



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 306 515**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99931070 .9**

86 Fecha de presentación : **15.06.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1087993**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **04.04.2001**

54 Título: **Péptidos Fas y anticuerpos para la modulación de la apoptosis.**

30 Prioridad: **18.06.1998 GB 9813194**
12.03.1999 GB 9905793

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

73 Titular/es: **IMED AB.**
Nobels väg 3 Karolinska Institute Science Park
171 77 Stockholm, SE

72 Inventor/es: **Chiodi, Francesca**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 306 515 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos Fas y anticuerpos para la modulación de la apoptosis.

La presente invención se refiere en varios aspectos a procedimientos y medios para la modulación de la apoptosis y/o la proliferación celular, en particular mediante la estimulación o inhibición de Fas (también conocida como APO-1 y CD95). En parte se basa en el descubrimiento sorprendente de auto-anticuerpos anti-Fas en sueros humanos, anticuerpos que además son biológicamente funcionales e incluyen tanto anticuerpos IgG como IgM. Los fragmentos peptídicos de Fas y las variantes y miméticos de los mismos se pueden usar en la modulación de la apoptosis con propósitos terapéuticos.

Los presentes inventores han encontrado anticuerpos anti-Fas purificados mediante afinidad, aislados a partir del suero de donantes de sangre sanos que son capaces de inhibir la proliferación e inducir la apoptosis de células T leucémicas de Jurkat. Este efecto es inhibido por la proteína quimérica soluble Fas-Fc. La co-estimulación de las células mononucleares de sangre periférica por los auto-anticuerpos anti-Fas humanos y por los anticuerpos monoclonales anti-CD3 inducen o inhiben la proliferación celular dependiendo del estado de activación de las células. Los auto-anticuerpos anti-Fas pueden representar, de esta manera, un modelo adicional de regulación de señales mediadas por Fas *in vivo*, lo cual puede ser provechoso de acuerdo con la presente invención.

Fas (también denominada CD95/APO-1) es una proteína del receptor celular tipo I que pertenece a la familia de receptores factor de crecimiento neuronal/factor de necrosis tumoral (NGF/TNF) (Itoh, *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1994). Se ha demostrado que el receptor transduce una señal apoptótica en varios tipos celulares una vez se une a su ligando natural, ligando de Fas (FasL) (Suda *et al.*, 1993).

Se ha demostrado también que determinados anticuerpos monoclonales anti-Fas desencadenan la señalización de Fas mediante la reticulación de este receptor *in vitro*. Los anticuerpos anti-Fas pueden (i) inducir apoptosis de células T y B inmortalizadas y estimuladas de manera crónica (Yonehara *et al.*, 1989; Trauth *et al.*, 1989; Weis *et al.*, 1995; Mapara *et al.*, 1993; Owen-Schaub *et al.*, 1992; Klas *et al.*, 1993) y de células hepáticas (Ogasawara *et al.*, 1993); (ii) inducir la proliferación de linfocitos periféricos en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (Alderson *et al.*, 1993; Alderson *et al.*, 1994); (iii) inhibir la apoptosis inducida por otro anticuerpo anti-Fas (Silvestris *et al.*, 1996) o FasL (Alderson *et al.*, 1994). Se ha sugerido que Fas juega un papel principal en la destrucción órgano-específica durante alteraciones autoinmunes y enfermedades infecciosas (Katsikis *et al.*, 1995.; Watanabe Fukunaga *et al.*, 1993; Estaquier, *et al.*, 1995; Galle, *et al.*, 1995; Stassi *et al.*, 1997; Dowling *et al.*, 1996; D'Souza *et al.*, 1996).

En base al trabajo experimental descrito más abajo, la presente invención proporciona, en varios aspectos, procedimientos y medios para la modulación de la apoptosis y/o la proliferación celular. La inducción de la apoptosis y/o inhibición de la proliferación celular se puede usar en contextos terapéuticos que incluye trastornos proliferativos tales como tumores, cáncer y soriasis. La inhibición de la apoptosis se puede usar en contextos terapéuticos que incluyen la diabetes tipo I, la esclerosis múltiple y la cirrosis hepática, y la infección por VIH. Tachiban *et al* (Cancer Research (1995) 55: 5528-5530) han publicado la correlación entre la progresión de los astrocitomas y el aumento de la expresión de Fas en células tumorales. Una revisión de De Maria y Testi (Immunology Today (1998) 19: 121-125) demuestra que las células que expresan Fas y su ligando natural están en la proximidad de lesiones en esclerosis múltiple, diabetes tipo I, enfermedades hepáticas y la infección del VIH.

El descubrimiento sorprendente de auto-anticuerpos anti-Fas en suero humano permite la modulación de la unión de estos anticuerpos a Fas para modular los efectos mediados por Fas, en particular la apoptosis. Los fragmentos peptídicos de Fas y miméticos de los mismos se pueden usar para bloquear la unión de anticuerpo a Fas, inhibiendo o incrementando la unión del ligando de Fas a Fas. Antes del trabajo de los presentes investigadores, no se habría esperado de una manera razonable que la administración de fragmentos peptídicos de Fas (un autoantígeno) tuviera alguna utilidad.

Como se indica más abajo en la sección experimental, los aspectos de la presente invención se ejemplifican mediante fragmentos peptídicos de Fas conocidos como Fp5, con la secuencia GQCHKPCPPGERKARDCTV que corresponde a Gly₄₀-Val₅₉ de Fas, Fp8 con la secuencia QEGKEYTDKAHFSSKCRRCR, Fp9 con la secuencia HFSSKCRRCRLCDEGHGLEV, Fp11 con la secuencia EINCTRTQNTKCRCKPNFFC que corresponde a Glu₁₀₀-Cys₁₁₉ de Fas, Fp12 con la secuencia KCRCKPNFFCNSTVCEHCDP, y Fp17 con la secuencia WLCLLLPIPLIVWVKRKEV que corresponde a Trp₁₆₀-Val₁₇₉ de Fas, y Fp18 con la secuencia LIVWVKRKEVQKTCRKHKE. Se demuestra en el presente documento que Fp5 es capaz de inducir apoptosis. Fp8 y Fp9 comprenden aminoácidos que son importantes para la unión de Fas a su ligando natural, FasL. Se demuestra en el presente documento que Fp11 y Fp17 son capaces de bloquear la apoptosis. Los auto-anticuerpos contra Fp11 y Fp17 inducen apoptosis, así que la administración de estos péptidos y los relacionados se pueden usar para bloquear la apoptosis en células portadoras de Fas. Los auto-anticuerpos contra Fp5 pueden tener la propiedad de regular de manera homeostática la apoptosis interfiriendo en la unión del ligando natural de Fas a Fas, de manera que la administración del péptido Fp5 y de péptidos relacionados se pueden usar para incrementar la unión del ligando de Fas a células Fas positivas, induciendo la apoptosis. Los auto-anticuerpos contra Fp8 pueden funcionar como regulador homeostático de la apoptosis mediada por Fas, ocupando en Fas la región que se ocupa en la unión al ligando. Tales anticuerpos se pueden usar como inductores o bloqueadores o en la apoptosis mediada por Fas, dependiendo del estado de activación de la célula relevante.

ES 2 306 515 T3

En un aspecto la presente invención proporciona un péptido de 10-20 aminoácidos de longitud que es un fragmento de Fas humano según se define en la reivindicación 1, para usar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. El tratamiento puede ser de un individuo con una dolencia, enfermedad o alteración, o puede ser profiláctico, tal y como se discute más abajo.

5

Péptidos preferidos para usar de acuerdo con los aspectos y realizaciones de la presente invención incluyen los péptidos Fp5, Fp6, Fp9, Fp11, Fp12, Fp17 y Fp18 para los que se proporcionan las secuencias en el presente documento.

10

Los experimentos muestran que el péptido 16, el cual tiene una coincidencia de 10 aminoácidos con Fp17, tiene poca o ninguna reactividad con los sueros humanos. (El péptido 16 tiene la secuencia KEEGSRNLGWLCLLLLPIP). Esto proporciona una indicación de la especial importancia de la región C-terminal de Fp17. Esto está soportado por los hallazgos con Fp18 (véase Tabla 1). Una realización adicional de la presente invención proporciona, por lo tanto, un péptido que incluye o consiste en la secuencia de aminoácidos QKTCRKHRKE (siendo ejemplos de un péptido que incluye dicha secuencia Fp17 y Fp18).

15

Un péptido para usar en la presente invención puede ser un fragmento de Fas o puede ser una variante o derivado del mismo, mediante la adición, delección, inserción o sustitución de uno o más aminoácidos. Dicha variante o derivado del mismo retendrá, generalmente, la capacidad de modular, ya sea la inducción o inhibición, de la apoptosis y/o la proliferación celular (p.e. cuando se mide usando las células de Jurkat o células T).

20

Preferiblemente, la secuencia aminoacídica de una variante o derivado peptídico comparte la similitud o identidad de secuencia con la secuencia del fragmento relevante de Fas, preferiblemente al menos aproximadamente un 30%, ó 40%, ó 50%, ó 60%, ó 70%, ó 75%, ó 80%, ó 85% de similitud o identidad, o al menos aproximadamente un 90% ó 95% de similitud o identidad. Como es bien conocido, la similitud permite la "variación conservativa", i. e. la sustitución de un residuo hidrofóbico tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, tal como arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina. La similitud puede ser la que se define y determina mediante el programa TBLASTN, de Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10, el cual se usa de manera estándar en el campo de la técnica. La similitud o identidad puede ser respecto la longitud completa del polipéptido relevante o puede ser, más preferiblemente, respecto una secuencia contigua de aproximadamente 15, 20, 25, 30, 35 ó 40 aminoácidos, comparado con la secuencia de aminoácidos relevante de tipo salvaje. Se usan los parámetros por defecto.

30

Se puede proporcionar un péptido de acuerdo con la presente invención en una fusión con aminoácidos adicionales. Se pueden fusionar aminoácidos adicionales en uno o ambos extremos N-terminal y C-terminal del péptido. Los aminoácidos adicionales pueden ser una secuencia de aminoácidos que no sea un fragmento de la proteína Fas o puede ser una secuencia que sea parte de aquella proteína.

35

Un péptido para usar en la invención puede incluir o consistir esencialmente en un fragmento de Fas. Se pueden incluir aminoácidos adicionales que se pueden encontrar o no de manera contigua dentro de Fas, y el péptido puede ser aproximadamente de 10, 15, 20, 25, 30, 35 ó 40 aminoácidos de longitud. Se puede incluir un péptido de acuerdo con este aspecto se puede incluir dentro de una proteína de fusión más grande, en particular cuando el péptido está fusionado a una secuencia no-Fas (i. e. heterólogo o extraño), tal como un polipéptido o dominio proteico.

40

Un péptido de la invención puede tener hasta aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, p.e. aproximadamente 10-40 aminoácidos de longitud, p.e. aproximadamente 10-20.

45

Se puede proporcionar un péptido en una forma aislada, p.e. después de su producción mediante su expresión a partir del ácido nucleico codificante. Como se indica más abajo, se pueden proporcionar uno o más péptidos de acuerdo con la presente invención mediante síntesis peptídica.

50

Pueden proporcionarse una pluralidad de péptidos, cada uno con una secuencia de aminoácidos de un péptido seleccionado diferente en forma aislada, individual o en una mezcla. Los diferentes fragmentos peptídicos de Fas que no se encuentran de manera natural unidos de forma contigua (o variantes o derivados adecuados de los mismos) se pueden proporcionar contiguamente juntos en péptidos o polipéptidos.

55

Los péptidos y polipéptidos (p.e. moléculas de fusión que incluyen un péptido según se ha indicado) se pueden preparar usando cualquiera de la diversidad de técnicas al alcance de la persona experta en la materia.

Los péptidos se pueden sintetizar usando química de péptidos estándar tal como el procedimiento común que utiliza Fmoc (Fluorenilmetilosilicarbonyl) t-Bu (tert-butil), según se describe en Atherton y Sheppard (1989), Solid Phase Peptide Synthesis, a Practical Approach, IRL Press, Oxford.

60

Una manera adecuada de producir un péptido o polipéptido es expresar el ácido nucleico que lo codifica, usando el ácido nucleico en un sistema de expresión. De acuerdo con esto, también se describe un procedimiento de preparación de un péptido o polipéptido, incluyendo el procedimiento de la expresión de un péptido o polipéptido a partir del ácido nucleico codificante (generalmente un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención). Esto se puede conseguir de manera conveniente haciendo crecer una célula hospedadora, que contiene un vector, en cultivo en condiciones

65

adecuadas que causan o permiten la expresión del polipéptido. Los péptidos y polipéptidos se pueden expresar en sistemas *in vitro*, tal como un lisado reticulocito.

El ácido nucleico que codifica un péptido o polipéptido de acuerdo con la presente invención se puede usar en inmunización con ácido nucleico con el fin de modular la apoptosis y/o la proliferación celular en un mamífero, tal como un individuo humano con un propósito terapéutico o profiláctico, o un animal no humano con dicho propósito o con el fin de producir anticuerpos para la subsiguiente manipulación y/o uso (p. e. en contextos diagnósticos o terapéuticos como se discute adicionalmente más abajo).

Cuando se desee expresar un péptido o polipéptido a partir de un ácido nucleico codificante, el ácido nucleico incluye las secuencias control reguladoras adecuadas. Se pueden seleccionar o construir vectores adecuados que contengan secuencias reguladoras adecuadas, incluyendo secuencias promotoras, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias que sean adecuadas. Los vectores pueden ser plásmidos, víricos, p.e. fagos, o fagémido, según se considere adecuado. Para más detalles véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Se describen muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en las células y expresión génica, y análisis de proteínas en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons, 1992.

Son bien conocidos sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una diversidad de células hospedadoras diferentes. Células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células eucariotas tales como las de mamífero y levadura, y sistemas baculovirus. Las líneas celulares de mamíferos accesibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen las células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de cría de hámster, células COS y muchas otras. Un hospedador bacteriano común preferido es *E. coli*.

La presente invención puede hacer uso de una célula hospedadora *in vitro* que contiene ácido nucleico según se describe en el presente documento. El ácido nucleico de la invención se puede integrar en el genoma (p. e. cromosoma) de la célula hospedadora. La integración se puede promover mediante la inclusión de secuencias que promuevan la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar. El ácido nucleico puede estar en un vector extra-cromosómico dentro de la célula.

En todavía otro aspecto se proporciona un procedimiento que incluye la introducción del ácido nucleico en una célula hospedadora *in vitro*. La introducción, que se puede referir de manera general (en particular para la introducción *in vitro*) de manera general sin limitación como "transformación", puede utilizar cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposoma y transducción usando retrovirus u otros virus, p.e., vaccinia o, para células de insecto, baculovirus. Para células bacterianas, técnicas adecuadas pueden incluir la transfección con cloruro de calcio, electroporación y transfección usando un bacteriófago. Se puede usar, como alternativa, la inyección directa del ácido nucleico. Se pueden utilizar genes marcadores como genes de resistencia o de sensibilidad a antibiótico en la identificación de clones que contienen el ácido nucleico de interés, como es bien conocido en el estado de la técnica.

La introducción puede ir seguida de causar o permitir la expresión del ácido nucleico, p.e., cultivando células hospedadoras (que pueden incluir células ya transformadas aunque más probablemente las células serán descendientes de las células transformadas) bajo condiciones para la expresión del gen, de manera que se produce el péptido o polipéptido codificado. Si se expresa el péptido o polipéptido acoplado a un péptido señal líder adecuado, éste puede ser segregado de la célula al medio cultivo. Después de la producción mediante la expresión, se puede aislar y/o purificar de la célula hospedadora y/o del medio de cultivo, según pueda ser el caso, y usar subsiguientemente cuando se desee, p. e. en la formulación de una composición que puede incluir uno o más componentes adicionales, tal como una composición farmacéutica que incluye uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, vehículos o portadores (p. e. véase más abajo).

Un péptido o polipéptido de acuerdo con la presente invención se puede usar como inmunógeno o de otra manera en la obtención de anticuerpos de unión. Los anticuerpos son útiles en la purificación y otra manipulación de polipéptidos y péptidos, cribado diagnóstico y contextos terapéuticos, incluyendo la inmunización pasiva. Esto se discute adicionalmente más abajo.

Particularmente útiles en dichos contextos son el péptido Fp17 y las variantes y derivados del mismo de acuerdo con la presente invención, incluyendo fragmentos de Fp17 que incluyen los 10 aminoácidos del C-terminal, y variantes y derivados de los mismos.

De acuerdo con un aspecto más de la presente invención, se proporciona un procedimiento de obtención de una o más moléculas de anticuerpos que contienen un sitio de unión capaz de unirse a Fas, incluyendo el procedimiento poner en contacto una población de moléculas de anticuerpo y un péptido de acuerdo con la presente invención, y seleccionar una o más moléculas de anticuerpo de la población que es capaz de unirse a dicho péptido.

Las moléculas de anticuerpo seleccionadas pueden ser del isotipo IgG o IgM.

El procedimiento puede implicar poner en contacto la población de anticuerpos con una pluralidad de péptidos de acuerdo con la presente invención.

El péptido o péptidos se puede(n) administrar a un mamífero no humano para ponerlos en contacto con una población de moléculas de anticuerpo producidas por el sistema inmune del mamífero, a continuación se pueden obtener del mamífero una o más moléculas de anticuerpo capaces de unirse al péptido o péptidos, o se pueden obtener del mamífero las células que produzcan tales moléculas de anticuerpo. El mamífero puede ser sacrificado.

Si las células se obtienen del mamífero, las moléculas de anticuerpo se pueden obtener a partir de dichas células o descendientes de las mismas. Tales descendientes, en particular, pueden incluir células de hibridoma.

En lugar de o así como la inmunización de un animal, un procedimiento de obtención de anticuerpos según se ha descrito puede implicar exhibir la población de moléculas de anticuerpos en la superficie de partículas de bacteriófagos, cada partícula conteniendo el ácido nucleico codificante de la molécula de anticuerpo exhibida en su superficie.

El ácido nucleico se puede extraer de una partícula de bacteriófago que exhibe una molécula de anticuerpo capaz de unirse a un péptido o péptidos de interés, para la manipulación y/o uso en la producción de la molécula de anticuerpo codificada o un derivado de la misma (p. e. una proteína de fusión, una molécula que incluye una región constante u otros aminoácidos, y así sucesivamente). En lugar de usar un bacteriófago para la exhibición, se pueden usar ribosomas o polisomas, tal y como se describe, por ejemplo, en US-A-5643768, US-A-5658754, W95/11922.

Se pueden proporcionar las moléculas de anticuerpo en una forma aislada, ya sea de manera individual o en mezcla. Se puede proporcionar en una forma aislada una pluralidad de moléculas de anticuerpo. Los anticuerpos preferidos de acuerdo con la invención están aislados, en el sentido que están libres de contaminantes tales como anticuerpos capaces de unirse a otros polipéptidos y/o libres de componentes del suero. Se prefieren los anticuerpos monoclonales para algunos propósitos, aunque los anticuerpos policlonales se encuentran dentro del ámbito de la presente invención.

La presente invención también se extiende a procedimientos de obtención de anticuerpos hacia uno o más péptidos o polipéptidos de la invención. Tales procedimientos pueden incluir la administración de un péptido o polipéptido o una mezcla de péptidos o polipéptidos a un mamífero con el fin de incrementar una respuesta de anticuerpo. Para la producción de anticuerpos o células productoras de anticuerpos para que sean aisladas y usadas en cualquiera de una diversidad de aplicaciones, se puede incluir una etapa de sacrificio de un mamífero no humano. Tal mamífero no humano puede ser, por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, gato, cerdo, caballo, burro, cabra, oveja, camello, mono del viejo mundo (en inglés "old world monkey"), chimpancé u otro primate. Los anticuerpos se pueden obtener a partir de animales inmunizados usando cualquiera de las técnicas conocidas en el estado de la técnica, y cribar usando preferiblemente la unión de anticuerpo a un péptido o polipéptido de interés. Por ejemplo, se pueden usar las técnicas de transferencia Western o inmunoprecipitación (Armitage *et al*, Nature, 357: 80-82, 1992).

La producción de anticuerpos policlonales y monoclonales está bien establecida en el estado de la técnica. Los anticuerpos monoclonales se pueden someter a las técnicas de la tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas químicas que retienen la especificidad del anticuerpo original. Dichas técnicas pueden implicar la introducción del ADN codificante de la región variable de la inmunoglobulina, o las regiones de determinación de complementariedad (CDRs), de un anticuerpo a las regiones constantes o a las regiones constantes junto a regiones esqueleto de una inmunoglobulina diferente. Véase, por ejemplo, EP-A-184187, GB-A-2188638 o EP-A-239400. También se incluyen en la presente invención los anticuerpos humanizados en los que los CDR de una fuente no humana se injertan en regiones estructurales humanas, típicamente con la alteración de algunos de los residuos aminoácidos del esqueleto, para proporcionar anticuerpos que son menos inmunogénicos que los anticuerpos no humanos originales. Un hibridoma productor de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención se puede someter a mutación genética o a otros cambios, los cuales pueden o no alterar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en EP-A-0120694 y EP-A-0125023.

Como alternativa o complemento a la inmunización de un mamífero con un péptido, se puede obtener un anticuerpo específico para una proteína a partir de una librería producida de manera recombinante a partir de dominios variables de inmunoglobulinas expresadas, p. e. usando bacteriófagos que exhiben dominios de unión a inmunoglobulina funcionales en su superficie -por ejemplo véase WO92/01047- o ribosomas/polisomas según se ha indicado más arriba. La librería puede ser naïve, que se construye a partir de secuencias obtenidas a partir de un organismo que no ha sido inmunizado con otras proteínas (o fragmentos), o puede ser una construida usando secuencias obtenidas a partir de un organismo que ha sido expuesto al antígeno de interés.

Los anticuerpos se pueden modificar de diversas maneras: fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo moléculas sintéticas y moléculas cuya forma mimetiza la de un anticuerpo que le permite la unión a un antígeno o epítopo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos, capaces de unirse a un antígeno u otra pareja de unión son el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, Cl y CH1; el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un brazo de un anticuerpo; el fragmento dAb que consiste en un dominio VH; las regiones CDR aisladas y fragmentos F(ab)₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra. También se incluyen los fragmentos Fv de cadena sencilla.

Una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser del isotipo IgG o IgM, y esto puede ser preferido en algunas realizaciones.

Se pueden usar hibridomas capaces de producir anticuerpos con características de unión deseadas, también se pueden usar células hospedadoras, eucariotas o procariotas, que contienen el ácido nucleico que codifica anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpos) y capaces de expresarse. La invención también proporciona procedimientos de producción de anticuerpos que incluyen hacer crecer una célula capaz de producir el anticuerpo en condiciones en las que se produce el anticuerpo y se segrega, preferiblemente.

Las reactividades de los anticuerpos sobre una muestra (p. e. en un ensayo diagnóstico) se pueden determinar mediante cualquier medio adecuado. El marcaje con moléculas reporteras individuales es una posibilidad. Las moléculas reporteras pueden generar de manera directa o indirecta señales detectables y preferiblemente medibles. La unión de las moléculas reporteras puede ser de manera directa o indirecta, covalente, p.e. mediante un enlace peptídico o de manera no covalente, p. e. mediante un enlace peptídico o no covalente. La unión mediante un enlace peptídico puede ser el resultado de la expresión recombinante de una fusión de genes que codifica el anticuerpo y la molécula reportera.

Un modo favorecido es mediante unión covalente de cada anticuerpo con un fluorocromo individual, fósforo o un colorante láser con características de absorción o emisión espectralmente aisladas. Fluorocromos adecuados incluyen la fluoresceína, la rodamina, la ficoeritrina y el Rojo de Texas. Colorantes cromogénicos adecuados incluyen la diaminobenzidina. Otros reporteros incluyen partículas coloidales macromoleculares o material particulado tal como esferas de látex que son magnéticas o paramagnéticas, coloreadas, y agentes biológicamente o químicamente activos que pueden causar de manera directa o indirecta señales detectables que se observan visualmente, se detectan electrónicamente o se registran de otras maneras. Estas moléculas pueden ser enzimas que catalicen reacciones que desarrollen o cambien colores o causen cambios en propiedades eléctricas, por ejemplo. Pueden ser molecularmente excitables, de manera que las transiciones electrónicas entre estados de transición resultan en absorciones o emisiones espectrales características. Pueden incluir entidades químicas usadas junto con biosensores. Se pueden usar los sistemas de detección biotina/avidina o biotina/estreptavidina y la fosfatasa alcalina.

El modo de determinación de la unión no es una característica de la presente invención y aquellos expertos en la materia son capaces de escoger un modo adecuado de acuerdo con su preferencia y su conocimiento general.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención se pueden usar en el cribado de la presencia de un péptido o polipéptido, por ejemplo en una muestra de ensayo que contiene células o un lisado de células tal y como se ha discutido, y se puede usar en la purificación y/o aislamiento de un péptido o polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo después de la producción del polipéptido mediante la expresión del ácido nucleico codificante del mismo.

Los anticuerpos también son útiles en la profilaxis, mediante inmunización pasiva, y en terapia. Cuando los anticuerpos se han de administrar, puede ser preferible incluir una mezcla de anticuerpos, tal como anticuerpos con reactividad cruzada de manera colectiva con una pluralidad de péptidos de acuerdo con la presente invención.

Los anticuerpos que se unen a un péptido de acuerdo con la presente invención pueden usarse así mismo como inmunógenos en la producción de anticuerpos anti-idiotípicos. Estos pueden ser usados para mimetizar un epítipo peptídico en la provocación de una respuesta inmune en un individuo, p. e. con propósitos terapéuticos y/o profilácticos.

Se puede proporcionar un anticuerpo en un kit que puede incluir instrucciones para usar el anticuerpo, p.e., en la determinación de la presencia de una sustancia concreta en una muestra de ensayo. Se pueden incluir uno o más reactivos adicionales, tales como moléculas de etiquetado, soluciones tampón, eluyentes y así sucesivamente. Los reactivos se pueden proporcionar dentro de recipientes que los protegen del entorno externo, tal como un vial sellado.

Se pueden usar los anticuerpos contra péptidos (e. g. Fp17) de acuerdo con la presente invención en contextos diagnósticos, por ejemplo para determinar la presencia en un individuo, o una muestra extraída de un individuo, de células tales como células tumorales que expresan niveles elevados de Fas. Un procedimiento puede implicar el uso de un anticuerpo anti-Fp17 (por ejemplo), poner en contacto una muestra de ensayo con el anticuerpo y determinar la unión del anticuerpo a la muestra.

Como ya se ha indicado, se pueden formular en forma de composiciones péptidos, polipéptidos y anticuerpos de acuerdo con la presente invención, y son útiles en contextos farmacéuticos. Estas composiciones pueden incluir, además de una de las sustancias anteriores, un excipiente farmacéuticamente aceptable, un portador, un tampón, un estabilizante u otros materiales bien conocidos para los expertos en la materia. Tales materiales no deberían ser tóxicos y no deberían interferir en la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del portador u otro material depende de la ruta de administración, p. e. ruta oral, intravenosa, cutánea, subcutánea, nasal, intramuscular, intraperitoneal.

Las composiciones para la administración oral pueden estar en forma de pastilla, cápsula, polvo o líquido. Una pastilla puede incluir un portador sólido como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen generalmente un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites animal o vegetal, aceite mineral o aceite sintético. Se puede incluir una solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tal como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógeno y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Aquellos con experiencia relevante en la materia serán capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como la inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactada. Se pueden

Se puede unir un péptido a un portador adecuado. Se conocen en el estado de la técnica varios procedimientos de acoplamiento de péptidos a otras moléculas, que incluyen reactivos formadores de disulfuro (cuando el péptido incluye una cisteína o se añade una cisteína al péptido con este propósito), agentes de acoplamiento formadores de tioéteres y así sucesivamente. Los portadores incluyen la albúmina de suero humano (HSA), tétano toxoide, otras proteínas bastante largas que tienen vidas medias razonables en condiciones fisiológicas, y moléculas no proteináceas estables tales como polisacáridos y copolímeros de aminoácidos.

Se puede incluir un adyuvante, tal como alumbre, emulsiones aceite-en-agua o adyuvante de Freund (completo o incompleto). Se pueden usar citoquinas para potenciar la inmunogenicidad de la composición peptídica o polipeptídica.

Cuando este es un polipéptido, anticuerpo o péptido de acuerdo con la presente invención que se da a un individuo, la administración puede ser en una "cantidad profilácticamente efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" (según sea el caso, aunque la profilaxis se puede considerar terapia). Más preferiblemente el efecto es suficiente para prevenir en el individuo el sufrimiento de uno o más síntomas clínicos y/o reducir el dolor. Un efecto terapéutico es suficiente para potenciar la respuesta inmune de un individuo hacia una afección pre-existente, preferiblemente suficiente para antagonizar la afección, total o parcialmente. Más preferiblemente, el efecto es suficiente para mejorar uno o más síntomas clínicos, y/o curar la afección y/o reducir el dolor en un individuo. La cantidad actual administrada, y la velocidad y curso del tiempo de la administración, dependerá de la naturaleza y severidad de lo que sea tratado. La prescripción del tratamiento, p.e., decisiones sobre la dosificación, etc, se encuentra dentro de la responsabilidad de los médicos generales y otros doctores en medicina, y típicamente tiene en cuenta la afección a ser tratada, la condición del paciente individual, el sitio de liberación, el método de administración y otros factores conocidos por los médicos. Ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados más arriba se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980.

La invención proporciona métodos de tratamiento que incluyen la administración de un péptido, mezcla de péptidos, molécula de anticuerpo o mezcla de moléculas de anticuerpo, tal y como se ha proporcionado, composiciones farmacéuticas que incluyen un péptido, mezcla de péptidos, molécula de anticuerpo o mezcla de moléculas de anticuerpos, y uso de dicho péptido, mezcla de péptidos, molécula de anticuerpo o mezcla de moléculas de anticuerpo, en la fabricación de un medicamento para la administración de, por ejemplo en un método de preparación de un medicamento o una composición farmacéutica que incluye formular un miembro de unión específico con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Se pueden usar los ácidos nucleicos que codifican los péptidos o polipéptidos y los miméticos no peptídicos.

Se puede administrar una composición sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultáneamente o secuencialmente dependiendo de la condición a ser tratada y la disponibilidad de tratamientos alternativos o adicionales. En algunas realizaciones de la presente invención la molécula relevante se usa junto con anticuerpos anti-CD3 u otras moléculas de unión anti-CD3.

Un aspecto de la presente invención proporciona el uso de un péptido según se ha descrito en la fabricación de un medicamento para usar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. El tratamiento puede ser de una afección proliferativa, tal como un tumor, cáncer o soriasis, o una afección autoinmune, diabetes tipo I, esclerosis múltiple, cirrosis hepática y así sucesivamente. Se puede inducir o inhibir la apoptosis y/o la proliferación celular puede ser inhibida o estimulada.

Se puede dirigir un péptido o anticuerpo de acuerdo con la presente invención hacia una lesión, p.e., un tumor. Los anticuerpos difunden bastante bien a través de tejidos y se puede emplear la inyección en un sitio distal al de la lesión. Alternativamente, se puede utilizar la inyección directa en una lesión, p.e. un tumor, y ésta se puede utilizar para péptidos y otras moléculas. Los vectores víricos dirigidos se pueden usar para liberar el ácido nucleico que codifica un péptido, polipéptido o anticuerpo de acuerdo con la invención a un sitio para la expresión del producto codificado.

Aspectos y realizaciones adicionales de la presente invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia basados en la presente descripción. Realizaciones de y la base experimental para la presente invención será ahora descrita con más detalle con referencia a las siguientes figuras:

Figura 1 ilustra los resultados de los experimentos que demuestran que los sueros de donantes de sangre sanos contienen anticuerpos contra péptidos de Fas humanos. Se analizaron los especímenes de suero de 30 individuos. Los títulos de ELISA de los anticuerpos contra los péptidos de Fas reactivos Fp5, Fp11 y Fp17 se expresan como percentiles y valores medios mediante el uso del gráfico de caja y bigotes (en inglés "box (notched) and whisker plot") del programa de ordenador estadístico StatView+Graphics.

Figura 2 (A) muestra los resultados del ensayo TUNEL de apoptosis de células T leucémicas de Jurkat en ausencia (negro) y en presencia (blanco) de la proteína quimérica Fas-Fc que demuestra que los auto-anticuerpos peptídicos anti-Fas pueden inducir apoptosis mediada por Fas.

Figura 2 (B) muestra que los auto-anticuerpos peptídicos anti-Fas pueden inhibir la apoptosis inducida por anticuerpos anti-Fas de murino CH-11.

Figura 3 (A) muestra la proliferación de células T de blastos en respuesta a una estimulación con auto-anticuerpos peptídicos anti-Fas en ausencia (negro) o presencia (blanco) de mAb anti-CD3 inmovilizado. La barra gris representa el resultado del mAb anti-CD3 solo.

Figura 3 (B) muestra la expresión de FasL en la superficie de blastos de células T activadas con PHA en respuesta a la estimulación con auto-anticuerpos peptídicos anti-Fas en ausencia (negro) o presencia (blanco) de mAb anti-CD3 inmovilizado. La barra gris representa el resultado del mAb anti-CD3 solo.

Figura 4 (A) muestra la proliferación de PBMC no estimulado en respuesta a la estimulación con auto-anticuerpos peptídicos anti-Fas en ausencia (negro) o presencia (blanco) de mAb anti-CD3.

Figura 4 (B) muestra la apoptosis de PBMC no estimulado en respuesta a la estimulación con auto-anticuerpos peptídicos anti-Fas en ausencia (negra) o presencia (blanca) de un mAb anti-CD3.

Experimental

Síntesis de los péptidos Fas

La secuencia de aminoácidos derivada (a. a.1-179) de la proteína Fas (Itoh *et al.*, 1991) se usó para la síntesis en fase sólida múltiple simultánea (Houghten *et al.*, 1985) de péptidos de 20 aminoácidos de longitud (con un solapamiento de 10 residuos). Los péptidos demostraron una homogeneidad del 70-97%, según reveló la HPLC. Estos péptidos se usaron en un ELISA de 30 sueros humanos obtenidos a partir de donantes de sangre sanos y se confirmó la especificidad del ensayo mediante ELISA competitiva de péptidos según se ha descrito (Leonov *et al.*, 1994). Se seleccionaron los péptidos Fp5 (Gly₄₀-Val₅₉), Fp11 (Glu₁₀₀-Cys₁₁₉), y Fp17 (Trp₁₆₀-Val₁₇₉) por reaccionar de manera positiva con sueros humanos y se usaron en subsiguientes experimentos.

Purificación y caracterización de los auto-anticuerpos de Fas

Se prepararon columnas de afinidad mediante acoplamiento de 7 mg de Fp5, Fp11, y Fp17 a ECH-Sefarosa (Pharmacia Biotech, Sweden) con hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, según se describe en el protocolo de cromatografía de afinidad del fabricante. Después de la absorción durante toda la noche de los sueros humanos recogidos de los donantes de sangre sanos, se eluyeron los anticuerpos anti-péptido con KSCN 4 M, se concentraron, dializaron y esterilizaron mediante filtración a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 µm. Estos eluatos se analizaron mediante electroforesis y transferencia Western usando NOVEX™ NuPAGE Gel kit:10% Bis-Tris Geles/tampones MOPS SDS de acuerdo con los protocolos del fabricante (NOVEX, San Diego, CA). La IgG humana purificada y la IgM de ratón, y NOVEX Mark12™ Wide Range Protein Standard se usaron como referencia.

Las proteínas solubilizadas a partir de 10⁷ células T leucémicas de Jurkat se separaron y transfirieron a una membrana de nitrocelulosa soportada con un tamaño de poro de 0,45 µm (Bio-Rad Laboratories AB, Sweden) usando el sistema tampón de transferencia Western de NOVEX. Las membranas se sondearon mediante mAb CH-11 anti-Fas de clase IgM (Medical Biological Laboratory, Nagoya, Japan) y el clon 13 de mAb anti-Fas de clase IgG1 (Transduction Laboratories, Lexington, KY) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante; IgG humana como control (que no reacciona con péptidos Fas), eluye de las columnas de afinidad, se recogieron los sueros humanos antes y después de la inmuoadsorción en columna diluidos con 1/50 en PBS que contenía un 5% de leche desnatada en polvo, Tween-20 al 0,1% y agente antiespumoso al 0,001% (Sigma).

Los anticuerpos unidos se revelaron mediante el uso secuencial de fragmentos de F(ab)₂ de cadena ligera de anticuerpos de cabra antihumanos con cadena ligera conjugados con peroxidasa y un sistema de sustrato quimioluminiscente SuperSignal ULTRA (ambos procedentes de Pierce, Rockford, IL).

Detección de la apoptosis

Las células T leucémicas de Jurkat (2x10⁶/pocillo) se cultivaron en placas de 24 pocillos con RPMI 1640 suplementado con FCS al 10%, HEPES 10 mM, glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 50 µM, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, y 10 µg/ml de gentamicina (RPMI-HEPES) previamente al recubrimiento durante toda la noche con anticuerpos peptídicos anti-Fas aislados mediante cromatografía de afinidad. Las concentraciones de anticuerpo fueron anti-Fp5 (10 µg/ml), anti-Fp11 (10 µg/ml) y anti-Fp17 (40 µg/ml). Las células se recogieron después de 48 h de incubación, y el ADN fragmentado de las células apoptóticas se determinó mediante el Sistema de Detección de Apoptosis, Fluoresceína (Promega, Madison, WI) basado en el ensayo de "TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling" (TUNEL) y análisis FACS (CellQuest software, Becton Dickinson) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para los experimentos de inhibición de la apoptosis, el medio de cultivo de las células Jurkat se suplementó con 200 ng/ml de una quimera recombinante Fas-Fc (R & D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK). La inhibición de la apoptosis mediada por CH-11 se llevó a cabo según describieron Fadeel *et al.*, 1997. Los datos se presentan como el valor medio de cuatro experimentos independientes, y el error estándar de la media se indica mediante las barras de error.

Ensayo de proliferación

Las PBMC se estimularon con fitohemaglutinina (PHA) (10 µg/ml) (Pharmacia Biotech, Sweden) durante 48 horas. Se cultivaron a continuación aproximadamente 5×10^5 células estimuladas en una placa de 96 pocillos de fondo plano previamente revestidos durante toda la noche con anticuerpos anti-Fas peptídicos aislados mediante afinidad y anti-CD3 (OKT-3, 10 µg/ml) purificado en medio RPMI-HEPES. Después de 48 horas de incubación, se determinó la proliferación mediante el ensayo de Alamar Blue (Biosource International, USA.) y los resultados se expresaron como la diferencia en porcentaje en la reducción del indicador REDOX (fluorométrico/colorimétrico) entre los pocillos recubiertos con el anticuerpo y el control (sin anticuerpos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (AMS Biotechnology AB, Sweden).

La expresión de FasL en los blastos de células T estimuladas con PHA se detectó en el mismo punto mediante el uso del clon 33 de mAb IgG anti-FasL (Transduction Laboratories, Lexington, KY) y Ficoeritrina (PE) conjugada a fragmentos F(ab)₂ de IgG de cabra anti-ratón (Dako, Sweden). Los resultados se expresaron como el porcentaje de células positivas analizadas mediante FACS.

Las PBMC no estimuladas se aislaron mediante Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Sweden) y se usaron en ensayos de proliferación según se ha descrito más arriba para las células PHA estimuladas. Se cuantificó la apoptosis mediante el ensayo TUNEL y se expresó como la diferencia en porcentaje de fluorescencia entre los cultivos que contienen el anticuerpo y los que están libre de anticuerpos.

Modelado computacional de Fas

El modelo molecular para el dominio extracelular (Itoh *et al.*, 1991) del monómero Fas (aminoácidos His₃₈-Lys₁₄₉) se creó usando métodos de modelado de proteínas basados en el conocimiento según implementación del servidor de Swiss-Model (Peitsch *et al.*, 1995 y 1996). El modelo se basó en la estructura tridimensional del TNFR1 (entrada No. 1TNR en la base de datos de Brookhaven).

Resultados

Los anticuerpos anti-Fas de clase IgG están presentes en el suero de los donantes de sangre

Se sintetizaron los péptidos correspondientes a las partes extracelular y transmembrana del Fas humano (Itoh, *et al.*, 1991). Tres de estos péptidos, Fp5 (Gly₄₀-Val₅₉ con la secuencia GQFCHKPCPPGERKARDCTV), Fp11 (Glu₁₀₀-Cys₁₁₉ con la secuencia EINCTRTQNTKCRCKPNFFC) y Fp17 (Trp₁₆₀-Val₁₇₉ con la secuencia WLCLLLL PIPLIVWVKRKEV), fueron reactivos a los anticuerpos presentes en la sangre de los 30 donantes sanos (Figura 1). Los títulos de suero contra los tres péptidos diferentes fueron variables con los títulos medios más bajos detectados contra Fp17.

Estos anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de afinidad basada en la inmovilización de péptidos Fas. El análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de los eluatos demostró que la mayoría de proteínas purificadas tenía un peso molecular correspondiente a anticuerpos de la clase IgG. La especificidad de los anticuerpos aislados se estudió adicionalmente mediante transferencia Western con la proteína Fas completa, lo cual confirmó que los anticuerpos anti-Fas están presentes en el suero de sujetos de humanos sanos.

Experimentos similares se llevaron a cabo con preparaciones de inmunoglobulinas disponibles comercialmente derivadas de suero humano recogido enriquecido mediante inmunosorbencia de fracciones de inmunoglobulina (Gammagard-Baxter, Hyland, Glendale, CA USA).

Los resultados de los experimentos con suero humano y con las preparaciones de inmunoglobulina se muestran en la Tabla 1.

Se estableció la presencia tanto de auto-anticuerpos IgG como IgM.

Auto-anticuerpos para regiones Fas representados por Fp11 y Fp17 median en la apoptosis de las células leucémicas de Jurkat a través de Fas

La capacidad de mediar en la apoptosis y en la inhibición de la proliferación se determinaron usando anticuerpos inmovilizados a una superficie de plástico. Los anticuerpos humanos inmovilizados dirigidos a Fp11 y Fp17 indujeron la apoptosis en, respectivamente, el 49% y el 58% de las células leucémicas de Jurkat (Figura 2 (A)). El nivel de apoptosis inducido por Fp5 no difirió del pocillo control en el que los anticuerpos no estaban incluidos, 25% versus 18%.

A continuación, se analizó la capacidad de los auto-anticuerpos anti-Fas para afectar la proliferación celular en el sistema de células de Jurkat. Los anticuerpos humanos dirigidos a Fp17 inhibió la proliferación celular en un 40% cuando se comparó con el pocillo control; los niveles de inhibición de la proliferación fueron inferiores para anti-Fp5 y anti-Fp11, 8% y 10% respectivamente. El uso de la proteína A o el inmunosorbente de IgG anti-humano para inmovilizar anticuerpos anti-péptido dio resultados similares. De esta manera, los anticuerpos peptídicos anti-Fas de clase IgG presentes en sangre humana pueden inducir apoptosis e inhibir la proliferación en células T de Jurkat. Sin

estar vinculado a una teoría, este efecto biológico es probable que esté mediado a través de la reticulación de moléculas Fas sobre la superficie celular, un mecanismo sugerido por operar para anticuerpos monoclonales anti-Fas tanto de las subclase IgM como IgG, incluyendo IgG1 (Dhein *et al.*, 1992; Fadeel *et al.*, 1997).

5 Los dos conjuntos de experimentos de bloqueo se llevaron a cabo para establecer que la apoptosis inducida por auto-anticuerpos anti-Fas está mediada a través de Fas.

10 La proteína quimérica Fas-Fc, que consiste en la parte extracelular de Fas (aa 1-173) y la parte Fc de la IgG humana se mostró previamente que bloqueaba la apoptosis causada por la interacción Fas-FasL (Itoh *et al.*, 1991). La adición de esta proteína a las células de Jurkat redujo completamente la apoptosis inducida por los anticuerpos humanos a Fp5 y Fp11 (Figura 2 (A)). Para las células de Jurkat incubadas con anti-Fp17, la reducción de la apoptosis fue del 60%, aunque se puede indicar que la porción de Fas incluida en el fragmento de Fas-Fc es de 1-173 mientras que el empalme de Fp17 está entre Trp₁₆₀ y Val₁₇₉.

15 En el segundo grupo de experimentos se usaron los auto-anticuerpos anti-Fas purificados en una forma soluble para bloquear la apoptosis inducida por CH-11 monoclonal anti-Fas IgM. Los anticuerpos monoclonales anti-Fas IgG1 de murino demostraron previamente que inhibían el efecto de CH-11 (Fadeel *et al.*, 1997). Los auto-anticuerpos dirigidos a Fp-5 y Fp-11 redujeron la apoptosis mediada por CH-11 en más de un 50%, de esta manera a niveles similares a la apoptosis espontánea que tiene lugar en células no tratadas. Los auto-anticuerpos humanos para Fp-17 únicamente disminuían la apoptosis inducida por CH-11 en un 31% (Figura 2 (B)). Se ha mostrado previamente que Fp11 puede bloquear la actividad apoptótica de CH-11 (Fadeel *et al.*, 1995). De esta manera, la reducción de la apoptosis indicada una vez se incubó con anti-Fp11 se deba probablemente a un bloqueo específico del sitio de Fas reconocido por CH-11. La unión de anticuerpos a Fp5 y Fp17 de Fas, por otro lado, puede dificultar estéricamente la unión de CH-11.

25 Juntos, estos datos demuestran que la apoptosis de células T leucémicas de Jurkat inducida por auto-anticuerpos anti-Fas humanos está mediada a través de una ruta dependiente de Fas.

La co-estimulación con anticuerpos anti-CD3 y auto-anticuerpos anti-Fas afecta a la proliferación de acuerdo con el estado de activación celular

30 A continuación, se investigó la capacidad de los auto-anticuerpos peptídicos anti-Fas humanos de afectar la proliferación de células T primarias. La reticulación del receptor CD3/TCR es conocida por potenciar un procedimiento dependiente de Fas denominado muerte celular inducida por activación (AICD) y de proliferación celular reducida (Varadhachary *et al.*, 1997; Dhein *et al.*, 1995; Brunner, *et al.*, 1997; Ju *et al.*, 1997).

35 Los blastos de células T estimulados con PHA se incubaron con anticuerpos anti-Fas aislados junto con anticuerpos dirigidos a CD3. Los auto-anticuerpos no tuvieron ningún efecto cuando se inmovilizaron solos (Figura 3 (A)). Sin embargo, la co-estimulación de células con anticuerpos anti-Fas y anticuerpos anti-CD3 inmovilizados redujo significativamente la proliferación (reducción del 21-42%) en comparación con anti-CD3 solo (reducción del 12%). Los auto-anticuerpos anti-Fas pueden potenciar, por lo tanto, el efecto antiproliferativo mediado por CD3.

40 Curiosamente, se encontró que la reducción de la proliferación fue paralela al incremento de la expresión de FasL (Figura 3 (B)). Los datos sugieren que la co-estimulación del complejo CD3/TCR y Fas mediante auto-anticuerpos anti-CD3 y anti-Fas humanos debería disminuir la proliferación de los blastos de células T activados. Un posible mediador de este efecto puede ser FasL, como se demuestra mediante la sobre-regulación de esta molécula una vez se reticula Fas con CD3.

45 El compromiso de CD3/TCR y Fas en la proliferación celular y en la apoptosis se investigó adicionalmente en experimentos con células mononucleares de sangre periférica no estimuladas (PBMC). En este sistema los auto-anticuerpos anti-Fas humanos inmovilizados solos o en combinación aumentó la proliferación de anti-CD3 entre un 20 y un 40% (Figura 4 (A)). Este efecto se puede deber a la reducción de la apoptosis espontánea. De hecho, la co-estimulación con anticuerpo anti-CD3 y auto-anticuerpos anti-Fas humanos indujo la reducción de la apoptosis espontánea del 15 al 55% para los tres anticuerpos anti-peptídicos (Figura 4 (B)). Estos datos se correlacionan con las observaciones previas de que la co-estimulación con CD3 y Fas usando anticuerpos monoclonales de murino inducía un incremento de la proliferación de células T aisladas (Alderson *et al.*, 1993; Alderson *et al.*, 1994).

55 De esta manera, los auto-anticuerpos anti-Fas humanos pueden modular el efecto biológico de la ligación CD3/TCR en PBMC no estimuladas a través de un mecanismo que incluye la reducción de la apoptosis.

Sitios de unión a Fas para los auto-anticuerpos y Fas L

60 Para aumentar el conocimiento sobre cómo los anticuerpos anti-Fas pueden inducir señales de activación/apoptóticas a través de Fas, se creó un modelo molecular de esta proteína en la que los sitios de unión a anticuerpo se podían visualizar en relación a las superficies de interacción de FasL. La parte extracelular de la molécula de Fas tiene una homología de secuencia diferente de la del receptor 1 de TNF (TNFR1; Nagata and Golstein, 1995). En base a la estructura tridimensional de TNFR1, se creó un modelo molecular de Fas (Peitsch, 1995 and 1996).

65 El modelo muestra que la unión de anticuerpo a las regiones Fas representado por Fp5 (Gly₄₀-Val₅₉) y Fp11 (Glu₁₀₀-Cys₁₀₉) puede interferir estéricamente en la unión de FasL a Arg₈₆ y Arg₈₇, aminoácidos que resultan críticos en la

unión Fas-FasL (Starling, *et al.*, 1997). Esto puede ser relevante para los aminoácidos Lys₈₄, Leu₉₀, Glu₉₃ y His₁₂₆, de los que se cree que son importantes para las interacciones Fas-FasL (Starling, *et al.*, 1997). De esta manera, la localización de estas dos regiones de unión a anticuerpo de la molécula de Fas puede explicar el efecto biológico de los auto-anticuerpos anti-Fas sobre las células mediante interferencia en la unión de FasL o mediante inducción directa de señales apoptóticas o proliferativas. En este contexto es importante indicar que la actividad apoptótica de mAb de Fas prototípicos anti-humanos (clon CH-11) depende de la unión a la región representada por Fp11, indicando de esta manera que este segmento presenta una propiedad antigénica pronunciada (Fadeel *et al.*, 1995). Por supuesto, la ejecución de los aspectos de la presente invención no requiere el conocimiento de cómo funciona la invención y el ámbito de la invención no está limitada a cualquier teoría concreta.

La región de Fas representada por Fp17 (Trp₁₆₀-Val₁₇₉) se predice que es un dominio transmembrana y podría no estar incluida en este modelo. El reconocimiento de este dominio de Fas por los auto-anticuerpos que median el efecto biológico indica que parte de este dominio es probable que se exponga en la superficie celular. Los títulos contra Fp17 eran los más bajos entre los tres péptidos. Sin embargo, el efecto de la inducción de apoptosis de estos anticuerpos anti-Fp17 fue evidente y excedía la de anti-Fp5 y anti-Fp11 cuando se usaron a la misma concentración. Fp17 no contiene residuos implicados en el contacto con FasL. Los resultados proporcionan una indicación de que la unión de auto-anticuerpos a esta región de Fp17 puede transducir una señal de manera eficiente a la maquinaria de muerte celular intracelular.

Discusión

El trabajo experimental descrito anteriormente demuestra la existencia de auto-anticuerpos humanos biológicamente activos contra Fas, una de las moléculas clave en el control de la expansión/delección de linfocitos *in vivo* (Lynch *et al.*, 1995). Los auto-anticuerpos anti-Fas estaban presentes en el suero de la mayoría de individuos sanos.

El trabajo también demuestra que los auto-anticuerpos anti-Fas humanos pueden potenciar las respuestas celulares a través del receptor de Fas *in vitro*. Esto proporciona una indicación de que además de los modos de regulación ya descritos de señales mediadas por Fas (Suda *et al.*, 1993; Irmeler *et al.*, 1997), los auto-anticuerpos constituyen un nivel adicional de modulación de las funciones mediadas por Fas *in vivo*.

Los hallazgos previos paralelos en murino con anticuerpos monoclonales (Owen-Schaub *et al.*, 1992; Klas *et al.*, 1993; Alderson *et al.*, 1993 and 1994), los auto-anticuerpos humanos contra Fas se pueden usar para proporcionar tanto inducción a apoptosis como efectos estimuladores dependiendo del estado de activación de las células. La conversión de señales mediadas por Fas desde la activación celular hasta la apoptosis puede representar un mecanismo seguro mediante el cual el sistema inmune elimine células transformadas del hospedador (Alderson *et al.*, 1994). Considerando que los anticuerpos pueden difundir fácilmente a los tejidos, las funciones hipotéticas de los auto-anticuerpos anti-Fas se puede encontrar en este balance de activación celular y apoptosis, en la finalización del inicio de las respuestas inmunes a través de AICD (Kabelitz *et al.*, 1993) y en el mantenimiento de la tolerancia periférica (Fisher *et al.*, 1995; Rieux-Laucat *et al.*, 1995).

La actividad de los auto-anticuerpos anti-Fas tiene repercusiones biológicas potenciales en enfermedades que están relacionadas con la disregulación de Fas, p. e. daño hepático (Galle *et al.*, 1995), diabetes mellitus insulino-dependiente (Stassi *et al.*, 1997) y esclerosis múltiple (Dowling *et al.*, 1996; D'Souza *et al.*, 1996). Los niveles aumentados de Fas y FasL en estas enfermedades puede ser análogo a cambios en los niveles de auto-anticuerpos de Fas.

Los auto-anticuerpos a las tres regiones de Fas presentan una actividad biológica diferente. Los auto-anticuerpos anti-Fp17 son eficaces en la mediación de la apoptosis de las células de Jurkat mientras que se encontró que los anticuerpos anti-Fp5 eran inductores pobres de la apoptosis pero que pueden bloquear de manera eficiente la actividad apoptótica de mAb CH-11 anti-Fas. De esta manera, la unión de auto-anticuerpos a regiones de Fas que pueden interferir espacialmente con el ligando (Fp5) o transducir de manera directa señales apoptóticas (Fp17) se pueden aprovechar en escenarios terapéuticos dirigidos a la inducción o reducción de la apoptosis mediada por Fas.

La medición de la distribución y títulos de anticuerpos dirigidos a péptidos de Fas de acuerdo con la presente invención proporciona una idea adicional en la disregulación de Fas y la implicación en la patogénesis de las enfermedades. Dicha distribución y títulos se miden en sueros obtenidos a partir de pacientes con esclerosis múltiple, diabetes tipo I e infección por VIH, usando técnicas disponibles para aquellos expertos en la materia.

Se identifican los fragmentos y variantes de péptidos de la invención que retienen la capacidad de inhibir o inducir la apoptosis, junto con los epítomos mínimos para la unión de anticuerpos anti-Fas, usando la sustitución sistemática en los péptidos de cada aminoácido individual, por ejemplo usando la exploración de alanina. La reactividad de los sueros humanos se evalúa con un ensayo inmunosorbente unido a enzima para definir los aminoácidos importantes o necesarios para la unión.

El carcinoma de colon, hepatocelular y otros carcinomas en los que la expresión de Fas se encuentra infra-regulada (Walker *et al.* (1997) *J. Immunology* 158: 4521-4524) se tratan con péptidos de la invención, en particular con Fp17, los aminoácidos C-terminales de Fp17, y los fragmentos y variantes de los mismos. La parte de Fas que incluye Fp17, incluye el péptido de empalme de membrana y se puede usar para proporcionar una señalización dirección cadena debajo de las células para que inicien apoptosis.

Los anticuerpos contra Fp17 se inyectan en animales para inducir apoptosis a tumores animales.

Los modelos animales representativos de (i) esclerosis múltiple y (ii) diabetes tipo I se tratan con un péptido o anticuerpo de la invención con el fin de bloquear el auto-anticuerpo anti-Fas que estimula la apoptosis en los órganos enfermos.

Referencias

- Alderson, et al. (1993).** *J. Exp. Med.* 178 (6), 2231-5.
- Alderson, et al. (1994).** *Int. Immunol.* 6 (11), 1799-806.
- Brunner, et al. (1995).** *Nature* 373,441-44.
- Dhein, et al. (1992).** *J Immunol* 149 (10), 3166-73
- Dhein, et al. (1995).** *Nature* 373,438-41.
- Dowling, et al. (1996).** *J Exp Med* 184 (4), 1513-8.
- D'Souza, et al. (1996).** *J Exp Med* 184 (6), 2361-70.
- Ellis and Atkinson, (1996).** *Nature Medicine* 2 (2), 14853.
- Estaquier, et al. (1995).** *J. Exp. Med.* 182 (6), 1759-67.
- Fadeel, et al. (1995).** *Int. Immunol* 12 (7), 1967-1975.
- Fadeel, et al. (1997).** *Int. Immunol* 9 (2), 201-9.
- Fisher, et al. (1995).** *Cell* 81,935-46.
- Galle, et al. (1995).** *J. Exp. Med.* 182 (5), 1223-30.
- Houghten, R. A. (1985).** *PNAS* 82 (15), 5131-5.
- Irmmler, et al. (1977).** *Nature* 388,190-5.
- Itoh, et al. (1991).** *Cell*, 66 (2), 233-43.
- Ju, et al. (1995).** *Nature* 373,444-48.
- Kabelitz, et al. (1993).** *Immunol. Today* 14 (7), 338-9.
- Katsikis, et al. (1995).** *J Exp. Med.* 181 (6), 2029-36.
- Klas, et al. (1993).** *Int. Immunol.* 5 (6), 625-30.
- Leonov, et al. (1994).** *J. Gen. Virol.* 75,1353-9.
- Lutowski, et al. (1995).** *J Neuroimmunol* 57 (1-2), 9-15.
- Lynch, et al. (1995).** *Immunol Today* 16 (12), 569-74.
- Mapara, et al. (1993)** *Eur. J. Immunol.* 23 (3), 702-8.
- Nagata and Golstein (1995).** *Science* 267,1449-56.
- Ogasawara, et al. (1993).** *Nature* 364,806-9.
- Owen-Schaub, et al. (1992).** *Cell. Immunol.* 140(1), 197 205.
- Peitsch, M. C. (1995).** *Bio/Technology*, 13,658-660.
- Peitsch, M. C. (1996).** *Biochem Soc Trans*, 24,274-9.
- Prabhakar, et al. (1997).** *Immunol Today* 18 (9), 437-42.

Rieux-Laucat, et al. (1995). *Science* 268,1347-9.

Rose and Bona (1993). *Immunol Today* 14 (9), 426-30.

Silvestris, et al. (1996). *J. Exp. Med.* 184 (6), 2287-300.

Smith, et al. (1994). *Cell*, 76 (6), 959-62.

Song, et al. (1996). *Immunol Today*, 17 (5), 232-38.

Starling, et al. (1977). *J. Exp. Med.* 185 (8), 1487-92.

Stassi, et al. (1997). *J Exp Med* 186 (8), 1193-200.

Suda, et al. (1993). *Cell* 75 (6), 1169-78.

Trauth, et al. (1989). *Science* 245,301-5.

Varadhachary, et al. (1997). *P. N. A. S. Usa* 94 (11), 577883.

Vassilev, et al. (1996). *Scand J Immunol* 44 (5), 535-9.

Watanabe-Fukunaga, et al. (1992). *Nature* 356,314-7.

Weis, et al. (1995). *Experimental Cell Research* 219 (2), 699-708.

Yonehara, et al. (1989). *J. Exp. Med.* 169 (5), 1747-56.

TABLA 1

Reactividad del suero humano y de las preparaciones de inmunoglobulina hacia péptidos Fas en ELISA

Péptido Número	Suero Humano	Preparaciones Inmunoglobulina (Gammagard)
Fp1	-	-
Fp2	-	-
Fp3	-	-
Fp4	-	-
Fp5	++	+
Fp6	-	-
Fp7	-	-
Fp8	-	+++
Fp9	-	++
Fp10	-	-
Fp11	+++	+++
Fp12	++	++
Fp13	-	-
Fp14	-	-
Fp15	-	-
Fp16	-	+
Fp17	+++	+
Fp18	no hecho	+++
+ = <0.5 O.D.490nm; ++ = <1.0 O.D.; +++ > 1.0 O.D.		

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 5643768 A [0035]
- US 5658754 A [0035]
- WO 9511922 A [0035]
- EP 184187 A [0038]
- GB 2188638 A [0038]
- EP 239400 A [0038]
- EP 0120694 A [0038]
- EP 0125023 A [0038]
- WO 9201047 A [0039]
- EP 9904105 W [0101]
- GB 9813194 A [0101]
- GB 9905793 A [0101]

Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- TACHIBAN *et al.* *Cancer Research*, 1995, vol. 55, 5528-5530 [0005]
- DE MARIA; TESTI. *Immunology Today Immunology Today*, 1998, vol. 19, 121-125 [0005]
- ALTSCHUL *et al.* *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-10 [0012]
- ATHERTON; SHEPPARD. *Solid Phase Peptide Synthesis, a Practical Approach*. IRL Press, 1989 [0019]
- *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0022]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. *John Wiley & Sons*, 1992 [0022]
- ARMITAGE *et al.* *Nature*, 1992, vol. 357, 80-82 [0037]
- WALKER *et al.* *J. Immunology*, 1997, vol. 158, 4521-4524 [0097]
- ALDERSON *et al.* *J. Exp. Med.*, 1993, vol. 178 (6), 2231-5 [0100]
- ALDERSON *et al.* *Int. Immunol.*, 1994, vol. 6 (11), 1799-806 [0100]
- BRUNNER *et al.* *Nature*, 1995, vol. 373, 441-44 [0100]
- DHEIN *et al.* *J Immunol*, 1992, vol. 149 (10), 3166-73 [0100]
- DHEIN *et al.* *Nature*, 1995, vol. 373, 438-41 [0100]
- DOWLING *et al.* *J Exp Med*, 1996, vol. 184 (4), 1513-8 [0100]
- D'SOUZA *et al.* *J Exp Med*, 1996, vol. 184 (6), 2361-70 [0100]
- ELLIS; ATKINSON. *Nature Medicine*, 1996, vol. 2 (2), 148-53 [0100]
- ESTAQUIER *et al.* *J. Exp. Med.*, 1995, vol. 182 (6), 1759-67 [0100]

ES 2 306 515 T3

- **FADEEL** *et al. Int. Immunol*, 1995, vol. 12 (7), 1967-1975 [0100]
- **FADEEL** *et al. Int. Immunol*, 1997, vol. 9 (2), 201-9 [0100]
- 5 • **FISHER** *et al. Cell*, 1995, vol. 81, 935-46 [0100]
- **GALLE** *et al. J. Exp. Med.*, 1995, vol. 182 (5), 1223-30 [0100]
- **HOUGHTEN**, R.A. *PNAS*, 1985, vol. 82 (15), 5131-5 [0100]
- 10 • **IRMLER** *et al. Nature*, 1977, vol. 388, 190-5 [0100]
- **ITOH** *et al. Cell*, 1991, vol. 66 (2), 233-43 [0100]
- 15 • **JU** *et al. Nature*, 1995, vol. 373, 444-48 [0100]
- **KABELITZ** *et al. Immunol. Today*, 1993, vol. 14 (7), 338-9 [0100]
- **KATSIKIS** *et al. J Exp. Med.*, 1995, vol. 181 (6), 2029-36 [0100]
- 20 • **KLAS** *et al. Int. Immunol.*, 1993, vol. 5 (6), 625-30 [0100]
- **LEONOV** *et al. J. Gen. Virol.*, 1994, vol. 75, 1353-9 [0100]
- 25 • **LUTOMSKI** *et al. J Neuroimmunol*, 1995, vol. 57 (1-2), 9-15 [0100]
- **LYNCH** *et al. Immunol Today*, 1995, vol. 16 (12), 569-74 [0100]
- **MAPARA** *et al. Eur. J. Immunol.*, 1993, vol. 23 (3), 702-8 [0100]
- 30 • **NAGATA; GOLSTEIN**. *Science*, 1995, vol. 267, 1449-56 [0100]
- **OGASAWARA** *et al. Nature*, 1993, vol. 364, 806-9 [0100]
- 35 • **OWEN-SCHAUB** *et al. Cell. Immunol.*, 1992, vol. 140 (1), 197-205 [0100]
- **PEITSCH**, M.C. *Bio/Technology*, 1995, vol. 13, 658-660 [0100]
- **PEITSCH**, M.C. *Biochem Soc Trans*, 1996, vol. 24, 274-9 [0100]
- 40 • **PRABHAKAR** *et al. Immunol Today*, 1997, vol. 18(9), 437-42 [0100]
- **RIEUX-LAUCAT** *et al. Science*, 1995, vol. 268, 1347-9 [0100]
- 45 • **ROSE; BONA**. *Immunol Today*, 1993, vol. 14 (9), 426-30 [0100]
- **SILVESTRI** *et al. J. Exp. Med.*, 1996, vol. 184 (6), 2287-300 [0100]
- **SMITH** *et al. Cell*, 1994, vol. 76 (6), 959-62 [0100]
- 50 • **SONG** *et al. Immunol Today*, 1996, vol. 17 (5), 232-38 [0100]
- **STARLING** *et al. J. Exp. Med.*, 1977, vol. 185 (8), 1487-92 [0100]
- 55 • **STASSI** *et al. J Exp Med*, 1997, vol. 186 (8), 1193-200 [0100]
- **SUDA** *et al. Cell*, 1993, vol. 75 (6), 1169-78 [0100]
- **TRAUTH** *et al. Science*, 1989, vol. 245, 301-5 [0100]
- 60 • **VARADHACHARY** *et al. P.N.A.S. Usa*, 1997, vol. 94 (11), 5778-83 [0100]
- **VASSILEV** *et al. Scand J Immunol*, 1996, vol. 44 (5), 535-9 [0100]
- **WATANABE-FUKUNAGA** *et al. Nature*, 1992, vol. 356, 314-7 [0100]
- 65 • **WEIS** *et al. Experimental Cell Research*, 1995, vol. 219 (2), 699-708 [0100]
- **YONEHARA** *et al. J. Exp. Med.*, 1989, vol. 169 (5), 1747-56 [0100]

REIVINDICACIONES

1. Péptido de 10-20 aminoácidos de longitud que es un fragmento de Fas humano y un inmunógeno que provoca anticuerpos en suero humano, en donde dicho fragmento comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) GQFCHKPCPPGERKARDCTV,
- (ii) QEGKEYTDKAHFSSKCRRRCR,
- (iii) HFSSKCRRRCRLCDEGHGLEV,
- (iv) EINCTRTQNTKCRCKPNFFC,
- (v) KCRCKPNFFCNSTVCEHCDP,
- (vi) WLCLLLLPIPLIVWVKRKEV,
- (vii) LIVWVKRKEVQKTCRKHRKE, y
- (viii) QKTCRKHRKE, o

en donde dicho fragmento modula la apoptosis y/o la proliferación celular y comprende una secuencia aminoacídica inmunogénica que se encuentra dentro de la secuencia de aminoácidos seleccionada de dicho grupo para usar en un método de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia.

2. Péptido de acuerdo con la reivindicación 1 fusionado a una secuencia aminoacídica heteróloga diferente de Fas.

3. Mezcla de una pluralidad de péptidos diferentes de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2.

4. Composición que comprende un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 o una mezcla de péptidos de acuerdo con la reivindicación 3, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5. Uso de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, o una mezcla de péptidos de acuerdo con la reivindicación 3, o una composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un tumor, cáncer o una enfermedad autoinmune en un humano.

6. Procedimiento de obtención de una o más moléculas de anticuerpo que contienen un sitio de unión que se une a Fas, comprendiendo el procedimiento

poner en contacto una población de moléculas de anticuerpo humanos y un péptido de 10-20 aminoácidos de longitud que es un fragmento de Fas humano, comprendiendo el procedimiento una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) GQFCHKPCPPGERKARDCTV,
- (ii) QEGKEYTDKAHFSSKCRRRCR,
- (iii) HFSSKCRRRCRLCDEGHGLEV,
- (iv) EINCTRTQNTKCRCKPNFFC,
- (v) KCRCKPNFFCNSTVCEHCDP,
- (vi) WLCLLLLPIPLIVWVKRKEV,
- (vii) LIVWVKRKEVQKTCRKHRKE, y
- (viii) QKTCRKHRKE,

o comprende una secuencia aminoacídica inmunogénica que se encuentra dentro de una secuencia de aminoácidos seleccionada de dicho grupo; y

seleccionar una o más moléculas de anticuerpo humano capaces de unirse a dicho péptido.

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además proporcionar células hospedadoras *in vitro* que producen las moléculas de anticuerpo humanas seleccionadas capaces de unirse a dicho péptido.

ES 2 306 515 T3

8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 o reivindicación 7, en donde se obtiene una molécula de anticuerpo dirigida a dicho péptido, o una mezcla de moléculas de anticuerpo dirigidos hacia uno o más de dichos péptidos, y se formula en una composición que comprende al menos un componente adicional.

- 5 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha composición comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

15

20

25

30

35

40

45

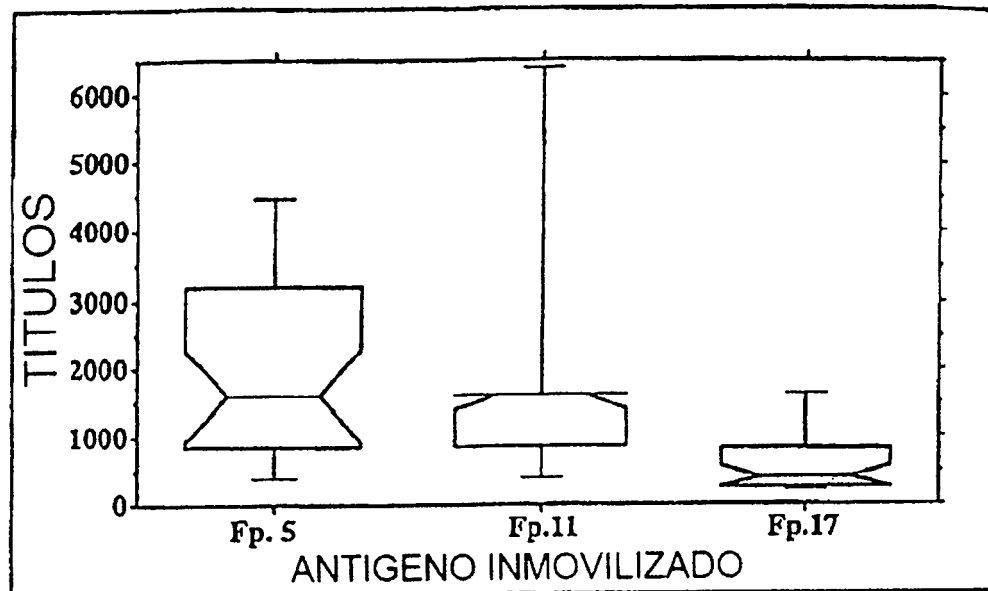
50

55

60

65

FIG. 1



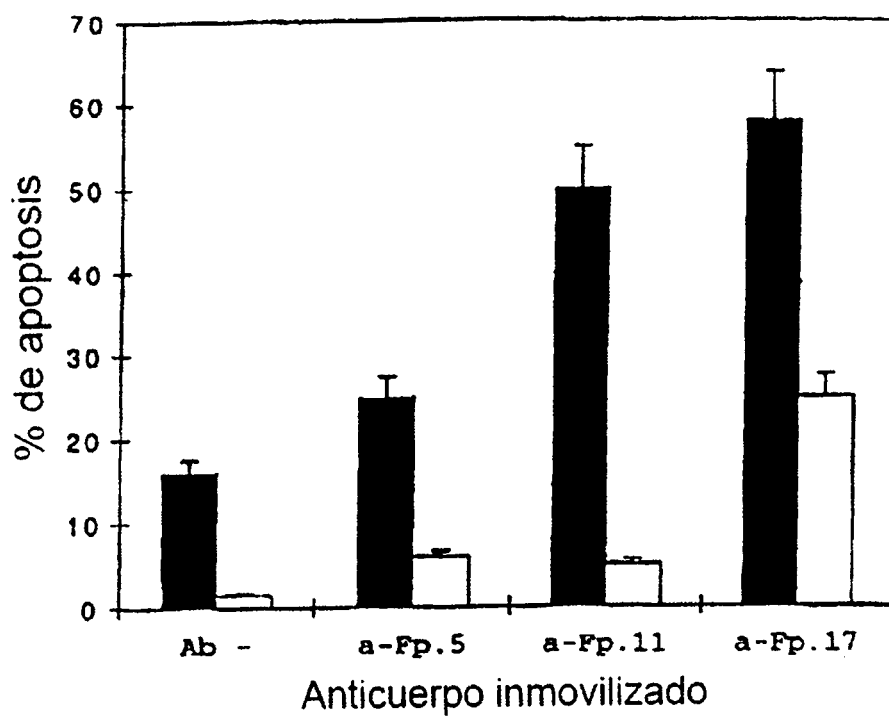


Fig. 2a

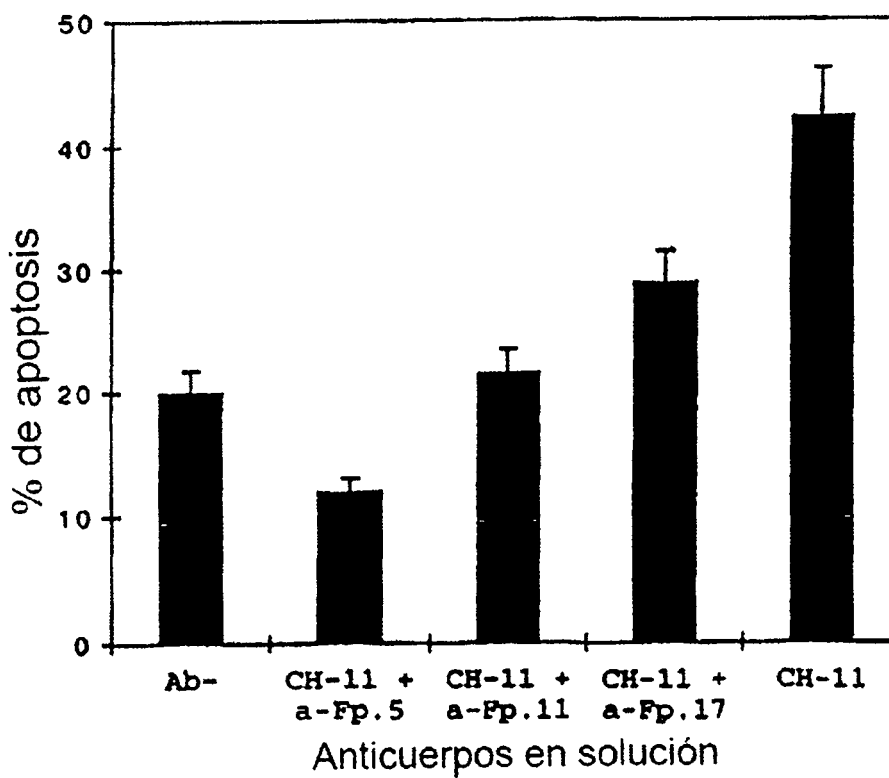


Fig. 2b

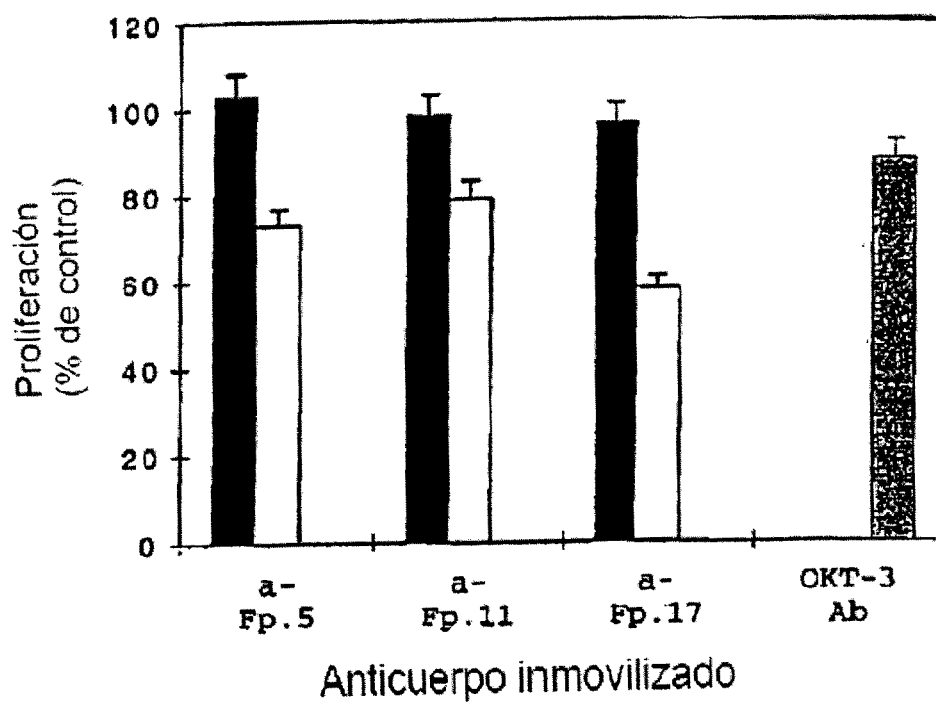


Fig. 3a

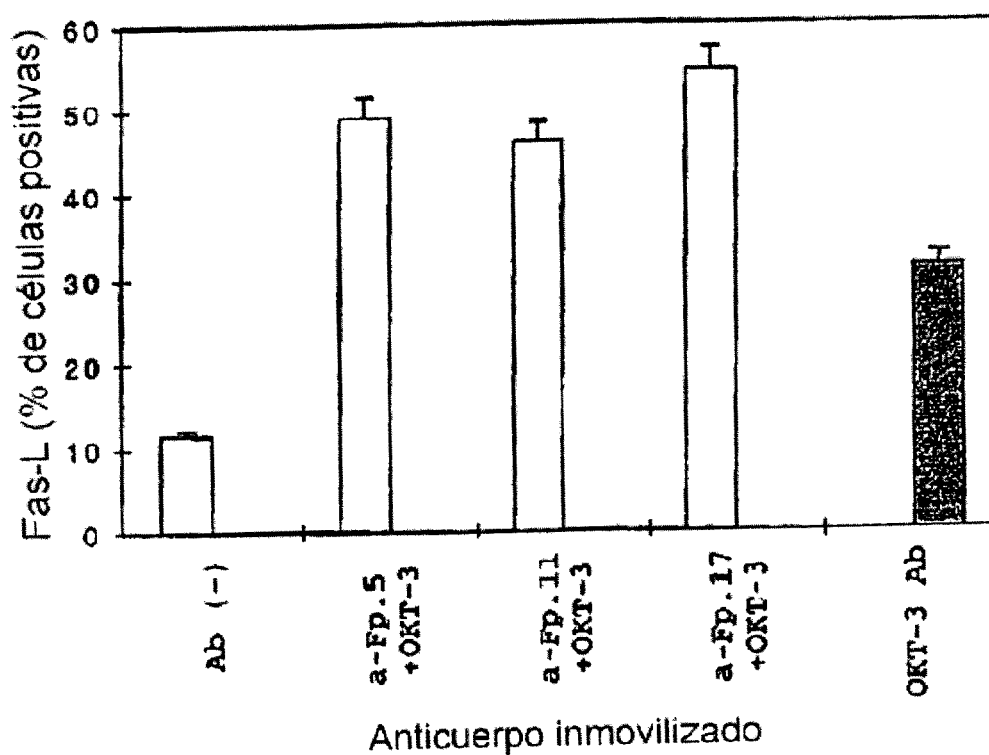


Fig. 3b

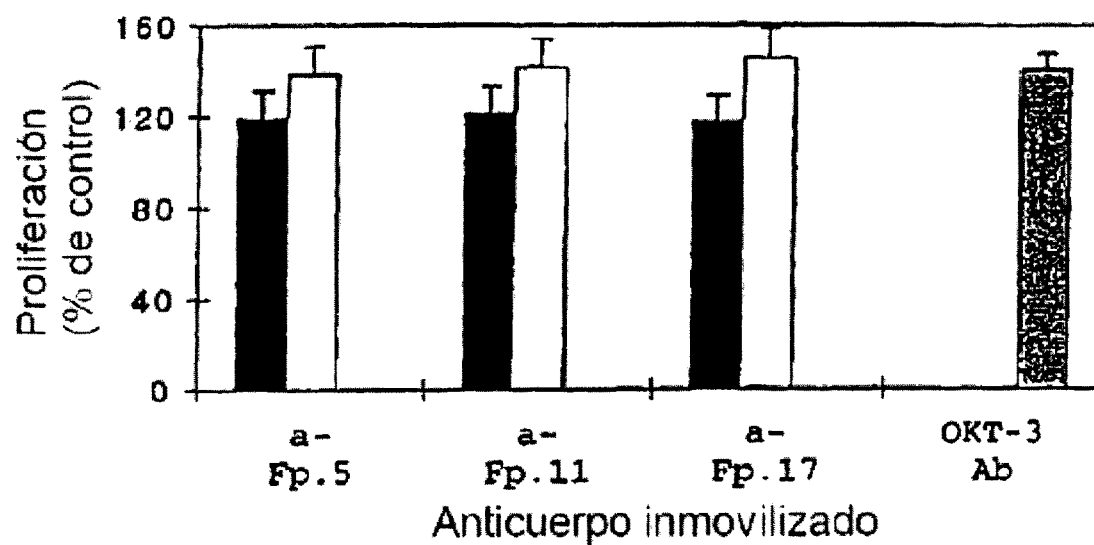


Fig. 4a

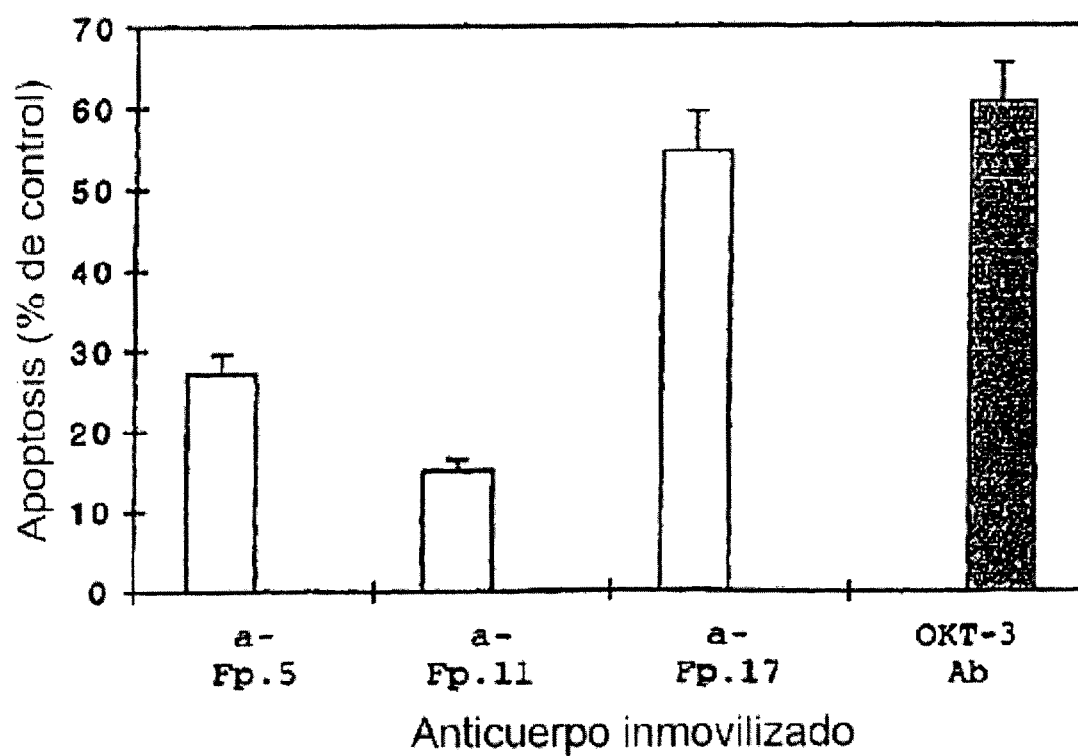


Fig. 4b

ES 2 306 515 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Karolinska Innovations AB Chiodi, Francesca

5 <120> Péptidos de Fas y anticuerpos para modular la apoptosis

<130> SMW/FP5781810

10 <140> PCT/EP99/04105
<141> 1999-06-15

<150> GB 9813194.9

15 <151> 1998-06-18

<150> GB 9905793.7
<151> 1999-03-12

20 <160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

25 <210> 1
<211> 20
<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia sintética

35 <400> 1

40 **Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg**
 1 5 10 15

45 **Asp Cys Thr Val**
 20

<210> 2
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia sintética

<400> 2

60 **Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His Phe Ser Ser Lys Cys**
 1 5 10 15

65 **Arg Arg Cys Arg**
 20

ES 2 306 515 T3

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia sintética

<400> 3

His Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His

1

5

10

15

Gly Leu Glu Val

20

 $\langle 210 \rangle_4$ $\langle 211 \rangle$ 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia sintética

<400> 4

Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg Cys Lys Pro

1

5

10

15

Asn Phe Phe Cys

20

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia sintética

<400> 5

Lys Cys Arg Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu

1

5

10

15

His Cys Asp Pro

20

<210> 6

<211> 20

ES 2 306 515 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia sintética

<400> 6

10

Trp Leu Cys Leu Leu Leu Leu Pro Ile Pro Leu Ile Val Trp Val Lys

1

5

10

15

15

Arg Lys Glu Val

20

<210> 7

20 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia sintética

<400> 7

30

Leu Ile Val Trp Val Lys Arg Lys Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg Lys

1

5

10

15

35

His Arg Lys Glu

20

40 <210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia sintética

50 <400> 8

Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Asn Leu Gly Trp Leu Cys Leu Leu Leu

1

5

10

15

55

Leu Pro Ile Pro

20

60

<210> 9

<211> 10

65 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 306 515 T3

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia sintética

$$5 \quad \langle 400 \rangle \quad 9$$

Gln Lys Thr Cys Arg Lys His Arg Lys Glu

10	1	5	10
----	----------	----------	-----------

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65