

15 Con objeto de identificar adicionalmente la aparición de estructuras de unión a las células inmunitarias *in vivo*, se preparó plasma sanguíneo y se llevó a cabo una cromatografía de afinidad como se ha descrito anteriormente. Las sustancias unidas por la columna de ACS se eluyeron, se fraccionaron en una electroforesis en gel bidimensional y se identificaron mediante el uso de la técnica de MALDI TOF. Como se esperaba, se identificaron las áreas del gel bidimensional correspondientes a la albúmina y a las inmunoglobulinas. Además, también se identificaron otras sustancias de unión a las células inmunitarias (Fig. 13). La unión de algunas variedades de albúmina, probablemente albúmina dañada portadora de cambios conformacionales, a las células inmunitarias, había sido descrita previamente por varios grupos. Las nuevas estructuras de unión a las células inmunitarias encontradas en esta investigación se resumen en la Tabla 7.

**Tabla 7. Proteínas identificadas mediante la MALDI-TOF ms.**

25

1.	Región variable de la cadena pesada de la IgA	Acc. #: 3004672
2.	Regiones de unión y variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina	Acc. #: 2198477
3.	Cadena pesada de la inmunoglobulina	Acc. #: 1669777
	Región V de la cadena pesada de la Ig (clon LUNmO3)	Acc. #: 484974
4.	Proteína que contiene el dominio SERTA 2 (TRIP-Br2)	Acc. #: Q14140
5.	Región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina	Acc. #: 42632530

Por lo tanto, además de la albúmina sérica, también otras proteínas naturales son sustratos para la generación de fragmentos inmunorreguladores.

30 Por lo tanto, puede concluirse, y se demuestra claramente en la presente solicitud de patente, que las secuencias de las proteínas naturales tales como la albúmina sérica y la IgG, se unen a los receptores de la superficie celular de las células inmunitarias y tienen una actividad inmunorreguladora. Se han identificado ambas secuencias estimuladoras e inhibitoras. Además, se encontró que la reticulación de los receptores de las células inmunitarias era un mecanismo mediante el cual puede modularse la función de estas células.

35

*Modelo ex vivo humano para la evaluación de la inmunosupresión en pacientes con cáncer*

40 La IL-2 tiene una importancia fundamental para el inicio y la estimulación de una respuesta inmunitaria, y la actividad de esta citocina está a menudo inhibida en la inmunosupresión relacionada con el cáncer. Por lo tanto, se estableció un modelo *ex vivo* humano para la inmunosupresión en pacientes con cáncer (Fig. 14 y 15) para la evaluación de posibles péptidos inmunorreguladores inhibitoras.

En este modelo se demostró que la respuesta a la IL-2 se correlacionaba con la supervivencia global de los pacientes (Fig. 15). La inmunosupresión en este modelo *ex vivo* humano está mediada por factores séricos, ya que

la capacidad proliferativa de las PBMC procedentes de controles sanos está significativamente inhibida si estas células se cultivan con sueros de pacientes con cáncer en el medio (Fig.16).

#### *Identificación de péptidos inmunorreguladores adicionales*

5 Se usaron columnas de superficie celular artificial (ACS) con objeto de identificar las secuencias de los péptidos de la unión de la albúmina a los receptores de la superficie de las células inmunitarias. Después de la biotilación, dichos receptores se unieron a microesferas de estreptavidina. Los péptidos que se unían a dichas columnas fueron identificados después de la elución mediante la técnica de MALDI-TOF. Tomando como base estos resultados y su  
10 relación con los péptidos de la albúmina identificados previamente, se sintetizaron cinco péptidos. Su actividad inmunorreguladora se probó principalmente en la respuesta a la IL-2.

15 Se analizó el efecto de diferentes péptidos sobre la proliferación inducida por la IL-2 en el modelo *ex vivo* humano. El péptido 3028 inhibe de forma regular la proliferación inducida por la IL-2, pero ninguno de los otros péptidos identificados por su unión a la superficie celular artificial tenía ninguna actividad inhibidora (Fig. 17). Dado que la parte C-terminal del péptido 3028 contiene una estructura inmunorreguladora identificada previamente, la E5K, también se probó el efecto de cinco péptidos que contienen esta estructura sobre la proliferación inducida por la IL-2, pero éstos solo mostraron una actividad inhibidora mínima, o ninguna actividad.

20 La actividad inhibidora del péptido 3028 sobre la proliferación inducida por la IL-2 también puede demostrarse en cultivos con PBMC de pacientes con cáncer, incluso si la respuesta a la IL-2 ya había sido suprimida (Fig. 18). Dado que la inmunosupresión en el cáncer está caracterizada por una baja respuesta a la IL-2, la inhibición de la actividad de esta neo-estructura de la albúmina en pacientes con cáncer tiene una gran capacidad para superar la inmunosupresión relacionada con el cáncer. El péptido inhibe uno de los mecanismos fundamentales de inicio y de  
25 regulación por aumento de una respuesta inmunitaria, por lo tanto será más probable que sea de gran valor en la regulación por disminución de la actividad inmunitaria en las enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes.

#### *Caracterización adicional del efecto del péptido 3028 sobre la proliferación inducida por la IL*

30 Dado que previamente se ha encontrado que ciertas neo-estructuras de la albúmina tienen una actividad inmunorreguladora, y la parte C-terminal del péptido 3028 tiene una estructura similar, se sintetizaron las partes C y N terminales del péptido 3028 y se analizaron por separado y en combinación. Obviamente, la actividad inhibidora de las dos partes del péptido 3028 es mucho más débil (Fig. 19).

#### *Caracterización de un antisuero de conejo y de anticuerpos de conejo purificados por afinidad dirigidos contra el péptido 3028*

35 Los antisueros de conejo dirigidos contra el péptido de la albúmina 3028 se unen a la dHSA, y en menor grado a la kHSA. Se probaron dos antisueros, R y L, procedentes de dos conejos diferentes. Estos anticuerpos séricos se unen preferentemente al fragmento 3325 pero no al 3218 de 3028. También se obtuvieron unos resultados similares con los anticuerpos purificados por afinidad (véase la figura 21).

#### *Efecto inmunomodulador de los anticuerpos de conejo purificados por afinidad dirigidos contra el péptido 3028*

45 Según se muestra en la Figura 22, la inhibición de la respuesta proliferativa a la IL-2 fue superada en pacientes con cáncer inmunodeprimidos (Fig. 22A) y en los controles normales con la regulación por disminución de la reactividad inmunitaria (Fig. 22 B) que tiene un índice proliferativo menor de 100.000 dpm en el modelo *ex vivo* humano. Los anticuerpos anti-3028 no tuvieron ningún efecto cuando la tasa proliferativa está en el intervalo normal.

50 Se añadió IgG policlonal de conejo a cultivos de control con objeto de asegurarse de que el efecto de los anticuerpos purificados por afinidad no era debido a una actividad no específica de la IgG de conejo en este modelo. La IgG de conejo solo tuvo una actividad mínima. La especificidad de los anticuerpos anti-3028 fue demostrada adicionalmente ya que el efecto estimulador de estos anticuerpos fue neutralizado por una pequeña cantidad de péptido 3028 que no tiene ninguna actividad inhibidora *per se*. Además, la adsorción de los sueros de inhibidores por parte del gel al  
55 que se habían unido los anticuerpos anti-3028 redujo la actividad inhibidora de dichos sueros.

De forma similar a los resultados con el modelo *ex vivo* autólogo, la actividad inmunosupresora de los sueros procedentes de personas con una baja respuesta proliferativa a la IL-2 fue superada mediante la adición a los cultivos de los anticuerpos anti-3028.

#### *Unión de los anticuerpos anti-3028 a / Expresión del epítipo 3028 en / tumores malignos*

60 Las estructuras a las que se unen los anticuerpos anti-3028 son ampliamente expresadas en los tumores malignos humanos, por ejemplo, en el melanoma maligno, en el carcinoma de células renales y en el cáncer colorrectal  
65 (véase la figura 23).

**El receptor del péptido 3028:***Unión del 3028 al LFA-1*

5 De una forma similar a los resultados descritos anteriormente para los sueros de los pacientes con cáncer y los péptidos inmunorreguladores identificados previamente, el péptido 3028 tiene la capacidad de modular la unión del anticuerpo LFA-1 (HI 111) al LFA-1 de las células mononucleares sanguíneas. Tanto la inhibición (Fig. 24) como la potenciación de la unión han sido demostradas, dependiendo razonablemente de la estructura del LFA-1 (forma activada o inactivada) cuando se prepararon las preparaciones de las células con el cytospin. También se ha  
10 demostrado que las partes C y N terminales de este péptido tienen una cierta actividad inhibitoria (Fig. 24).

De acuerdo con estos resultados y con el efecto del péptido 3028 sobre la proliferación inducida por la IL-2, es de bastante interés apreciar que el anticuerpo anti-LFA-1 usado en estos experimentos es un potente inhibidor de la proliferación inducida por la IL-2. Unos resultados similares han sido publicados previamente por Vyth-Dreese et al.  
15 (1993).

*Unión del 3028 a la cadena  $\alpha$  (CD25) del receptor de la IL-2*

Dado que el péptido 3028 inhibe significativamente la respuesta proliferativa a la IL-2, se comparó la secuencia de aminoácidos de este péptido con la de la IL-2 y se encontraron ciertas similitudes en el sitio de unión al receptor de la IL-2 (Tabla 8).  
20

**Tabla 8. Homologías entre la secuencia de aminoácidos del péptido de la albúmina 3028 y un segmento de la interleucina humana 2, que participa en la interacción de la interleucina-2 con el receptor alfa de la interleucina-2 (CD25).**  
25

Péptido 3028: V F D E F K P L V E E P Q N L I K  
IL-2 humana: E L K P L E E  
(a.a. 61-72)  
30

Tomando como base esta observación, se estudió el efecto del péptido 3028 en la unión de la IL-2 a los CD25. La proteína de fusión de CD25 y la parte Fc de la IgG se unió a microplacas recubiertas con proteína G / placas de ELISA, y las placas se incubaron IL-2 biotinilada con o sin el péptido 3028 presente. Sorprendentemente, la unión de la IL-2 a los CD25 era potenciada por el péptido 3028, lo que indica una interacción de terceras partes entre la IL-2, los CD25 y el 3028. Incluso si la unión de la IL-2 a los CD25 está potenciada, el ensamblaje apropiado del receptor de alta afinidad y/o la transcripción de señales está bloqueada, ya que el péptido 3028 es un potente inhibidor de la proliferación inducida por la IL-2 (véase más arriba).  
35

Después se demostró, mediante el uso de un modelado molecular asistido por ordenador, que el péptido 3028 se une a los CD25 en el sitio de unión de la IL-2 (Fig. 25). Por lo tanto, puede concluirse que el péptido 3028 tiene una capacidad inmunorreguladora doble mediante la unión tanto al LFA-1 como al receptor de la IL-2.  
40

**El péptido 3028, estructura inmunosupresora óptima:***El péptido inhibidor fisiológico*  
45

Tomando como base los resultados descritos anteriormente (la diferencia en la actividad antiproliferativa de los péptidos 3218 y 3325, la especificidad de la afinidad de los anticuerpos purificados dirigidos contra el 3325 y no contra el péptido 3218, la actividad inmunomoduladora de estos anticuerpos y el efecto de estos péptidos sobre la unión del AcMc anti-LFA-1 a las células inmunitarias), puede concluirse que ninguno de los péptidos menores, el 3218 ni el 3325, son tan eficaces como el péptido completo, el 3028 (Fig. 26). Sin embargo, ambos péptidos inhiben la unión del AcMc HI 111 al LFA-1. Una explicación razonable para esto es que ambos péptidos menores contribuyen a la actividad completa del efecto inhibitorio del péptido 3028. Por lo tanto, es lógico extender el péptido 3325 con los aminoácidos N terminales del péptido 3218. Dado que la extensión C terminal del péptido 3325 es una lisina, sería de bastante interés producir péptidos más largos con objeto de probar la posibilidad de que los péptidos más largos sean incluso más eficaces que el péptido 3028.  
50  
55

Con objeto de mantener la naturaleza fisiológica de este péptido inhibidor, la única modificación pertinente de su estructura es cambiar su longitud, como se ha analizado más arriba.  
60

Este programa clarificará la estructura óptima del péptido 3028 que se va a usar como fármaco inmunosupresor para el tratamiento de afecciones patológicas / enfermedades relacionadas / dependientes de la IL-2, tales como neoplasias de los linfocitos T, rechazo de un aloinjerto de trasplantes de órganos, enfermedad del injerto contra el hospedador (GVH), enfermedades inflamatorias crónicas tales como psoriasis, y algunas enfermedades autoinmunes. El fundamento del uso terapéutico del péptido inmunoinhibidor 3028 en estas afecciones está demostrado por la actividad terapéutica de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los CD25 (el receptor Tac).  
65

**Tabla 9**

3028			
	3325	3218	
<b>PHECYAK</b>	VFDEFKPLVE	<b>EPQNLIK</b>	<b>QNCSELFQ</b>
	Cierta actividad antiproliferativa	Cierta actividad antiproliferativa	
	Unión débil al LFA-1	Unión débil al LFA-1	
	Se une a los anticuerpos purificados por afinidad	No se une a los anticuerpos purificados por afinidad	

**Comentarios sobre el actual mecanismo inmunorregulador**

5 Dado que la inmunosupresión en el cáncer está caracterizada por una mala respuesta a la IL-2, la inhibición de la actividad de esta neo-estructura de la albúmina en pacientes con cáncer tiene una gran capacidad para superar la inmunosupresión relacionada con el cáncer. Este péptido inhibe uno de los mecanismos fundamentales en el inicio la regulación por aumento de una respuesta inmunitaria, y por lo tanto será probablemente de gran valor en la regulación por disminución de la reactividad inmunitaria en las enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes.

10 La estructura inmunorreguladora 3028 descrita en la presente solicitud de patente es generada por un mecanismo fisiológico presente en la inflamación y en el cáncer. Por lo tanto, serán generalmente aplicables unas estrategias terapéuticas basadas en estos objetivos.

15 Tomando como base los datos actuales de que el mecanismo de acción es específico de la especie, por lo tanto no son aplicables los modelos animales análogos. Se obtiene una prueba de viabilidad en un modelo *ex vivo* humano en el que los resultados se correlacionan con la supervivencia global de los pacientes con cáncer

**Anticuerpos específicos para el péptido 3028 de la albúmina para su uso terapéutico**

20 Los anticuerpos, completos o en fragmentos, con especificidad por el 3028, así como por el fragmento divulgado en la SEQ.ID.NO: 80, deberían ser preferentemente humanizados o completamente humanos para las aplicaciones terapéuticas. Dichos anticuerpos pueden ser producidos mediante la utilización de diversas tecnologías establecidas.

25 Para humanizar un anticuerpo monoclonal animal (por ejemplo, de ratón) se usan metodologías recombinantes para injertar las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del ADNc de una inmunoglobulina de un hibridoma derivado de un animal en las regiones correspondientes del ADNc de la inmunoglobulina humana correspondiente. El anticuerpo recombinante resultante puede ser entonces expresado y producido en diversos organismos, por ejemplo, en bacterias o en líneas celulares de mamífero.

30 Los anticuerpos completamente humanos pueden ser obtenidos principalmente a través de tres metodologías diferentes; 1) mediante el rescate de anticuerpos naturales a partir de donantes humanos inmunes a través de la transformación de linfocitos B con el virus de Epstein Barr (EBV) o a través de una clonación mediante una PCR y la expresión en un fago. 2) mediante la inmunización en la producción de hibridomas a partir de ratones transgénicos, que han sido creados con un repertorio de secuencias génicas germinales de inmunoglobulinas humanas. 3) mediante el cribado de colecciones de fagos sintéticos que contienen los genes de la región variable (V-) del anticuerpo humano y la selección de las regiones de unión al antígeno V- a través de la expresión en un fago. A continuación, el anticuerpo seleccionado se clona.

40 Ahora existen múltiples compañías comerciales que desarrollan anticuerpos humanos hacia una proteína/péptido definido con un sistema de pago por servicio. Además, se están desarrollando y produciendo rápidamente nuevas moléculas "de tipo anticuerpo" (por ejemplo, anticálina, afilina, aficuerpos) como potenciales candidatos a fármacos (para una revisión, véase, por ejemplo: Peterson NC. Advances in monoclonal antibody technology: Genetic engineering of mice, cells and immunoglobulins. ILAR Journal, 2005, 46: 314-9.)

**Efecto de los péptidos de la albúmina sobre la actividad citotóxica de los linfocitos citolíticos naturales (NK) procedentes de donantes de sangre sanos**

50 Resultados

Se probó la actividad citotóxica NK de las células mononucleares sanguíneas de cuatro donantes sanos. Según se observa en la figura XX, la presencia del péptido 3028 y en un menor grado, del péptido 3026, redujo el porcentaje de lisis específica de las células objetivo K562 en los cuatro donantes. La inhibición no se observó, sin embargo, en presencia de péptido 3027.

**Materiales y métodos***Preparación de albúmina sérica humana desnaturalizada (dHSA)*

5 Una solución para infusión de albúmina sérica humana (HSA) (Pharmacia, Uppsala, Suecia) se desnaturalizó y se redujo mediante su suspensión a una concentración final de 10 mg/ml en urea 8 M y ditiotreitól 10 mM (ambos de Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) en Tris-HCL 50 mM (a pH 7,9) durante 2 h a 25 °C. Después, la HSA fue alquilada mediante la adición de yodoacetamida 60 mM (Sigma) y se incubó adicionalmente durante 2 h a 25 °C en la oscuridad. La solución de HSA se diluyó hasta una concentración de 100 µg/ml con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco BRL) y se dializó intensamente frente a PBS mediante el uso de tubos de diálisis Spectrapore 4 con un peso molecular de corte de 12.000 (Spectrum Europe, Breda, Holanda). Se preparó HSA de control en paralelo mediante la incubación de la HSA a 10 mg/m en Tris-HCL (a pH 7,9) seguido de una diálisis. Antes de su uso en los experimentos de cultivo tisular, la dHSA se filtró estéril a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm (Millipore Co, MA, EE.UU.). La DHSa se almacenó a 4 °C, o se liofilizó y se almacenó a -20 °C.

*Escisión enzimática de la dHSA con una baja dosis de tripsina*

Se llevó a cabo el intercambio del tampón por NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM, a pH 8, en la HSA desnaturalizada con una filtración en gel en Sephadex-G25 (columnas de desalinización PD-10, Amersham Biosciences Europe, Uppsala, Suecia). El intercambio de proteínas se determinó con un ensayo de proteínas Bio-Rad basado en el procedimiento de unión al colorante de Bradford siguiendo las recomendaciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories AB, Sundbyberg, Suecia). Se añadió tripsina modificada de calidad para secuenciación (Promega, Madison, concentración después del tampón WI) se añadió a una concentración final de 2, de 0,2 o de 0,02 ng/ml a la HSA desnaturalizada (49 µg/ml). Alternativamente, como control, se añadió la cantidad equivalente del tampón de dilución de la tripsina (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 50 mM). La mezcla se incubó a 37 °C durante 18 horas. La actividad de la tripsina se detuvo mediante el paso de la muestra por una columna con inhibidor de tripsina de soja reticulado con agarosa activada por CNBr (Sigma).

*Escisión enzimática completa de la dHSA con una dosis alta de tripsina, seguida de una incubación con el AcMc A para el cartografiado del epítipo*

Se liofilizaron ocho µg de dHSA tratada con una dosis baja de tripsina y después se disolvieron en 16 µl de tripsina modificada de calidad para secuenciación (a 5 µg/ml) (Promega) y se incubaron a 37 °C durante 18 horas. Una porción (10 µl) de los péptidos digeridos con tripsina se hizo reaccionar con el anticuerpo monoclonal (AcMc A) a una concentración final de 0,3 mg/ml durante 2 horas a la temperatura ambiente. Las muestras se almacenaron a 4 °C durante una noche y después se analizaron mediante una MALDI TOF MS (véase a continuación).

*Incubación de la dHSA con el AcMc seguida de una escisión enzimática completa con tripsina para el cartografiado del epítipo*

Se incubó la HSA desnaturalizada tratada con una dosis baja de tripsina (8 µg) en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM, a pH 8, con 8 µg del anticuerpo monoclonal (AcMc A) o con un control de PBS durante 2 horas a 4 °C. También se cultivó en un control paralelo solo por separado que consiste en 8 µg del anticuerpo monoclonal en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM. Las muestras se agitaron vorticalmente brevemente cada 10 min. Después las muestras se secaron inmediatamente durante una noche en un concentrador a vacío SpeedVac (Savant, Farmingdale, NY). Después las muestras se disolvieron en 16 µl de tripsina modificada de calidad para secuenciación a 5 µg/ml (Promega) y se incubaron a 37 °C durante 18 horas. Las muestras se almacenaron a 4 °C durante una noche y después se analizaron mediante una MALDI TOF MS (véase a continuación).

*Incubación del dHSA con el AcMc seguida de una escisión enzimática con tripsina con una ultrafiltración en condiciones ácidas para el cartografiado del epítipo*

Se incubó la HSA desnaturalizada (80 µg) con el AcMc A (10 µg) en PBS durante 18 h a la temperatura ambiente. Para eliminar la dHSA libre, la mezcla de reacción de dHSA-AcMc A se centrifugó durante 5 min a 3.000 rpm en un ultrafiltro Amicon Ultra-15 con un peso molecular de corte de 100.000 Da (Millipore Co., Billerica, MA). El retenido se diluyó en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM y se centrifugó de nuevo como se ha descrito anteriormente. El retenido se transfirió a un tubo de microcentrífuga eppendorf estéril en 0,4 ml de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM y se añadieron 0,4 µg de tripsina modificada de calidad para secuenciación (Promega). La digestión se llevó a cabo a 37 °C durante una noche con una agitación suave. Se eliminaron la tripsina y los fragmentos de albúmina libre (no unidos al anticuerpo) mediante una ultrafiltración con un filtro Amicon Ultra-4 (peso molecular de corte de 30.000 Da, Millipore Co.) durante 5 min a 3.000 rpm. Esto se repitió tres veces. Después, el retenido se transfirió a un nuevo ultrafiltro en el que el AcMc A se disoció de la albúmina unida mediante la adición de 600 µl de glicina-HCl 0,1 M, a pH 2,7, durante 30 min a la temperatura ambiente, tras lo cual el ultrafiltro se centrifugó durante 10 min a 3.000 rpm. El filtrado se transfirió a un tubo de microcentrífuga eppendorf estéril y se neutralizó con Tris-HCl, a pH 9. Después, la muestra se secó inmediatamente durante una noche en un concentrador a vacío SpeedVac. Después las muestras se disolvieron en 16 µl de tripsina modificada de calidad para secuenciación (a 5 µg/ml) (Promega) y se incubaron a 37 °C durante 18

horas. Se usaron puntas de pipeta Zip Tip (Millipore) que contienen medio para cromatografía  $C_8$  para desalinizar la muestra antes de que fuera analizada mediante la MALDI TOF ms (véase a continuación).

#### *Espectrometría de masas MALDI TOF*

- 5 Se mezcló 1  $\mu$ l de cada muestra de la digestión con tripsina con 1  $\mu$ l de una solución saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (0,02 mg/ml) en acetonitrilo al 70 % / ácido trifluoroacético al 0,3 %. Se punteó 1  $\mu$ l de esa mezcla en la placa objetivo de acero inoxidable y se analizó mediante el uso de una MALDI-TOF ms (Voyager-DE PRO, Applied Biosystems, CA, Estados Unidos) equipada con un láser de  $N_2$  a 337 nm.
- 10 Las búsquedas de las bases de datos para las masas correspondientes a la albúmina sérica humana en los espectros resultantes se llevaron a cabo en el NCBI o SwissProt con el motor de búsqueda MS-Fit.

#### *Péptidos de la albúmina*

- 15 Todos los péptidos sintéticos de la albúmina usados en el presente documento fueron preparados a medida por CSBio Co, Menlo Park, CA. Los péptidos tenían una pureza > 95 % según se confirmó mediante una HPLC. Los péptidos se mantuvieron liofilizados a menos 20 °C. Los péptidos fueron reconstituidos con  $H_2O$  estéril (Sigma) para su uso en un ELISA, o en RPMI1640 (GIBCO) para su uso en los experimentos de cultivo celular. Los péptidos se filtraron estériles a través de un filtro de jeringa de 0,22  $\mu$ m (Millipore Co) antes de su uso en los experimentos de cultivo celular.
- 20

- ELISA del anti-dHSA, incubación conjunta del AcMc A anti-dHSA con péptidos sintéticos de albúmina  
Los pocillos duplicados en placas de microtitulación Hi-binding (Costar 2592, Corning Inc, NY, Estados Unidos) se recubrieron con 100  $\mu$ l de dHSA diluida en PBS a 4,5  $\mu$ g/ml y se incubaron a la temperatura ambiente durante una  
25 noche. Después los pocillos se lavaron con tampón de lavado que consiste en Tween-20 al 0,05 % en PBS (Sigma) seguido de un bloqueo durante 1 h a 25 °C con 200  $\mu$ l de gelatina al 0,5 % preparada a partir de piel bovina (Sigma) en PBS seguido de un lavado con tampón de lavado. El anticuerpo monoclonal AcMc A, diluido en diluyente de reactivo para ELISA (gelatina al 0,01 % y Tween-20 al 0,05 % en solución salina tamponada con Tris 20 mM (TBS, Sigma)) a 4  $\mu$ g/ml se incubó previamente durante 1 h a la temperatura ambiente con las concentraciones indicadas de los péptidos. Después se añadieron 100  $\mu$ l del anticuerpo monoclonal solo, o, como alternativa, el anticuerpo monoclonal mezclado con los péptidos, por pocillo y se incubaron durante 1,5 h a 25 °C seguido de un lavado. Se añadió diluyente de reactivo Envision-HRP (DakoCytomation Norden A/S, Glostrup, Dinamarca) diluido a 1/10 en ELISA y las placas se incubaron durante 15 min a 25 °C seguido de un lavado. Finalmente se añadió la solución de sustrato, que consiste en  $H_2O_2$  y tetrametilbenzidina (R&D Systems Europe, Ltd, Abingdon, Reino Unido). La  
35 reacción se detuvo con  $H_2SO_4$  1 M y se midió la densidad óptica en forma de absorbancia (A) a dos longitudes de onda, a 450 nm y a 570 nm, con un lector de microplacas Multiscan EX (Labsystems).

- Correlación entre la tinción inmunohistológica de las biopsias con un AcMc anti-dHSA (el AcMc A) y la supervivencia en pacientes con melanoma maligno
- 40

- Las biopsias procedentes de los tumores obtenidos a partir de 20 pacientes diagnosticados con un melanoma maligno metastásico se ultracongelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su uso. Se cortaron secciones de tejido congeladas de 6-7  $\mu$ m de grosor, se descongelaron y se fijaron con acetona durante 5 min a la temperatura ambiente. Las secciones se bloquearon en primer lugar con suero AB humano normal al 10 % durante 1 h antes de la tinción. Después se añadió el anticuerpo primario, que consiste en monoclonal de ratón anti-albúmina desnaturalizada humana (AcMc-A) diluido en solución salina tamponada con Tris (TBS, a pH 7,6) a 10  $\mu$ g/ml, y los portaobjetos se incubaron durante 30 min. Los portaobjetos se lavaron con TBS seguido de Envision-fosfatasa alcalina (DakoCytomation) durante 30 min. Después de un lavado adicional con TBS, los portaobjetos se incubaron en el sustrato de fosfatasa alcalina, que consiste en la sal Fast Red TR (Sigma), naftol AS-MX (Sigma) y levamisol 5 mM (Sigma) para bloquear la actividad endógena de la fosfatasa alcalina, durante 20 min, seguido de un lavado con TBS. Se contratiñeron con hematoxilina de Mayer durante 1 minuto y se montaron en Glycergel (Dakopatts). Como control negativo se usó una IgG1 monoclonal de ratón contra un antígeno irrelevante (glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, DakoCytomation). Todas las incubaciones se llevaron a cabo a la temperatura ambiente en una cámara humidificada. La intensidad de la tinción fue evaluada con un microscopio óptico y se clasificó como baja, media o alta. La supervivencia entre los grupos se analizó según unos análisis de Kaplan Meyer y de rangos logarítmicos.
- 55

#### *Aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC)*

- 60 Se extrajo sangre venosa de voluntarios sanos o de pacientes con cáncer en tubos de vidrio a vacío con una solución ácida de dextrosa citrato A como anticoagulante (Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Los eritrocitos se eliminaron mediante una sedimentación en una solución de dextrano T500 al 2 % (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) en NaCl al 0,9 % (esta etapa fue omitida para los cultivos con una estimulación con PHA, véase más abajo). Después, las PBMC se aislaron mediante una centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-paque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia), tras lo cual las células se lavaron dos veces con una modificación de Dutch del RPMI 1640 (Gibco, InVitrogen AB, Estocolmo, Suecia) con
- 65

albúmina sérica humana al 2 % (HSA) (Pharmacia & Upjohn, Estocolmo, Suecia) (RPMI / HSA al 2 %). Para los cultivos con una estimulación con PHA, las PBMC se lavaron con solución salina equilibrada de Hank (HBSS) con un 10 % de plasma autólogo en lugar de con RPMI / HSA al 2 %. La viabilidad celular fue evaluada mediante una exclusión con Trypan Blue al 0,05 %, y fue siempre superior al 95 %. La suspensión celular se tiñó con solución de Türk, y el número de linfocitos y de monocitos en la preparación de PBMC se contó con un hemocitómetro. Las PBMC se suspendieron en RPMI / HSA al 2 % y la concentración de células se ajustó a  $5 \times 10^5$  linfocitos/ml.

#### Suero

Se recogió suero humano en tubos de recolección de suero sin aditivos (Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) al mismo tiempo que las muestras de sangre para el aislamiento de las PBMC. Los sueros fueron inactivados térmicamente a 56 °C durante 30 minutos.

#### *Proliferación inducida por PHA de las PBMC en presencia de péptidos de albúmina y/o de dHSA*

Se resuspendieron PBMC de voluntarios sanos en RPMI1640 con o sin la adición de dHSA y/o de péptidos de albúmina, según se indica, a una concentración celular de  $5 \times 10^5$  linfocitos/ml. Se sembraron 100 µl de la suspensión celular en placas de microtitulación de fondo redondo (Corning, NY, Estados Unidos) seguido de 100 µl de un medio de cultivo que consiste en RPMI 1640 (Flow Laboratories, Irvine, Escocia) complementado con 200 UI/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomina (Flow laboratories) y un 20 % de suero autólogo inactivado por calor. Después se añadió la fitohemaglutinina (PHA-P, Sigma Chemical Co, St.Louis, MO) a una concentración final de 5 o de 10 µg/ml. Todas las condiciones de cultivo se establecieron en pocillos por triplicado. Las células se cultivaron durante 3 días en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. La proliferación se ensayó mediante la incorporación de 1,6 µCi/pocillo de [<sup>3</sup>H]timidina (Amersham International, Reino Unido) durante las últimas 18 h. Para los cálculos se usaron los valores medios de las desintegraciones por minuto (dpm) de los triplicados.

#### *Producción de IL-6 inducida por LPS, efecto de los péptidos*

Se añadieron 100 µl de un medio de cultivo que consiste en RPMI1640 complementado con 200 UI/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomina, L-glutamina 4 mM (Sigma Chemical, MO, Estados Unidos) y un 20 % de suero autólogo reciente inactivado por calor, a placas de microtitulación no recubiertas o recubiertas previamente, seguido de 100 µl de la suspensión de PBMC ( $5 \times 10^4$  linfocitos) en RPMI / HSA al 2 % con los péptidos a las concentraciones indicadas. Se añadió lipopolisacárido (LPS, Sigma Chemical Co, MO, Estados Unidos) a una concentración final de 0,05 ng/ml. Las células se cultivaron en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Todas las condiciones de cultivo se establecieron en pocillos por triplicado. Los sobrenadantes (SN) se recogieron después de 24 h y las células residuales se eliminaron mediante una centrifugación en una centrífuga refrigerada (Beckman) a 2.600 x g durante 5 minutos. Los SN se congelaron y se almacenaron a -70 °C. La IL-6 de los SN del cultivo celular se midió mediante un ELISA mediante el uso del kit de desarrollo DuoSet<sup>®</sup> ELISA para IL-6 humana (R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, Reino Unido) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante. El límite inferior de detección era de 3,1 pg/ml. Las muestras se analizaron como la media de los pocillos por triplicado.

#### *Proliferación inducida por la interleucina 2 (IL-2) de las PBMC en presencia de péptidos de albúmina en placas de cultivo tisular recubiertas y no recubiertas*

Se recubrieron previamente placas de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo redondo (Costar, Corning Inc. NY, Estados Unidos) solo con HSA o con HSA e IgG humana agrupada para una inyección intravenosa (Gammagard, Baxter AS, DK) como sigue; la HSA se diluyó en RPMI1640 sin complementos hasta una concentración de 10 mg/ml. También se preparó una mezcla de 1 mg/ml de IgG en una solución de 9 mg/ml de HSA en RPMI (HSA/IgG). Después se añadieron 200 µl de la HSA o de HSA/IgG a cada pocillo de la placa. Las placas se incubaron a 4 °C durante 30 minutos, tras lo cual los pocillos se lavaron dos veces con 200 µl de RPMI1640. Las placas recubiertas se usaron inmediatamente. Se añadieron 100 µl de RPMI1640 complementado con 200 UI/ml de penicilina, 200 µl/ml de estreptomina, L-glutamina 4 mM (todos de Sigma Chemical Co. MO, Estados Unidos) y un 20 % de suero humano inactivado por calor (autólogo) a los pocillos de microtitulación del cultivo tisular con HSA o con HSA/IgG recubiertos. Las PBMC, aisladas a partir de individuos sanos, se diluyeron en RPMI / HSA al 2 % y se añadieron directamente los péptidos a la suspensión celular a una concentración de 10 µg/ml. Después se añadieron cien µl de esta suspensión celular ( $5 \times 10^4$  linfocitos) por pocillo, proporcionando una concentración final de 5 µg/ml de péptido por pocillo. Se añadió a los pocillos IL-2 (Proleukin, Chiron, NL), a una concentración final de 120 UI/pocillo. Las células se cultivaron durante 7 días en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. La proliferación se ensayó mediante la incorporación de 1,6 µCi/pocillo de [<sup>3</sup>H]-timidina (Amersham Int., Reino Unido) durante las últimas 18 h. Para los cálculos se usaron los valores medios de las dpm (desintegraciones por minuto) de los triplicados.

65

*Tinción inmunocitoquímica de las PBMC y de una línea celular monocítica humana con un anticuerpo anti-integrina (CD11a) en presencia o en ausencia de péptidos de albúmina*

Las PBMC se separaron como se ha descrito anteriormente. Las células THP-1 cultivadas (obtenidas en la American Type Culture Collection a través de LGL Nordic AB, Suecia) se lavaron cuidadosamente y se suspendieron en RPMI1640. Inmediatamente, las PBMC y las THP-1 se rotaron en portaobjetos de microscopio lavados previamente con un Shandon Cytospin (Shandon Scientific Ltd, Reino Unido) a 1.000 RPM durante 7 min a 2,5 o a  $5 \times 10^4$  células por portaobjetos. Los portaobjetos se dejaron secar a la temperatura ambiente durante una noche, tras lo cual se envolvieron con parafilm y se almacenaron a  $-70^\circ\text{C}$ . Inmediatamente antes de su uso, los *cytospins* se descongelaron y se fijaron con acetona durante 5 min a la temperatura ambiente. Los *cytospins* se bloquearon en primer lugar con suero AB humano normal al 10 % con y sin los péptidos de albúmina (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 1 h antes de la tinción. Se añadió el anticuerpo primario, que consiste en un monoclonal anti-CD11a humana de ratón (clon HM11, BD Biosciences) diluido en solución salina tamponada con Tris (TBS, a pH 7,6) a 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (THP-1) o a 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (PBMC). Los portaobjetos se incubaron durante 30 min y después se lavaron con TBS seguido de Envision-Fosfatasa alcalina (Dako Norden A/S, Dinamarca) durante 30 min. Después de un lavado adicional con TBS, los portaobjetos se incubaron con un sustrato de la fosfatasa alcalina que consiste en la sal Fast Red TR (Sigma), naftol AS-MX (Sigma) y levamisol 5 mM (Sigma) para bloquear la actividad endógena de la fosfatasa alcalina, durante 20 min, seguido de un lavado con TBS. Se contratiñeron con hematoxilina de Mayer durante 1 minuto y se montaron en Glycergel (Dako Norden A/S). Como control negativo se usó una IgG1 monoclonal de ratón contra un antígeno irrelevante (glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, Dako Norden A/S). Todas las incubaciones se llevaron a cabo a la temperatura ambiente en una cámara humidificada.

*Fragmentación proteolítica de albúmina sérica humana desnaturalizada (dHSA) con tripsina o con endoproteinasa ASP-N*

La dHSA liofilizada (0,5 mg) se reconstituyó con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM, a pH 8, que contiene 10 mg de tripsina modificada de calidad para secuenciación (Promega Corporation, WI) o 2 mg de endoproteinasa ASP-N (Sigma) y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante una noche. Para eliminar la albúmina no fragmentada y la enzima, la muestra se ultrafiltró a través de un filtro de centrifuga Amicon Ultra 4 (peso molecular de corte de 5.000) o Centriplus (peso molecular de corte de 10.000) (Millipore AB, Solna, Suecia). El filtrado, que contiene la dHSA fragmentada sin enzimas, se recogió y se diluyó en PBS con Ca y Mg (GIBCO).

*Preparación de un lisado celular a partir de las PBMC con las proteínas de la superficie celular biotiniladas (ACS)*

Se recogieron las capas leucocitarias generadas a partir de 450 ml de cada sangre procedente de 4 donantes sanos. Los eritrocitos se eliminaron mediante una sedimentación con una solución de dextrano T500 al 2 % (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) en NaCl al 0,9 %. Después se aislaron las células mononucleares (PBMC) mediante una centrifugación con un gradiente de densidad de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bioscience AB Suecia). Después, las PBMC se suspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene Ca y Mg (GIBCO) a una concentración de  $10 \times 10^6$  /ml. se añadió EZ Link Sulfo-NHS-biotina (Pierce Estados Unidos) a una concentración final de 0,2 mg/ml y la mezcla se incubó con un agitador a la temperatura ambiente durante 10 min. Después se eliminó el exceso de biotina mediante el lavado de las PBMC con PBS. Las PBMC biotiniladas se lisaron a continuación mediante la adición de 1,0 ml de tampón de lisis enfriado en hielo (Tris-HCL 50 mM, a pH 7,5, con NaCl 0,15 M,  $\text{MgCl}_2$  5 mM que contiene octil glucósido 100 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM) por  $2 \times 10^7$  células sedimentadas con una agitación suave, después se incubaron durante 30 min en hielo. Los desechos se eliminaron mediante una centrifugación a  $5.000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  durante 10 min y los sobrenadantes se recogieron y se agruparon a partir de los cuatro donantes. Después el lisado se almacenó a  $-70^\circ\text{C}$  en tubos de plástico de polipropileno.

Preparación de la columna de afinidad con proteínas de la superficie celular biotiniladas de células mononucleares acopladas a estreptavidina-sepharose (usadas para la adsorción de la dHSA fragmentada con tripsina)

Se diluyeron 18 ml del lisado de células biotiniladas en tampón de lisado a 1/10 en tampón de unión ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, NaCl 0,15 M, a pH 7,5). Esta cantidad de lisado se corresponde con  $36 \times 10^7$  células mononucleares. Se añadió a una columna de afinidad de 1 ml Hitrap Streptavidin HP (Amersham Biosciences). Para bloquear posibles restos de biotina libre, se añadieron 5 ml de glicina 0,1 M (Sigma) a la columna. Después se hizo reaccionar la estreptavidina no saturada de la columna con 150  $\mu\text{g}$  de biotina (Sigma) en tampón de unión. La columna se lavó cuidadosamente con PBS y se almacenó en PBS con un 0,1 % de  $\text{NaN}_3$  a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Preparación de la columna de afinidad con proteínas de la superficie celular biotiniladas de células mononucleares acopladas a estreptavidina-sepharose (usadas para la adsorción de la dHSA fragmentada con ASP-N)

El lisado de células biotiniladas en tampón de lisado experimentó un intercambio del tampón mediante una diálisis con tubos de diálisis Spectrapore 4 (Spectrum Europe, Breda, Países Bajos) en tampón de unión ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, NaCl 0,15 M a pH 7,5). Se añadieron 27 ml del lisado de células biotiniladas en tampón de unión (que se corresponden con  $54 \times 10^7$  células mononucleares) a 1,5 ml de Streptavidin Sepharose HP lavada (Amersham

Biosciences). Para bloquear posibles restos de biotina libre, se añadieron 25 ml de glicina 0,1 M (Sigma) a la Streptavidin Sepharose. Después se hizo reaccionar la estreptavidina no saturada con 225 µg de biotina (Sigma) en tampón de unión. La Streptavidin Sepharose se lavó cuidadosamente con PBS. Después se empaquetó un ml del lisado de células biotiniladas acopladas a la Streptavidin Sepharose en una columna vacía (Tricorn Empty High Performance Column, Amersham Bioscience) y se lavó con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene Ca y Mg (GIBCO).

*Adsorción de la dHSA fragmentada con la enzima mediante el uso de una columna de afinidad con proteínas de la superficie celular biotiniladas (ACS)*

Se hicieron pasar dos ml de la dHSA fragmentada con la enzima en PBS, que se corresponden con un total de 0,2 mg de proteína, por la columna de ACS, preparada como se ha descrito anteriormente. El flujo pasante se recogió teniendo en consideración el volumen vacío y la dilución de la muestra adsorbida mediante la recolección en pequeñas porciones de 0,2 ml. Se secaron treinta µl de cada muestra, incluyendo una muestra de control que no había sido adsorbida, en una centrifuga Speed-Vac.

*Espectrometría de masas*

Las muestras secas fueron reconstituidas en 10 µl de TFA al 0,1 %. Se usaron puntas de pipeta Zip Tip (Millipore, Estados Unidos) que contienen medio de fase inversa C<sub>18</sub> para la desalinización de las muestras reconstituidas.

Para el análisis de las muestras en el intervalo de masas de 700 - 3.600 Da, se mezcló un µl de cada muestra eluida con Zip Tip con 1 µl de una solución saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (0,02 mg/ml) en acetonitrilo al 70 % / ácido trifluoroacético al 0,3 %. Para el análisis de las muestras en el intervalo de masas de 1.500 - 9.000 Da, se mezcló un µl de cada muestra eluida con Zip Tip con 1 µl de ácido sinapínico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico). Se punteó 1 µl de la mezcla en la placa de MALDI y se analizó mediante el uso de una MALDI-TOF MS (Voyager-DE PRO, Applied Biosystems, CA, Estados Unidos). La búsqueda de la identidad de masa de los espectros resultantes se llevó a cabo en las bases de datos SwissProt o NCBI mediante el uso de MS-Fit.

**Identificación de las proteínas del plasma humano que se unen a la ACS**

*Cromatografía de afinidad del plasma con la ACS*

El plasma se obtuvo mediante una plasmaféresis a partir de un paciente con un diagnóstico de melanoma maligno. El plasma se congeló a -20 °C. Tras la descongelación, el plasma se coágulo inmediatamente mediante la adición de CaCl<sub>2</sub> a una concentración final de 13 mM. El coágulo de plasma gelificado se eliminó mediante una centrifugación a 3.500 RPM durante 7 min a 4 °C. Después el plasma se dializó intensivamente frente a PBS mediante el uso de tubos de diálisis Spectrapore 4 (Spectrum Europe, Breda, Países Bajos). Se preparó una columna de afinidad con proteínas de la superficie celular biotiniladas a partir de células mononucleares acopladas a estreptavidina-sepharose (ACS-sepharose) como se ha descrito anteriormente.

Se incubaron 45 ml del plasma con la ACS-sepharose durante una noche a 4 °C con una agitación suave. El plasma-ACS sepharose se lavó ampliamente con PBS. El ACS-sepharose lavado se almacenó durante cinco días a 4 °C en PBS con un 0,1 % de NaN<sub>3</sub>. El ACS-sepharose se empaquetó en una columna vacía (Tricorn Empty High Performance Column, Amersham Bioscience) y las proteínas unidas se eluyeron con 2 ml de Glicina-HCl 0,1 M, a pH 2,7. La fracción eluida se neutralizó inmediatamente con tampón Tris 1 M a pH 9 y se liofilizó.

*Electroforesis en gel bidimensional*

Las muestras liofilizadas se desalinizaron mediante su reconstitución en H<sub>2</sub>O y ácido tricloroacético al 10 % (TCA) con DTT 20 mM en acetona. Las muestras se centrifugaron a 13.000 RPM durante 5 min. El sedimento resultante se lavó dos veces con DTT 20 mM en acetona para retirar el TCA y finalmente se disolvió en un tampón de rehidratación (tampón de urea 8 M, CHAPS al 4 %, DTT 10 mM, IPG al 0,5 % y una cantidad mínima de naranja G). La electroforesis en gel bidimensional se llevó a cabo en un conjunto horizontal 2-DE (Multiphore/IPGphore, Pharmacia Biotech, SE) basado en isoelectroenfoque (IEF) en la primera dimensión y en masa molecular en la segunda dimensión. En resumen, las muestras se aplicaron a geles de IPG (tira de Immobiline™ Dry, pH 3-10 NL, GE Healthcare) y se isoelectroenfocaron durante una noche a 38060 Vh. Después se llevó a cabo una SDS-PAGE con geles planos premoldeados de poliacrilamida Exelgel XL SDS 12-14 (Amersham Biosciences). En cada análisis se incluyeron patrones de peso molecular. Las proteínas separadas fueron detectadas mediante una tinción de plata según el método de Shevenco. Los digeridos con tripsina de los puntos de proteínas se recortaron del gel y se analizaron con una MALDI-TOF ms como se ha descrito anteriormente.

*Pacientes oncológicos*

A los pacientes, incluidos en los análisis de la supervivencia global según la respuesta proliferativa de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a la interleucina-2, se les diagnosticó un carcinoma de células renales

con metástasis sistémicas. Previamente estaban sin tratar y se les programó para un tratamiento con interleucina-2 (Proleukin, Chiron, NL). Se tomaron muestras sanguíneas antes de iniciar el tratamiento. Los pacientes incluidos en otros estudios de esta solicitud de patente se describen brevemente según sea apropiado en la sección de resultados.

5 *Modelo ex vivo de inmunosupresión relacionada con la IL-2; proliferación de las PBMC inducida por la interleucina-2 (IL-2)*

10 Las PBMC se aislaron a partir de muestras de sangre venosa de donantes de sangre sanos (controles) o de pacientes con cáncer. Se añadieron cien  $\mu$ l de medio de cultivo (RPMI 1640 con la modificación de Dutch (Gibco, InVitrogen AB, Estocolmo, Suecia) complementado con 200 UI/ml de penicilina, 200  $\mu$ l/ml de estreptomicina, L-glutamina 4 mM (todos de Sigma Chemical Co. MO, Estados Unidos) y un 20 % de suero humano inactivado con calor) a placas de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo redondo (Costar, Corning Inc. NY, Estados Unidos).  
 15 Después se añadieron cien  $\mu$ l de las PBMC en RPMI / HSA al 2 % ( $5 \times 10^4$  linfocitos) por pocillo, seguido de IL-2 (Proleukin, Chiron, NL) a una concentración final de 120 UI/pocillo. En paralelo se establecieron pocillos de control sin IL-2. Las células se cultivaron durante 7 días en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. La proliferación celular se ensayó mediante la incorporación de 1,6  $\mu$ Ci/pocillo de [3H]-timidina (Amersham Int., Reino Unido) durante las últimas 18-24 h. Se usaron los valores medios de las dpm (desintegraciones por minuto) de los pocillos por triplicado para los cálculos. En los cultivos en los que se usó un suero recogido de los pacientes con  
 20 cáncer en lugar del suero autólogo, las PBMC eran de donantes con un grupo sanguíneo compatible.

Proliferación de las PBMC inducida por la interleucina-2 (IL-2) en presencia de péptidos de albúmina

25 Se establecieron cultivos para la proliferación inducida por IL-2 con PBMC procedentes de donantes sanos y de suero autólogo como se ha descrito anteriormente, con la excepción de que las PBMC eran incubadas previamente en primer lugar durante 30 min a la temperatura ambiente con los péptidos de albúmina indicados a una concentración de 10  $\mu$ g/ml.

30 *Generación de un antisuero de conejo específico para el péptido de la albúmina 3028*

El péptido 3028 se sintetizó con una cisteína añadida en el extremo N terminal y después se conjugó con hemocianina de lapa californiana (KLH) como proteína portadora. Se generaron antisueros policlonales mediante inmunizaciones repetidas de conejos con el péptido 3028 conjugado con la KLH y adyuvantes de Freund. Para algunos experimentos, los antisueros fueron purificados por afinidad mediante una cromatografía de geles de yodoacetilo Ultralink conjugados con el péptido 3028 (Pierce Biotechnology Inc.). Para los experimentos de cultivo celular se llevó a cabo un intercambio del tampón por RPMI 1640 con modificación de Dutch (Gibco, InVitrogen AB, Estocolmo, Suecia) mediante el paso a través de columnas PD-10 sephadex (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) seguido de una filtración estéril con filtros de jeringa de 0,22  $\mu$ m Millex (Millipore Co., MA, Estados Unidos). Las inmunizaciones de los conejos y la purificación de los antisueros fueron llevadas a cabo por Agrisera AB, Suecia.

40 *ELISA con antisuero de conejo anti 3028*

45 Se recubrieron pocillos por duplicado en placas de microtitulación Hi-binding (Costar 2592, Corning Inc, NY, Estados Unidos) con 100  $\mu$ l del péptido 3028 (10  $\mu$ g/ml), HSA desnaturalizada (denHSA, 4,5  $\mu$ g/ml) o HSA de control (4,5  $\mu$ g/ml). Todos los reactivos de recubrimiento se diluyeron con PBS y se incubaron a la temperatura ambiente durante una noche. Después los pocillos se lavaron con un tampón de lavado que consiste en Tween-20 al 0,05 % en PBS (Sigma) seguido de un bloqueo durante 1 h a 25 °C con 200  $\mu$ l de gelatina al 0,5 % preparada a partir de piel bovina (Sigma) en PBS, seguido de un lavado con tampón de lavado. Se añadieron los sueros de conejo preinmunes o los sueros anti-3028, diluidos a 1/1.000.000 en diluyente de reactivo de ELISA (gelatina al 0,01 % y Tween-20 al 0,05 % en PBS), y se incubaron durante 1 h a 25 °C seguido de un lavado. Después se añadió IgG biotinilada de caballo anti-conejo/ratón (Vectastain ELITE, Vetor Laboratories Inc, CA, Estados Unidos) diluida a 1/5 en diluyente de reactivo de ELISA, y las placas se incubaron durante 1 h a 25 °C, seguido de un lavado. Después, se añadió estreptavidina conjugada con HRP (R&Dsystems Europe, Ltd, Reino Unido). Finalmente, después de un lavado con  
 55 tampón de lavado, se añadió una solución de sustrato que consiste en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tetrametilbenzidina (R&D Systems). La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y la densidad óptica se midió en forma de absorbancia (A) a dos longitudes de onda, a 450 nm y a 570 nm, con un lector de microplacas Multiscan EX (Labsystems).

60 *Inhibición del ELISA del anti-3028 de conejo por parte de los péptidos de albúmina*

Para probar si los péptidos de la albúmina inhibían la unión del anti-3028 de conejo a los pocillos recubiertos con 3028, se incubaron previamente los antisueros de conejo diluidos a 1/1.000.000 en diluyente de reactivo de ELISA durante 1 h a la temperatura ambiente con las concentraciones indicadas de los péptidos. Después se añadieron 100  $\mu$ l del anticuerpo monoclonal solo, o, como alternativa, el anticuerpo monoclonal mezclado con péptidos, a los pocillos recubiertos con 3028, y se llevó a cabo el ELISA según se ha descrito.

*Proliferación de las PBMC inducida por la interleucina-2 (IL-2) en presencia de anti-3028 de conejo purificado por afinidad*

Los cultivos para probar el efecto inmunomodulador de los anticuerpos de conejo purificados por afinidad específicos para el 3028 se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente para la proliferación inducida por la IL-2 con las siguientes excepciones; se omitió la SA al 2 % del medio de lavado y del medio de suspensión de las PBMC. El medio de cultivo que contiene el suero (100 µl/pocillo) se incubó previamente con 20 µg/ml de anticuerpos de conejo durante 30 min a la temperatura ambiente antes de la adición de 100 µl de la suspensión de PBMC a los pocillos del cultivo.

*Tinción inmunohistoquímica de las biopsias de tumores con anti-3028 de conejo*

Se prepararon secciones tisulares a partir de biopsias fijadas con formalina procedentes de pacientes con cáncer. Las secciones se desparafinizaron y se bloquearon con suero AB humano normal al 10 % en solución salina equilibrada de Hank complementada con Hepes 0,01 M (BSS, GIBCO BRL) durante una hora antes de la tinción. Después, las secciones se tiñeron con 10 µg/ml de anti-3028 de conejo purificado por afinidad diluido en BSS con un 2 % de suero AB y 0,1 g/ml de saponina durante 30 min. Después del lavado con BSS con 0,1 g/ml de saponina, se añadió un polímero de fosfatasa alcalina Ultravison One específico para la Ig de ratón y de conejo (Lab Vision Co., CA, Estados Unidos). Después se lavó el exceso de polímero de las secciones con BSS con 0,1 g/ml de saponina. Después se detectó el complejo polimérico unido mediante sustrato de fosfato de naftol y cromógeno líquido Fast Red (Lab Vision Corp.) Las secciones se contratiñeron con hematoxilina de Mayer y se montaron en Glycergel.

**Efecto de los péptidos de la albúmina sobre la actividad citotóxica de las células citolíticas naturales (NK) procedentes de donantes de sangre sanos**

Las células mononucleares se separaron mediante una centrifugación en un gradiente de densidad Ficoll-paque Plus estándar (Pharmacia AB, Suecia) a partir de sangre heparinizada obtenida de donantes sanos. La actividad citotóxica de las células NK de las células mononucleares se probó después mediante el uso de un kit comercial (NKTEST, Orpegen Pharma GmbH, Heidelberg, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. En resumen, el kit contiene células objetivo sensibles a las NK criopreservadas (K562) marcadas con un colorante de membrana fluorescente verde lipófilo, que permite la discriminación entre las células efectoras y las objetivo. Después de una incubación con las células efectoras, las células objetivo destruidas son identificadas mediante una tinción del ADN, que penetra y tiñe específicamente los núcleos de las células objetivo muertas. De esta forma, puede determinarse el porcentaje de objetivos destruidos mediante una citometría de flujo. Las células mononucleares se incubaron previamente durante 30 min a 37 °C con los péptidos indicados (los péptidos han sido descritos previamente) a 10 µg/ml. Después se añadieron las células objetivo, dando una proporción de efectoras:objetivo de 40:1, y la mezcla de células se incubó a 37 °C durante 3-4 horas. Las muestras se analizaron con un FACSCalibur (BD Biosciences, San José, CA).

**Legendas de las figuras**

**Figura 1.** Este diagrama muestra que algunos péptidos que contienen la secuencia E5K inhiben la unión del AcMc A a las placas de ELISA recubiertas con la dHSA. Obviamente, existen algunas diferencias en la actividad inhibidora de los péptidos probados.

**Figura 2.** Efecto de la expresión de la E5K detectada por el AcMc A sobre la supervivencia de los pacientes con melanoma maligno metastásico ( $p = 0,009$ ).

Expresión baja                      x - - x

Expresión alta                      o - - o

**Figura 3 A.** Se probó el efecto de dos péptidos de la albúmina, el 2605 y el 2608, sobre la proliferación de las PBMC inducida por la PHA (5 µg/ml) de un control sano y de dos pacientes con cáncer. Las tres diferentes concentraciones de los péptidos (µg/ml) están indicadas en la figura. Los pacientes P45 y 46 padecían un carcinoma de células renales y un melanoma maligno.

**Figura 3 B.** Se probó el efecto de dos péptidos de la albúmina, el 2605 y el 2608, sobre la proliferación de las PBMC inducida por la PHA (10 µg/ml) de un control sano y de dos pacientes con cáncer. Las tres concentraciones de péptido usadas (µg/ml) están indicadas en la figura.

**Figura 4.** Variación interindividual en el efecto de los péptidos de la albúmina sobre la proliferación inducida por la PHA por parte de las PBMC procedentes de controles sanos y de pacientes con cáncer. La PHA se usó a una concentración de 5 µg/ml, y los péptidos a una concentración de 10 µg/ml. Los pacientes tenían los siguientes diagnósticos: melanoma maligno (P46) y carcinoma de células renales (P39, P41 y P45).

**Figura 5.** Efecto de la dHSA, a 8 µg/ml, sobre la proliferación inducida por la PHA de las PBMC procedentes de 5 controles y de 4 pacientes con cáncer.

**Figura 6 A.** Efecto del péptido 2605 sobre la proliferación inducida por la PHA potenciada por la dHSA. Los detalles se describen en el texto.

**Figura 6 B.** Efecto del péptido 2608 sobre la proliferación inducida por la PHA potenciada por la dHSA. Los detalles se describen en el texto.

**Figura 7.** Efecto de los péptidos de la albúmina sobre la producción de IL-6 inducida por LPS por parte de las

PBMC procedentes de A) un donante sano, B) y C) pacientes con cáncer con melanoma maligno. Las PBMC fueron estimuladas con LPS durante 24 h en presencia de los péptidos indicados a 0,01 µg/ml (barras negras), a 0,1 µg/ml (barras grises), a 1 µg/ml (barras blancas) o a 10 µg/ml (barras sombreadas). La cantidad de IL-6 liberada en el medio de cultivo se midió mediante un ELISA. Los resultados están expresados en forma del porcentaje de IL-6 liberada en los cultivos de control sin la adición de los péptidos. Esto era de 1.072 pg/ml, de 997 pg/ml y de 902 pg/ml en A), B) y C), respectivamente.

**Figura 8 A-F.** Efecto de los péptidos de la albúmina sobre la unión de los anticuerpos al LFA-1 de las células inmunitarias. La línea celular monocítica THP-1 (paneles A y B), las PBMC procedentes de dos controles sanos (paneles C, D y E, F, respectivamente). El péptido 2606 se usó en los experimentos mostrados en B y en D, y el péptido 2605 se usó en F.

**Figura 9.** Efecto de los péptidos sobre la proliferación inducida por la PHA modulada por la dHSA de las PBMC

**Figura 10.** Efecto de la nueva serie de péptidos sobre la proliferación inducida por la IL-2 (A) y la reversión de la actividad inhibidora del péptido 3028 mediante la modulación del receptor Fc (B).

**Figura 11.** Efecto de la nueva serie de péptidos sobre la producción de IL-6 inducida por LPS por parte de las PBMC procedentes de dos controles sanos.

**Figura 12.** Efecto de la nueva serie de péptidos sobre la producción de IL-6 inducida por LPS por parte de las PBMC procedentes de tres pacientes con cáncer, con melanoma maligno (MM) y con carcinoma de células renales (RCC).

**Figura 13.** Electroforesis en gel bidimensional de las proteínas del plasma después de una cromatografía de afinidad de ACS. El plasma se obtuvo a partir de un paciente con melanoma maligno.

**Figura 14.** Proliferación inducida por la IL-2 por parte de las PBMC procedentes de controles sanos, y de PBMC procedentes de pacientes con carcinoma de células renales (RCC), cultivadas en sueros autólogos al 10 %.

**Figura 15.** Un análisis de Kaplan Meyer de los pacientes con carcinoma de células renales según la respuesta proliferativa a la IL-2. Una baja tasa proliferativa indica una baja supervivencia.

**Figura 16.** Cultivo de las PBMC procedentes de controles sanos en los sueros de los pacientes con cáncer que se sabe que tienen la respuesta a la IL-2 suprimida en el modelo *ex vivo*.

**Figura 17.** Análisis del efecto de cuatro péptidos diferentes sobre la proliferación inducida por la IL-2 por parte de las PBMC procedentes de controles sanos. Las PBMC se cultivaron durante 7 días en presencia de IL-2 (20 U/ml) y de los péptidos. La proliferación se midió en forma de la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina durante las 18 horas finales. // PBMC de control (ninguno frente a 3028, \* p < 0,0006, n = 17) (Nota, 3026, 3027, 3029 n = 4 o 5).

**Figura 18.** Inhibición de la respuesta proliferativa a la IL-2 por parte del péptido 3028 en el modelo *ex vivo* humano mediante el uso de las PBMC de pacientes con cáncer.

**Figura 19. A.** Efecto de las partes C (3218) y N (3325) terminales del péptido 3028 sobre la proliferación inducida por la IL-2 en comparación con el efecto del péptido 3028 completo. Se muestra un experimento representativo.

**B.** El efecto inhibidor del péptido 3028 sobre la proliferación inducida por la IL-2 no es neutralizado por las partes C (3218) y N (3325) terminales del péptido 3028 solas o en combinación.

**Figura 20.** Los antisueros, pero no los sueros preinmunes, procedentes de dos conejos inmunizados con el péptido de la albúmina 3028, se unen a los pocillos recubiertos con el péptido 3028, con la HSA desnaturalizada (denHSA) y en menor grado, con la HSA de control tratada (no desnaturalizada) que se ha preparado igual que la HSA desnaturalizada excepto por el procedimiento de desnaturalización.

**Figura 21.** Inhibición de la unión del suero del conejo L anti 3028 a pocillos recubiertos con el péptido 3028 en un ELISA por parte de los péptidos de la albúmina. El péptido 2607, que contiene la estructura E5K, se usa como control negativo.

**Figura 22.** Efecto de los anticuerpos purificados por afinidad dirigidos contra el péptido 3028 sobre la respuesta proliferativa a la IL-2 de las PBMC procedentes de pacientes inmunodeprimidos con cáncer y de controles normales con una regulación por disminución de la reactividad inmunitaria. P21 tiene un carcinoma de células renales, y p26, p28 y p29 tienen un melanoma maligno.

**Figura 23.** Tinción inmunohistoquímica de metástasis de un melanoma maligno mediante el uso de anticuerpos de conejo purificados por afinidad dirigidos contra el epítipo 3028.

**Figura 24.** Inhibición de la unión del anti-LFA-1, el AcMc HI111, a las células mononucleares sanguíneas por parte del péptido 3028 y de los fragmentos 3325 y 3218. Un procedimiento de tinción inmunohistoquímica habitual mediante el uso de una fijación con acetona, suero AB humano al 10 % para el bloqueo, una incubación con HI111 y un anticuerpo secundario (Ultravision, un polímero conjugado con fosfato alcalino unido a fragmentos Fab de anti-Ig de ratón de cabra), seguido de un desarrollo con Fast Red. Después, los portaobjetos se montaron en GlycerGel. La incubación previa con los péptidos añadidos al suero AB fue como sigue: A. No se añadió ningún péptido, B. El péptido 3028, C. La parte C terminal (3218), y D. La parte N terminal (3325).

**Figura 25.** Demostración, mediante el uso de un modelado molecular asistido por ordenador, de que el péptido 3028 se une a los CD25 en el sitio de unión de la IL-2. La cadena α del péptido 3028 de unión al receptor de la IL-2 (CD25) (A) al sitio de unión de la IL-2 (B). CD25 en amarillo e IL-2 en azul.

**Figura 26.** Diferencia en la actividad antiproliferativa de los péptidos 3218 y 3325, especificidad de los anticuerpos purificados por afinidad dirigidos contra el péptido 3325 y no contra el péptido 3218, actividad inmunomoduladora de estos anticuerpos, y efecto de estos péptidos sobre la unión del AcMc anti-LFA-1 a las células inmunitarias, puede concluirse que ninguno de los péptidos menores, el 3218 ni el 3325, son tan eficaces como el péptido completo, el 3028.

**Figura 27.** Efecto de los péptidos de la albúmina sobre la actividad citotóxica de las células citotóxicas naturales

(NK) células procedentes de donantes de sangre sanos.

**Figura 28.** Tabla 4A. Secuencias de la E3-7K en la HSA.

**Figura 29.** Tabla 4B. Secuencias de la K3-7E en la HSA.

5 **LISTA DE REFERENCIAS**

1. Suckau D et al, PNAS, 1990, 87: 9848.
2. Macht M et al, Biochemistry, 1996, 35: 15633.
3. Kiselar JG y Downard KM, Anal Chem 1999, 71: 1792.
- 10 4. Davis GE, Exp. Cell Res, 1992, 200; 242.
5. Doyen N et al. Mol Immunol, 1985, 22: 1-10
6. Peterson NC. Advances in monoclonal antibody technology: Genetic engineering of mice, cells and immunoglobulins. ILAR Journal, 2005, 46: 314-9.

15 **LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> Canimguide Therapeutics AB
- <120> ESTRUCTURAS INMUNORREGULADORAS PROCEDENTES DE PROTEÍNAS NATURALES
- 20 <130> P17558PC00
- <150> SE0701099-4
- <151> 08-05-2007
- 25 <150> SE0701100-0
- <151> 08-05-2007
- <150> SE0702520-8
- 30 <151> 15-11-2007
- <160> 194
- <170> PatentIn versión 3.3
- 35 <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 40 <400> 1
- Glu Glu Asn Phe Lys**
- 1 5**
- 45 <210> 2
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 50 <400> 2
- Glu Asp His Val Lys**
- 1 5**
- 55 <210> 3
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 60 <400> 3

**Glu Asn Cys Asp Lys**  
**1 5**

5  
 <210> 4  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

**Glu Thr Phe Leu Lys**  
**1 5**

10  
 15  
 <210> 5  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

**Glu Arg Ala Phe Lys**  
**1 5**

20  
 25  
 <210> 6  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

**Glu Cys Cys Glu Lys**  
**1 5**

30  
 <210> 7  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35  
 <400> 7

**Glu Cys Tyr Ala Lys**  
**1 5**

40  
 <210> 8  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

45  
 <400> 8

**Glu Arg Gln Ile Lys**  
**1 5**

50  
 <210> 9  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

**Glu Lys Cys Cys Lys**  
**1 5**

5 <210> 10  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 10

**Glu Glu Gly Lys Lys**  
**1 5**

10 <210> 11  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 15 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 11

**Glu Glu Thr Phe Leu Lys**  
**1 5**

20 <210> 12  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 25 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 12

**Glu Thr Phe Leu Lys Lys**  
**1 5**

30 <210> 13  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 35 <400> 13

**Glu Thr Thr Leu Glu Lys**  
**1 5**

40 <210> 14  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 14  
 45

**Glu Thr Tyr Val Pro Lys**  
**1 5**

50 <210> 15  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 15

**Glu Arg Gln Ile Lys Lys**  
**1 5**

5 <210> 16  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 16

**Glu Leu Val Lys His Lys**  
**1 5**

10 <210> 17  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 15 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 17

**Glu Val Ala His Arg Phe Lys**  
**1 5**

20 <210> 18  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 25 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 18

**Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys**  
**1 5**

30 <210> 19  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 35 <400> 19

**Glu Cys Phe Leu Gln His Lys**  
**1 5**

40 <210> 20  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 45 <400> 20

**Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys**  
**1 5**

50 <210> 21  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 21

**Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys**  
**1 5**

55

<210> 22  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 22  
  
**Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys**  
**1 5**

10  
 <210> 23  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 15  
 <400> 23  
  
**Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys**  
**1 5**

20  
 <210> 24  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 25  
 <400> 24  
  
**Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys**  
**1 5**

30  
 <210> 25  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 25  
  
**Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys**  
**1 5**

35  
 <210> 26  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 40  
 <400> 26  
  
**Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys**  
**1 5**

45  
 <210> 27  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 50  
 <400> 27  
  
**Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys**  
**1 5**

55  
 <210> 28  
 <211> 7



<400> 34

**Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys**  
 1 5

5 <210> 35  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 35

**Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys**  
 1 5

15 <210> 36  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 36

**Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys**  
 1 5

25 <210> 37  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 37

**Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys**  
 1 5

30 <210> 38  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 38

**Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys**  
 1 5

40 <210> 39  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 39

**Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys**  
 1 5

50 <210> 40  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

55 <400> 40

**Lys Asp Leu Gly Glu**  
**1 5**

5  
 <210> 41  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 41

**Lys Leu Val Asn Glu**  
**1 5**

10  
 <210> 42  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 15 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 42

**Lys Gln Glu Pro Glu**  
**1 5**

20  
 <210> 43  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 25 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 43

**Lys Tyr Leu Tyr Glu**  
**1 5**

30  
 <210> 44  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 35 <400> 44

**Lys Val His Thr Glu**  
**1 5**

40  
 <210> 45  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 45 <400> 45

**Lys Tyr Ile Cys Glu**

**1 5**

50  
 <210> 46  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 55 <400> 46

**Lys Glu Cys Cys Glu**  
**1 5**

5 <210> 47  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 47

**Lys Pro Leu Leu Glu**  
**1 5**

10 <210> 48  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 48

**Lys Asn Tyr Ala Glu**  
**1 5**

20 <210> 49  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 25 <213> *Homo sapiens*

<400> 49

**Lys Val Phe Asp Glu**  
**1 5**

30 <210> 50  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 50

**Lys Pro Leu Val Glu**  
**1 5**

40 <210> 51  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 51

**Lys Gln Asn Cys Glu**  
**1 5**

50 <210> 52  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 52

**Lys Cys Cys Thr Glu**  
**1 5**

5 <210> 53  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 53

**Lys Ala Thr Lys Glu**  
**1 5**

10 <210> 54  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 15 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 54

**Lys Asp Leu Gly Glu Glu**  
**1 5**

20 <210> 55  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 25 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 55

**Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu**  
**1 5**

30 <210> 56  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 35 <400> 56

**Lys Ala Ala Phe Thr Glu**  
**1 5**

40 <210> 57  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 45 <400> 57

**Lys Ala Glu Phe Ala Glu**  
**1 5**

50 <210> 58  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 58

**Lys Pro Leu Val Glu Glu**  
**1 5**

5 <210> 59  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 59

**Lys Glu Phe Asn Ala Glu**  
**1 5**

10 <210> 60  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 60

**Lys Ala Asp Asp Lys Glu**  
**1 5**

20 <210> 61  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 25 <213> *Homo sapiens*

<400> 61

**Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu**  
**1 5**

30 <210> 62  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 62

**Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu**  
**1 5**

40 <210> 63  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 63

**Lys Ser His Cys Ile Ala Glu**  
**1 5**

50 <210> 64  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 64

**Lys Cys Cys Lys His Pro Glu**  
**1 5**

55

<210> 65  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 65  
  
**Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu**  
**1 5**  
 10  
 <210> 66  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 66  
  
**Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu**  
**1 5**  
 20  
 <210> 67  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 67  
  
**Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu**  
**1 5**  
 30  
 <210> 68  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 68  
  
**Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu**  
**1 5**  
 35  
 <210> 69  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 40  
 <400> 69  
  
**Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu**  
**1 5**  
 45  
 <210> 70  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 50  
 <400> 70  
  
**Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu**  
**1 5**  
 55  
 <210> 71  
 <211> 8

<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 71

**Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu**  
**1 5**

10 <210> 72  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 72

15 **Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu**  
**1 5**

20 <210> 73  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 73

25 **Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu**  
**1 5**

30 <210> 74  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 74

35 **Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu**  
**1 5**

40 <210> 75  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 75

45 **Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu**  
**1 5**

50 <210> 76  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 76

50 **Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu**  
**1 5**

<210> 77  
<211> 9

<212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 77  
 5  
**Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu**  
**1 5**  
  
 <210> 78  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 78  
  
**Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu**  
**1 5**  
 15  
  
 <210> 79  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 20  
  
 <400> 79  
  
**Glu Lys Asp Asp Ala Lys Cys Cys Lys**  
**1 5**  
 25  
  
 <210> 80  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 30  
  
 <400> 80  
  
**Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile**  
**1 5 10 15**  
  
**Lys**  
  
 35  
 <210> 81  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 40  
 <400> 81  
  
**Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu**  
**1 5 10**  
  
 <210> 82  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 82  
 50  
**Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys**  
**1 5 10**



**Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys**  
**1 5**

5  
 <210> 89  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 89

**Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys**  
**1 5 10**

10  
 15  
 <210> 90  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 90

**Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys**  
**1 5 10**

20  
 25  
 <210> 91  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 91

**His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg**  
**1 5 10**

30  
 35  
 <210> 92  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 92

**Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys**  
**1 5 10**

40  
 45  
 <210> 93  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 93

**Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys**  
**1 5 10**

50  
 <210> 94  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 94

**Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg**  
**1 5**

5 <210> 95  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 95

**Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg**  
**1 5**

10 <210> 96  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 96

**Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys**  
**1 5 10**

20 <210> 97  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 97

**Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys**  
**1 5**

30 <210> 98  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 98

**Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg**  
**1 5**

40 <210> 99  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 99

**Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg**  
**1 5**

50 <210> 100  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 100

**Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg**  
**1 5**

55

<210> 101  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 101  
  
**Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg**  
**1 5**  
 10  
 <210> 102  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 102  
  
**Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys**  
**1 5**  
 20  
 <210> 103  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 103  
  
**Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg**  
**1 5**  
 30  
 <210> 104  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 35  
 <400> 104  
  
**Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys**  
**1 5 10**  
 40  
 <210> 105  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 45  
 <400> 105  
  
**Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys**  
**1 5 10 15**  
  
**Val Ala**  
 50  
 <210> 106  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 55  
 <400> 106  
  
**Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr**  
**1 5 10**

<210> 107  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 107  
  
**Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln**  
**1 5 10 15**  
  
**Glu Pro Glu Arg Asn Glu**  
**20**  
  
 10  
 <210> 108  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 15  
 <400> 108  
  
**Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu**  
**1 5 10**  
  
 20  
 <210> 109  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 25  
 <400> 109  
  
**Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile**  
**1 5 10 15**  
  
**Ala Arg Arg His Pro**  
**20**  
  
 30  
 <210> 110  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 110  
  
**Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu**  
**1 5 10**  
 35  
  
 40  
 <210> 111  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 111  
  
**Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser**  
**1 5 10 15**  
  
**Ala Lys**  
  
 45  
 <210> 112  
 <211> 12

ES 2 608 803 T3

<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 112

**Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser**  
**1 5 10**

10 <210> 113  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 113

**Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn**  
**1 5 10 15**

15 **Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys**  
**20**

20 <210> 114  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 114

25 **Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe**  
**1 5 10**

30 <210> 115  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 115

35 **Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg**  
**1 5**

40 <210> 116  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 116

45 **Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg**  
**1 5 10 15**

50 <210> 117  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 117

ES 2 608 803 T3

Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile  
 1 5 10 15

**Lys**

5 <210> 118  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 118

10 Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg  
 1 5 10

15 <210> 119  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 119

20 Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys  
 1 5 10 15

25 <210> 120  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 120

30 Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg  
 1 5

<210> 121  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 121

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys  
 1 5

40 <210> 122  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 122

45 Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys  
 1 5 10

50 <210> 123  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 123

**Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg**  
**1 5**

5 <210> 124  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 124

**Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg**  
**1 5**

15 <210> 125  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 125

**Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys**  
**1 5 10**

25 <210> 126  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 126

**Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys**  
**1 5 10**

35 <210> 127  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 127

**Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg**  
**1 5**

40 <210> 128  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 128

**Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys**  
**1 5 10**

50 <210> 129  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 608 803 T3

<400> 129

**Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys**  
**1 5 10**

5 <210> 130  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 130

**Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys**  
**1 5**

15 <210> 131  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 131

**Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys**  
**1 5 10**

25 <210> 132  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 132

**Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys**  
**1 5 10**

30 <210> 133  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 133

**Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp**  
**1 5 10 15**

**Arg**

40 <210> 134  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 134

**Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys**  
**1 5 10**

50 <210> 135  
 <211> 12  
 <212> PRT



ES 2 608 803 T3

<400> 141

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg  
1 5

5 <210> 142  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 142

Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg  
1 5 10 15

15 <210> 143  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 143

Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile  
1 5 10 15

25 <210> 144  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 144

Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys  
1 5 10

30 <210> 145  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 145

Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg  
1 5 10 15

His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro

40 20

<210> 146  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 146

Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg  
1 5 10 15

50

ES 2 608 803 T3

<210> 147  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 147  
  
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu  
 1 5 10 15  
  
 Val Arg  
 10  
 <210> 148  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 148  
  
 Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu  
 1 5 10  
  
 <210> 149  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 20  
 <400> 149  
 25  
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe  
 1 5 10  
  
 <210> 150  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 30  
 <400> 150  
  
 Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys  
 1 5 10 15  
  
 Val Ala  
 35  
 <210> 151  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 40  
 <400> 151  
  
 Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala  
 1 5 10 15  
  
 Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu  
 20  
 45  
 <210> 152  
 <211> 23  
 <212> PRT

ES 2 608 803 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 152

Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro  
 1 5 10 15

5 Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val  
 20

<210> 153

<211> 17

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 153

Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr His  
 1 5 10 15

Ala

15 <210> 154

<211> 27

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 154

Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu  
 1 5 10 15

Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn  
 20 25

<210> 155

25 <211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 155

30

Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met  
 1 5 10 15

<210> 156

35 <211> 34

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 156

Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr  
 1 5 10 15

Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys  
 20 25 30

40 Val Phe

ES 2 608 803 T3

<210> 157  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5  
 <400> 157

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala  
 1 5 10 15

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln  
 20 25 30

His Lys

10  
 <210> 158  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15  
 <400> 158

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala  
 1 5 10 15

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu  
 20 25 30

Lys Ala Val Met  
 35

20  
 <210> 159  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25  
 <400> 159

Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu  
 1 5 10 15

Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala  
 20 25 30

Glu Val Glu Asn  
 35

30  
 <210> 160  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35  
 <400> 160

ES 2 608 803 T3

Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp  
 1 5 10 15

Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr  
 20 25 30

Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala  
 35 40

5 <210> 161  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 161

Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln  
 1 5 10 15

Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu  
 20 25 30

Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala  
 35 40

15 <210> 162  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 162

Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys  
 1 5 10 15

Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn  
 20 25 30

20 Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala  
 35 40

25 <210> 163  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 163

Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr  
 1 5 10 15

Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn  
 20 25 30

30 Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val  
 35 40



ES 2 608 803 T3

Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val  
 1 5 10 15

Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu  
 20 25

5 <210> 169  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 169

Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val  
 1 5 10 15

Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys  
 20 25

10 <210> 170  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 170

Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val  
 1 5 10 15

Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn  
 20 25

20 <210> 171  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 171

Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val  
 1 5 10 15

Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln  
 20 25

30 <210> 172  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 172

His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu  
 1 5 10 15

Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys  
 20

<210> 173  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 173

**Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu**  
 1 5 10 15

**Pro Gln Asn Leu Ile Lys**  
 20

10 <210> 174  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 174

**Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro**  
 1 5 10 15

**Gln Asn Leu Ile Lys**  
 20

20 <210> 175  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 175

**Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln**  
 1 5 10 15

**Asn Leu Ile Lys**  
 20

30 <210> 176  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 176

**Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn**  
 1 5 10 15

35 **Leu Ile Lys**

40 <210> 177  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 177

Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu  
 1 5 10 15

Ile Lys

5 <210> 178  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 178

Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val  
 1 5 10 15

Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys  
 20

10  
 15 <210> 179  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 179

His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu  
 1 5 10 15

Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu  
 20 25 30

20  
 25 <210> 180  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 180

Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu  
 1 5 10 15

Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe  
 20 25

30 <210> 181  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 181

Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu  
 1 5 10 15

Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu  
 20 25

ES 2 608 803 T3

<210> 182  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 182  
  
   Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro  
   1                  5                  10                  15  
  
   Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu  
                   20                  25  
 10  
 <210> 183  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 183  
  
   Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln  
   1                  5                  10                  15  
  
   Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu  
                   20  
 20  
 <210> 184  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 184  
  
   Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln  
   1                  5                  10                  15  
  
   Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys  
                   20  
 30  
 <210> 185  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 35  
 <400> 185  
  
   Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val  
   1                  5                  10                  15  
  
   Glu  
  
 40  
 <210> 186  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 608 803 T3

<400> 186

His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu

1 5 10 15

5

<210> 187  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 187

Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu

1 5 10 15

15

<210> 188  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 188

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu

1 5 10

25

<210> 189  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

30

<400> 189

Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu

1 5 10

35

<210> 190  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 190

40

Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu

1 5 10

45

<210> 191  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 191

Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu

1 5 10

50

<210> 192  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

55

ES 2 608 803 T3

<400> 192

Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn  
1 5 10 15

Leu Ile Lys Gln Asn  
20

5 <210> 193  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 193

Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu  
1 5 10 15

Ile Lys Gln

15 <210> 194  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 194

Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu  
1 5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo o un fragmento del mismo con especificidad frente a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 80 para su uso en el tratamiento de un tumor maligno.
2. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento está humanizado.
- 10 3. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento es humano.
4. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo completo.
- 15 5. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
6. Un anticuerpo policlonal contra un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 80 para su uso en el diagnóstico de un tumor maligno.
- 20 7. Un anticuerpo policlonal de conejo contra un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 80 para su uso en la prueba del efecto inmunomodulador del anticuerpo sobre la proliferación inducida por la IL-2 de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC).
- 25 8. Un método *in vitro* para el diagnóstico de un tumor maligno, mediante la determinación de la presencia de un fragmento de un péptido o de una proteína mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 80.

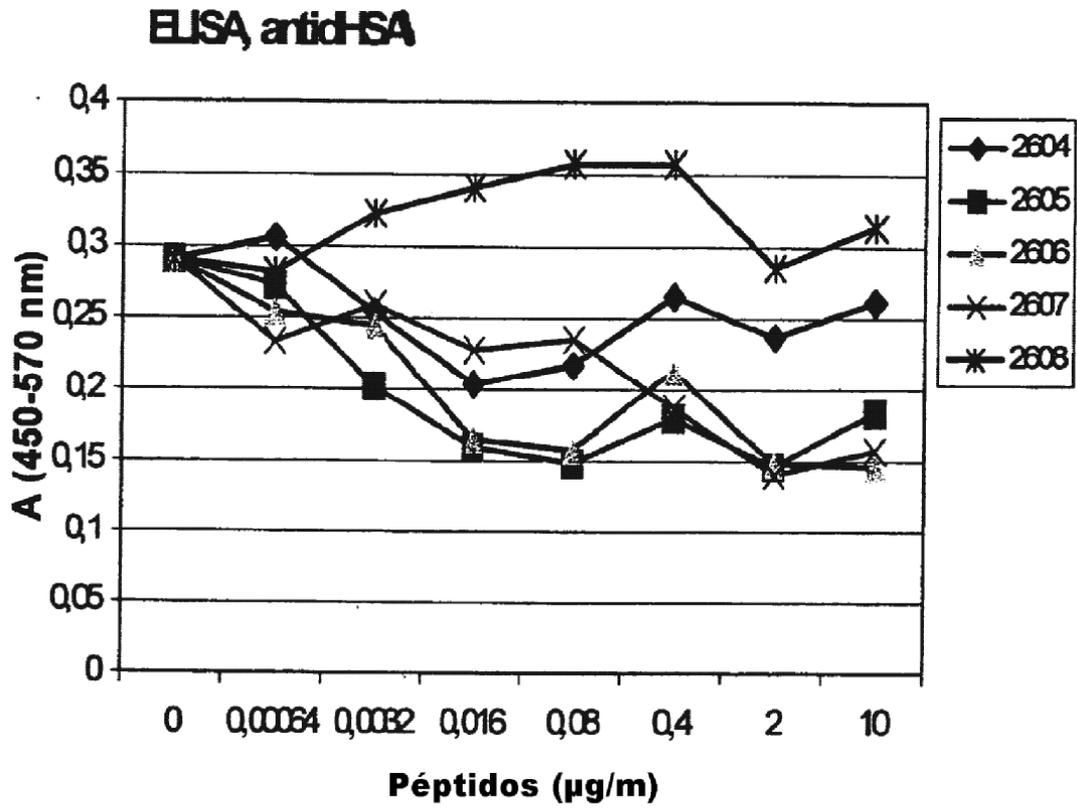


fig. 1

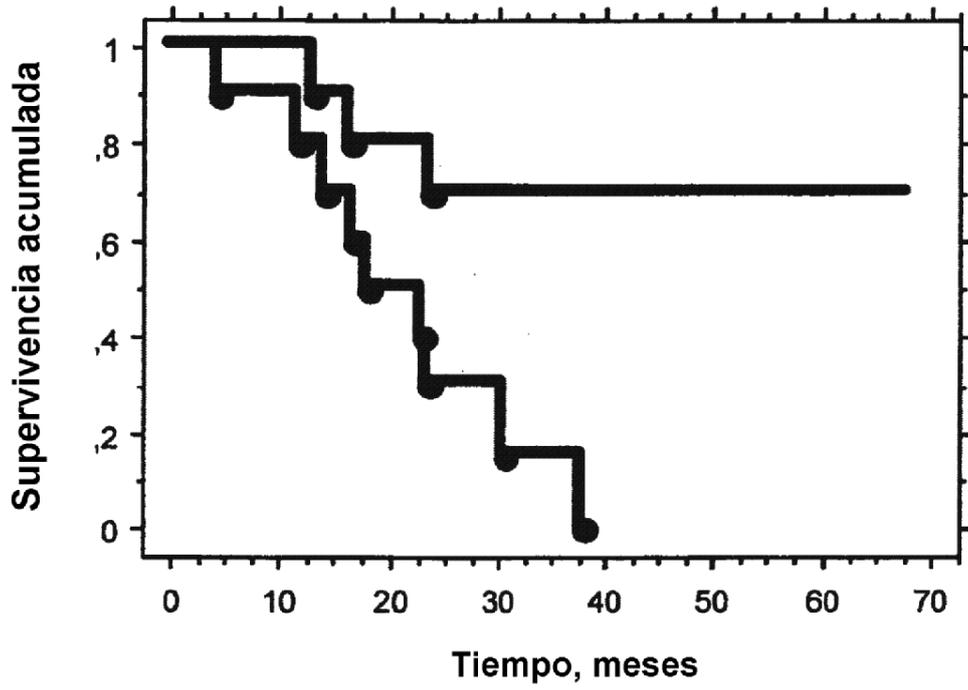


fig. 2

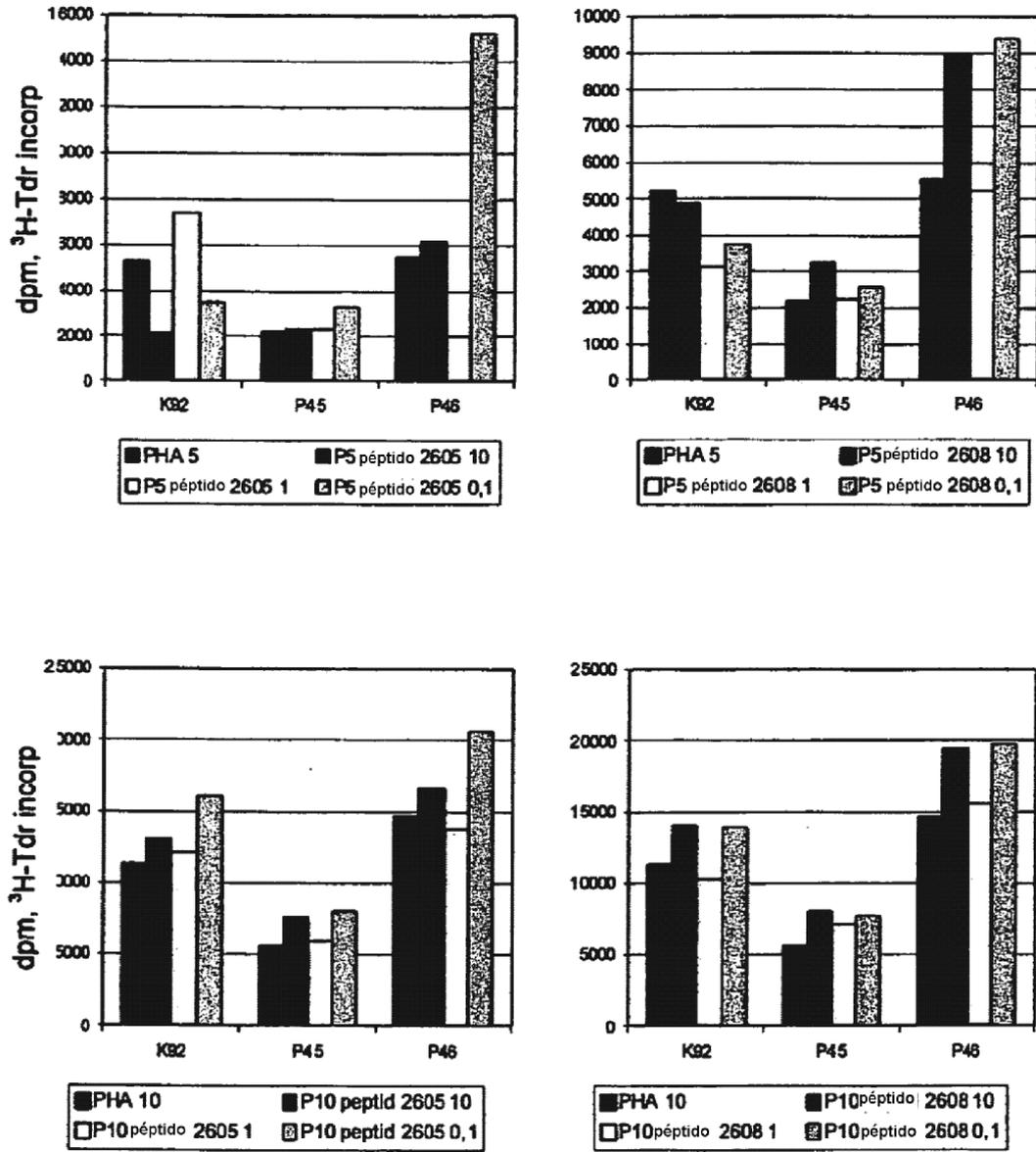


fig. 3

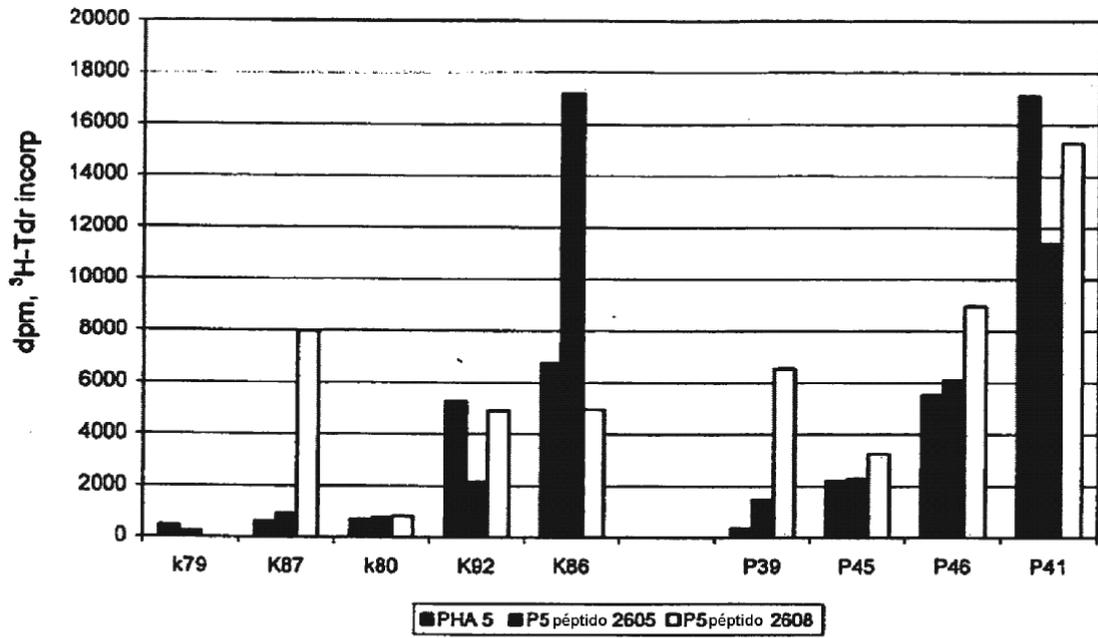


fig. 4

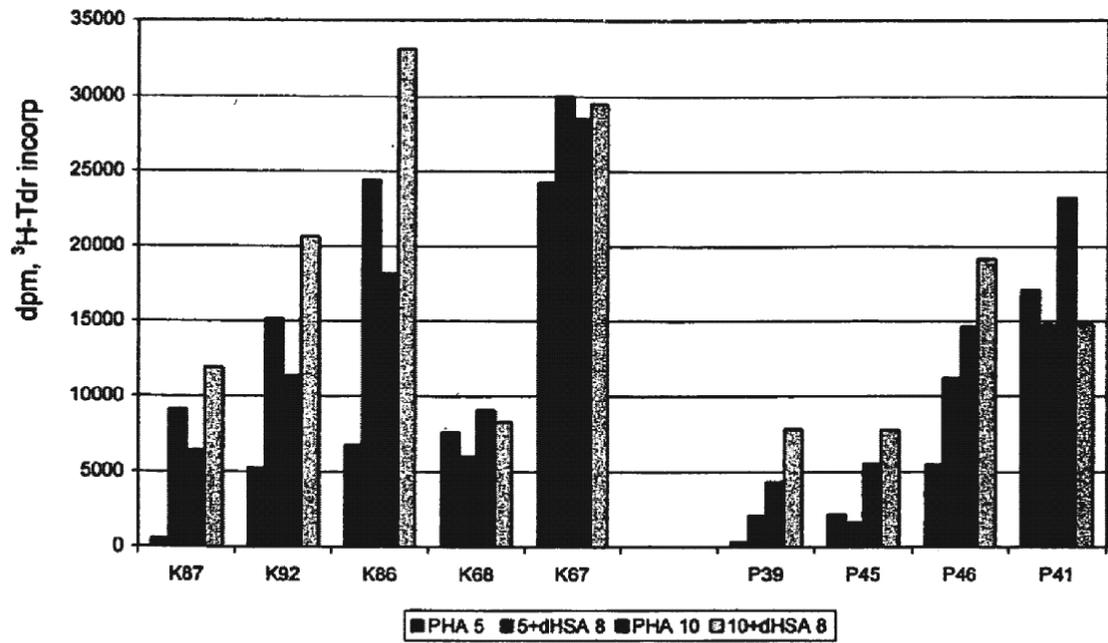


fig. 5

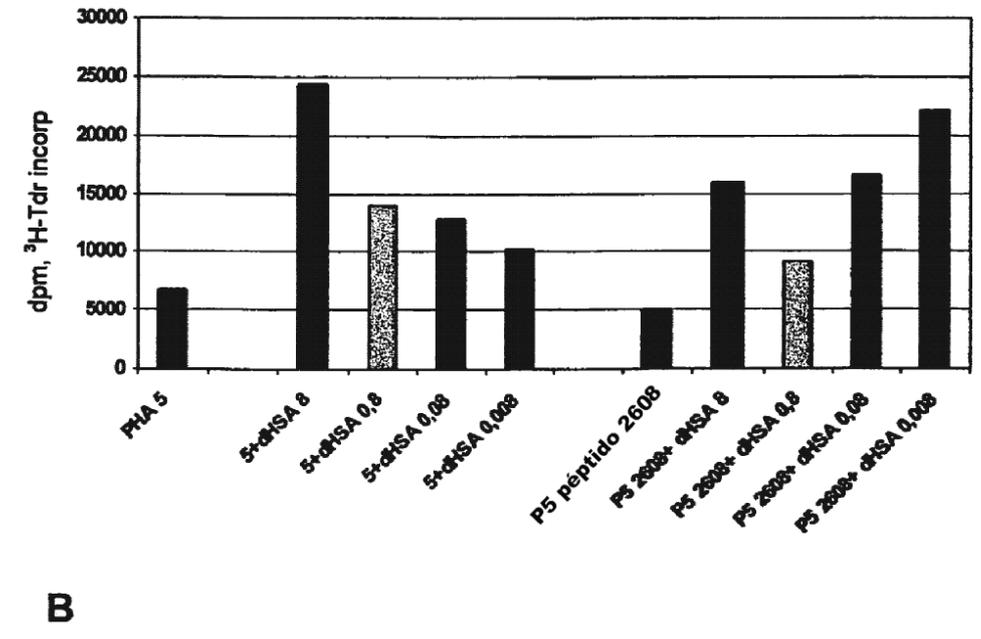
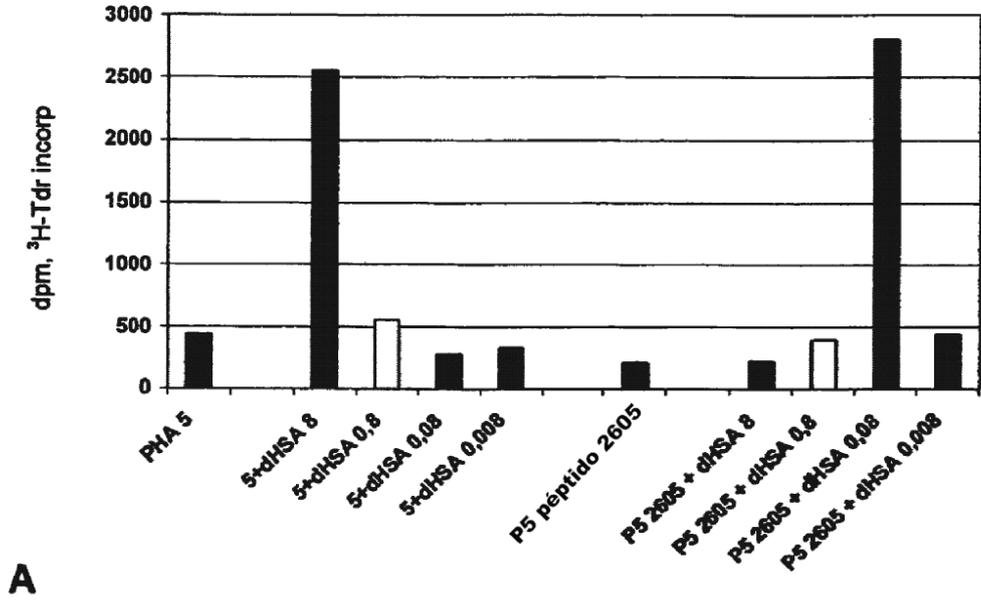


fig. 6

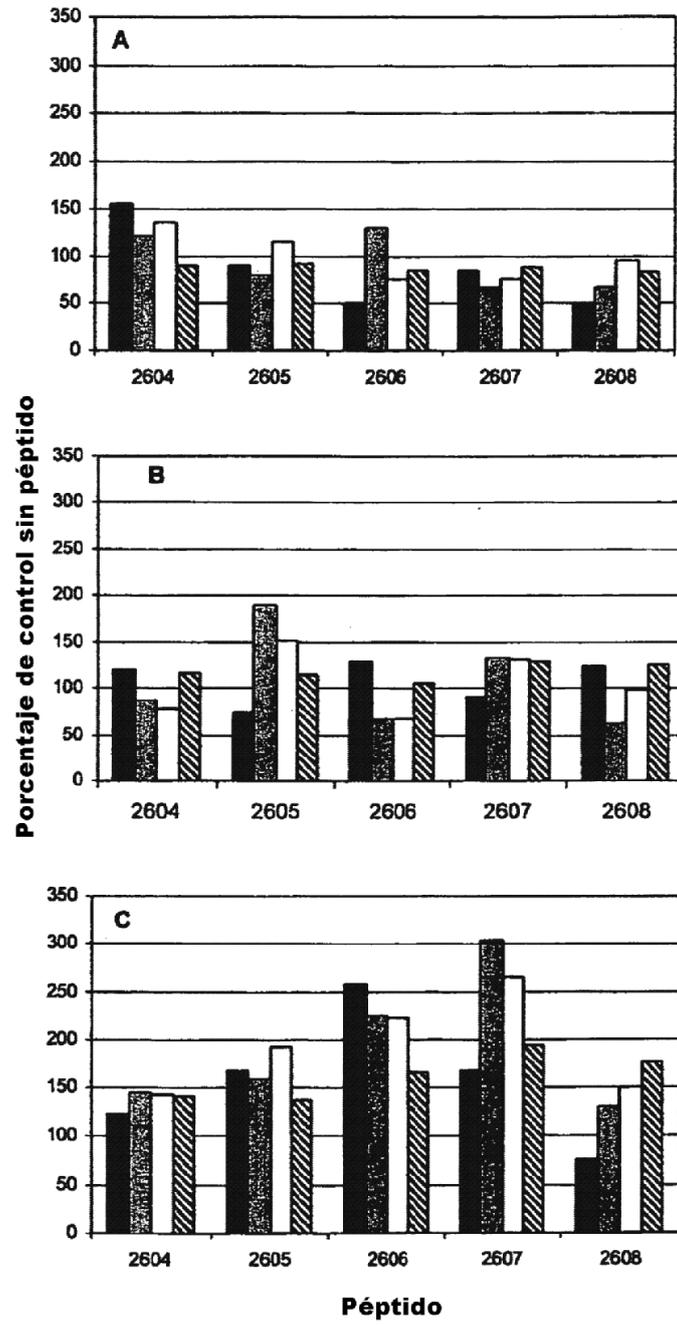


fig. 7

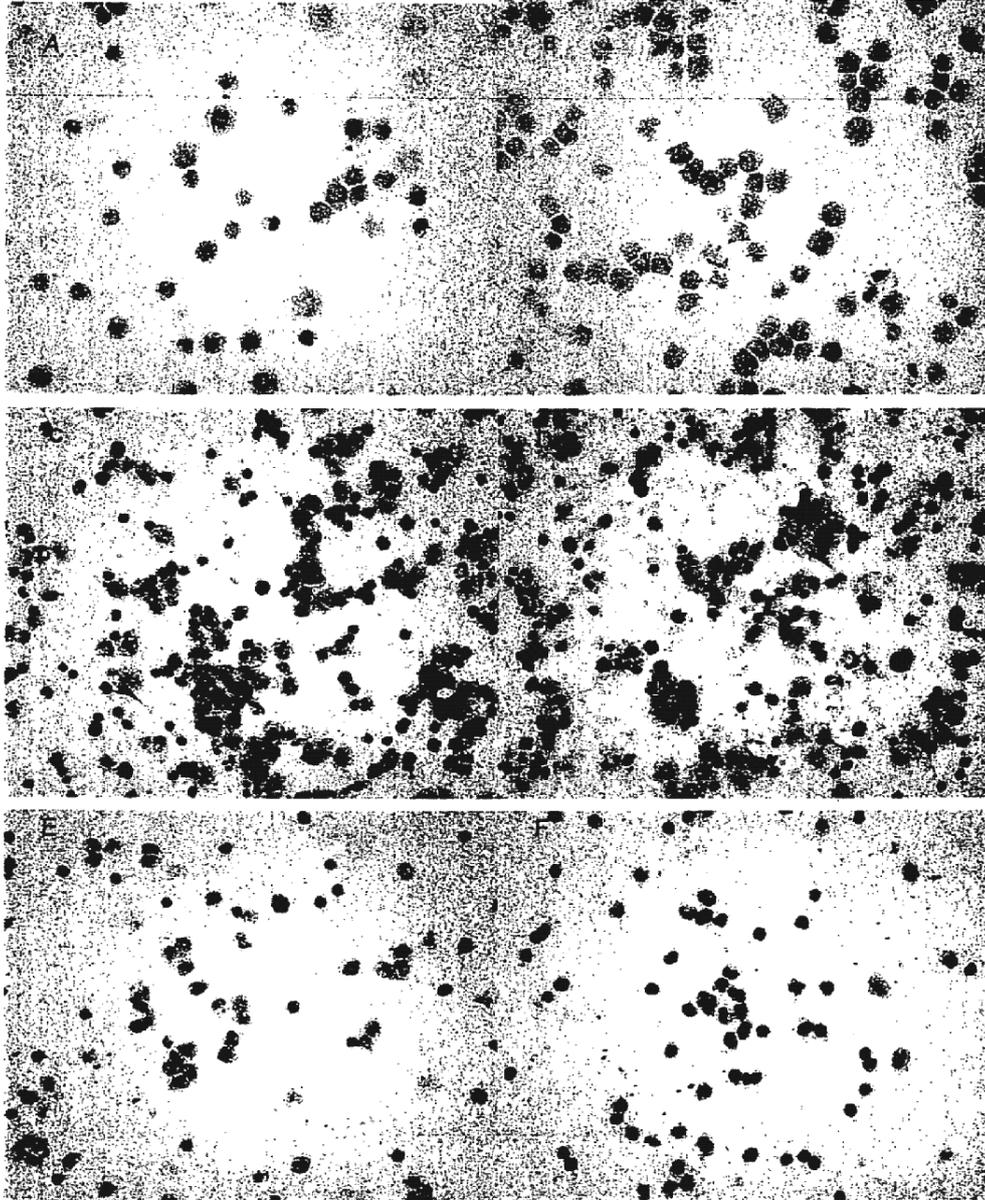


fig. 8

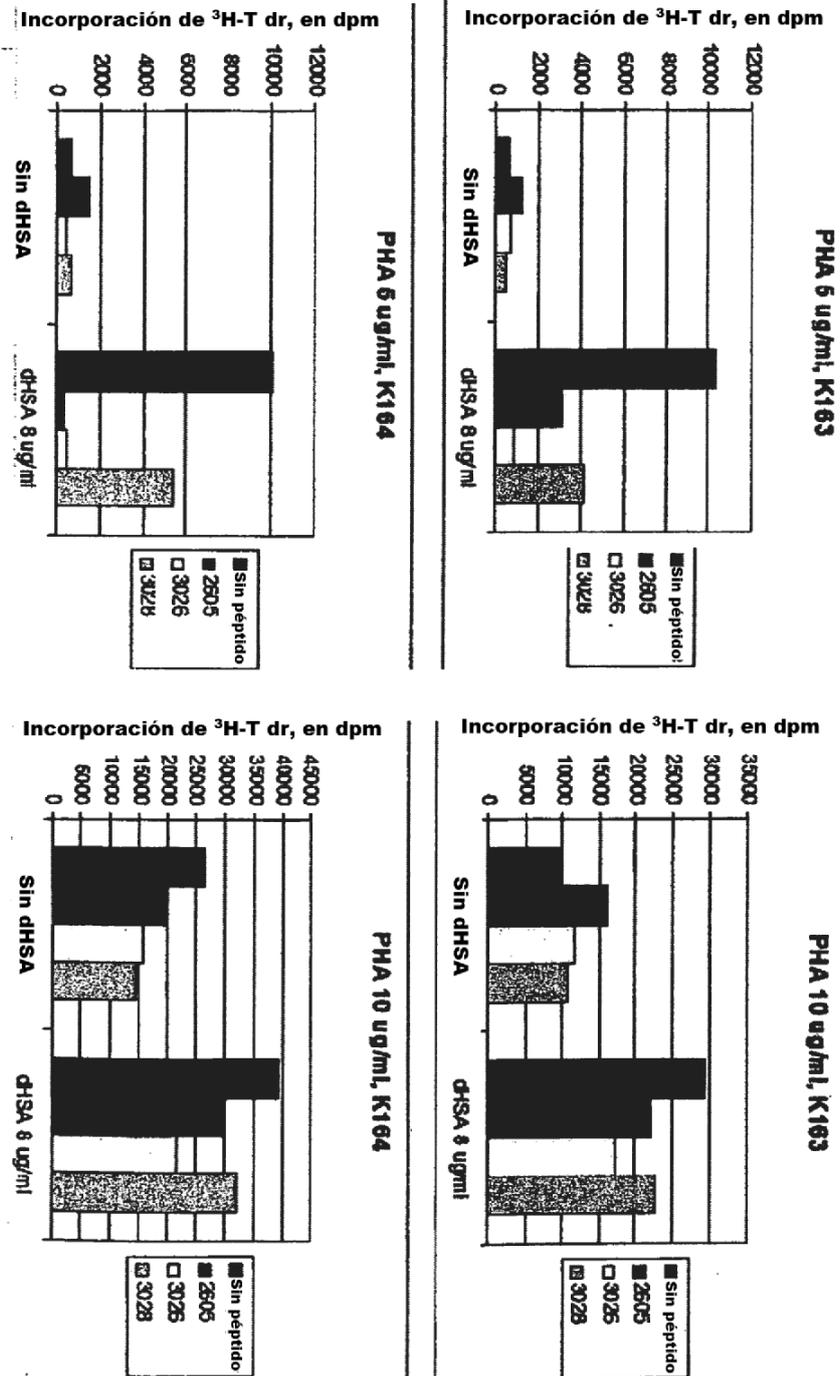


fig. 9

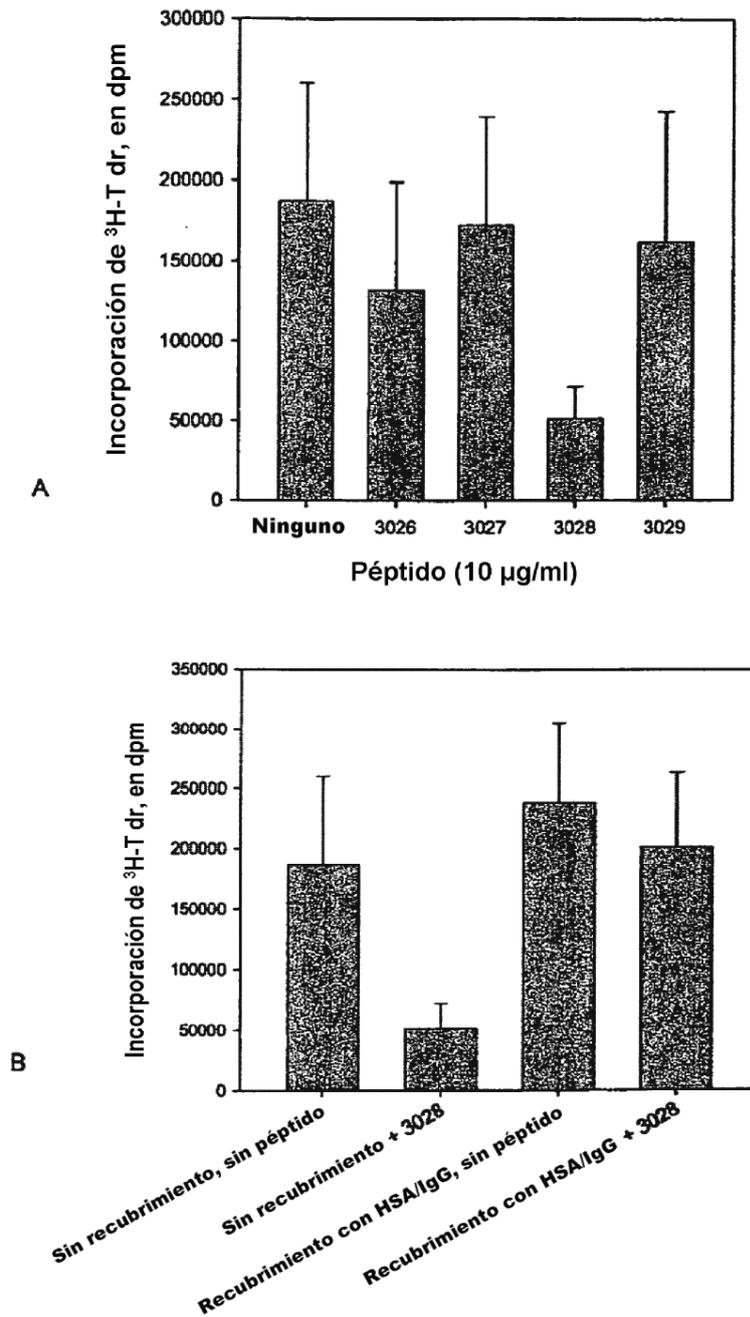
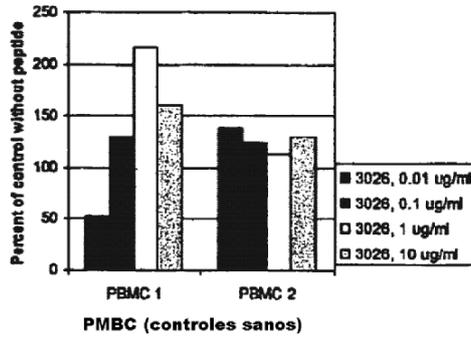
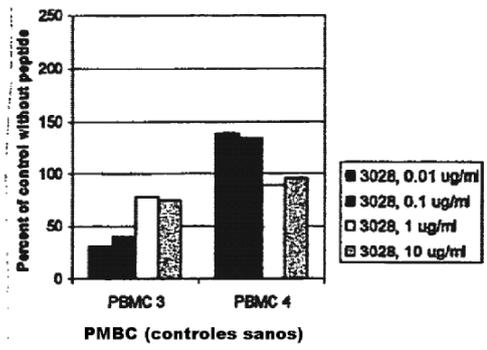


fig. 10

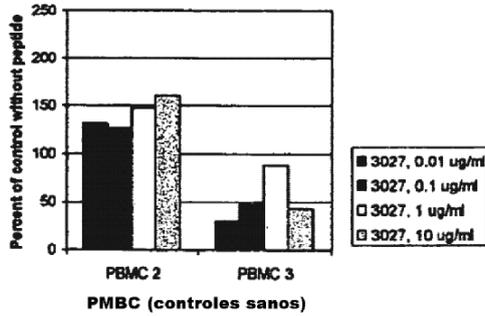
Efecto 3026 sobre la producción de IL-6 inducida por LPS



Efecto 3028 sobre la producción de IL-6 inducida por LPS



Efecto 3027 sobre la producción de IL-6 inducida por LPS



Efecto 3029 sobre la producción de IL-6 inducida por LPS

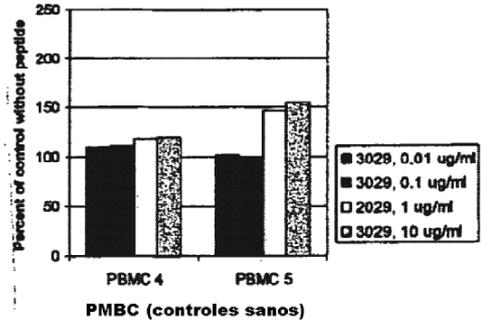
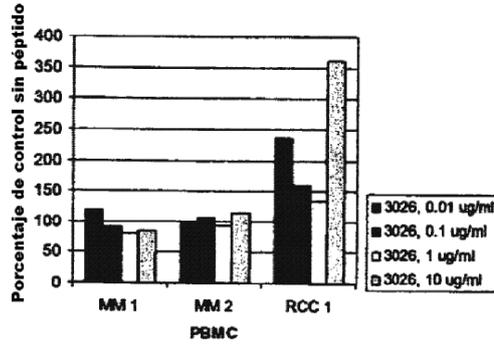
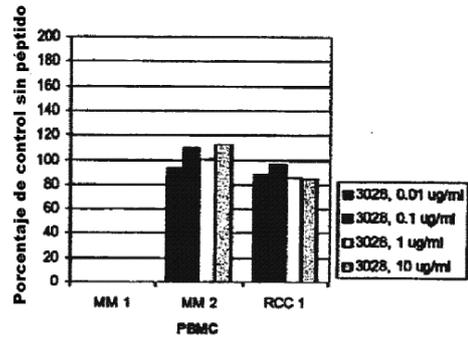


fig. 11

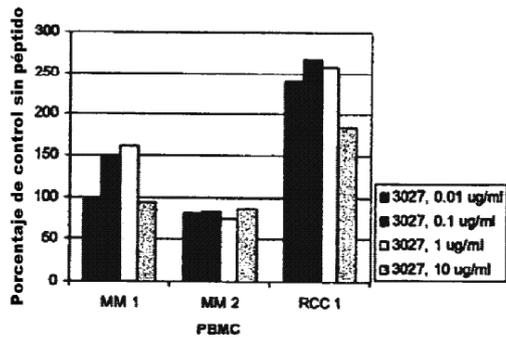
Efecto 3026 sobre la producción de IL-6 inducida por LPS



Efecto 3028 sobre la producción de IL-6 inducida por LPS



Efecto 3027 sobre la producción de IL-6 inducida por LPS



Efecto 3029 sobre la producción de IL-6 inducida por LPS

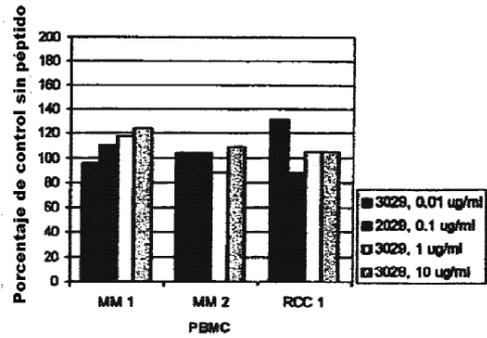


fig. 12

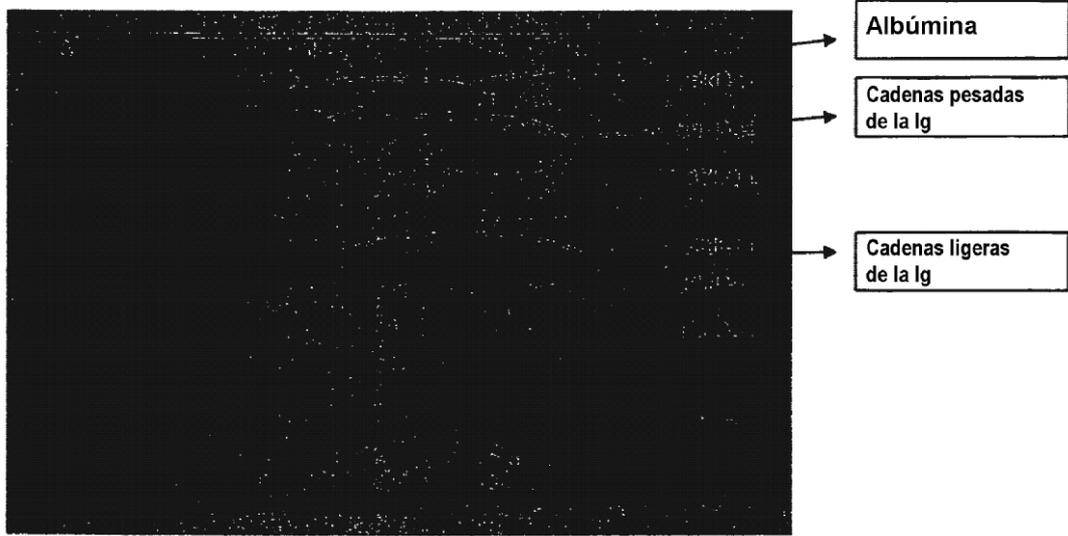


fig. 13

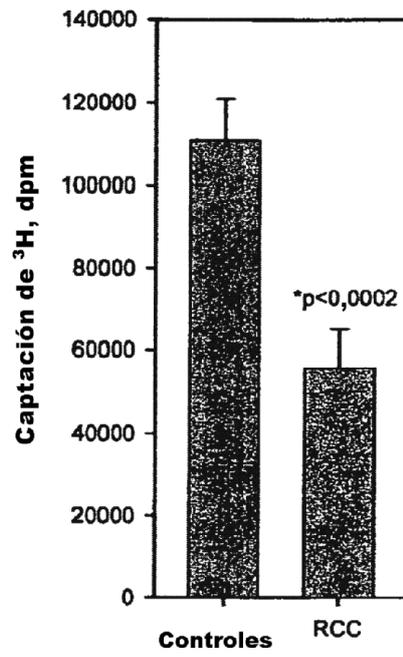


fig. 14

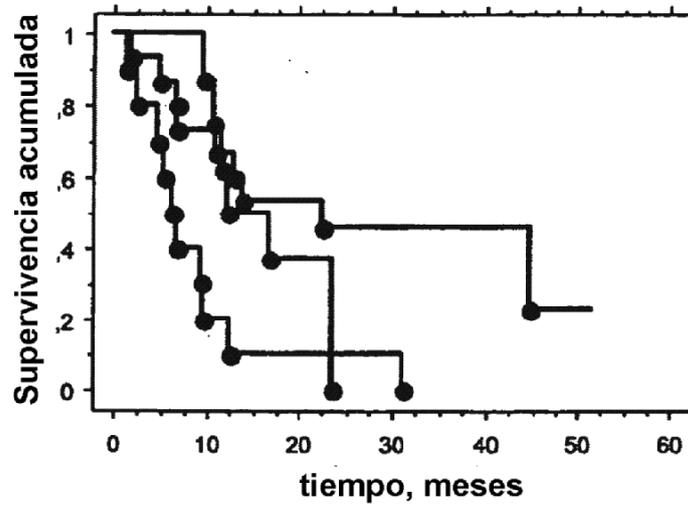


fig. 15

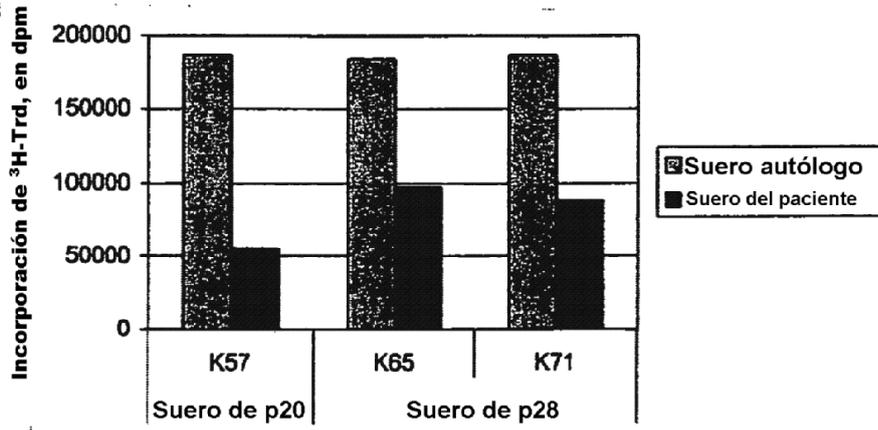


fig. 16

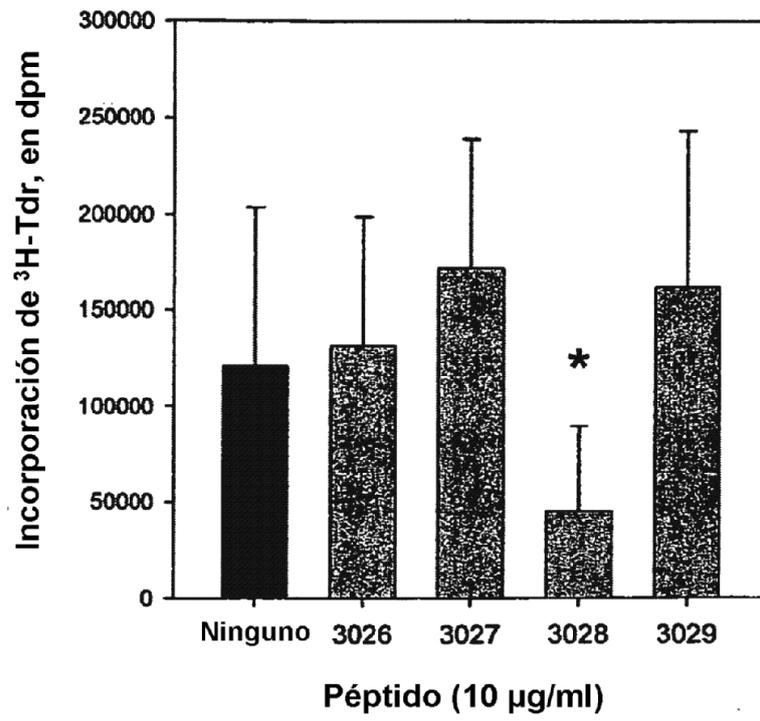


fig. 17

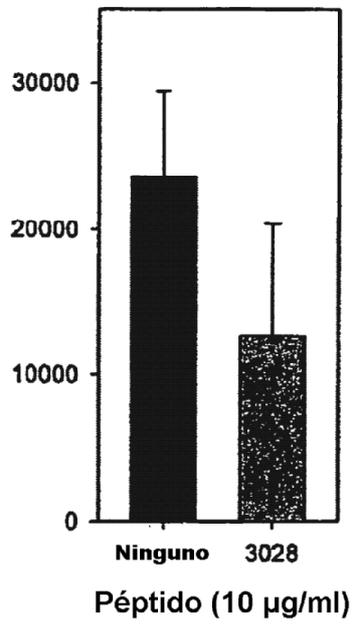


fig. 18

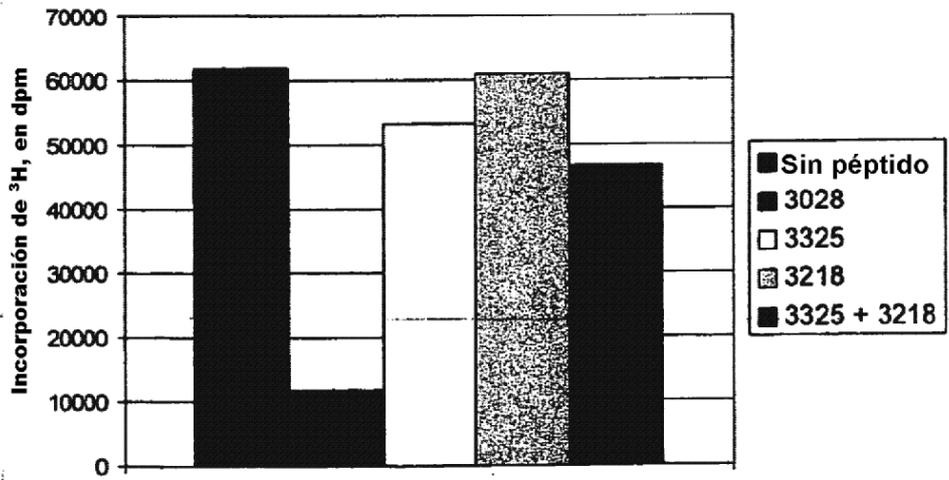
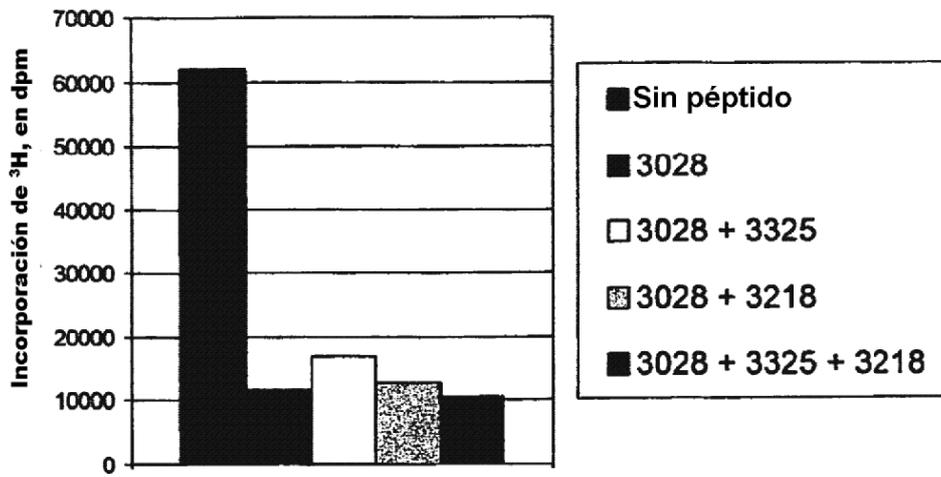


fig. 19

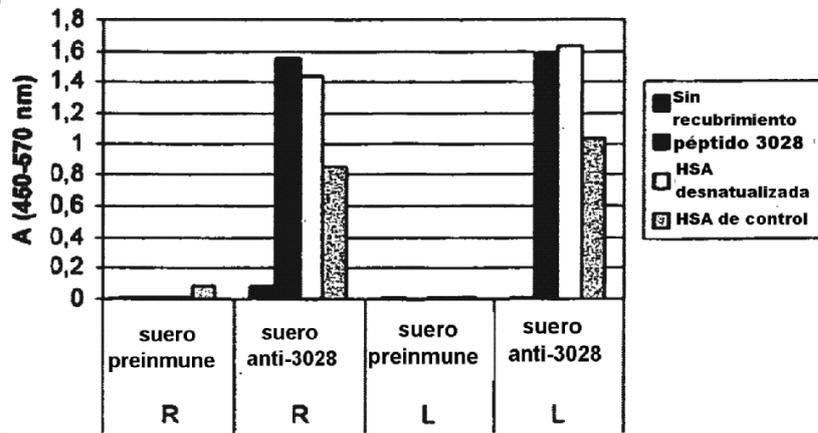


fig. 20

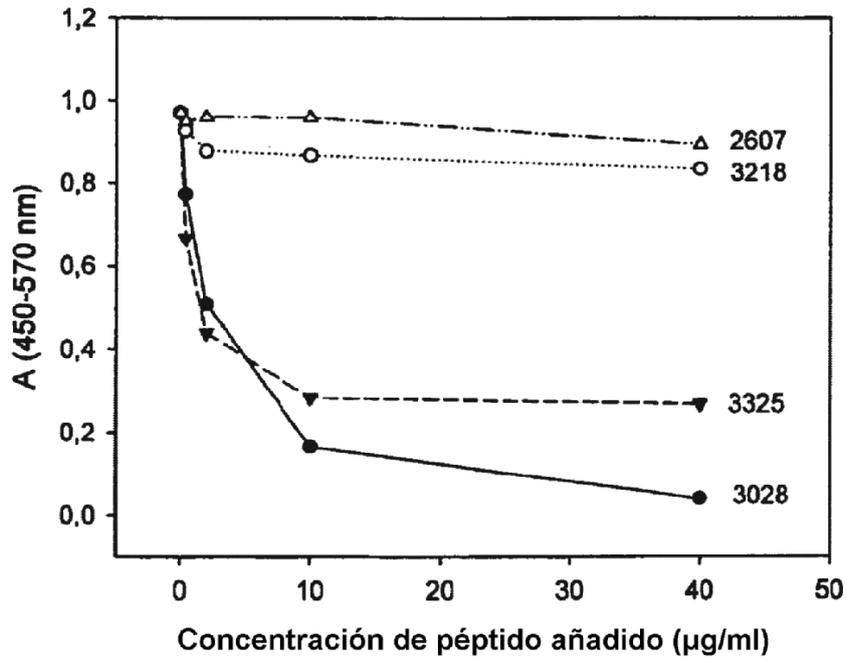


fig. 21

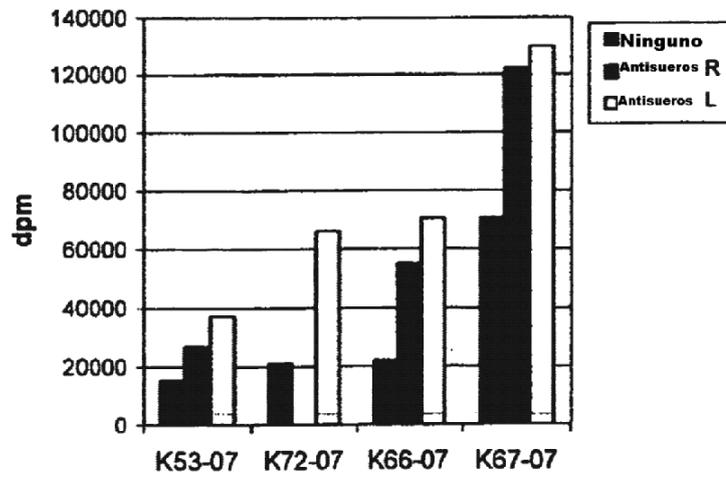
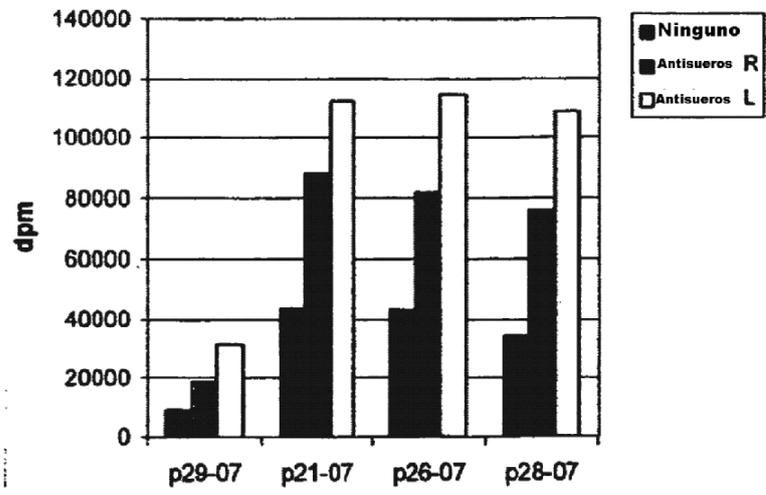


fig. 22



fig. 23

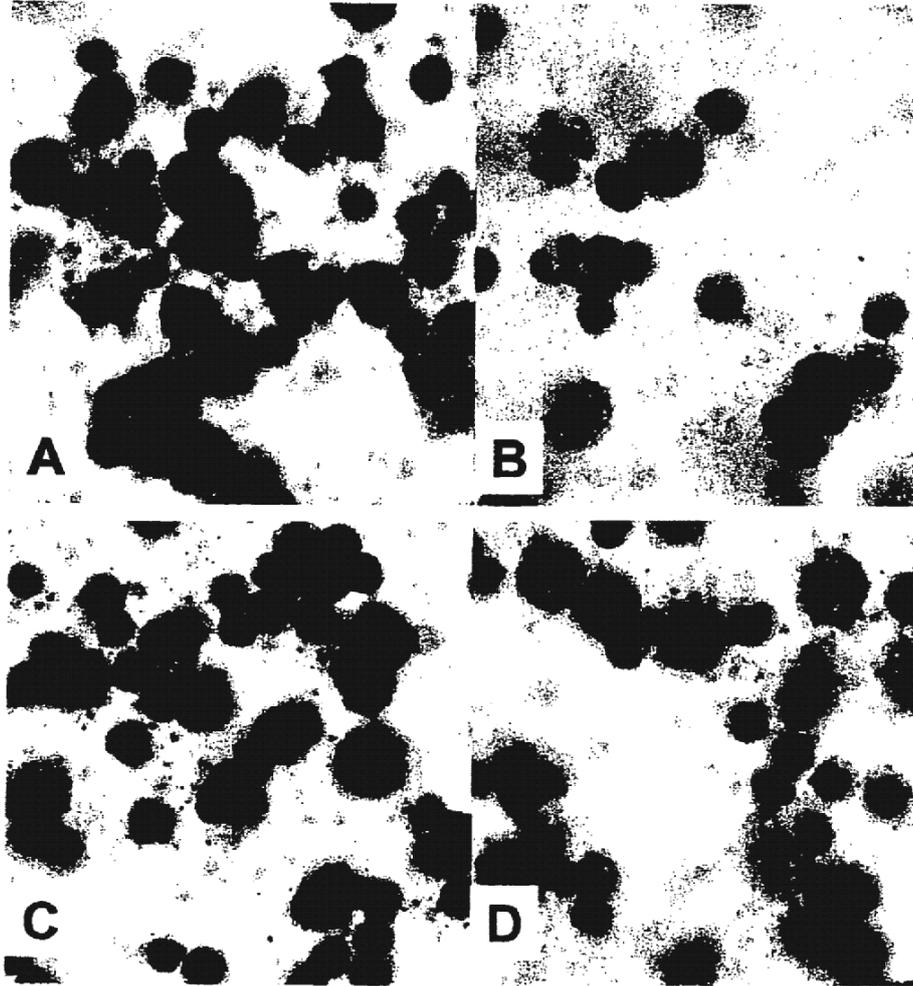


fig. 24

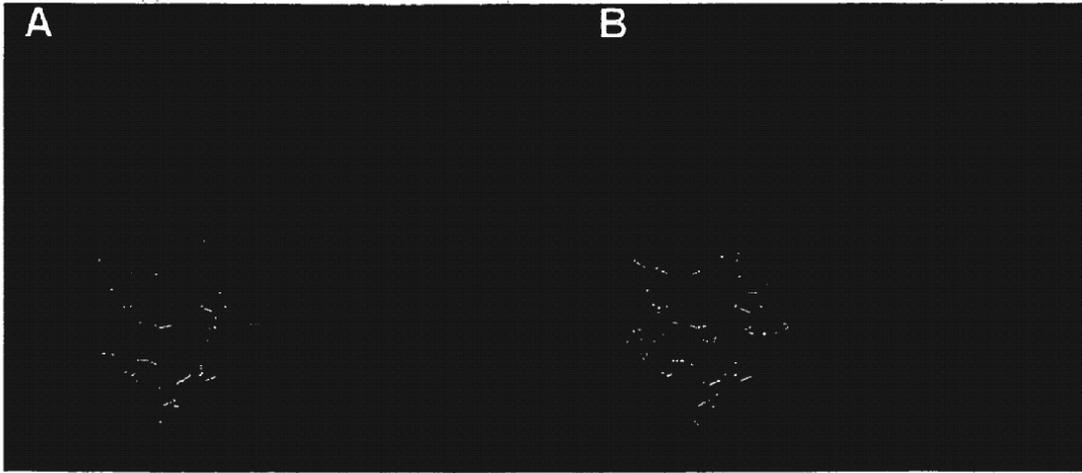


fig. 25

3028

3325

3218

**PHCYAK VFDEFKPLVE EPQMLIK QNCHLFRQ**

Cierta actividad  
antiproliferativa

Cierta actividad  
antiproliferativa

Unión débil a  
LFA-1

Unión débil a  
LFA-1

Se une a los  
anticuerpos  
purificados por  
afinidad

Se une a los  
anticuerpos  
purificados por  
afinidad

fig. 26

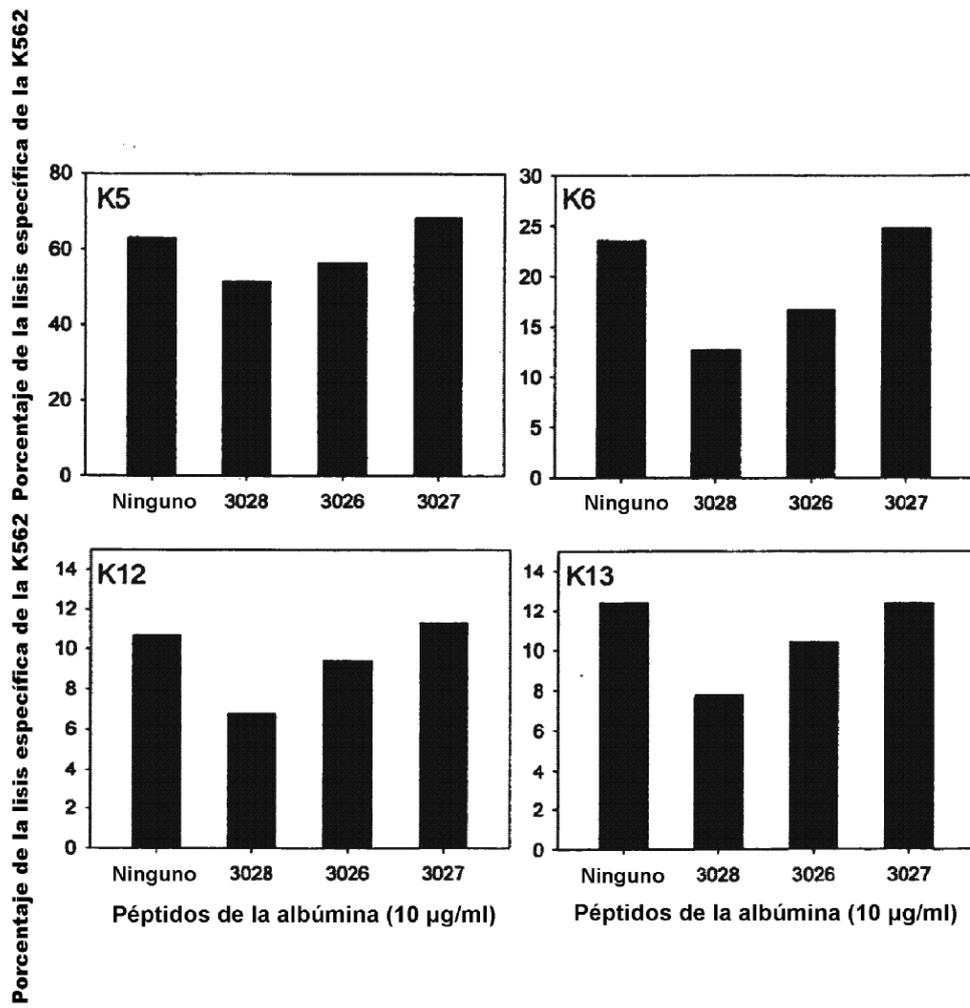


fig. 27

Tabla 4A. Secuencias de la E3-7K en la HSA

Secuencia E3K		Secuencia E4K		Secuencia E5K		Secuencia E6K		Secuencia E7K	
Inicio de la secuencia	Secuencia								
040	EENFK	155	EETFLK	030	EVAHRFK	081	ESAENCDK	290	ENQDSISSK
061	EDHVK	156	ETFLKK	068	EVTTEFAK	110	EMADCCAK	580	EKCKKADDK
084	ENCDK	378	ETTLEK	124	ECFLQHK	191	ECCQAADK	589	ETCFAEEGK
156	ETFLK	519	ETYVPK	155	EETFLKK	212	EKGASSAK		
232	ERAFK	544	ERQIKK	177	ELLFFAK	406	EEPQNLIK		
301	ECCEK	555	ELVKHK	208	ELRDEGK	449	EVSRLGK		
391	ECYAK			251	EFAEVSK	542	EKERQIKK		
544	ERQIK			304	EKPLEK	555	ELVKHKPK		
580	EKCKK			335	ESKDVCK				
594	EEGKK			407	EPQNLIK				
				420	EQLGEYK				
				542	EKERQIK				

fig. 28

Tabla 4B. Secuencias de la K3-7E en la HSA

Secuencia K3E		Secuencia K4E		Secuencia K5E		Secuencia K6E		Secuencia K7E	
Inicio de la secuencia	Secuencia								
036	KDLGE	036	KDLGEE	075	KTCVADE	065	KLNEVTE	183	KRYKAAFTF
065	KLVNE	160	KKLYE	298	KLKECCE	117	KQEPERNE	337	KDVCCKNYAE
117	KQEPE	186	KAAFTE	310	KSHCIAE	205	KLDELRLDE	558	KHKPKATKE
161	KLYE	249	KAFAE	460	KCKHPE	375	KTYETTLE	581	EKDDAKCCK
264	KVHTE	402	KPLVEE	468	KRMPCAE	412	KQNCSELF		
286	KYICE	523	KEFNAE	549	KQTALVE	548	KKQTALVE		
300	KECCE	584	KADDKE	560	KPKATKE	588	KETCFAAE		
305	KPLLE			588	KETCFAE				
341	KNYAE								
396	KVFDE								
402	KPLVE								
413	KQNCE								
499	KCCTE								
562	KATKE								

fig. 29