

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 780**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2014 PCT/EP2014/060088**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014 WO14187743**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2014 E 14724102 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2999485**

54 Título: **Composición inmunogénica de péptido de gastrina**

30 Prioridad:

21.05.2013 EP 13168565

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

27.04.2018

73 Titular/es:

**TYG ONCOLOGY LTD. (100.0%)
Synergy House 7 Acorn Business Park
Commercial Gate
Mansfield, Nottinghamshire NG18 1EX, GB**

72 Inventor/es:

**MUDDE, GEERT;
BROOME, PAUL CHRISTOPHER;
JACOBS, FREDERICK WILLIAM y
LANGER, CHRISTOF**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 665 780 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

Composición inmunogénica de péptido de gastrina

5 La invención se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden un inmunógeno de péptido de gastrina y un radical anti-CD32 unido a un ligando de TLR9, una vacuna que comprende dicha composición inmunogénica y su uso en el tratamiento de enfermedades dependientes de gastrina.

Antecedentes

10 El cáncer conocido médicamente como neoplasia maligna, es un amplio grupo de diversas enfermedades, implicando todas crecimiento celular no regulado. En el cáncer, las células se dividen y crecen sin control, formando tumores malignos e invadiendo partes cercanas del organismo. El cáncer también puede diseminarse a partes más distantes del organismo a través del sistema linfático o el torrente sanguíneo. No todos los tumores son cancerosos.
15 Los tumores benignos no crecen sin control, no invaden los tejidos vecinos y no se diseminan por todo el organismo. Hay más de 200 tipos de cáncer conocidos que afectan a los seres humanos.

Determinar qué causa el cáncer es complejo. Se sabe que muchos factores aumentan el riesgo de cáncer, incluido el consumo de tabaco, ciertas infecciones, la radiación, la falta de actividad física, la obesidad y los contaminantes ambientales. Estos pueden dañar genes directamente o combinarse con defectos genéticos existentes dentro de las células para causar la enfermedad. Aproximadamente de cinco a diez por ciento de los cánceres son completamente hereditarios.

20 El cáncer se puede detectar de varias maneras, incluida la presencia de ciertos signos y síntomas, pruebas de escrutinio u obtención de imágenes médicas. Una vez que se detecta un posible cáncer, se diagnostica mediante el examen microscópico de una muestra de tejido. El cáncer generalmente se trata con quimioterapia, radioterapia y cirugía. Las posibilidades de sobrevivir a la enfermedad varían mucho según el tipo y ubicación del cáncer y la extensión de la enfermedad al comienzo del tratamiento. Si bien el cáncer puede afectar a personas de todas las edades, y algunos tipos de cáncer son más comunes en niños, el riesgo de desarrollar cáncer generalmente
25 aumenta con la edad. En 2007, el cáncer causó aproximadamente 13% de todas las muertes humanas en todo el mundo (7,9 millones). Las tasas están aumentando a medida que más personas viven hasta una edad avanzada y cuando se producen cambios masivos en el estilo de vida en el mundo en desarrollo.

Dado que el sistema inmunitario responde a los factores ambientales que encuentra sobre la base de la discriminación entre lo propio y lo extraño, muchas clases de células tumorales que surgen como resultado de la aparición del cáncer son más o menos toleradas por el propio sistema inmunitario del paciente, ya que las células tumorales son esencialmente las propias células del paciente que crecen, se dividen y se diseminan sin un control regulador adecuado.

40 La tolerancia inmunitaria o tolerancia inmunológica es el proceso por el cual el sistema inmunitario no ataca a un antígeno. En la tolerancia natural o autotolerancia, el cuerpo no monta una respuesta inmunitaria a los autoantígenos. Ocurre en tres formas: tolerancia central, tolerancia periférica y tolerancia adquirida.

Tolerancia central¹:

45 La tolerancia central se produce durante el desarrollo de linfocitos y opera en el timo y la médula ósea. Aquí, los linfocitos T y B que reconocen autoantígenos se eliminan antes de que se conviertan en células completamente inmunocompetentes, previniendo la autoinmunidad. Este proceso es más activo en la vida fetal, pero continúa a lo largo de la vida a medida que se generan linfocitos inmaduros.

Tolerancia periférica²:

50 La tolerancia periférica es la tolerancia inmunológica desarrollada después de que las células T y B maduran y entran en la periferia. Las células T que salen del timo son relativamente, pero no completamente seguras. Algunas tendrán receptores (TCR) que pueden responder a autoantígenos que están presentes a una concentración tan alta que pueden unirse a los receptores "débiles" que las células T no encontraron en el timo (tales como las moléculas específicas de tejido como las de los islotes de Langerhans, cerebro o médula espinal). Esas células T autorreactivas que escapan a la selección intratímica negativa en el timo pueden infligir daño celular a menos que sean suprimidas o silenciadas eficazmente en el tejido periférico. Se sabe que existen varios mecanismos de retroalimentación para silenciar tales células T potencialmente auto-reactivas. Estos incluyen los siguientes: Anergia,
55 Muerte celular inducida por activación, Supresión periférica.

Tolerancia adquirida o inducida³:

La tolerancia adquirida o inducida se refiere a la adaptación del sistema inmunitario a antígenos externos caracterizados por una no reactividad específica de los tejidos linfoides con un antígeno dado que, en otras circunstancias, probablemente induciría inmunidad mediada por células o humoral. Uno de los tipos naturales más importantes de tolerancia adquirida es la tolerancia inmunitaria en el embarazo, donde el sistema inmunitario materno debe tolerar el feto y la placenta.

Inmunoterapia dirigida a antígenos asociados a tumores:

La inmunoterapia del cáncer es el uso del sistema inmunitario para rechazar el cáncer. La premisa principal es estimular el sistema inmunitario del paciente para atacar las células malignas del tumor que son responsables de la enfermedad. Esto puede ser a través de la inmunización activa del paciente (p.ej., mediante la administración de una vacuna celular contra el cáncer, como Provenge, Dendreon, Seattle, Washington, EE.UU.)⁴, en cuyo caso el propio sistema inmunitario del paciente está entrenado para reconocer las células tumorales como dianas que se destruirán, o mediante la administración de anticuerpos terapéuticos como fármacos, en cuyo caso el sistema inmunitario del paciente se recluta para destruir las células tumorales mediante los anticuerpos terapéuticos. Otro enfoque para activar el sistema inmunitario del paciente contra los tumores es utilizar los denominados antígenos asociados a tumores (TAA), que son autoproteínas que se expresan hasta cierto punto en células normales sanas, pero expresadas en exceso en células tumorales⁵. Estos TAA se formulan y se presentan al organismo de manera inmunogénica de modo que el sistema inmunitario genere una respuesta a pesar del hecho de que estas proteínas son propias. Obviamente, este enfoque solo será útil para TAA contra los cuales el paciente ha desarrollado tolerancia periférica o adquirida. Cuando las células T y B que reconocen el TAA se han eliminado del repertorio inmunológico, la inmunoterapia activa contra el cáncer no es una opción.

Gastrina:

Un ejemplo de un autoantígeno que se puede utilizar como diana para el tratamiento de cánceres gastrointestinales, tales como el cáncer de páncreas, es la gastrina (G17)⁶⁻⁹. Además, la neutralización de G17 también puede ser beneficiosa en cualquier enfermedad relacionada con la gastrina, incluidas las úlceras gástricas, enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE)¹⁰, ya que el pH del estómago está regulado por la gastrina, y para la Insuficiencia Renal en Etapa Terminal (IRET)¹¹, ya que la gastrina circula a concentraciones más altas de lo normal en pacientes con IRET.

El documento US5023077 describe composiciones inmunogénicas y métodos para el tratamiento y prevención de enfermedad ulcerosa gástrica y duodenal, cuyas composiciones inmunogénicas están basadas en péptidos de gastrina, que están acoplados a un portador inmunogénico, tal como toxoide diftérico, toxoide tetánico, hemocianina de lapa californiana o albúmina sérica bovina.

La gastrina tiene varias funciones importantes en el tracto gastrointestinal, siendo las dos más importantes la estimulación de la secreción ácida y la estimulación del crecimiento de las células en el tracto gastrointestinal. La hormona existe en al menos dos formas moleculares, heptadecagastrina, la denominada gastrina pequeña ("G17") y tetratriacontagastrina ("G34") nombrada de acuerdo con el número de residuos de aminoácidos ("AA") en cada molécula, en donde la G17 constituye los 17 residuos amino terminales ("N-terminales") de G34.

El documento US5609870 describe la preparación de un inmunógeno anti-G17 que aumenta los anticuerpos en un mamífero contra su propia G17 que no reacciona con G34 que comprende la conjugación de un péptido que consiste en una secuencia correspondiente a un fragmento de la secuencia de aminoácidos N-terminal de G17 hasta el residuo de aminoácido número 12 por su extremo C con un péptido espaciador que está conjugado con un portador inmunogénico, tal como toxoide diftérico, toxoide tetánico, hemocianina de lapa californiana y albúmina sérica bovina.

Equilibrio inmunitario:

El equilibrio inmunitario regulado por las células Th1/Th2/Th17/Treg juega un papel importante en el desarrollo de las terapias inmunitarias.

Las células Th1 (células T auxiliares de Tipo 1) se caracterizan por la producción de citocinas proinflamatorias como IFN- γ , IL-2 y TNF- β . Las células Th1 están implicadas en la inmunidad mediada por células. Las citocinas producidas por las células Th1 estimulan la fagocitosis y la destrucción de patógenos microbianos. Se han descrito varias enfermedades inflamatorias crónicas como enfermedades dominantes de tipo Th1, es decir, esclerosis múltiple, diabetes y artritis reumatoide.

Las células Th2 (células T auxiliares de Tipo 2) se caracterizan por la producción de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. Se cree que las células Th2 desempeñan un papel en las respuestas alérgicas. Las citocinas como IL-4 generalmente estimulan la producción de anticuerpos. IL-5 estimula las respuestas de eosinófilos, también parte de la respuesta inmunitaria. Se cree que la atopía y la alergia son las afecciones dominantes de tipo Th2.

El desequilibrio de la inmunidad Th1/Th2 o Th17/Treg se convierte en la causa de diversas enfermedades inmunitarias.

La alergia es considerada una reacción hipersensible a las proteínas del medio ambiente. Los alérgenos son antígenos a los que los pacientes atópicos responden con respuestas de anticuerpos IgE que posteriormente conducen a reacciones alérgicas. Los antígenos en los complejos o proteínas de fusión pueden ser alérgenos ambientales (p.ej., ácaro del polvo doméstico, polen de abedul, polen de pasto, antígenos de gato, antígenos de cucaracha) o alérgenos alimentarios (p.ej., leche de vaca, cacahuete, camarón, soja) o una combinación de ambos. Las moléculas de IgE son importantes debido a su función en la activación de células efectoras (mastocitos, basófilos y eosinófilos). Generalmente se acepta que la IgE también juega un papel importante en la fase de inducción de enfermedades alérgicas, regulando positivamente el potencial de captura de antígenos de las células B y las células dendríticas (DC), a través de receptores tanto de baja afinidad (CD23) como de alta afinidad (FcεRI). Las funciones negativas de los anticuerpos IgE pueden contrarrestarse con anticuerpos IgG específicos de alérgenos, p.ej., puesto que estos dirigen la respuesta inmunitaria de las células B a monocitos y DC. Además, compiten con las moléculas de IgE por los sitios de unión a alérgenos. Por lo tanto, las alergias se pueden tratar, curar y prevenir mediante la inducción de moléculas de IgG específicas de alérgenos.

Las moléculas de IgG tienen una vida media en suero de aproximadamente tres semanas en comparación con aproximadamente tres días para las moléculas de IgE. Las moléculas de IgE son inducidas por la interacción entre células B (no expuestas previamente) y células Th2 que proporcionan la IL-4 e IL-13 junto con la expresión de CD40L necesaria para inducir un cambio de clase a IgE en células B de memoria y células plasmáticas. Por el contrario, las células Th1, que producen IFN-γ e IL-2, inducen un cambio de clase a IgG. Por lo tanto, la inducción de respuestas de células T auxiliares de tipo Th1, en lugar de Th2 contra alérgenos, es beneficiosa para la prevención, el tratamiento y la curación de enfermedades alérgicas.

En el documento WO 97/07218 se describen proteínas de fusión alérgeno-anti-CD32. En esta publicación se evitan los problemas con el aislamiento de moléculas de IgG específicas y la baja afinidad de estos anticuerpos IgG para CD32 y se reducen los factores de riesgo de la inmunoterapia clásica, que utiliza alérgenos completos de "unión a IgE".

El documento WO2007098934A1 describe moléculas capaces de unirse a TLR9 y a CD32 que comprenden al menos un epítipo de al menos un antígeno, su producción y su uso en un medicamento, especialmente para el tratamiento de alergias.

El rol de TLR9:

Los receptores de tipo Toll (TLR) son una clase de proteínas que desempeñan un papel clave en el sistema inmunitario innato. Son receptores únicos, que abarcan la membrana, no catalíticos, generalmente expresados en la superficie de la célula y en el compartimento endocítico de las células centinelas, tales como los macrófagos y las células dendríticas. Los TLR reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), moléculas estructuralmente conservadas, derivadas de microbios e inician la señalización para inducir la producción de citocinas necesarias para la inmunidad innata y la subsiguiente inmunidad adaptativa.

Los diversos TLR muestran diferentes patrones de expresión. Este gen se expresa preferentemente en tejidos ricos en células inmunitarias, tales como bazo, nódulo linfático, médula ósea y leucocitos de sangre periférica.

Se han identificado trece TLR (denominados simplemente TLR1 a TLR13) en seres humanos y ratones, y se han encontrado formas equivalentes de muchos de ellos en otras especies de mamíferos. Sin embargo, no todos los receptores TLR en ratones también se encuentran en humanos o viceversa. Además, no se conoce el ligando y la función para cada receptor TLR, p.ej. TLR10 es un receptor huérfano con función desconocida.

La activación de los receptores TLR se ha usado para el tratamiento de diversas enfermedades, por ejemplo, se ha demostrado que la activación de TLR9 por productos farmacéuticos es beneficiosa en el tratamiento de la alergia y la oncología. Los estudios en ratones y seres humanos indican que los ligandos naturales de TLR9 son secuencias CpG no metiladas en moléculas de ADN. Los sitios CpG son relativamente raros (~1%) en los genomas de vertebrados en comparación con los genomas bacterianos o el ADN viral. El TLR9 es expresado por numerosas

células del sistema inmunitario tales como células dendríticas, linfocitos B, monocitos y células asesinas naturales (NK). Sin embargo, en seres humanos sanos, la expresión de TLR9 está restringida a células dendríticas plasmacitoides (pDC) y células B. La expresión es intracelular, dentro de los compartimentos y funciones endosomales para alertar al sistema inmunitario de infecciones virales y bacterianas uniéndose a ADN rico en motivos CpG. Sin embargo, en condiciones patológicas, también se ha informado de la expresión de TLR9 en la superficie celular de las células²⁻¹⁴.

Se ha informado sobre muchas moléculas agonistas de TLR9 sintéticas diferentes. Los ligandos agonísticos (activación de TLR9) se han clasificado en tres grupos:

El grupo que consiste en CpG de clase A, en particular oligodesoxinucleótidos (ODN) CpG-A (D)¹⁵, también conocidos como ODN tipo "D". Tales agonistas de TLR9 inducen una fuerte inducción de IFN α y una maduración mínima de las células dendríticas, y se denominan en la presente memoria ligando TLR9 del "grupo 1". Un ejemplo es ODN2216¹⁶: GGGGGACGATCGTCGGGGGG (SEQ ID 46)

El grupo que consiste en CpG de clase B, en particular oligodesoxinucleótidos (ODN) CpG-B (K)¹⁵, también conocidos como ODN tipo "K". Tales agonistas de TLR9 inducen una inducción y maduración de IFN α débil de las células dendríticas, y se denominan en la presente memoria ligando de TLR9 del "grupo 2". Un ejemplo es ODN2006^{17,18}: TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID 47)

El grupo que consiste en CpG clase C, también conocido como oligodesoxinucleótidos (ODN) CpG-C¹⁵. Tales agonistas de TLR9 inducen IFN α y maduración de células dendríticas inmaduras, y se denominan en la presente memoria ligando de TLR9 del "grupo 3". Un ejemplo es ODNM362¹⁵: TCGTCGTCGTTCGAACGACGTTGAT (SEQ ID 48)

Todos los ligandos para TLR9 descritos hasta la fecha se basan en nucleótidos. Aunque se ha informado de anticuerpos específicos para TLR9 y se han utilizado para demostrar la presencia y la ubicación del receptor, estas moléculas no se han descrito como ligandos para TLR9, no hubo ningún informe de actividad activadora o inhibidora de TLR9.

El rol de CD32:

CD32 se expresa fuertemente en monocitos/células dendríticas y células B y por lo tanto tales moléculas están diseñadas para dirigir la respuesta inmunitaria a estas células inmunológicas importantes, con la intención de prevenir la presentación de antígenos por las células B, mientras promueven la presentación de antígenos especialmente mediante células dendríticas (DC), esto último conduce a la inducción de respuestas Th1 contra el antígeno, cuando se estimula suficientemente. Existen al menos dos tipos de DC: células dendríticas mieloides (mDC) y plasmacitoides (pDC), lo que ha llevado al nuevo concepto de células DC1 y DC2. En este concepto, las células DC1 promueven la inducción del desarrollo de células Th1 después de la estimulación específica del antígeno y las células DC2 apoyan el desarrollo de células Th2. Las DC derivadas de monocitos (o mDC) generalmente se consideran de tipo DC1, mientras que las pDC se consideran de tipo DC2. Ambos tipos de DC expresan CD32a e inducirán una respuesta de células T específica de antígeno; sin embargo, no se garantiza que el resultado sea de tipo Th1. De hecho, en los donantes alérgicos las respuestas Th2 son más probables. De manera importante, la pDC expresa el receptor TLR9, que se une a CpG-ODN (oligodesoxinucleótidos (ODN) que contienen motivos CpG no metilados). La activación de este receptor en la pDC conduce a una producción muy fuerte de IFN- α e IL-12, que promueve la inducción de Th1 y por lo tanto transforma la DC2 potencial en células DC1.

Por lo tanto, tales moléculas pueden combinar la activación del receptor TLR9 en pDC con la estimulación específica y la inducción de células Th1 específicas de antígeno.

En las inmunoterapias tumorales existe el objetivo particular de utilizar células T auxiliares específicas del antígeno tumoral tipo 1 (Th1) además de linfocitos T citotóxicos (CTL).

Bobinas en espiral:

Las bobinas en espiral consisten en motivos estructurales en las proteínas, en los cuales 2-7 hélices alfa se enrollan entre sí como los hilos de una cuerda; los dímeros y trímeros son los tipos más comunes. Las hélices de bobina en espiral se han utilizado para estabilizar fragmentos de anticuerpos Fv que dan como resultado dominios heterodiméricos de bobina en espiral¹⁹.

Compendio de la invención

Existe la necesidad de proporcionar inmunoterapias mejoradas dirigidas a gastrina y enfermedades dependientes de gastrina. Por lo tanto, el objeto de la invención es proporcionar una vacuna con inmunogenicidad, estabilidad y estructura mejoradas para regular la respuesta inmunitaria a epítomos de gastrina específicos.

El objeto se resuelve por el tema que se reivindica.

De acuerdo con la invención, se proporciona una composición inmunogénica que comprende

- a. un coadyuvante dirigido que comprende al menos un radical anti-CD32 unido a un ligando de TLR9 y una primera hélice alfa peptídica; y
- b. un inmunógeno de péptido de gastrina-17 unido a una segunda hélice alfa peptídica enrollada a la primera hélice alfa, cuyo inmunógeno peptídico es uno de

(i) gastrina-17 humana que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID 1, o un fragmento de la misma que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID 2, o al menos los 4 aminoácidos N-terminales del SEQ ID 2;

(ii) un análogo de (i), preferiblemente de origen de mono rhesus o murino; y/o

(iii) una variante funcionalmente activa de cualquiera de (i) o (ii), con una, dos, tres o cuatro mutaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID 2.

Específicamente, dicho inmunógeno peptídico es un péptido lineal que comprende o consiste en

(i) una secuencia de aminoácidos del SEQ ID 3, preferiblemente la SEQ ID 4;

(ii) una secuencia de aminoácidos del SEQ ID 5, preferiblemente la SEQ ID 6;

(iii) una secuencia de aminoácidos del SEQ ID 7, preferiblemente la SEQ ID 8; o

(iii) una secuencia de aminoácidos del SEQ ID 2 o 9.

Se prefiere que la composición inmunogénica de la invención comprenda al menos dos de los inmunógenos peptídicos unidos a la segunda hélice alfa peptídica, preferiblemente 2, 3 o 4 de los inmunógenos peptídicos.

Cuando se une más de un inmunógeno peptídico a la segunda hélice alfa, los inmunógenos peptídicos pueden p.ej. conjugarse con la hélice alfa consecutivamente, es decir, unir los inmunógenos peptídicos en una fila, p. unir el extremo C terminal de un primer inmunógeno peptídico a un extremo N terminal de un segundo inmunógeno peptídico, cuyos primer y segundo inmunógenos peptídicos son idénticos o difieren entre sí.

Alternativamente, o además, se pueden incorporar inmunógenos peptídicos adicionales a la composición inmunogénica de la invención entrecruzando, p.ej. dos o más inmunógenos peptídicos, que son idénticos o difieren entre sí, están unidos a la misma hélice alfa por reacción química, tal como la entrecruzamiento químico que permite el establecimiento de enlaces cruzados intermoleculares, p.ej. con reactivos homobifuncionales tales como adipimidato de dimetilo (DMA), suberimidato de dimetilo (DMS) o glutaraldehído. Por ejemplo, tal entrecruzamiento se puede realizar empleando entrecruzamiento de glutaraldehído mediante grupos de lisina libres de la hélice alfa o un espaciador/conector, respectivamente. De ese modo, dos o más inmunógenos peptídicos, según se utilizan de acuerdo con la invención, se acoplan a la hélice alfa en paralelo, o uno junto al otro.

De acuerdo con un aspecto específico de la invención, cada una de dichas primera y segunda hélices alfa comprende repeticiones de 3 a 5 aminoácidos de un motivo de aminoácidos, uniéndose específicamente entre sí con una Kd de menos de 10^{-6} M, preferiblemente con una Kd de menos de 10^{-7} M, más preferido menos de 10^{-8} M o 10^{-9} M.

De acuerdo con un aspecto específico adicional de la invención, dicho radical anti-CD32 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD32, un fragmento de anticuerpo y un péptido, preferiblemente dirigido a CD32a. El fragmento de anticuerpo específicamente puede, p.ej. ser un Fab, Fv, scFv, dAb, F(ab)2 o Fcab, o cualquier otra posible entidad de unión, siempre que se una específicamente al receptor y se internalice después de la unión.

Específicamente, dicho radical anti-CD32 se dirige a CD32a, preferiblemente con una alta afinidad de $K_d \leq 10^{-6}$ M, más preferido menos de 10^{-7} M o menos de 10^{-8} M.

Más específicamente, dicho radical anti-CD32 es un elemento de unión de CD32a específico o selectivo, es decir, que no se dirige a CD32b o que se dirige a CD32b con una baja afinidad de $K_d > 10^{-6}$ M, preferiblemente superior a 10^{-5} M, más preferido superior a 10^{-4} M. La afinidad diferencial de unión a CD32a y CD32b es preferiblemente al menos 1 log, más preferido al menos 2 log o al menos 3 log de la diferencia más alta en el valor de Kd.

La alta afinidad específicamente preferida o la alta afinidad diferencial del radical anti-CD32 para unirse a CD32a en lugar de CD32b se utiliza típicamente en una vacuna inmunoestimulante que emplea adicionalmente el ligando agonístico de TLR9.

- 5 La afinidad de unión del radical anti-CD32 que se dirige utilizando específicamente a cualquiera de CD32a o CD32b, o tanto a CD32a como a CD32b, puede determinarse en un ensayo adecuado tal como un ELISA típico utilizando formas recombinantes etiquetadas con HIS de CD32a y CD32b asequibles comercialmente, aplicadas como recubrimiento sobre placas de ELISA Ni-NTA, p.ej. Placas Ni-NTA HisSorb (Qiagen, Austria). Los radicales anti-CD32 pueden estar biotinilados y, como tales, pueden detectarse utilizando estreptavidina-HRP o estreptavidina AP y los sustratos apropiados. Alternativamente, los radicales se pueden analizar en un ensayo FACS utilizando células U937 (p.ej., ATCC: CRL 1593) que expresan CD32a pero no CD32b y células B transformadas con EBV, p.ej. CFB4:2 como describen van Reijssen et al.²⁰, que expresan CD32b y no CD32a.
- 10 De acuerdo con un aspecto específico adicional de la invención, dicho ligando de TLR9 es un agonista de TLR9 seleccionado del grupo que consiste en oligodesoxinucleótidos CpG de clase A, B y C, o un péptido inmunoestimulador que imita a cualquiera de los oligodesoxinucleótidos de CpG.
- 15 De acuerdo con un aspecto específico de la invención, el ligando de TLR9 es un agonista de TLR9 seleccionado del grupo que consiste en CpG de clase A, en particular oligodesoxinucleótidos (ODN) CpG-A (D)¹⁷, también conocidos como ODN tipo "D". Dichos agonistas de TLR9 inducen una fuerte inducción de IFN α y una maduración mínima de células dendríticas, y se denominan en la presente memoria ligando TLR9 del "grupo 1".
- 20 De acuerdo con otro aspecto específico de la invención, el ligando de TLR9 es un agonista de TLR9 seleccionado del grupo que consiste en CpG de clase B, en particular oligodesoxinucleótidos (ODN) CpG-B (K)²¹, también conocidos como ODN tipo "K". Dichos agonistas de TLR9 inducen una débil inducción y maduración de IFN α de células dendríticas, y se denominan en la presente memoria ligando de TLR9 del "grupo 2".
- 25 De acuerdo con otro aspecto específico de la invención, el ligando de TLR9 específicamente es un agonista de TLR9 seleccionado del grupo que consiste en CpG de clase C, también conocido como oligodesoxinucleótidos (ODN) CpG-C^{15;21}. Dichos agonistas de TLR9 inducen IFN α y la maduración de células dendríticas inmaduras, y se denominan en la presente memoria ligando de TLR9 del "grupo 3".
- 30 La inducción de IFN α puede determinarse por el nivel de expresión de IFN α y el respectivo aumento con respecto a un nivel de referencia. El aumento relativo a las células no estimuladas se puede comparar con los niveles de inducción inducidos por las referencias establecidas para cada tipo de CpG como se define por el grupo 1, 2 o 3 ligando de TLR9 y está típicamente entre 30% y 300% de la referencia respectiva, preferiblemente al menos 100%, más preferiblemente al menos 120%, al menos 150%, al menos 200% o al menos 250%.
- 35 La maduración de las células dendríticas inmaduras puede determinarse por el nivel de expresión de cualquiera de los marcadores CD80, CD83 y CD86. El respectivo aumento con respecto a las células no estimuladas se puede comparar con los niveles de inducción inducidos por referencias establecidas para cada tipo de CpG como se define por el ligando TLR9 del grupo 1, 2 o 3 y está típicamente entre 30% y 300% de la referencia respectiva, preferiblemente al menos 100%, más preferiblemente al menos 120%, al menos 150%, al menos 200% o al menos 250%.
- 40 Específicamente, el agonista de TLR9 del grupo 1 y 3 daría como resultado un aumento de expresión de IFN α y un agonista de TLR9 del grupo 2 y 3 conduciría a un aumento de expresión de cualquiera de los factores de maduración de DC CD80, CD83 y CD86. El antagonista de TLR9 daría como resultado una reducción de la expresión de IFN α y una reducción de la expresión de cualquiera de los factores de maduración de DC CD80, CD83 y CD86, incluso en presencia de un agonista de TLR9 de cualquier grupo 1-3.
- 45 Como una alternativa a los ligandos de TLR9 polinucleotídicos como se describió anteriormente, se puede utilizar cualquier otro elemento de unión a TLR9 con efecto agonístico, v.g. un elemento de unión peptídico o un elemento de unión proteico, incluyendo anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.
- 50 De acuerdo con un aspecto específico adicional de la invención, la composición inmunogénica comprende una o más secuencias conectoras, preferiblemente compuestas de residuos de glicina y/o serina y/o lisina, preferiblemente una secuencia de aminoácidos del SEQ ID 12 o 13. Las secuencias conectoras pueden ser lineales o ramificadas, p.ej. para proporcionar un enlace o entrecruzamiento entre dos o más entidades peptídicas o polipeptídicas.
- 55 De acuerdo con un aspecto específico adicional de la invención, la composición inmunogénica comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 10 o SEQ ID 11.
- 60 De acuerdo con la invención, se proporciona adicionalmente una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicha vacuna es típicamente una vacuna

inmunoestimulante, p.ej. que estimula la respuesta inmunitaria humoral y de células T (Th1).

De acuerdo con una realización preferida, la respuesta inmunitaria humoral y de células T (Th1) es transitoria, p.ej. con un título de IgG máximo específico inducido tras la vacunación que normalmente se logra en un periodo de 2 a 8 semanas tras la vacunación, seguido de una reducción del título de al menos 30%, preferiblemente al menos 40% o al menos 50% o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o hasta 100%, en el plazo de los 6 meses posteriores a la vacunación, preferiblemente en el plazo de 5 meses, o en el plazo de 4 meses, o en el plazo de 3 meses, o en el plazo de 2 meses. Dicha reducción del título puede aumentarse de nuevo con una inyección de refuerzo. En una serie de vacunación, la respuesta inmunitaria transitoria posiblemente se determina después de la última inyección de la composición inmunogénica o vacuna. La respuesta inmunitaria transitoria tiene la ventaja de un tratamiento controlado con, p.ej. la posibilidad de interrumpir o detener el tratamiento según sea necesario.

De acuerdo con la invención, se proporciona además un kit para preparar la composición inmunogénica de la invención, que comprende los siguientes componentes

- a. un coadyuvante dirigido que comprende al menos un radical anti-CD32 unido a un ligando de TLR9 y una primera hélice alfa peptídica; y
- b. un inmunógeno de péptido de gastrina-17 unido a una segunda hélice alfa peptídica que coincide con la primera hélice alfa" cuyo inmunógeno peptídico es uno de

- (i) gastrina-17 humana que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID 1, o un fragmento de la misma que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 2, o al menos los 4 aminoácidos N-terminales de SEQ ID 2;
- (ii) un análogo de (i), preferiblemente de origen de mono rhesus o murino; y/o
- (iii) una variante funcionalmente activa de cualquiera de (i) o (ii), con una, dos, tres o cuatro mutaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 2.

El kit se puede utilizar específicamente para facilitar la producción de la vacuna utilizando el componente coadyuvante dirigido preformado para la combinación con un inmunógeno que se puede proporcionar de acuerdo con la necesidad de un grupo de sujetos o del sujeto individual.

De acuerdo con la invención, se proporciona adicionalmente la composición inmunogénica para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece enfermedades o estados de enfermedad dependientes de gastrina. Dicha enfermedad o estado de enfermedad están causados principalmente por o están asociados a la producción o la producción en exceso de gastrina endógena en el sujeto. Las enfermedades o estados de enfermedad dependientes de gastrina incluyen específicamente tumores dependientes de gastrina o cáncer dependiente de gastrina, tales como cáncer de páncreas o cánceres gastrointestinales, úlcera gástrica, enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), insuficiencia renal en etapa terminal (IRET) u obesidad.

Por tanto, la invención proporciona específicamente un método para tratar a un sujeto que padece enfermedades dependientes de gastrina, tales como tumores dependientes de gastrina o cáncer dependiente de gastrina, tales como cáncer de páncreas o cánceres gastrointestinales, úlcera gástrica, enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), insuficiencia renal en etapa terminal (IRET) u obesidad, mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de la composición inmunogénica o la vacuna de la invención, ya sea profilácticamente, p.ej. para prevenir el brote de una enfermedad o estado de enfermedad o el progreso de la enfermedad, o terapéuticamente, p.ej. para mejorar una enfermedad o estado de enfermedad.

Específicamente, la composición se administra al sujeto en una cantidad eficaz empleando una estrategia de estímulo primario.

Específicamente, la cantidad eficaz oscila entre 0,0001 y 2 mg por administración, preferiblemente entre 0,001 y 2 mg por dosis.

De acuerdo con una realización específica de la invención, el sujeto se trata adicionalmente mediante quimioterapia, p.ej. en el curso de tratar un cáncer dependiente de gastrina.

Específicamente, la composición inmunogénica de la invención desencadena una respuesta inmunitaria protectora en el sujeto, preferiblemente con un título de IgG en suero contra la gastrina-17 humana de al menos 1/1000, preferiblemente al menos 1/10⁴, preferiblemente al menos 1/10⁵, preferiblemente al menos 1/10⁶, o inferior, por lo tanto, detectable a una dilución más alta.

Figuras

La Figura 1 muestra el anticuerpo (inducción de IgG) en monos cinomolgos. Curva de tiempo de inducción de IgG anti G17, después de tres inyecciones con la vacuna (TYG100_2RM) en d0, d14 y d28. Se observó una significativa inducción de IgG contra la bobina 1 de ScFV y G17RM y G17H. No se observó respuesta contra un péptido control de peso molecular similar o cuando los animales se inmunizaron con G17RM_2 sin la presencia de cabeza activa. Todos los títulos de IgG específicos disminuyen 4 semanas después de la última inmunización, lo que indica que son necesarias inyecciones de refuerzo para mantener los niveles de IgG. Además, la presencia de G17RM natural no refuerza la respuesta y dado que la disminución de IgG contra G17RM es significativamente mayor que la de la bobina 1 de ScFV, se puede concluir que la respuesta inmunitaria inducida es reversible.

La Figura 2 muestra la pérdida de peso tras la inmunización anti-gastrina. Cuatro de los 6 animales mostraron una pérdida significativa de peso dependiente del tiempo después de la inmunización con TYG100_2RM. Los cuidadores de animales observaron que estos animales perdían el apetito por los aperitivos de la tarde, sin perder el interés en la comida diaria normal. Tales observaciones nunca se hicieron con otras vacunas, por lo tanto, la vacuna anti-gastrina de la invención se puede utilizar para controlar la obesidad.

La Figura 3 muestra la información de secuencia de

SEQ ID 1: pequeña gastrina humana, G17;

SEQ ID 2: péptido de gastrina humana, primeros 12 AA (aminoácidos) (N-terminales) de gastrina pequeña, G12;

SEQ ID 3: epítipo N-terminal de gastrina pequeña, primeros 4 AA (N-terminales), que incluyen variantes específicas funcionalmente activas con mutaciones puntuales;

SEQ ID 4: epítipo N-terminal de gastrina pequeña, primeros 4 AA (N-terminales), que incluyen variantes funcionalmente activas más específicas con mutaciones puntuales;

SEQ ID 5: epítipo N-terminal de gastrina pequeña, primeros 12 AA (N-terminales), que incluyen variantes específicas funcionalmente activas con mutaciones puntuales;

SEQ ID 6: Epítipo N-terminal de gastrina pequeña, primeros 12 AA (N-terminales), que incluyen variantes funcionalmente activas más específicas con mutaciones puntuales;

SEQ ID 7: epítipo N-terminal de gastrina pequeña, primeros 13 AA (N-terminales), que incluyen variantes específicas funcionalmente activas con mutaciones puntuales;

SEQ ID 8: epítipo N-terminal de gastrina pequeña, primeros 13 AA (N-terminales), que incluyen variantes funcionalmente activas más específicas con mutaciones puntuales;

SEQ ID 9: péptido de gastrina humana, primeros 13 AA (aminoácidos) (N-terminales) de gastrina pequeña, G13;

SEQ ID 10: Componente inmunogénico de TYG100_1H: Parte de una composición inmunogénica de la invención, que comprende un péptido de gastrina humano de SEQ ID NO 9, una secuencia conectora y un péptido hélice alfa (TYG100_1H). Esta parte puede estar unida al coadyuvante dirigido adecuado por un enlace de bobina espiral.

negrita es el inmunógeno peptídico, *cursiva es conector*, subrayado es la bobina

SEQ ID 11: Componente inmunógeno de TYG100_2H: Parte de una composición inmunogénica de la invención, que comprende dos péptidos de gastrina humanos de SEQ ID NO 9, una secuencia conectora ramificada y un péptido hélice alfa (TYG100_2H). Esta parte puede estar unida al coadyuvante dirigido adecuado por un enlace en espiral.

negrita es el inmunógeno peptídico, *cursiva es conector*, subrayado es la bobina

SEQ ID 12: secuencia conectora lineal;

SEQ ID 13: secuencia conectora ramificada.

Descripción detallada de la invención

Los términos específicos utilizados en toda la memoria descriptiva tienen el siguiente significado.

El término "coadyuvante", según se utiliza en la presente memoria, significa un componente integrado o administrado conjuntamente de una vacuna, que:

- mejora la respuesta inmunitaria a un inmunógeno específico, p.ej. un antígeno o un hapteno. La respuesta inmunitaria es típicamente mayor que la respuesta inmunitaria provocada por una cantidad equivalente de la composición inmunogénica administrada sin el coadyuvante, y/o
- el coadyuvante se utiliza para dirigir un tipo particular o clase de respuesta inmunitaria contra el inmunógeno, p.ej. un tipo de respuesta inmunitaria Th1 o Treg, entendido aquí como "coadyuvante dirigido".

Una "cantidad eficaz" de un coadyuvante de la presente invención específicamente es una cantidad que potencia

una respuesta inmunológica al inmunógeno de manera que, por ejemplo, se requieren menos o menores dosis de la composición inmunogénica para generar una respuesta inmunitaria eficaz de la clase deseada.

El coadyuvante dirigido de acuerdo con la invención no solo media la respuesta inmunitaria eficaz, sino también la regulación de la respuesta inmunitaria de la manera deseada. Al dirigir el inmunógeno a las células inmunitarias apropiadas para su internalización y procesamiento posterior, se induce la respuesta inmunitaria Th1 en lugar de la respuesta inmunitaria Th2, en particular cuando se emplea un ligando de TLR9 que es un agonista de TLR9 del grupo 3. Si un agonista de TLR9 de el grupo 1 se combina con un radical anti-CD32 que se une a CD32b, generalmente se anticipa la inducción de células Treg.

Una "cantidad eficaz" de una composición inmunogénica, p.ej. según se utiliza en una vacuna de la invención se refiere a una cantidad suficiente para mostrar un beneficio significativo en un sujeto que se está tratando, cuando se administra como parte de un régimen de dosificación de vacunación. Los expertos en la técnica apreciarán que, en algunas realizaciones, se puede considerar que una composición particular contiene una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz si contiene una cantidad apropiada para una forma de dosificación unitaria administrada en un régimen de dosificación específico, aunque tal la cantidad puede ser insuficiente para lograr el beneficio significativo si se administra como una única dosis unitaria. Los expertos en la técnica apreciarán adicionalmente que una cantidad eficaz de una composición inmunogénica puede diferir para diferentes sujetos que reciben la composición, por ejemplo dependiendo de factores tales como el criterio de valoración biológico deseado, la naturaleza de la composición, la vía de administración, la salud, tamaño y/o edad del sujeto que se esté tratando, etc. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es aquella que se ha correlacionado con un efecto beneficioso cuando se administra como parte de un régimen de dosificación particular, por ejemplo. una sola administración o una serie de administraciones tales como en un régimen de "refuerzo".

El término "hélice alfa peptídica", según se utiliza en la presente memoria, significará un motivo estructural en espiral basado en una secuencia peptídica que comprende un número de repeticiones, también llamadas repeticiones en espiral. Dicha hélice alfa es capaz de unirse a otra contraparte, también llamada hélice alfa de emparejamiento del mismo tipo para formar un dímero, un trímero u oligómero adicional, también llamado bobina en espiral.

Una bobina en espiral es un motivo estructural en polipéptidos o péptidos, en el que de dos a siete hélices alfa se enrollan juntas como los hilos de una cuerda. En algunas realizaciones, la bobina en espiral de la vacuna es una con dos hélices alfa enrolladas entre sí. Dichas regiones alfa helicoidales son propensas a formar estructuras de bobina en espiral y pueden estar implicadas en la oligomerización de las repeticiones de la bobina, tal como se mide en un ensayo de unión de interacción de bobina en espiral.

Específicamente, se puede formar un dímero de hélices alfa poniendo en contacto los dos monómeros, de manera que el dímero se forme a través de una interacción con los dos dominios de la bobina en espiral de la hélice alfa. En algunas realizaciones, las bobinas comprenden un péptido con la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 14 o 16 (bobina y anti-bobina), que incluyen x repeticiones.

EVSAL (SEQ ID 14)
 E5: EVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEK-NH2 (SEQ ID 15)
 KVSAL (SEQ ID 16)
 K5: KVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKE-NH2 (SEQ ID 17)

Alternativamente, se puede utilizar cualquiera de las secuencias descritas por Chao et al²² o Litowsky et al^{23;24} o equivalentes funcionales, que generan el enlace del tipo de bobina en espiral específica, tal como se indica en la siguiente tabla, incluyendo variantes de los mismos, p.ej. con un número diferente de repeticiones, o una, dos o tres mutaciones puntuales en el tipo de bobina:

Tipo de bobina	Tipo/número de repeticiones: Secuencia ilustrativa
EIAAL (SEQ ID 18)	E3: EIAALEKEIAALEKEIAALEK-NH2 (SEQ ID 19)
EIAAL (SEQ ID 18)	E4: EIAALEKEIAALEKEIAALEKEIAALEK-NH2 (SEQ ID 20)
KIAAL (SEQ ID 21)	K3: KIAALKEKIAALKEKIAALKE-NH2 (SEQ ID 22)
KIAAL (SEQ ID 21)	K4: KIAALKEKIAALKEKIAALKEKIAALKE-NH2 (SEQ ID 23)
EISAL (SEQ ID 24)	E3: EISALEKEISALEKEISALEK-NH2 (SEQ ID 25)

Tipo de bobina	Tipo/número de repeticiones: Secuencia ilustrativa
EISAL (SEQ ID 24)	E4: EISALEKEISALEKEISALEKEISALEK-NH2 (SEQ ID 26)
KISAL (SEQ ID 27)	K3: KISALKEKISALKEKISALKE-NH2 (SEQ ID 28)
KISAL (SEQ ID 27)	K4: KISALKEKISALKEKISALKEKISALKE-NH2 (SEQ ID 29)
EVAAL (SEQ ID 30)	E3: EVAALEKEVAALEKEVAALEK-NH2 (SEQ ID 31)
EVAAL (SEQ ID 30)	E4: EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK-NH2 (SEQ ID 32)
KVAAL (SEQ ID 33)	K3: KVAALKEKVAALKEKVAALKE-NH2 (SEQ ID 34)
KVAAL (SEQ ID 33)	K4: KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE-NH2 (SEQ ID 35)
EVSAL (SEQ ID 14)	E3: EVSALEKEVSALEKEVSALEK-NH2 (SEQ ID 36)
EVSAL (SEQ ID 14)	E4: EVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEK-NH2 (SEQ ID 37)
KVSAL (SEQ ID 16)	K3: KVSALKEKVSALKEKVSALKE-NH2 (SEQ ID 38)
KVSAL (SEQ ID 16)	K4: KVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKE-NH2 (SEQ ID 39)

5 Para el propósito de la invención, el tipo preferido de una bobina en espiral es un dímero, bien un heterodímero (heterobobina) de dos hélices diferentes, pero coincidentes, que difieren en al menos un aminoácido en la secuencia de repetición de la bobina, o bien un homodímero de dos hélices coincidentes idénticas, es decir, aquellas que comprenden las secuencias de repetición de la bobina correspondiente (las "bobinas").

El número preferido de repeticiones de bobina es 3-5, preferiblemente cualquiera de las combinaciones 3+3, 3+4, 3+5, 4+4, 4+5, 5+5, 4+3, 5+3 o 5+4.

10 Como una alternativa a las repeticiones de héptadas (repeticiones de una secuencia de aminoácidos que consiste en 7 aminoácidos, heptámeros), pueden utilizarse hexámeros, octámeros o nonámeros.

15 En el caso de una bobina en espiral homodimérica, el número típico de repeticiones de bobina es específicamente no más de 5, para evitar emparejamientos erróneos no deseados de la estructura. En el caso de una bobina en espiral heterodimérica, típicamente es deseable emplear una longitud de la secuencia peptídica con al menos 3 bobinas. De este modo, la unión de los componentes de la vacuna, es decir, el coadyuvante dirigido y los componentes inmunogénicos, entre sí se logra típicamente con alta afinidad preferida de una K_d de menos de 10^{-7} M, más preferido menos de 10^{-8} M o 10^{-9} M. Sin embargo, aunque más repeticiones aumentan la afinidad, esto puede ser a costa de una mayor homodimerización.

20 Los componentes de la composición inmunogénica de la invención también pueden comprender un espaciador peptídico para unir el radical anti-CD32 y/o el ligando de TLR9, y opcionalmente también el epítipo (del inmunógeno peptídico) con las repeticiones de la bobina, respectivamente. Por ejemplo, el espaciador peptídico puede estar en cualquiera o en ambos extremos de una bobina en espiral. Cada uno de los espaciadores peptídicos se puede unir a un solo dominio de bobina en espiral de la hélice alfa de bobina en espiral.

25 El espaciador peptídico puede ser, por ejemplo, un péptido de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos o más, lineal o ramificado, p.ej. para proporcionar dos, tres, cuatro o más ramas. El número de aminoácidos en el espaciador peptídico puede ser, en algunas realizaciones, 20 aminoácidos o hasta 10 aminoácidos mayor o menor, dependiendo de las secuencias concretas y de la longitud de la bobina.

30 El término "radical anti-CD32" según se utiliza en la presente memoria significará un ligando que se une específicamente a la diana celular CD32, CD32a, CD32b o tanto CD32a como CD32b. El radical puede ser cualquier estructura de unión, tal como derivada de proteínas, polipéptidos o péptidos, incluyendo anticuerpos y fragmentos de anticuerpos o moléculas compuestas con una porción de unión. La porción de unión de las moléculas o complejo de molécula de la invención puede estar compuesta por proteínas tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, tales como Fab, Fv, scFv, dAb, F(ab)₂, minicuerpos, dominios pequeños de inmunoglobulina mutada u otros elementos de unión biológicos, tales como el receptor soluble de células T, DARPins, etc. Se pueden generar

anticuerpos y fragmentos de anticuerpos y derivados para unirse a CD32 de acuerdo con métodos conocidos tales como tecnología de hibridoma, clonación de células B, presentación de fagos, presentación de ribosomas o presentación en la superficie celular de bibliotecas de anticuerpos, escrutinio de matrices de anticuerpos variantes. Los radicales anti-CD32 ilustrativos son scFv derivados del anticuerpo monoclonal anti-CD32 AT-10²⁵, IV.3²⁶, 2E1²⁷ o cualquier otro anticuerpo monoclonal aCD32.

La unión específica se puede determinar en un ensayo de unión adecuado, tal como inmunoensayos convencionales. Existen numerosos métodos conocidos en la técnica para detectar la unión en un inmunoensayo. Se pueden utilizar diversos inmunoensayos conocidos en la técnica que incluyen sistemas de ensayo competitivos y no competitivos utilizando técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, transferencia western, BIAcore, etc.

El término "reactivo cruzado" con respecto a antígenos o anticuerpos según se utiliza en la presente memoria se referirá a epítomos compartidos entre antígenos de origen diferente, p.ej. de origen humano, de mono rhesus o de ratón. Se encontró que el epítomo N-terminal que consiste en o que comprende los primeros 4 AA de G17 presenta reactividad cruzada en péptidos de diversos orígenes, cuyo epítomo desencadena una respuesta inmunitaria y anticuerpos IgG que presentan reactividad cruzada con los epítomos.

La composición inmunogénica de la invención es específicamente útil para tratar enfermedades dependientes de gastrina o estados de enfermedad que están asociados con exceso de gastrina, p.ej. tumores dependientes de gastrina o cáncer dependiente de gastrina, tal como cáncer de páncreas, úlcera gástrica, enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), insuficiencia renal terminal (IRT) u obesidad.

El término "tumor dependiente de gastrina" o "cáncer dependiente de gastrina" según se utiliza en la presente memoria se referirá a tumores o enfermedades o estados de enfermedad asociados a los mismos, de, p.ej. adenocarcinoma colorrectal dependiente de gastrina y otros cánceres dependientes de gastrina como el de estómago, hígado, páncreas y carcinoma de pulmón de células pequeñas. El término se utiliza específicamente en la presente memoria con respecto al tratamiento del tumor para prevenir la progresión de la enfermedad tumoral, para una respuesta tumoral positiva o para la contracción del tumor. El término también se aplica a la enfermedad residual mínima, que se trataría con éxito, p.ej. eligiendo como diana las células tumorales circulantes para reducir su número por debajo de un cierto umbral, p.ej. por debajo del límite de detección.

La enfermedad de úlcera gástrica puede ser causada por un aumento en el ácido estomacal y un colapso de las complejas defensas estomacales que normalmente protegen la mucosa gástrica del daño por ácido. Aunque los dos estados tienen diferentes etiologías, ambos se benefician de una reducción en la secreción de ácido gástrico. El ácido gástrico se produce en una célula estomacal especializada, la célula parietal. Las células parietales pueden estimularse para secretar ácido mediante acetilcolina, histamina y gastrina, tras la unión de cada uno de estos compuestos a receptores específicos en la superficie de la célula. De estos, el estimulador más potente de la secreción de ácido es la hormona peptídica gastrina. La terapia de inmunoterapia anti-gastrina como se describe en la presente memoria, mejoraría los estados de enfermedad de úlcera gástrica.

El término "péptido de gastrina-17" o "péptido de G17" o "G17" según se utiliza en la presente memoria se referirá a la gastrina pequeña G17, que consiste en los 17 AA N-terminales de la gastrina. El péptido G17 puede ser de origen humano, u otro origen de mamífero, incluyendo mono rhesus, o ratón, por lo tanto, tiene una secuencia humana u otra de mamífero, o puede ser una construcción artificial, por ejemplo para incorporar secuencias artificiales, p.ej. obtenidas cambiando el tipo y/o secuencia de residuos de aminoácidos en la secuencia de G17 nativa (de origen natural). El término incluirá específicamente variantes de G17 humana, con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID 1, o fragmentos de la misma, pero difiere de su secuencia peptídica, ya que se obtiene a partir de una secuencia homóloga de una especie diferente. Estos se conocen como variantes o análogos de origen natural. El término "análogos" también se referirá a construcciones químicas que se originan a partir de dos o más orígenes, en donde al menos una parte es de origen natural, p.ej. que constituye la mayor parte (al menos 50%) del inmunógeno peptídico, y otra parte es diferente a la misma, ya sea de origen natural o sintética (artificial).

El término incluirá específicamente fragmentos o variantes funcionalmente activas de G17, p.ej. aquellos que comprenden una o más mutaciones puntuales, o si no péptidos o polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos adicionales además del G17, p.ej. extendiendo el N-terminal y/o el C-terminal por medio de uno o más residuos de aminoácidos o secuencias adicionales. Se prefiere una extensión del extremo C-terminal, p.ej. con repeticiones de secuencias de G17, idénticas o no, o con secuencias de aminoácidos adicionales de gastrina.

El término incluirá específicamente los péptidos con uno o más residuos de aminoácidos modificados. Las modificaciones comunes incluyen fosforilación, metilación, acetilación, amidación, formación de ácido

pirrolidoncarboxílico, isomerización, hidroxilación, sulfatación, unión a flavina, oxidación de cisteína y nitrosilación. La modificación ilustrativa como se describe en la presente memoria es la modificación del ácido glutámico N-terminal de G17, es decir, el piroGlu en la posición 1, que también se conoce como "Ácido pirrolidoncarboxílico (Glu)" o pGlu o pE.

El término "variantes funcionalmente activas" según se utiliza en la presente memoria con respecto al inmunógeno peptídico de la invención, significará una secuencia que resulta de la modificación de esta secuencia (una secuencia parental), p.ej. por inserción, delección o sustitución de uno o más aminoácidos, tal como mediante técnicas de recombinación o derivatización química de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos, o nucleótidos dentro de la secuencia de nucleótidos codificante, o en uno o ambos extremos distales de la secuencia, y cuya modificación no afecta (concretamente perjudica) la actividad de esta secuencia. En el caso de un inmunógeno peptídico que provoca una cierta respuesta inmunitaria a la gastrina diana, la variante funcionalmente activa del inmunógeno peptídico todavía incorporaría el determinante antigénico o epítipo, aunque esto podría cambiarse, p.ej. para aumentar la inmunogenicidad. Específicamente, las variantes funcionalmente activas del inmunógeno peptídico G17, o un fragmento del mismo, tal como el fragmento G12 o G13, tienen la potencia para originar anticuerpos IgG anti-gastrina en un sujeto tratado, cuyos anticuerpos reaccionan de forma cruzada con la gastrina endógena del sujeto.

Se pueden obtener variantes funcionalmente activas, p.ej. cambiando la secuencia de un péptido parental, p.ej. el péptido G17 humano, de mono rhesus o murino, o un fragmento del mismo, p.ej. el péptido G12 o G13, introduciendo una o más modificaciones que no deterioran sustancialmente los epítopos que presentan reacción cruzada, para obtener una molécula con sustancialmente la misma inmunogenicidad. El término "sustancialmente la misma inmunogenicidad" según se utiliza en la presente memoria se refiere a la cantidad de una respuesta inmunitaria o anticuerpos IgG anti-gastrina inducidos en un sujeto tratado con la composición inmunogénica, cuya cantidad es preferiblemente al menos 20% al menos 30% al menos 40%, al menos 50% al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o incluso al menos 100% o al menos 110%, o al menos 120%, o al menos 130%, o al menos 140%, o al menos 150%, o al menos 160%, o al menos 170%, o al menos 180%, o al menos 190%, por ejemplo hasta 200% de la cantidad determinada para el péptido original.

En una realización preferida, la variante funcionalmente activa de un péptido parental

- a) se obtiene a partir del péptido mediante al menos una sustitución de, inserción (adición) y/o delección aminoácido, p.ej. que comprende una o más mutaciones puntuales en donde la variante funcionalmente activa tiene una identidad de secuencia específica con la molécula parental, tal como al menos 50% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%; aún más preferiblemente al menos 90%; y/o
- b) consiste en el péptido y adicionalmente al menos un aminoácido heterólogo con respecto al péptido.

Las variantes funcionalmente activas se pueden obtener mediante alteraciones de secuencia en la secuencia peptídica, p.ej. mediante una o más mutaciones puntuales, en donde las alteraciones de la secuencia retienen sustancialmente una función de la secuencia peptídica inalterada, cuando se utilizan de acuerdo con la invención. Tales alteraciones de secuencia o mutaciones puntuales pueden incluir, pero no se limitan a, sustituciones (conservativas), adiciones, delecciones, mutaciones e inserciones, p.ej. alteración de 1, 2, 3 o 4 aminoácidos, o mediante adición o inserción de uno a varios aminoácidos, p.ej. 1, 2, 3 o 4 aminoácidos, o mediante una derivatización química de uno a varios aminoácidos, p.ej. 1, 2, 3 o 4, o una combinación de los mismos, preferiblemente mediante mutaciones puntuales que no son contiguas. Las sustituciones en residuos de aminoácidos pueden ser sustituciones conservativas, por ejemplo, que sustituyen un aminoácido hidrófobo por un aminoácido hidrófobo alternativo.

Las sustituciones conservativas son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales y propiedades químicas. Los ejemplos de tales familias son aminoácidos con cadenas laterales alcalinas, con cadenas laterales ácidas, con cadenas laterales alifáticas no polares, con cadenas laterales aromáticas no polares, con cadenas laterales polares sin carga, con cadenas laterales pequeñas, con cadenas laterales grandes, etc.

Las mutaciones puntuales preferidas se refieren al intercambio de aminoácidos con la misma polaridad y/o carga. A este respecto, los aminoácidos se refieren a veinte aminoácidos naturales codificados por sesenta y cuatro codones triplete. Estos 20 aminoácidos se pueden dividir en aquellos que tienen cargas neutras, cargas positivas y cargas negativas:

Los aminoácidos "neutros" se muestran a continuación junto con sus respectivos códigos de tres letras y una sola letra y polaridades:

Alanina: (Ala, A) no polar, neutro;
 Asparagina: (Asn, N) polar, neutro;
 Cisteína: (Cys, C) no polar, neutro;
 5 Glutamina: (Gln, Q) polar, neutro;
 Glicina: (Gly, G) no polar, neutro;
 Isoleucina: (Ile, I) no polar, neutro;
 Leucina: (Leu, L) no polar, neutro;
 Metionina: (Met, M) no polar, neutro;
 Fenilalanina: (Phe, F) no polar, neutro;
 10 Prolina: (Pro, P) no polar, neutro;
 Serina: (Ser, S) polar, neutro;
 Treonina: (Thr, T) polar, neutro;
 Triptófano: (Trp, W) no polar, neutro;
 Tirosina: (Tyr, Y) polar, neutro;
 15 Valina: (Val, V) no polar, neutro; y
 Histidina: (His, H) polar, positiva (10%) neutro (90%).
 Los aminoácidos cargados "positivamente" son:
 Arginina: (Arg, R) polar, positivo; y
 Lisina: (Lys, K) polar, positivo.
 20 Los aminoácidos cargados "negativamente" son:
 Ácido aspártico: (Asp, D) polar, negativo; y
 Ácido glutámico: (Glu, E) polar, negativo.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias peptídicas descritas en la
 25 presente memoria se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que es
 idéntico a los residuos de aminoácidos en la secuencia peptídica específica, después de alinear la secuencia y
 introduciendo huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no
 considerando ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Los expertos en la técnica
 30 pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluidos los algoritmos necesarios para
 lograr un alineamiento máximo en toda la longitud de las secuencias que se comparan.

Las variantes funcionalmente activas se pueden obtener mediante cualquiera de los métodos de mutagénesis
 conocidos, incluyendo mutaciones puntuales en las posiciones deseadas, p.ej. obtenidas por técnicas de
 35 aleatorización. En algunos casos, las posiciones se eligen de forma aleatoria, p.ej. con cualquiera de los posibles
 aminoácidos o una selección de aminoácidos preferidos para aleatorizar las secuencias peptídicas. A este respecto,
 el término "mutagénesis" se refiere a cualquier mecanismo reconocido en la técnica para alterar una secuencia
 polinucleotídica o polipeptídica.

El término "inmunógeno" o "inmunógeno peptídico" según se utiliza en la presente memoria significará un antígeno o
 40 inmunógeno de estructura peptídica, en particular un inmunógeno que comprende o consiste en un péptido de una
 secuencia de aminoácidos específica, que se proporciona como un péptido lineal o péptido ramificado, que
 comprende residuos de aminoácidos naturales o modificados, p.ej. un derivado obtenido por modificación o
 derivatización química, tal como por fosforilación, metilación, acetilación, amidación, formación de ácido
 45 pirrolidonacarboxílico, isomerización, hidroxilación, sulfatación, unión a flavina, oxidación de cisteína y nitrosilación.

El inmunógeno peptídico está diseñado específicamente para desencadenar una respuesta inmunitaria en un sujeto,
 y particularmente incluye uno o más determinantes antigénicos, que pueden reconocerse posiblemente por un sitio
 de unión de un anticuerpo o es capaz de unirse al surco peptídico de moléculas de HLA clase I o clase II u otras
 moléculas presentadoras de antígenos tales como CD1 y, como tales, pueden servir como estimulantes para células
 50 T específicas. El antígeno diana se reconoce como una molécula diana completa o como un fragmento de dicha
 molécula, especialmente subestructuras, p.ej. una estructura polipeptídica o carbohidratada de dianas, generalmente
 denominadas "epítomos", p.ej. epítomos de células B, epítomo de células T, que son inmunológicamente relevantes,
 es decir, también son reconocibles por anticuerpos naturales o monoclonales. En la presente memoria se prefiere el
 uso de epítomos de células B.

El término "epítomo" según se utiliza en la presente memoria de acuerdo con la presente invención se referirá en
 particular a una estructura molecular que puede formar completamente un compañero de unión específico o ser
 parte de un compañero de unión específico a un sitio de unión de un anticuerpo. Químicamente, un epítomo de un
 inmunógeno peptídico de la presente invención puede ser un epítomo peptídico que normalmente incluye al menos 3
 60 residuos de aminoácidos, preferiblemente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 aminoácidos. No existe un límite superior
 crítico para la longitud del péptido, que podría comprender incluso toda la longitud de una secuencia de aminoácidos
 de una proteína.

Se pueden utilizar uno o más epítomos del mismo antígeno o diferentes antígenos de acuerdo con la presente invención.

5 Se entiende específicamente que inmunógeno peptídico de la invención es un autoantígeno. El término "autoantígeno", según se utiliza en la presente memoria, significa cualquier antígeno, específicamente polipéptido o péptido producido por un sujeto sano normal que no provoca una respuesta inmunitaria como tal. Estos autoantígenos pueden producirse a niveles aberrantes o altos en ciertos estados de enfermedad, incluyendo la enfermedad del cáncer, denominados antígenos asociados a tumores (TAA). En la presente memoria, se entiende
10 que la gastrina humana o G17 humana es un autoantígeno en sujetos humanos, y específicamente un TAA en sujetos que padecen un tumor dependiente de gastrina.

Se entiende que los autoantígenos tales como los utilizados de acuerdo con la invención, pueden ser de origen natural, producidos recombinantemente o sintéticamente. También se entiende que los autoantígenos no necesitan ser idénticos al antígeno producido naturalmente, sino que pueden incluir variaciones con ciertas identidades, similitudes u homología de secuencia.

El inmunógeno peptídico o la composición inmunogénica utilizada en la vacuna de acuerdo con la invención, por lo general está contenido en una vacuna en una cantidad eficaz, que en la presente memoria se entiende específicamente como "cantidad inmunológicamente eficaz". Por "cantidad inmunológicamente eficaz", se entiende que la administración de esa cantidad a un sujeto, ya sea en una sola dosis o como parte de una serie de dosis, es eficaz sobre la base de los objetivos terapéuticos o profilácticos. Esta cantidad variará dependiendo de la salud y la condición física del sujeto a tratar, la edad, la capacidad del sistema inmunitario del sujeto para sintetizar anticuerpos, el grado de respuesta inmunitaria deseada, la formulación de la vacuna y otras condiciones.

25 La invención también proporciona un método para tratar un sujeto o elevar una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la etapa de administrar una cantidad inmunológicamente eficaz del inmunógeno peptídico, la composición inmunogénica o la vacuna de la invención.

30 Una cantidad o dosificación eficaz puede variar de 0,0001 a 2 mg, p.ej. entre 0,001 y 2 mg de la composición inmunogénica administrada al sujeto que lo necesita, p.ej. un sujeto humano adulto. La dosificación eficaz de la composición inmunogénica es capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un paciente de niveles efectivos de título de anticuerpos para unir y neutralizar G17 madura y precursora endógena durante, p.ej. 1-3 meses después de la inmunización. La eficacia de la terapia puede analizarse mediante los títulos de anticuerpos anti-gastrina en
35 muestras de sangre tomadas del sujeto.

El término "ligando de TLR9" según se utiliza en la presente memoria se entiende de la siguiente manera.

40 El receptor 9 de tipo Toll (TLR9) reconoce el ADN de CpG bacteriano no metilado e inicia una cascada de señalización que conduce a la producción de citocinas proinflamatorias. Existen numerosas estructuras o secuencias que se ha demostrado que actúan como un ligando de TLR9, es decir, se unen a este receptor y por lo tanto activan (estimulan, regulan al alza positivamente, agonistas de TLR9) o desactivan (regulan negativamente, antagonistas de TLR) TLR9. Por ejemplo, el ADN microbiano o el ADN sintético, p.ej. el ODN de CpG sintético puede estimular TLR9 con variaciones en el número y la ubicación de los dímeros de CpG, así como las secuencias de bases precisas que
45 flanquean los dímeros de CpG. Los ODN de CpG sintéticos difieren del ADN microbiano en que tienen una cadena principal parcialmente o completamente fosforotioada en lugar de la típica cadena principal de fosfodiéster y pueden o no tener una cola de poli G en el extremo 3', en el extremo 5' o en ambos.

50 El término "agonista" junto con el ligando de TLR9 según se utiliza en la presente memoria se referirá específicamente a la unión y activación de TLR9 en un ensayo basado en células.

El ligando de TLR9 que está compuesto de una secuencia de nucleótidos típicamente se acopla al componente coadyuvante dirigido de la presente composición inmunogénica mediante acoplamiento químico, p.ej. utilizando el KIT disponible comercialmente de Solulink. Un ligando peptídico de TLR9 se puede acoplar utilizando química de péptidos convencional o se puede integrar utilizando tecnología de ADN recombinante.

Los ligandos ilustrativos de TLR9 son ODN 2216²⁸ (grupo 1), ODN 2006/ODN 2007²¹ (grupo2) y CpG-M362¹⁹ (grupo 3).

60 Otros ligandos ilustrativos de TLR9 pueden ser péptidos que imitan la acción de un agonista CpG de TLR9, p.ej. identificados por u obtenidos a partir de una biblioteca de péptidos, que se seleccionan por la afinidad para unirse a TLR9 y la actividad agonista probada, o ligandos proteicos, incluyendo anticuerpos específicos.

- 5 La función de un ligando o agonista de TLR9 se puede determinar en un ensayo adecuado, p.ej. de la siguiente manera: los pDC se purifican de la sangre de un donante sano como describen Tel et al²⁹ y posteriormente se incuban con la concentración apropiada del ligando TLR9. Después de 24 h, se mide IFN α en el sobrenadante utilizando protocolos de ELISA convencionales. Para la determinación del estado de maduración de las células, los pDC se tiñen para determinar la expresión de CD80 CD83 o CD86 utilizando procedimientos de FACS convencionales con anticuerpos específicos disponibles comercialmente antes y después de la incubación con el ligando de TLR9.
- 10 El número de células T reactivas que se activan tras la exposición a la vacuna de acuerdo con la invención se puede determinar por una serie de métodos que incluyen ELISPOT, análisis de FACS, liberación de citocinas o ensayos de proliferación de células T.
- 15 Según se utiliza en la presente memoria, el término "especificidad" o "unión específica" se refiere a una reacción de unión que es determinante del ligando afín de interés en una población heterogénea de moléculas. Por lo tanto, en condiciones designadas (p.ej., condiciones de inmunoensayo), uno o más antígenos están específicamente unidos por el sitio o los sitios de unión respectivos de un elemento de unión, que no se une en una cantidad significativa a otras moléculas presentes en una muestra. La unión específica significa que la unión es selectiva en términos de identidad de la diana, afinidad o avidez de unión alta, media o baja, según se seleccione. La unión selectiva se consigue normalmente si la constante de unión o la dinámica de unión son al menos 10 veces diferentes, preferiblemente la diferencia es al menos 100 veces, y más preferida es al menos 1000 veces. Es bien sabido que el término también se referirá a elementos de unión multiespecíficos o de reacción cruzada que reconocen específicamente uno o más antígenos diferentes.
- 20 El término "tratamiento" según se utiliza en la presente memoria siempre se refiere a tratar a los sujetos con propósitos profilácticos (es decir, para prevenir la infección y/o el estado de la enfermedad) o terapéuticos (es decir, para tratar enfermedades independientemente de su patogénesis). El tratamiento de un sujeto típicamente será terapéutico en casos de estados de enfermedad cancerosos, incluyendo tumores dependientes de gastrina o cáncer dependiente de gastrina. Sin embargo, en el caso de pacientes que padecen una enfermedad primaria, que tienen riesgo de progresión de la enfermedad o riesgo de desarrollar una enfermedad secundaria o reacción secundaria, p.ej. que depende de la producción endógena de gastrina de los efectos de la gastrina, el tratamiento puede ser profiláctico.
- 25 El tratamiento puede efectuarse con la composición inmunogénica o la vacuna de acuerdo con la invención como el único agente profiláctico o terapéutico o también en combinación con cualquier medio adecuado, p.ej. incluyendo la quimioterapia o el uso de antiácidos.
- 30 En la terapia del cáncer, los tratamientos terapéuticos adicionales incluyen, por ejemplo, resección quirúrgica, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, vacunas antitumorales, terapias basadas en anticuerpos, irradiación de todo el organismo, trasplante de médula ósea, trasplante de células madre de sangre periférica y la administración de agentes quimioterapéuticos.
- 35 El término "combinación" tal según se utiliza a este respecto, p.ej. con respecto a la combinación de compuestos o tratamientos se refiere específicamente al tratamiento concomitante, simultáneo, paralelo o consecutivo de un sujeto.
- 40 Para el tratamiento, la composición inmunogénica o la vacuna de acuerdo con la invención se puede administrar de una vez, o se puede dividir en los componentes individuales y/o una cantidad de dosis más pequeñas para administrar a intervalos de tiempo. La vacuna se administra típicamente a una concentración de 0,1 a 500 $\mu\text{g/ml}$, p.ej. ya sea por vía subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, oral, por inhalación o por vía intranasal, con o sin un coadyuvante adicional como ALUMBRE. Se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento está en función de la enfermedad que se está tratando y se puede determinar empíricamente utilizando protocolos de ensayo conocidos o mediante extrapolación de datos de ensayo *en vivo* o *in vitro*.
- 45 La composición inmunogénica o la vacuna de la presente invención se pueden administrar por cualquier medio adecuado y formulaciones respectivas para incluir, pero sin limitarse a, por ejemplo, cualquier inyección parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica), o inyección local en el sitio afectado, tal como las articulaciones o dentro o alrededor del tumor. En una realización preferida, la vacuna se proporciona en una formulación para inyección intramuscular, subcutánea o intradérmica.
- 50 La invención también proporciona un dispositivo de administración, p.ej. una jeringa, precargada con la vacuna de acuerdo con la invención.
- 55
- 60

Típicamente, al estimular a un sujeto mediante una primera inyección de una vacuna de acuerdo con la invención, se pueden realizar una o más inyecciones de refuerzo durante un período de tiempo por la misma o diferentes rutas de administración. Cuando se utilizan inyecciones múltiples, se pueden realizar inyecciones posteriores, p.ej. en el
5 plazo de 1 a 52 semanas de la inyección previa, o incluso más.

La vacuna típicamente puede contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etanol, etc. Además, como sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, pueden estar presentes entre los excipientes sustancias tamponadoras de pH y similares. Típicamente, la vacuna de acuerdo con la invención se
10 prepara como un inyectable, como soluciones o suspensiones líquidas, o formas sólidas adecuadas para la solución o la suspensión en vehículos líquidos antes de su administración. Las preparaciones también pueden emulsionarse o encapsularse en liposomas.

La administración de la vacuna de acuerdo con la invención se puede combinar de forma adecuada y adicional con cualquiera de los agonistas de TLR9 y/o otras medidas de coadyuvante, p.ej. como entidades separadas en la
15 misma formulación o como formulaciones separadas, para mejorar la respuesta inmunitaria.

Una respuesta inmunitaria Th1 potenciada puede incluir un aumento en una o más de las citocinas asociadas con una respuesta inmunitaria Th1 (tal como IFN γ) y un aumento en los macrófagos activados.
20

Una respuesta inmunitaria Th1 potenciada puede incluir uno o más de un aumento en anticuerpos IgG específicos de antígeno, especialmente anticuerpos IgG1.

Por ejemplo, la composición inmunogénica o la vacuna de la invención, pueden estar asociadas (p.ej., enlazadas químicamente o recombinantemente, unidas por unión por afinidad o una mezcla de componentes separados) con uno o más coadyuvantes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. La vacuna de acuerdo con la invención puede incluir uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como agua, solución salina, glicerol, etanol, etc. Además, pueden estar presente en tales vehículos sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH, y similares. Los coadyuvantes pueden utilizarse
25 específicamente para mejorar la efectividad de la vacuna. Los coadyuvantes se pueden agregar directamente a las composiciones de vacuna o se pueden administrar por separado, ya sea simultáneamente o poco después de la administración de la vacuna.
30

Los coadyuvantes adecuados incluyen citocinas y compuestos similares que ayudan a orquestar una respuesta inmunitaria al inmunógeno. Según se utiliza en la presente memoria, el término "citocina" se utiliza como un nombre genérico para un grupo diverso de proteínas y péptidos solubles que actúan como reguladores humorales a concentraciones nanomolares a picomolares y que, en condiciones normales o patológicas, modulan las actividades funcionales de células y tejidos individuales. Estas proteínas también median las interacciones entre las células directamente y regulan los procesos que tienen lugar en el entorno extracelular.
35

Los ejemplos de citocinas incluyen IL-1, IL-4, TNF α , IFN α , INF γ , GM-CSF, G-CSF. Los oligonucleótidos CpG también se pueden utilizar como coadyuvante junto con la presentación de epítomos respectivos. Otros coadyuvantes incluyen alumbre, coadyuvante de Freund (in)completo, B. pertussis o su toxina, IC31, etc.
40

Los componentes de la composición inmunogénica, es decir, el componente coadyuvante dirigido, p.ej. el radical anti-CD32 unido al ligando TLR9 y la primera hélice alfa peptídica, y el componente inmunogénico, p.ej. que comprende el inmunógeno peptídico unido a la segunda hélice alfa peptídica que se empareja con la primera, así como la composición inmunogénica o la vacuna, o cualquiera de sus radicales o ligandos de unión y el inmunógeno con o sin las repeticiones de la bobina se pueden obtener por medio de diversos métodos conocidos en la técnica, p.ej. por purificación o aislamiento del cultivo celular, tecnología recombinante o por síntesis química.
45
50

De acuerdo con una realización específica, la composición inmunogénica y/o el componente coadyuvante dirigido y/o su componente inmunogénico, se producen como un polipéptido recombinante, tal como mediante tecnología de ADN recombinante. Según se utiliza en la presente memoria, el término "recombinante" se refiere a una molécula o construcción que no se produce de forma natural en una célula anfitriona. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico recombinante contienen dos o más secuencias de origen natural que están unidas entre sí de una manera que no ocurre de forma natural. Una proteína recombinante se refiere a una proteína que está codificada y/o expresada por un ácido nucleico recombinante. En algunas realizaciones, las "células recombinantes" expresan genes que no se encuentran en forma idéntica dentro de la forma nativa (es decir, no recombinante) de la célula y/o expresan genes nativos que de otro modo están anormalmente expresados en exceso, sub-expresados y/o no expresados en absoluto debido a la intervención humana deliberada. Las células recombinantes contienen al menos un polinucleótido o polipéptido recombinante. La "recombinación", "recombinando" y la generación de un ácido
55
60

nucleico "recombinado" generalmente abarcan el ensamblaje de al menos dos fragmentos de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, las proteínas recombinantes y los ácidos nucleicos recombinantes permanecen funcionales, es decir, retienen su actividad o exhiben una actividad potenciada en la célula anfitriona.

5 Así, la invención se refiere adicionalmente a la producción de la composición inmunogénica o los componentes de la misma, y los medios recombinantes para tal producción, que incluyen un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos, un casete de expresión, un vector o plásmido que comprenden el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos que se va a expresar, y una célula anfitriona que comprende cualquiera de tales medios. Los mecanismos convencionales adecuados de ADN recombinante son conocidos en la técnica y los describen entre otros Sambrook et al., en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), 2ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory press).

15 En la presente memoria se entiende que el término "sujeto" comprende sujetos humanos o mamíferos, que incluyen ganado, animales de compañía y animales de laboratorio, en particular seres humanos, que son pacientes que padecen una enfermedad específica o sujetos sanos.

La invención proporciona adicionalmente un kit de componentes para preparar la composición inmunogénica de la invención, p.ej. un kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes cargados con los componentes. Los kits se pueden utilizar en los métodos descritos anteriormente. En una realización concreta, el kit comprende adicionalmente instrucciones para utilizar los componentes de la composición inmunogénica o la composición o vacuna inmunogénica preparadas de la invención.

De acuerdo con un ejemplo específico, la vacuna de acuerdo con la invención comprende un polipéptido recombinante de

25

SEQ ID 40:
EVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWLNTYT
GESIYPDDFKGRFAFSSETSASTAYLQINNLIKNEEDMATYFCARGDYGDDPLDYWGQ
GTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQAAPSPVTPGESVVISCRSSKSLHTN
GNTYLHWFLQRPQGSPQLLIYRMSVLASGVPDRFSGSGGTAFTLSISRVEAEDVGV
FYCMQHLEYPLTFGAGTKLELKGSI**SAW**SH**PQ**FEKGPEVSALEKEVSALEKEVSALE
KEVSALEKEVSALEK

30 Extremo N-terminal subrayado: secuencia de ScFv que se une específicamente a CD32a; Cursiva: Conector; se puede utilizar cualquier conector alternativo comúnmente utilizado en preparaciones de scFv
 Negrita: StrepTag II para la purificación, se puede utilizar cualquier etiqueta alternativa, p.ej. etiqueta flag o etiqueta HIS o no utilizar etiqueta, en cuyo caso la purificación puede hacer uso de la hélice alfa con repeticiones en héptada
 Extremo C-terminal doble subrayado: hélice alfa con repeticiones en héptada (pepE) para formar la bobina en espiral con la contra-hélice alfa con repeticiones en héptada en el inmunógeno (pepK).

35

En este ejemplo (SEQ ID 40) se utilizan 5 repeticiones; más repeticiones pueden provocar autoagregación y menos repeticiones pueden reducir la afinidad, en este caso se utilizaron 4 repeticiones. El número funcional mínimo preferido de repeticiones para las bobinas utilizadas es 3 y el número funcional máximo preferido es 5²²⁻²⁴ pero son posibles más repeticiones dependiendo del tipo de alfa hélice que se utilice. Limitante sería la cantidad de repeticiones que comienzan a inducir la homodimerización. Por lo tanto, la homodimerización está específicamente excluida.

40

Los polipéptidos similares pueden comprender una secuencia líder, la secuencia de aminoácidos de un radical anti-CD32 específico, que es p.ej. un scFv recombinante, un conector, una etiqueta para fines de purificación y la secuencia de pepE en hélice alfa peptídico. Esta construcción con o sin el ligando de TLR9 también se denomina "cabeza activa", que a continuación puede utilizarse para construir una vacuna mediante combinación con un inmunógeno ligado a la contra-hélice alfa pepK.

45

De acuerdo con otro ejemplo específico, el radical anti-CD32 es un péptido anti-CD32a con la secuencia de SEQ ID 41: ADGAWAWVWLTETAVGAAK³⁰ utilizado como alternativa al ScFv.

50

De acuerdo con un ejemplo adicional, se establece una bobina en espiral estable entre la cabeza activa de scFv y el inmunógeno.

Se ha demostrado que las PBMC podrían estimularse eficazmente con dicho inmunógeno o vacuna.

5 En un ejemplo adicional podría demostrarse que la cabeza activa mediaba en la presentación mejorada de antígenos. Las células T se estimularon eficazmente cuando el inmunógeno con la bobina (la bobina pepK) interactuó con la cabeza activa que contenía la bobina homóloga (la bobina pepE).

10 En ejemplos adicionales, se describe el tratamiento del cáncer de páncreas en un modelo de ratón y en un modelo de mono rhesus, utilizando una cabeza activa que emplea el scFv anti-CD32 o el péptido anti-CD32a unido mediante la bobina en espiral al inmunógeno del péptido G12. La reducción del apetito y el control del apetito se describen en el modelo del mono rhesus.

15 Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición inmunogénica y una vacuna únicas, y aplicaciones respectivas.

La descripción anterior se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, tales ejemplos son meramente representativos de métodos para poner en práctica una o más realizaciones de la presente invención y no se debe interpretar que limitan el alcance de la invención.

20 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Elementos de unión ilustrativos

25 **Región de unión a hCD32, también denominada en la presente memoria radical anti-CD32 o elemento de unión a CD32:**

Elementos de unión a CD32a: Anticuerpo que se une específicamente a CD32a: mAb IV.3³¹
 ScFv derivado de mAb IV.3 (VH-conector-VL): (SEQ ID 42)
EVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWKQAPGKGLKWMGWLNTYTGE
SIYPDDFKGRFAFSSETSASTAYLQINNLKNEPMATYFCARGDYGDDPLDYWGQGTSV
TVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKSLHTNGNTYLH
WFLQRPQSPQLLIYRMSVLASGVPDRFSGSGSGTAFTLSISRVEAEDVGVFVFCMQHLEY
PLTFGAGTKLELKGS

30 Subrayado: dominio VH
 Negrita: dominio HL
 Tipo normal establecido. Conector flexible (puede ser cualquier conector)
 Péptido anti-CD32a: ³⁰

35 (SEQ ID 43): ADGAWAWVWLTETAVGAAK
 Elementos de enlace del grupo CD32a+b:
 Anticuerpo que se une específicamente a CD32a y CD32b: mAb AT-10 (AbD Serotec)
 ScFv derivado de mAb AT-10 (VH-conector-VL): (SEQ ID 44)
EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSYYWMNWVVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNY
ATHYAESVKGRFTISRDDSKNNVYLQMNLRRAEDTGIYYCNRREYYAMDYWGQGTSV
SVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPGSLAVSLGQRATISCRASESVDNFGISFMNW
FQQKPGQPRLLIYGASNQSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDAAMYFCQQSKEV
PWTFGGGKLEIKGS

40 Subrayado: dominio VH
 Negrita: dominio HL
 Tipo normal establecido. Conector flexible (puede ser cualquier conector)
 Fragmento Fc de IgG1 (dominio CH2-CH3): (SEQ ID 45)
 (PKSCDKTHTCPPCP)PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

45 Entre () está la región de bisagra, puede omitirse
 Subrayado: dominio CH2
 Negrita: dominio CH3
Región o radical de unión a TLR9, en la presente memoria también denominado elemento de unión a TLR9 o elemento de unión a TLR9

50 CpG clase A
 Grupo CpG-A:

ODN2216: (SEQ ID 46): GGGGGACGATCGTCGGGGGG

CpG clase B

Grupo CpG-B:

Ligandos naturales:

5 ODN2006: (SEQ ID 47): TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT

CpG clase C

Grupo CpG-C

ODNM362: (SEQ ID 48): TCGTCGTCGTTTCAACGACGTTGAT

10 **Productos de unión a CD32 ilustrativos con bobinas**

ScFV-coil 1 (IV.3): (SEQ ID 49)

EVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWWVKQAPGKGLKWMGWLNTYTGE
SIYPDDFKGRFAFSSETSASTAYLQINNLKNEDMATYFCARGDYGYDDPLDYWGQTSV
TVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKSLHTNGNTYLH
WFLQRPQSPQLLIYRMSVLASGVPDFRFSGSGSFTAFTLSISRVEAEDVGVFYCMQHLEY
PLTFGAGTKLELKGSI*SAW***SH***PF***EKGPEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSA**
LEK

Subrayado: dominio VH

15 Negrita: dominio HL

Tipo normal establecido. Conector flexible (puede ser cualquier conector)

En cursiva: Bobina pepE más secuencia C' StrepTag II y conector "GP" pueden ser cualquier conector flexible (StrepTag II puede ser eliminada o reemplazada por HIS Tag o cualquier otra etiqueta)

Bobina 2 de ScFV-coil (AT10): (SEQ ID 50)

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVCVSGFTFSYYWMNWWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNY
ATHYAESVKGRFTISRDDSKNNVYLQMNLRaedtGIYYCNRrDEYYAMDYWGQTSV
SVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVLTQSPGSLAVSLGQRATISCRASEVDNFGISFMNWF
QQKPGQPPRLLIYGASNQSGVPARFSGSGSDFSLNIHPVEEDDAAMYFCQQSKEV
PWTFGGGKLEIKGSI*SAW***SH***PF***EKGPEVSALEKEV**

20 **SALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEK**

Subrayado: dominio VH

Negrita: dominio HL

Tipo normal establecido. Conector flexible (puede ser cualquier conector)

25 En cursiva: Bobina pepE más en la secuencia C' StrepTag II y el conector "GP" puede ser cualquier conector flexible (StrepTag II puede ser eliminada o reemplazada por su etiqueta HIS o cualquier otra etiqueta)

Péptido-bobina: (SEQ ID 51)

ADGAWAWVWLTETAVGAAGPEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEK

En cursiva: Bobina pepE más el conector "GP" puede ser cualquier conector flexible

Fragmento de Fc de IgG1-bobina: (SEQ ID 52)

(PKSCDKTHTCPPCP)PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GPEVSAL**
EKEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEK

30 Entre () está la región de la bisagra, puede ser omitida

Subrayado: dominio CH2

Negrita: Dominio CH3

En cursiva: Bobina pepE más el conector "GP" puede ser cualquier conector flexible

35 **Productos de unión a TLR9 ilustrativos con el grupo SH para el entrecruzamiento químico al elemento de enlace a CD32**

Grupo CpG-A:

40 ODN2216_SH: (SEQ ID 46): GGGGGACGATCGTCGGGGGGG-**SH**

En un conector flexible en negrita con el grupo SH para el entrecruzamiento químico con la bobina de ScFV (puede ser cualquier conector y grupo químicamente reactivo, por ejemplo, NH₂, adecuado para el entrecruzamiento químico)

Grupo CpG-B:

45 Ligandos naturales:

ODN2006_SH: (SEQ ID 47): TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-**SH**

En un conector flexible en negrita con el grupo SH para el entrecruzamiento químico con la bobina de ScFV (puede

ser cualquier conector y grupo químicamente reactivo, por ejemplo, NH₂, adecuado para el entrecruzamiento químico)

Grupo CpG-C

ODNM362_SH: (SEQ ID 48): TCGTCGTCGTTCTGAACGACGTTGAT-**SH**

5 En un conector flexible en **negrita** con el grupo SH para el entrecruzamiento químico con la bobina de ScFV (puede ser cualquier conector y grupo químicamente reactivo, por ejemplo NH₂, adecuado para el entrecruzamiento químico)

10 **Cabeza armada ilustrativa, es decir, una estructura que comprende un elemento de unión a CD32 y un elemento de unión a TLR9**

15 Cualquier miembro representativo grupo de los elementos de unión a CD32 enlazados químicamente mediante cualquier método con cualquier miembro representativo del grupo de elementos de unión a TLR9, donde preferiblemente los elementos de unión a TLR9 están acoplados a lisinas (K) disponibles en los elementos de unión a CD32, p.ej. También se pueden acoplar mezclas de diferentes elementos de unión a TLR9, p.ej. elementos de unión a CpG-B naturales o peptídicos.

Bobina 1 de ScFV (IV.3) (SEQ ID 49)

EVQLQQSGPEL**K**KPGETV**K**ISCKASGYTFTNYGMNWV**K**QAPG**K**GLKWMGWLNTYTGE
SIYPDDF**K**GRFAFSSETSASTAYLQINNL**K**NEDMATYFCARGDYGYDDPLDYWGQGTSV
TVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSS**K**SLLHTNGNTYLHW
FLQRPQSPQLLIYRMSVLASGVPDRFSGSGSGTAFTLSISRVEAEDVGVFYCMQHLEYP
LTFGAGT**K**LEL**K**GSISAWSHQFE**K**GPEVSALE**K**EVSALE**K**EVSALE**K**EVSALE**K**EVSALE

K

20 Se prefieren las lisinas en la estructura de bobina (cursiva) o

Péptido-bobina: (SEQ ID 51)

ADGAWAWVWLTETAVGA**K**GPEVSALE**K**EVSALE**K**EVSALE**K**EVSALE**K**EVSALE**K** Se prefieren las lisinas en la estructura de bobina (cursiva)

25 **Ejemplo 2: Uso de la plataforma de tecnología en oncología.**

Cabeza activa basada en la bobina 1 de ScFV (IV.3) + ODNM362, e inmunógeno G17 de mono rhesus y cinomolgo (G17RM). En lo sucesivo pE se entiende como piroGlu.

30 Secuencia de gastrina pequeña inmunogénica humana (G17H, primeros 13 AA, SEQ ID 9): pEGPWLEEEEE EAYG

Secuencia de gastrina pequeña inmunogénica de mono rhesus y cinomolgo (G17RM, primeros 13 AA, SEQ ID 53): pEGPWMEEEEE AAYG

35 Secuencia de gastrina pequeña inmunogénica de ratón (G17M, primeros 13 AA, SEQ ID 54): pERPAGRMEEEE EAYG

diferencias con G17RM en **negrita**

Inmunógeno de bobina 1 de G17RM y bobina 1 de G17H producto final:

40 Bobina 1 de G17RM, SEQ ID 55:

pEGPWMEEEEEAYG**GGSGG***KVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKE*

Bobina 1 de G17H, SEQ ID 56:

pEGPWLEEEEEAYG**GGSGG***KVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKE*

En **negrita**: un conector (puede ser cualquier conector)

En cursiva: la bobina pepK para la interacción con la cabeza activa

45 **TYG100 1 RM y TYG100 1H listos para su uso (producto final)**

50 La cabeza activa descrita anteriormente (basada en la bobina 1 de ScFV IV.3) se mezcla con bobina de G17RM o bobina 1 de G17H a una proporción que indica que 100% de la cabeza activa está complejada con bobina 1 de G17RM o bobina 1 de G17H, sin estar presente inmunógeno libre de G17 (razón molar de ~ 1:1) y formulado sobre Alumbre. Por lo tanto, se producen TYG100_1RM y TYG100_1H.

Ejemplo 3 TYG100 1RM para el tratamiento de cáncer dependiente de gastrina, v.g. cáncer de páncreas:

55 Se inmunizaron 6 ratones Balb/c 3 veces el día 0, el día 14 y el día 35 con TYG100_1RM o G17_1RM (sin cabeza activa) que contenían G17 de mono rhesus (58,4 µg/disparo en 0,5 ml). Dos semanas después de la última inmunización, se tomó suero y se analizó la presencia de anticuerpos IgG contra G17RM, G17H y G17M (=G17 del

ratón)

Tabla 1

Núm. Ratón	Título de IgG contra la cabeza activa (bobina 1 de ScFV)	Título de IgG contra G17RM	Título de IgG contra G17H	Título de IgG contra G17M
1	$2,5 \cdot 10^{-7}$	$2,1 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-3}$
2	$2,1 \cdot 10^{-7}$	$4,7 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$5,6 \cdot 10^{-3}$
3	$1,2 \cdot 10^{-7}$	$8,9 \cdot 10^{-7}$	$2,1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-2}$
4	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-2}$
5	$2,0 \cdot 10^{-7}$	$9,7 \cdot 10^{-6}$	$9,8 \cdot 10^{-6}$	n.d.
6	$5,8 \cdot 10^{-7}$	$4,7 \cdot 10^{-6}$	$6,5 \cdot 10^{-6}$	$3,7 \cdot 10^{-3}$
promedio	$4,1 \cdot 10^{-7}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$2,9 \cdot 10^{-5}$	$6,6 \cdot 10^{-3}$

5 La Tabla 1 muestra que todos los ratones respondieron con IgG contra los 2 componentes de la vacuna (cabeza activa y G17RM). De forma importante, todos los ratones produjeron IgG que reaccionó de forma cruzada con G17 humana y, en menor medida, con G17 de ratón (G17M). Esto último es notable porque los primeros 13 aminoácidos de G17 de ratón (**pERPRMEEEE EAYG**, SEQ ID 9) son diferentes en 3 AA de G17RM (las diferencias se indican en **negrita** y se subrayan) y G17M es un autoantígeno para el ratón. Los anticuerpos que reconocen G17M son por lo tanto autoanticuerpos, lo que indica que TYG100_1RM ha podido romper la tolerancia natural contra el autoantígeno G17M. No hubo respuesta contra G17 cuando el péptido G17 se inmunizó sin la cabeza activa.

10 La capacidad de una vacuna para inducir una respuesta autoinmune es un requisito previo para una vacuna contra el cáncer, donde todos los antígenos asociados a tumores (TAA) son autoantígenos que están expresados en exceso, p.ej. expresados en exceso en células tumorales. Por lo tanto, se puede utilizar una vacuna compuesta por la cabeza activa de TYG100_1RM combinada con G17 humana como inmunógeno como vacuna para el tratamiento de tumores dependientes de gastrina, tal como el cáncer de páncreas.

20 **Ejemplo 4: Productos ilustrativos que incluyen un dímero del inmunógeno peptídico**

Inmunógeno producto final bobina 2 de G17RM y bobina 2 de G17H:

Se sintetizó químicamente un dímero de G17RM (primeros 13 AA de gastrina pequeña) utilizando un conector flexible especial que conecta los 2 péptidos a una bobina pepK

25 **Bobina 2 de G17RM:** (SEQ ID 57: Parte de una composición inmunogénica de la invención, que comprende dos péptidos de gastrina de mono rhesus de SEQ ID 53, una secuencia conectora ramificada y una hélice alfa peptídica (TYG100_2RM). Esta parte puede estar unida al coadyuvante dirigido adecuado por medio de una conexión de bobina en espiral)



en **negrita** un conector flexible especial (puede ser cualquier conector que conecte tres péptidos). En *cursiva*, la bobina pepK para la interacción con la cabeza activa.

35 **Bobina 2 de G17H:** (SEQ ID 11: Parte de una composición inmunogénica de la invención, que comprende dos péptidos de gastrina humanos de SEQ ID NO 9, una secuencia conectora ramificada y una hélice alfa peptídica (TYG100_2H). Esta parte puede unirse al coadyuvante dirigido adecuado mediante una conexión de bobina en espiral)



en negrita un conector flexible especial (puede ser cualquier conector que conecte tres péptidos). En cursiva, la bobina pepK para la interacción con la cabeza activa.

Producto final TYG100 2RM y TYG100 2H

La cabeza activa como se describió anteriormente (basada en la bobina 1 de ScFV; IV.3) se mezcla con la bobina 2 de G17RM o la bobina 2 de G17H a una proporción que indica que 100% de la cabeza activa se compleja con el inmunógeno de la bobina 2 de G17RM o la bobina 2 de G17H, sin estar presente inmunógeno libre de G17 (razón molar de ~ 1:1) y formulada en Alumbre. Por lo tanto, se producen TYG100_2RM y TYG100_2H.

Ejemplo 5: TYG100 2RM para el tratamiento de cáncer dependiente de gastrina, p.ej. cáncer de páncreas:

Se inmunizaron 6 ratones Balb/c 3 veces el día 0, el día 14 y el día 35 con TYG100_2RM que contenía los primeros 13 aminoácidos de G17 de mono Rhesus (66,8 µg/disparo en 0,5 ml). Dos semanas después de la última inmunización, se tomó suero y se analizó la presencia de anticuerpos IgG contra G17RM, G17H y G17M (=G17 del ratón)

Tabla 2

Núm. ratón	Título de IgG contra la cabeza activa (bobina 1 de ScFV)	Título de IgG contra G17RM	Título de IgG contra G17H	Título de IgG contra G17M
1	1*10 ⁻⁷	1,8*10 ⁻⁷	2,2*10 ⁻⁶	4,3*10 ⁻³
2	2,8*10 ⁻⁷	1,1*10 ⁻⁶	15,6*10 ⁻⁶	2,9*10 ⁻³
3	8,9*10 ⁻⁷	8,4*10 ⁻⁷	2,4*10 ⁻⁶	4,4*10 ⁻³
4	5,9*10 ⁻⁷	9,2*10 ⁻⁷	1,2*10 ⁻⁶	2,2*10 ⁻³
5	1,7*10 ⁻⁷	8,0*10 ⁻⁷	1*10 ⁻⁵	7,6*10 ⁻³
6	1,1*10 ⁻⁷	6,1*10 ⁻⁶	2,5*10 ⁻⁵	7,4*10 ⁻³
promedio	3,5*10 ⁻⁷	1,6*10 ⁻⁶	3,5*10 ⁻⁶	4,8*10 ⁻³

La Tabla 2 muestra que todos los ratones respondieron con IgG contra los 2 componentes de la vacuna (cabeza activa y G17RM). De forma importante, todos los ratones produjeron IgG que reaccionó de forma cruzada con G17 humana y, en menor medida, con G17 de ratón (G17M). Esto último es notable porque los primeros 13 aminoácidos de G17 de ratón (**pERPRMEEEE EAYG**, SEQ ID 9) es diferente en 3 AA de G17RM (las diferencias se indican en negrita y se subrayan) y G17M es un autoantígeno para el ratón. Los anticuerpos que reconocen G17M son por lo tanto autoanticuerpos, lo que indica que TYG100_2RM ha podido romper la tolerancia natural contra el autoantígeno G17M. No hubo respuesta contra G17 cuando el péptido G17 se inmunizó sin la cabeza activa.

La capacidad de una vacuna para inducir una respuesta autoinmune es un requisito previo para una vacuna contra el cáncer, donde todos los antígenos asociados a tumores (TAA) son autoantígenos que se expresan en exceso en las células tumorales. Por lo tanto, se puede utilizar una vacuna compuesta por la cabeza activa de TYG100_2RM combinada con G17 humana como inmunógeno como vacuna para el tratamiento de tumores dependientes de gastrina, tales como el cáncer de páncreas. Las respuestas contra los 3 tipos de G17 inducidas por TYG100_2RM fueron más fuertes que las inducidas por TYG100_1RM (tabla 1), lo que indica que el dímero es el preferido en la vacuna.

Ejemplo 6 TYG100 2RM para el tratamiento de cáncer dependiente de gastrina, p.ej. cáncer de páncreas:

Seis monos Cynomolgus se inmunizaron con TYG100_2RM y 6 se inmunizaron con la bobina 2 de G17RM los d0, d14 y d28. En el suero del d0, d14, d28, 42 y d56 se analizó la presencia de anticuerpos IgG contra gastrina pequeña autóloga (G17RM), gastrina pequeña de seres humanos (G17H), un péptido de control irrelevante de PM similar a gastrina (péptido de control) o contra la cabeza activa (bobina 1 de ScFV) utilizando el sistema ELISA múltiple de Meso Scale Discovery (MSD) de acuerdo con el manual de MSD.

En la figura 1, se puede ver que los 6 animales mostraron una fuerte respuesta de IgG dependiente del tiempo contra la cabeza activa (bobina 1 de ScFV) así como contra G17RM y G17H, no se observó respuesta contra el péptido de control. La respuesta contra G17RM después de tres inmunizaciones fue de 75% de la respuesta contra la bobina 1 de ScFV. Esto es notable ya que G17RM es una proteína 100% autóloga de solo ~1,2 kDa, mientras que la bobina 1 de ScFV es una proteína 100% alogénica de >30 kDa. Los anticuerpos anti-G17RM cruzados reaccionaron fuertemente con G17H. No hubo respuesta contra G17RM cuando se utilizó el péptido de bobina 2 de

G17RM sin la cabeza activa. La disminución en el título de IgG entre d42 y 56 fue más fuerte para G17RM que para ScFV, lo que indica que parte de los anticuerpos IgG fueron neutralizados por G17 endógena. Es importante destacar que la presencia de G17 endógena no aumentó la respuesta a G17RM.

5 Los datos en la figura 1 muestran que la vacuna fue capaz de inducir una respuesta de autoanticuerpo verdadera que es reversible. Este es un requisito previo para las vacunas contra el cáncer, ya que los antígenos asociados a tumores (TAA) son autoantígenos que son expresados en exceso, p.ej. expresado en exceso en células tumorales, pero también presentes a niveles de expresión más bajos en células sanas normales. Por lo tanto, se puede utilizar una vacuna como TYG100_2RM o TYG100_2H para el tratamiento de tumores dependientes de gastrina, tales como el cáncer de páncreas. Una vez que el cáncer se ha curado por completo, el tratamiento puede detenerse y los anticuerpos anti G17 inducidos se eliminarán de la circulación. Para mantener un estado estable (durante el tratamiento), la respuesta autoinmune debe reforzarse mediante inyecciones repetidas con la vacuna. No se induce ninguna enfermedad autoinmune irreversible con este tipo de vacuna.

15 **Ejemplo 7: TYG100 2RM para el tratamiento de la obesidad:**

Los animales del Ejemplo 3 se controlaron para determinar su apetito y se midió el peso corporal el d0, d14, d28, d42 y d56. Después de dos inyecciones con TYG100_2RM, 4 de 6 animales perdieron interés en sus aperitivos diarios (galletas), mientras que la ingesta básica de alimentos se mantuvo normal. Esto estuvo acompañado por una pérdida de peso significativa (figura 2), pero no se documentaron efectos secundarios no deseados. Hasta ahora, tales observaciones nunca se realizaron con otra vacunación con vacunas que se basaron en las interacciones de la cabeza activa y la bobina en espiral, tal como el direccionamiento de inmunógenos distintos de los inmunógenos de gastrina (datos no mostrados).

25 Estos datos indican que TYG100_2RM reduce el antojo aperitivos (entre comidas) sin influir en la ingesta básica de alimentos necesaria para una vida sana. Los animales normalmente estaban activos y felices. Por lo tanto, TYG100_2RM se puede utilizar para el tratamiento de la obesidad.

30 **Lista de referencias**

1. Mathis, D. y C. Benoist. 2004. Back to central tolerance. *Immunity* 20:509-516.
2. Miller, J. F. A. P. y G. Morahan. 1992. Peripheral T cell tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 10:51-69.
3. Tafuri, A., J. Alferink, P. Moller, G. J. Hammerling, y B. Arnold. 1995. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science* 270:630-633.
- 35 4. Cheever, M. A. y C. S. Higano. 2011. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin. Cancer Res.* 17:3520-3526.
5. Linley, A. J., M. Ahmad, y R. C. Rees. 2011. Tumour-associated antigens: considerations for their use in tumour immunotherapy. *Int. J. Hematol.* 93:263-273.
- 40 6. Brett, B. T., S. C. Smith, C. V. Bouvier, D. Michaeli, D. Hochhauser, B. R. Davidson, T. R. Kurzawinski, A. F. Watkinson, S. N. Van, R. E. Pounder, y M. E. Caplin. 2002. Phase II study of anti-gastrin-17 antibodies, raised to G17DT, in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 20:4225-4231.
7. Rengifo-Cam, W. y P. Singh. 2004. Role of progastrins and gastrins and their receptors in GI and pancreatic cancers: targets for treatment. *Curr. Pharm. Des* 10:2345-2358.
- 45 8. Watson, S. A., D. Michaeli, T. M. Morris, P. Clarke, A. Varro, N. Griffin, A. Smith, T. Justin, y J. D. Hardcastle. 1999. Antibodies raised by gastrimmune inhibit the spontaneous metastasis of a human colorectal tumour, AP5LV. *Eur J Cancer* 35:1286-1291.
9. Watson, S. A., T. M. Morris, D. F. McWilliams, J. Harris, S. Evans, A. Smith, y P. A. Clarke. 2002. Potential role of endocrine gastrin in the colonic adenoma carcinoma sequence. *Br. J Cancer* 87:567-573.
- 50 10. Morton, M., G. C. Prendergast, y T. D. Barrett. 2011. Targeting gastrin for the treatment of gastric acid related disorders and pancreatic cancer. *Trends in pharmacological sciences* 32:201-205.
11. Ciccotosto, G. D., J. K. Dawborn, K. J. Hardy, y A. Shulkes. 1996. Gastrin processing and secretion in patients with end-stage renal failure. *J Clin Endocrinol. Metab* 81:3231-3238.
12. Eaton-Bassiri, A., S. B. Dillon, M. Cunningham, M. A. Ryczyn, J. Mills, R. T. Sarisky, y M. L. Mbow. 2004. Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect. Immun.* 72:7202-7211.
- 55 13. Saikh, K. U., T. L. Kissner, A. Sultana, G. Ruthel, y R. G. Ulrich. 2004. Human monocytes infected with *Yersinia pestis* express cell surface TLR9 and differentiate into dendritic cells. *J. Immunol.* 173:7426-7434.
14. Tanaka, J., K. Sugimoto, K. Shiraki, M. Tameda, S. Kusagawa, K. Nojiri, T. Beppu, K. Yoneda, N. Yamamoto, K. Uchida, T. Kojima, y Y. Takei. 2010. Functional cell surface expression of toll-like receptor 9 promotes cell proliferation and survival in human hepatocellular carcinomas. *Int. J Oncol.* 37:805-814.

15. Hartmann, G., J. Battiany, H. Poeck, M. Wagner, M. Kerkmann, N. Lubenow, S. Rothenfusser, y S. Endres. 2003. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- α induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 33:1633-1641.
- 5 16. Tversky, J. R., A. P. Bieneman, K. L. Chichester, R. G. Hamilton, y J. T. Schroeder. 2010. Subcutaneous allergen immunotherapy restores human dendritic cell innate immune function. *Clin. Exp. Allergy.* 40:94-102.
17. Abel, K., Y. Wang, L. Fritts, E. Sanchez, E. Chung, P. Fitzgerald-Bocarsly, A. M. Krieg, y C. J. Miller. 2005. Deoxycytidyl-deoxyguanosine oligonucleotide classes A, B, and C induce distinct cytokine gene expression patterns in rhesus monkey peripheral blood mononuclear cells and distinct alpha interferon responses in TLR9-expressing rhesus monkey plasmacytoid dendritic cells. *Clin Diagn. Lab Immunol* 12:606-621.
- 10 18. Puig, M., K. W. Tosh, L. M. Schramm, L. T. Grajkowska, K. D. Kirschman, C. Tami, J. Beren, R. L. Rabin, y D. Verthelyi. 2012. TLR9 and TLR7 agonists mediate distinct type I IFN responses in humans and nonhuman primates in vitro and in vivo. *J Leukoc. Biol.* 91:147-158.
19. Arndt, K. M., K. M. Muller, y A. Pluckthun. 2001. Helix-stabilized Fv (hsFv) antibody fragments: substituting the constant domains of a Fab fragment for a heterodimeric coiled-coil domain. *J Mol. Biol.* 312:221-228.
- 15 20. Van Reijssen, F. C., C. A. F. M. Bruijnzeel-Koomen, F. S. Kalthoff, E. Maggi, S. Romagnani, J. K. T. Westland, y G. C. Mudde. 1992. Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 90:184-193.
21. Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky, y D. M. Klinman. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* 374:546-549.
- 20 22. Chao, H., D. L. Bautista, J. Litowski, R. T. Irvin, y R. S. Hodges. 1998. Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 715:307-329.
23. Litowski, J. R. y R. S. Hodges. 2001. Designing heterodimeric two-stranded alpha-helical coiled-coils: the effect of chain length on protein folding, stability and specificity. *J. Pept. Res.* 58:477-492.
24. Litowski, J. R. y R. S. Hodges. 2002. Designing heterodimeric two-stranded alpha-helical coiled-coils. Effects of hydrophobicity and alpha-helical propensity on protein folding, stability, and specificity. *J. Biol. Chem.* 277:37272-37279.
- 25 25. Greenman, J., A. L. Tutt, A. J. George, K. A. Pulford, G. T. Stevenson, y M. J. Glennie. 1991. Characterization of a new monoclonal anti-Fc gamma RII antibody, AT10, and its incorporation into a bispecific F(ab')₂ derivative for recruitment of cytotoxic effectors. *Mol. Immunol* 28:1243-1254.
- 30 26. Stuart, S. G., M. L. Trounstein, D. J. Vaux, T. Koch, C. L. Martens, I. Mellman, y K. W. Moore. 1987. Isolation and expression of cDNA clones encoding a human receptor for IgG (Fc gamma RII). *J. Exp. Med.* 166:1668-1684.
27. Macintyre, E. A., P. J. Roberts, R. Abdul-Gaffar, K. O'Flynn, G. R. Pilkington, F. Farace, J. Morgan, y D. C. Linch. 1988. Mechanism of human monocyte activation via the 40-kDa Fc receptor for IgG. *J Immunol.* 141:4333-4343.
- 35 28. Krug, A., S. Rothenfusser, V. Hornung, B. Jahrsdorfer, S. Blackwell, Z. K. Ballas, S. Endres, A. M. Krieg, y G. Hartmann. 2001. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 31:2154-2163.
29. Tel, J., N. Beenhakker, G. Koopman, B. Hart, G. C. Mudde, y V. de, I. 2012. Targeted delivery of CpG ODN to CD32 on human and monkey plasmacytoid dendritic cells augments IFN α secretion. *Immunobiology.* 217:1017-1024.
- 40 30. Berntzen, G., J. T. Andersen, K. Ustgard, T. E. Michaelsen, S. A. Mousavi, J. D. Qian, P. E. Kristiansen, V. Lauvrak, y I. Sandlie. 2009. Identification of a high affinity Fc gamma RIIA binding peptide that distinguishes Fc gamma RIIA from Fc gamma RIIB and exploits Fc gamma RIIA mediated phagocytosis and degradation. *J. Biol. Chem.* 284:1126-1135.
- 45 31. Stuart, S. G., N. E. Simister, S. B. Clarkson, B. M. Kacinski, M. Shapiro, y I. Mellman. 1989. Human IgG Fc receptor (hFcRII; CD32) exists as multiple isoforms in macrophages, lymphocytes and IgG-transporting placental epithelium. *EMBO J.* 8:3657-3666.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> TYG ONCOLOGY LTD.
- <120> COMPOSICIÓN INMUNOGÉNICA DE PÉPTIDO DE GASTRINA
- 55 <130> TY001P
- <160> 57
- 60 <170> BiSSAP 1.3
- <210> 1

ES 2 665 780 T3

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido

<400> 1

	Glu	Gly	Pro	Trp	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala	Tyr	Gly	Trp	Met	Asp
	1				5					10					15	
10	Phe															

<210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido

<400> 2

20 Glu Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr
 1 5 10

<210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido

30 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> 2
 <223> X es cualquier aminoácido

35 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> 4
 <223> X es cualquier aminoácido

40 <400> 3

	Glu	Xaa	Pro	Xaa
	1			

45 <210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Péptido

<220>
 <221> PÉPTIDO

55 <222> 2
 <223> X es cualquiera de G o R

<220>
 <221> PÉPTIDO

<222> 4
 <223> X es cualquiera de W o R

 <400> 4
 5

 Glu Xaa Pro Xaa
 1

 <210> 5
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido
 15

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> 2
 <223> X es cualquier aminoácido
 20

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> 4
 <223> X es cualquier aminoácido
 25

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> 5
 <223> X es cualquier aminoácido
 30

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> 10
 <223> X es cualquier aminoácido
 35

 <400> 5

 Glu Xaa Pro Xaa Xaa Glu Glu Glu Glu Xaa Ala Tyr
 1 5 10

 40 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Péptido

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 50 <222> 2
 <223> X es cualquiera de G o R

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 55 <222> 4
 <223> X es cualquiera de W o R

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 60 <222> 5

<223> X es cualquiera de L o M

<220>

<221> PÉPTIDO

5 <222> 10

<223> X es cualquiera de E o A

<400> 6

10 Glu Xaa Pro Xaa Xaa Glu Glu Glu Glu Xaa Ala Tyr
 1 5 10

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

20 <220>

<221> PÉPTIDO

<222> 2

<223> X es cualquier aminoácido

25 <220>

<221> PÉPTIDO

<222> 4

<223> X es cualquier aminoácido

30 <220>

<221> PÉPTIDO

<222> 5

<223> X es cualquier aminoácido

35 <220>

<221> PÉPTIDO

<222> 10

<223> X es cualquier aminoácido

40 <400> 7

Glu Xaa Pro Xaa Xaa Glu Glu Glu Glu Xaa Ala Tyr Gly
1 5 10

<210> 8

45 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Péptido

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> 2

55 <223> X es cualquiera de G o R

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> 4

60 <223> X es cualquiera de W o R

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> 5
 5 <223> X es cualquiera de L o M

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> 10
 10 <223> X es cualquiera de E o A

<400> 8

Glu Xaa Pro Xaa Xaa Glu Glu Glu Glu Xaa Ala Tyr Gly
 1 5 10

15 <210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido

<400> 9

25 Glu Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly
 1 5 10

<210> 10
 <211> 53
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Inmunógeno-bobina

35 <400> 10

Glu Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Gly Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu
 20 25 30
 Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val
 35 40 45
 Ser Ala Leu Lys Glu
 50

40 <210> 11
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Inmunógeno-bobina

<220>
 <221> PÉPTIDO
 50 <222> 16
 <223> en donde el péptido de la secuencia EGPWLEEEEEAYGGG se conecta a través de G a K C-terminal en la posición 16

<400> 11

ES 2 665 780 T3

Glu	Gly	Pro	Trp	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala	Tyr	Gly	Gly	Gly	Lys
1				5					10					15	
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Lys	Val	Ser	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ser	Ala
			20					25					30		
Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ser	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ser	Ala	Leu	Lys
		35					40					45			
Glu	Lys	Val	Ser	Ala	Leu	Lys	Glu								
	50					55									

5 <210> 12
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido
 <400> 12

Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5

15 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido

25 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> 3
 <223> en donde el péptido de la secuencia GG se conecta adicionalmente a través de la G a K C-terminal en la posición 3

30 <400> 13

Gly Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5

35 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido
 <400> 14

Glu Val Ser Ala Leu
 1 5

45 <210> 15
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Péptido
 <400> 15

ES 2 665 780 T3

Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala
 20 25 30
 Leu Glu Lys
 35

5 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido
 <400> 16

Lys Val Ser Ala Leu
 1 5

15 <210> 17
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido
 <400> 17

25 Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala
 20 25 30
 Leu Lys Glu
 35

30 <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido
 <400> 18

Glu Ile Ala Ala Leu
 1 5

40 <210> 19
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido
 <400> 19

ES 2 665 780 T3

Glu Ile Ala Ala Leu Glu Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Lys Glu Ile
 1 5 10 15
 Ala Ala Leu Glu Lys
 20

5 <210> 20
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido
 <400> 20

Glu Ile Ala Ala Leu Glu Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Lys Glu Ile
 1 5 10 15
 Ala Ala Leu Glu Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Lys
 20 25

15 <210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido
 <400> 21

Lys Ile Ala Ala Leu
 1 5

25 <210> 22
 <211> 21
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido
 35 <400> 22

Lys Ile Ala Ala Leu Lys Glu Lys Ile Ala Ala Leu Lys Glu Lys Ile
 1 5 10 15
 Ala Ala Leu Lys Glu
 20

40 <210> 23
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido
 <400> 23

Lys Ile Ala Ala Leu Lys Glu Lys Ile Ala Ala Leu Lys Glu Lys Ile
 1 5 10 15
 Ala Ala Leu Lys Glu Lys Ile Ala Ala Leu Lys Glu
 20 25

50 <210> 24

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido

<400> 24

Glu Ile Ser Ala Leu

10 1 5

<210> 25
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido

<400> 25

Glu Ile Ser Ala Leu Glu Lys Glu Ile Ser Ala Leu Glu Lys Glu Ile

1 5 10 15

Ser Ala Leu Glu Lys

20

<210> 26
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>

30 <223> Péptido

<400> 26

Glu Ile Ser Ala Leu Glu Lys Glu Ile Ser Ala Leu Glu Lys Glu Ile

1 5 10 15

Ser Ala Leu Glu Lys Glu Ile Ser Ala Leu Glu Lys

20 25

35 <210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido

<400> 27

45 <210> 28
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Péptido

55

ES 2 665 780 T3

<400> 28

Lys Ile Ser Ala Leu Lys Glu Lys Ile Ser Ala Leu Lys Glu Lys Ile
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Lys Glu
 20

5 <210> 29
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido

<400> 29

Lys Ile Ser Ala Leu Lys Glu Lys Ile Ser Ala Leu Lys Glu Lys Ile
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Lys Glu Lys Ile Ser Ala Leu Lys Glu
 20 25

15 <210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido

25 <400> 30

Glu Val Ala Ala Leu
 1 5

30 <210> 31
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido

<400> 31

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
 1 5 10 15
 Ala Ala Leu Glu Lys
 20

40 <210> 32
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido

<400> 32

50 Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
 1 5 10 15
 Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
 20 25

ES 2 665 780 T3

<210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido

10 <400> 33

Lys Val Ala Ala Leu
 1 5

15 <210> 34
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido

<400> 34

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
 1 5 10 15
 Ala Ala Leu Lys Glu
 20

25 <210> 35
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido

<400> 35

35 Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
 1 5 10 15
 Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 20 25

40 <210> 36
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido

<400> 36

Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Glu Lys
 20

50 <210> 37
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 665 780 T3

<223> Péptido

<400> 37

	Glu	Val	Ser	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ser	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val
	1				5					10					15	
5	Ser	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ser	Ala	Leu	Glu	Lys				
			20						25							

<210> 38

<211> 21

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

15 <400> 38

	Lys	Val	Ser	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ser	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val
	1				5					10					15	
	Ser	Ala	Leu	Lys	Glu											

20

20

<210> 39

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido

<400> 39

30

	Lys	Val	Ser	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ser	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val
	1				5					10					15	
	Ser	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ser	Ala	Leu	Lys	Glu				
				20					25							

<210> 40

<211> 297

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

40

<400> 40

ES 2 665 780 T3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Ile Tyr Pro Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Ser Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Tyr Gly Tyr Asp Asp Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro
 130 135 140
 Ser Val Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser
 145 150 155 160
 Ser Lys Ser Leu Leu His Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe
 165 170 175
 Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser
 180 185 190
 Val Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 Thr Ala Phe Thr Leu Ser Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 210 215 220
 Val Phe Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala
 225 230 235 240
 Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Ser Ile Ser Ala Trp Ser His Pro
 245 250 255
 Gln Phe Glu Lys Gly Pro Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser
 260 265 270
 Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu
 275 280 285
 Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys
 290 295

5 <210> 41
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido
 <400> 41

Ala Asp Gly Ala Trp Ala Trp Val Trp Leu Thr Glu Thr Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Ala Ala Lys

15 <210> 42
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> ScFV
 <400> 42

ES 2 665 780 T3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Ile Tyr Pro Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Ser Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Tyr Gly Tyr Asp Asp Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro
 130 135 140
 Ser Val Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser
 145 150 155 160
 Ser Lys Ser Leu Leu His Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe
 165 170 175
 Leu Gln Arg Pro Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Val
 180 185 190
 Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 195 200 205
 Ala Phe Thr Leu Ser Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
 210 215 220
 Phe Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Ser Ile
 245

5 <210> 43
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido
 <400> 43

Ala Asp Gly Ala Trp Ala Trp Val Trp Leu Thr Glu Thr Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Ala Ala Lys

15 <210> 44
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> ScFV
 <400> 44

ES 2 665 780 T3

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Lys Asn Asn
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Asn Arg Arg Asp Glu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Ser Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly
 130 135 140
 Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala
 145 150 155 160
 Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln
 165 170 175
 Gln Lys Pro Gly Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Gln
 180 185 190
 Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 195 200 205
 Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ala Ala Met Tyr
 210 215 220
 Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 225 230 235 240
 Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Ile
 245

<210> 45
 <211> 229
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fc de IgG1

10 <400> 45

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Pro Glu
 1 5 10 15
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 20 25 30

ES 2 665 780 T3

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 35 40 45
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 50 55 60
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln Tyr Asn
 65 70 75 80
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 85 90 95
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 100 105 110
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 115 120 125
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Pro Gly Lys
 225

5 <210> 46
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido
 <400> 46

Gly Gly Gly Gly Gly Ala Cys Gly Ala Thr Cys Gly Thr Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Gly
 20

15 <210> 47
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido
 <400> 47

Thr Cys Gly Thr Cys Gly Thr Thr Thr Thr Gly Thr Cys Gly Thr Thr
 1 5 10 15
 Thr Thr Gly Thr Cys Gly Thr Thr
 20

25 <210> 48
 <211> 25
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido

ES 2 665 780 T3

<400> 48

Thr Cys Gly Thr Cys Gly Thr Cys Gly Thr Thr Cys Gly Ala Ala Cys
 1 5 10 15
 Gly Ala Cys Gly Thr Thr Gly Ala Thr
 20 25

<210> 49

5 <211> 296

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> ScFV-bobina

<400> 49

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Ile Tyr Pro Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Ser Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Tyr Gly Tyr Asp Asp Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro
 130 135 140
 Ser Val Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser
 145 150 155 160
 Ser Lys Ser Leu Leu His Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe
 165 170 175
 Leu Gln Arg Pro Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Val
 180 185 190
 Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 195 200 205
 Ala Phe Thr Leu Ser Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
 210 215 220
 Phe Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Ser Ile Ser Ala Trp Ser His Pro Gln
 245 250 255
 Phe Glu Lys Gly Pro Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala
 260 265 270
 Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu
 275 280 285
 Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys
 290 295

15

<210> 50

<211> 294

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> ScFV-bobina

<400> 50

ES 2 665 780 T3

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Lys Asn Asn
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Asn Arg Arg Asp Glu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Ser Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser
 130 135 140
 Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Asp Asn Phe Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln
 165 170 175
 Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Gln
 180 185 190
 Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 195 200 205
 Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ala Ala Met Tyr
 210 215 220
 Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 225 230 235 240
 Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Ile Ser Ala Trp Ser His Pro Phe Glu
 245 250 255
 Lys Gly Pro Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu
 260 265 270
 Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu
 275 280 285
 Val Ser Ala Leu Glu Lys
 290

<210> 51
 <211> 56
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido-bobina

<400> 51

Ala Asp Gly Ala Trp Ala Trp Val Trp Leu Thr Glu Thr Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Ala Ala Lys Gly Pro Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala
 20 25 30
 Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu
 35 40 45
 Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys
 50 55

<210> 52
 15 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Fc de IgG1-bobina

<400> 52

ES 2 665 780 T3

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Pro Glu
 1 5 10 15
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 20 25 30
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 35 40 45
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 50 55 60
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 65 70 75 80
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 85 90 95
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 100 105 110
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 115 120 125
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 130 135 140
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 145 150 155 160
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 165 170 175
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Pro Gly Lys Gly Pro Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val
 225 230 235 240
 Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala
 245 250 255
 Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys
 260 265

5 <210> 53
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Inmunógeno
 <400> 53

Glu Gly Pro Trp Met Glu Glu Glu Glu Ala Ala Tyr Gly
 1 5 10

15 <210> 54
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Inmunógeno
 <400> 54

Glu Arg Pro Arg Met Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly
 1 5 10

25 <210> 55
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Inmunógeno-bobina

5 <400> 55

```

Glu Gly Pro Trp Met Glu Glu Glu Glu Ala Ala Tyr Gly Gly Gly Ser
1      5      10      15
Gly Gly Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu
20      25      30
Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val
35      40      45
Ser Ala Leu Lys Glu
50
    
```

<210> 56

10 <211> 53

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Inmunógeno-bobina

<400> 56

```

Glu Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Gly Gly Ser
1      5      10      15
Gly Gly Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu
20      25      30
Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val
35      40      45
Ser Ala Leu Lys Glu
50
    
```

20

<210> 57

<211> 57

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido

<220>

30 <221> PÉPTIDO

<222> 16

<223> en donde el péptido de la secuencia EGPWMEEEEAAYGGG está conectado a través de G a K C-terminal en la posición 16

35 <400> 57

```

Pro Glu Gly Pro Trp Met Glu Glu Glu Glu Ala Ala Tyr Gly Gly Gly
1      5      10      15
Lys Gly Gly Ser Gly Gly Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser
20      25      30
Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu
35      40      45
Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu
50      55
    
```

40

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende

- 5 a. un coadyuvante dirigido que comprende al menos un radical anti-CD32 unido a un ligando de TLR9 y una primera hélice alfa peptídica, en donde
- (i) dicho radical anti-CD32 es una proteína, polipéptido o péptido que se unen específicamente a CD32; y
- 10 (ii) dicho ligando de TLR9 es un agonista de TLR9 seleccionado del grupo que consiste en oligodesoxinucleótidos CpG de clase A, B y C; y
- b. un inmunógeno de péptido de gastrina-17 unido a una segunda hélice alfa peptídica enrollada a la primera hélice alfa, cuyo inmunógeno peptídico es uno de
- 15 (i) gastrina-17 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 1, o un fragmento de la misma que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 2, o al menos los 4 aminoácidos N-terminales de SEQ ID 2;
- (ii) un péptido de gastrina-17 de mono rhesus o murino; y/o
- 20 (iii) una variante funcionalmente activa de cualquiera de (i) o (ii), con una, dos, tres o cuatro mutaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 2.

2. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho inmunógeno peptídico es un péptido lineal que comprende o que consiste en

- 25 (i) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID 3, preferiblemente SEQ ID 4;
- (ii) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID 5, preferiblemente SEQ ID 6;
- (iii) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID 7, preferiblemente SEQ ID 8; o
- (iv) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID 2 o 9.

30 3. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende al menos dos de los inmunógenos peptídicos unidos a la segunda hélice alfa peptídica.

4. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende 2, 3 o 4 de los inmunógenos peptídicos.

35 5. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde cada una de dichas primera y segunda hélices alfa comprende repeticiones de 3-5 aminoácidos de un motivo de aminoácido, que se unen específicamente entre sí con una Kd de menos de 10^{-6} M.

40 6. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho radical anti-CD32 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD32, un fragmento de anticuerpo y un péptido, preferiblemente dirigido a CD32a.

45 7. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende una o más secuencias conectoras, preferiblemente compuestas de residuos de glicina y/o serina y/o lisina, preferiblemente una secuencia de aminoácidos de SEQ ID 12 o 13.

8. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 10 o SEQ ID 11.

50 9. La vacuna que comprende la composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y un portador farmacéuticamente aceptable.

55 10. Un kit para preparar la composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende los siguientes componentes

- a. un coadyuvante dirigido que comprende al menos un radical anti-CD32 unido a un ligando de TLR9 y una primera hélice alfa peptídica, en donde
- 60 (i) dicho radical anti-CD32 es una proteína, polipéptido o péptido que se unen específicamente a CD32; y
- (ii) dicho ligando de TLR9 es un agonista de TLR9 seleccionado del grupo que consiste en oligodesoxinucleótidos CpG de clase A, B y C; y

b. un inmunógeno de péptido de gastrina-17 unido a una segunda hélice alfa peptídica que coincide con la primera hélice alfa, cuyo inmunógeno peptídico es uno de

- 5 (i) gastrina-17 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 1, o un fragmento de la misma que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 2, o al menos los 4 aminoácidos N-terminales de SEQ ID 2;
- (ii) un péptido de gastrina-17 de mono rhesus o murino; y/o
- 10 (iii) una variante funcionalmente activa de cualquiera de (i) o (ii), con una, dos, tres o cuatro mutaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 2.

11. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece enfermedades dependientes de gastrina, tales como tumores dependientes de gastrina o cáncer dependiente de gastrina, tales como cáncer de páncreas, úlcera gástrica, enfermedad de reflujo gastroesofágico (ERGE), fin insuficiencia renal en etapa terminal (IRET) u obesidad.

15

12. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la composición se administra al sujeto en una cantidad eficaz empleando una estrategia de estímulo primario.

20 13. La composición inmunogénica para uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde la composición se administra al sujeto en una cantidad eficaz que oscila entre 0,0001 y 2 mg por administración.

14. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde el sujeto se trata adicionalmente mediante quimioterapia.

25

15. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que desencadena una respuesta inmunitaria protectora en el sujeto, preferiblemente con un título de IgG en suero contra gastrina-17 humana de al menos 1/1000.

Fig. 1

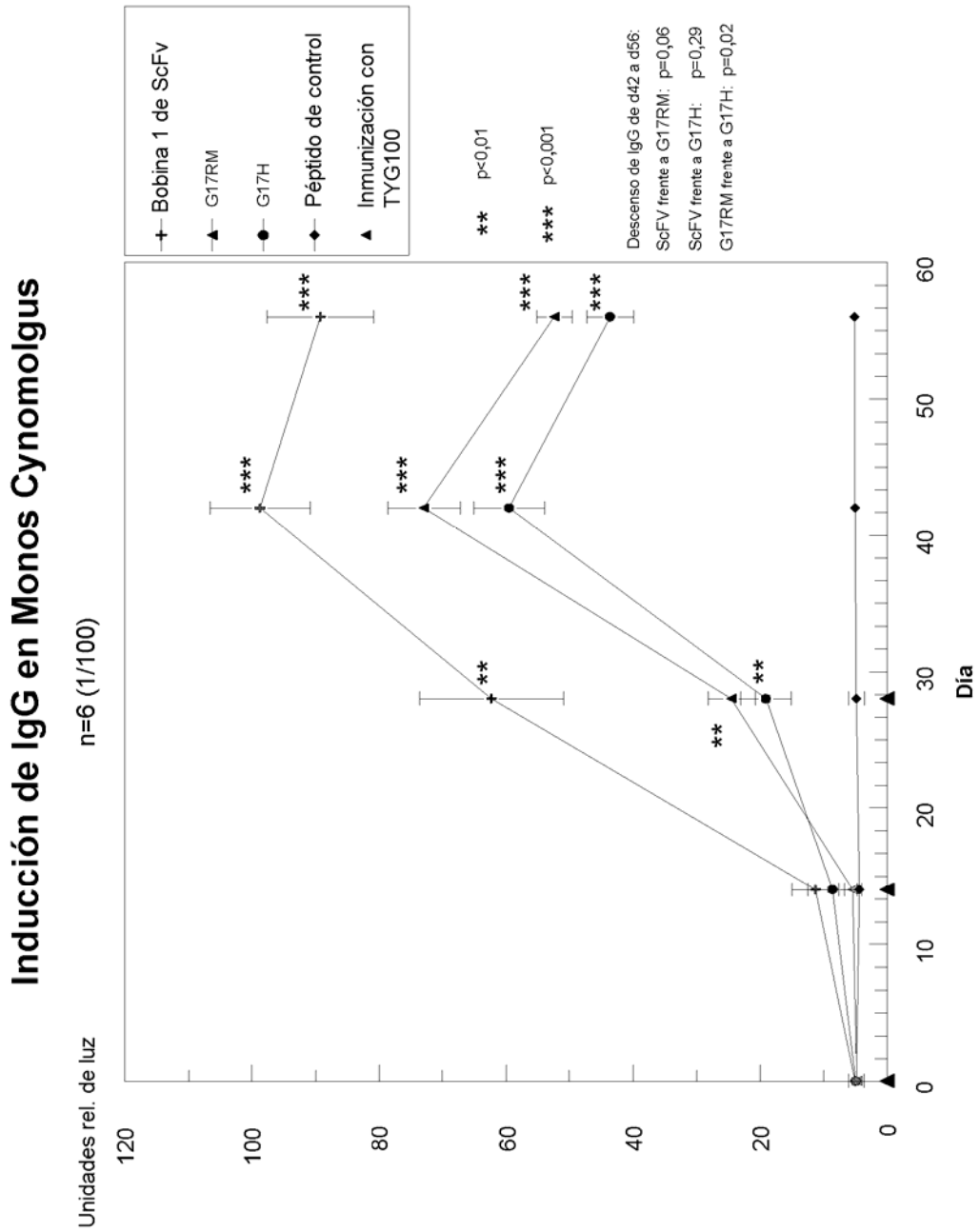


Fig. 2

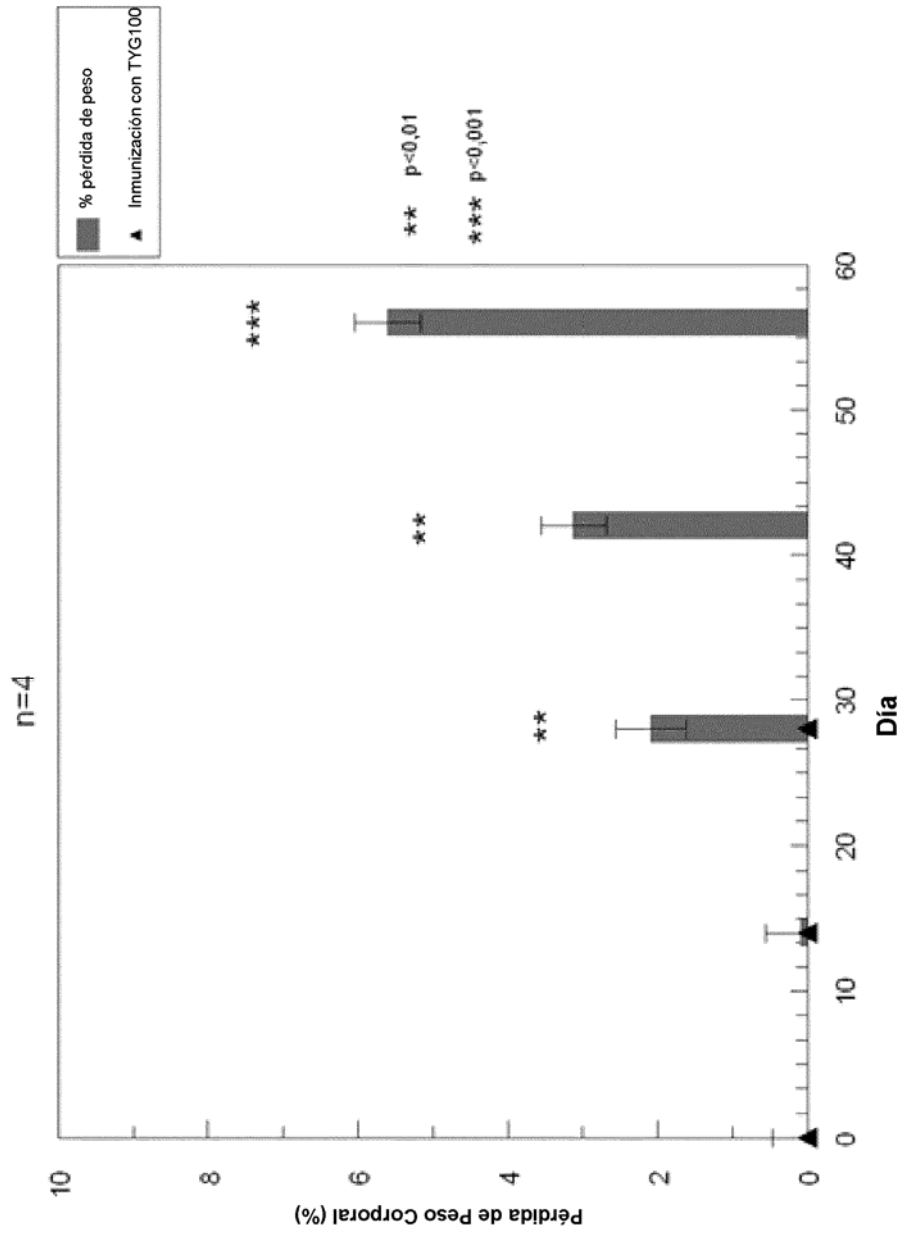


Fig. 3:

SEQ ID 1:

pEGPWLEEEEE AYGWMDF,

SEQ ID 2:

pEGPWLEEEEEAY

SEQ ID 3:

p**EXPX**

En donde

X es la posición 2, 4 es cualquier aminoácido.

SEQ ID 4:

p**EXPX**

En donde

X en la posición 2 es cualquiera de G o R;

X en la posición 4 es cualquiera de W o R

SEQ ID 5:

p**EXPXX**EEEE**X**AY

En donde X en la posición 2, 4, 5, o 10
es cualquier aminoácido.

Fig. 3 continuación

SEQ ID 6:

pEXPXXEEEEEXAY

En donde

X en la posición 2 es cualquiera de G o R;

X en la posición 4 es cualquiera de W o R;

X en la posición 5 es cualquiera de L o M; y

X en la posición 10 es cualquiera de E o A.

SEQ ID 7:

pEXPXXEEEEEXAYG

En donde

X en la posición 2, 4, 5, o 10 es cualquier aminoácido.

SEQ ID 8:

pEXPXXEEEEEXAYG

En donde

X en la posición 2 es cualquiera de G o R;

X en la posición 4 es cualquiera de W o R;

X en la posición 5 es cualquiera de L o M; y

X en la posición 10 es cualquiera de E o A.

SEQ ID 9:

pEGPWLEEEEEAYG

SEQ ID 10:

p **GPWLEEEEEAYG***GGSGG*KVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKE

en **negrita** es el inmunógeno peptídico, en *cursiva* es el conector, en subrayado es la bobina

Fig. 3 continuación

SEQ ID 11:



en **negrita** es el inmunógeno peptídico, en *cursiva* es el conector, en subrayado es la bobina

SEQ ID 12:

GGSGG

SEQ ID 13:

