



PCT
 ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
 Oficina Internacional
 SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
 EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

<p>(51) Clasificación Internacional de Patentes⁵ : C07K 7/08, 7/10, 15/00 A61K 37/02, 39/00, G01N 33/569</p>	A1	<p>(11) Número de publicación internacional: WO 92/12171</p> <p>(43) Fecha de publicación internacional: 23 de julio de 1992 (23.07.92)</p>
<p>(21) Solicitud internacional: PCT/ES91/00087</p> <p>(22) Fecha de presentación internacional: 18 de diciembre de 1991 (18.12.91)</p> <p>(30) Datos relativos a la prioridad: 9028097.5 27 de diciembre de 1990 GB (27.12.90)</p> <p>(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE NAVARRA, S.A. [ES/ES]; Avda. de Pio XII, 53, E-31008 Pamplona (ES).</p> <p>(72) Inventores; e</p> <p>(75) Inventores/solicitantes (sólo US) : SANTIAGO, Calvo, Esteban [ES/ES]; SUBIRA BADOS, María, Luisa [ES/ES]; BRUGAROLAS MASLLORENS, Antonio [ES/ES]; LOPEZ MORATALLA, Natalia [ES/ES]; LOPEZ ZABALZA, María, Jesús [ES/ES]; MARTIN ALGARRA, Salvador [ES/ES]; BORRAS CUESTA, Francisco [ES/ES]; Facultad de Medicina, Universidad de Navarra, E-31080 Pamplona (ES).</p>		<p>(74) Mandatario: ELZABURU, Marquez, Alberto; C/ Miguel Angel, 21, E-28010 Madrid (ES).</p> <p>(81) Estados designados: AT (Patente europea), AU, BB, BE (Patente europea), BF (Patente OAPI), BG, BJ (Patente OAPI), BR, CA, CF (Patente OAPI), CG (Patente OAPI), CH (Patente europea), CI (Patente OAPI), CM (Patente OAPI), DE (Patente europea), DK (Patente europea), ES (Patente europea), FI, FR (Patente europea), GA (Patente OAPI), GB (Patente europea), GN (Patente OAPI), GR (Patente europea), HU, IT (Patente europea), JP, KP, KR, LK, LU (Patente europea), MC (Patente europea), MG, ML (Patente OAPI), MR (Patente OAPI), MW, NL (Patente europea), NO, PL, RO, SD, SE (Patente europea), SN (Patente OAPI), SU, TD (Patente OAPI), TG (Patente OAPI), US.</p> <p>Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional. Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben tales modificaciones.</i></p>
<p>(54) Title: NEW SYNTHETIC PEPTIDES WITH IMUNOMODULATING ACTIVITY AND PREPARATION THEREOF</p>		
<p>(54) Título: NUEVOS PEPTIDOS SINTETICOS CON ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA Y SU PREPARACION</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>New imunomodulating peptides are disclosed, having general Formula $R_1\text{-aa}_1\text{-aa}_2\text{-aa}_3\text{-aa}_4\text{-aa}_5\text{-Proaa}_7\text{-aa}_8\text{-aa}_9\text{-aa}_{10}\text{-aa}_{11}\text{-aa}_{12}\text{-aa}_{13}\text{-aa}_{14}\text{-aa}_{15}\text{-R}_2$ wherein R_1 is H, R_2 is OH, or R_1 and R_2 are each an aminoacid residue or peptidic chains, similar or different, which contain from 2 to 10 aminoacid residues, so that when $R_1 = H$ and $R_2 = OH$, the formula represents a pentadecapeptide whose N-terminal and C-terminal aminoacids are respectively aa_1 and aa_{15}; aa_2 is a residue of Val, Leu, Ile, Ala, Lys or Gly; aa_{11} is a residue of Glu or Asp; and the other aminoacid residues aa_n different from aa_2 and aa_{11} may be any of the 20 natural aminoacids. The incubation of such peptides with lymphomononuclear cells of peripheral blood enhances their cytotoxic activity against K562 and Daudi cells used as target cells of tumors. Proliferation of lymphomononuclear cells as well as an increase of the number and proportion of CD14+, CD56+ and CD11b+ are induced. Such peptides are useful in biotherapy for cancer and also as reagents to evaluate the cellular response capacity of the immune system.</p>		
<p>(57) Resumen</p> <p>Se describen nuevos péptidos inmunomoduladores de fórmula general $R_1\text{-aa}_1\text{-aa}_2\text{-aa}_3\text{-aa}_4\text{-aa}_5\text{-Proaa}_7\text{-aa}_8\text{-aa}_9\text{-aa}_{10}\text{-aa}_{11}\text{-aa}_{12}\text{-aa}_{13}\text{-aa}_{14}\text{-aa}_{15}\text{-R}_2$ en la cual R_1 representa H, R_2 representa OH, o bien R_1 y R_2 representan cada uno un resto de aminoácido o cadenas peptídicas, iguales o diferentes, que contienen 2 a 10 restos de aminoácidos, de tal modo que cuando $R_1 = H$ y $R_2 = OH$, la fórmula representa un pentadecapéptido cuyos aminoácidos N-terminal y C-terminal son respectivamente aa_1 y aa_{15}; aa_2 es un resto de Val, Leu, Ile, Ala, Lys o Gly; aa_{11} es un resto de Glu o Asp; y los otros restos de aminoácidos aa_n distintos de aa_2 y aa_{11} pueden ser cualquiera de los 20 aminoácidos naturales. La incubación de estos péptidos con células linfomononucleares de sangre periférica aumenta su actividad citotóxica frente a células K562 y Daudi utilizadas como células diana de tumores. Se induce proliferación de las células linfomononucleares junto con un aumento en el número y proporción de células CD14+, CD56+ y CD11b+. Estos péptidos son útiles en bioterapia de cáncer y también como reactivos para evaluar la capacidad de respuesta celular del sistema inmune.</p>		

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AT	Austria	ES	España	MG	Madagascar
AU	Australia	FI	Finlandia	ML	Mali
BB	Barbados	FR	Francia	MN	Mongolia
BE	Bélgica	GA	Gabón	MR	Mauritania
BF	Burkina Faso	GB	Reino Unido	MW	Malawi
BG	Bulgaria	GN	Guinea	NL	Países Bajos
BJ	Benin	GR	Grecia	NO	Noruega
BR	Brasil	HU	Hungría	PL	Polonia
CA	Canadá	IT	Italia	RO	Rumania
CF	República Centroafricana	JP	Japón	RU	Federación de Rusia
CG	Congo	KP	República Popular Democrática de Corea	SD	Sudán
CH	Suiza	KR	República de Corea	SE	Suecia
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Camerún	LK	Sri Lanka	SU	Unión Soviética
CS	Checoslovaquia	LU	Luxemburgo	TD	Chad
DE	Alemania	MC	Mónaco	TG	Togo
DK	Dinamarca			US	Estados Unidos de América

- 1 -

NUEVOS PEPTIDOS SINTETICOS CON ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA Y
SU PREPARACION

El presente invento se refiere a una serie de nuevos péptidos activos como modulares del sistema inmune. Estos péptidos son útiles en inmunoterapia adoptiva y como reactivos para evaluar la inmunidad mediada por células. Estas nuevas moléculas, por su capacidad para inducir actividad citotóxica, encuentran aplicación terapéutica en enfermedades originadas o acompañadas por alteraciones en el sistema inmune, como ocurre en algunos tipos de cáncer, infecciones y patologías degenerativas o congénitas. Pueden ser útiles también en la profilaxis de disfunciones del sistema inmune.

15 Fundamentos del invento

La participación de mecanismos inmunológicos en la patogenia y desarrollo de diversas enfermedades como cáncer, infecciones y patologías congénitas o degenerativas es bien conocida. Se sabe también que la modulación de las alteraciones inmunológicas, mediante la administración de moléculas mediadoras de citotoxicidad, puede modificar la evolución natural de estas enfermedades, retrasando la aparición de complicaciones o incluso induciendo la curación (Rosenberg SA, Mule JJ, Spies PJ, Reichert CM, Schwartz SL, J Exp Med (1985) 161:1169-1188). También es bien conocida la participación de péptidos y proteínas en algunos de los mecanismos que regulan la respuesta inmunológica. Investigaciones recientes han conducido a importantes descubrimientos en este campo que han permitido la identificación de moléculas implicadas en el funcionamiento normal o anormal del sistema inmune (Young RA, Elliott TJ, Cell (1989) 59:5-8; Marx J, Science (1990) 249:246-248); han conducido también a la síntesis de nuevas moléculas con la intención de potenciar, modular o modificar los efectos obtenidos con productos naturales. La generación "in vitro" de células con actividad antitumoral a partir de células linfomononucleares presentes en sangre periférica, o a

- 2 -

partir de células linfomononucleares extraídas de tumores re-
seccionados, ha puesto de manifiesto que es posible modular
"ex vivo" el sistema inmune de tal manera que se abra la puer-
ta a nuevos abordajes terapéuticos en enfermedades resisten-
tes hasta ahora a los tratamientos convencionales (Rosenberg
5 SA. In De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. Important
advances in oncology. Philadelphia: JB Lippincott, 1986:55-
-91; Topalian SL, Rosenberg SA eds. Important advances in
oncology. Philadelphia: JB Lippincott, 1990:19-41).

10 Las proteínas y los péptidos, así como otros com-
puestos derivados de aminoácidos u otras estructuras químicas,
se utilizan ya como inmunomoduladores en la práctica
clínica. Entre las proteínas o péptidos cabe citar Interfe-
ron- -gamma (The Merck Index 11 ed. Nº 4894), Interleukin-2
15 (The Merck Index 11 ed. Nº 4896) y Thymomodulin (The Merck
Index 11 ed. Nº 9338).

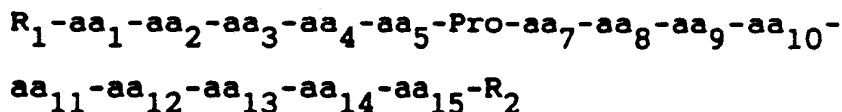
Entre los inmunomoduladores derivados de aminoácidos
pueden mencionarse unos cuantos compuestos: Bucillamine (The
Merck Index 11 ed. Nº 1447) y Ubinimex (The Merck Index 11
20 ed. Nº 9750). Otro grupo de los inmunomoduladores está rela-
cionado con mono- o poli-sacáridos. Representativos de este
grupo son Amiprilose (The Merck Index 11 ed. Nº 499) y Lenti-
nan (The Merck Index 11 ed. Nº 5322). Otros inmunoestimulado-
res poseen una estructura heterocíclica o mixta. Pertenecen
25 a este grupo Muroctasin (The Merck Index 11 ed. Nº 6217),
Platonin (The Merck Index 11 ed. Nº 7504), Procodazole (The
Merck Index 11 ed. Nº 7769) y Tetramisole (The Merck Index 11
ed. Nº 9161).

No obstante, este tipo de tratamiento está sujeto a
30 controversia debido a la gravedad de algunos de los efectos
secundarios (Osband ME, Ross S, Immunology Today (1990) 13:
193-195). Por esta razón, esta terapia queda reservada a cen-
tros especializados en los que puedan evaluarse adecuadamente
los factores inmunológicos que han de considerarse para su
35 correcto manejo.

HOJA SUSTITUIDA

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Basándonos en los datos existentes en la bibliografía sobre la existencia de péptidos que se unen específicamente a los receptores implicados en la estimulación del sistema inmunitario (Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoni B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC, Nature (1987) 329:506; White J, Herman A, Pullen AM, Kubo R, Kappler JW, Marrack P. Cell (1989) 56:27; Born W, Hall L, Dallas A, Boymel J, Schinnick T, Young D, Brennan P, O'Brien R, Science (1990) 249:67; Sette A, Buus S, Colon S, Smith JA, Miles C, Pierce SK, Proc Natl Acad Sci USA (1987) 84:1659), hemos realizado la síntesis de los péptidos objeto del invento. Estos péptidos inducen actividad citotóxica mediada por células linfomononucleares. Los péptidos objeto del presente invento responden a la fórmula general



en la cual R_1 representa H, R_2 representa OH, o bien R_1 y R_2 representan cada uno de ellos un resto de aminoácido o cadenas peptídicas, iguales o diferentes, que contienen 2 a 10 restos de aminoácidos, de tal modo que cuando $R_1=H$ y $R_2=OH$, la fórmula representa un pentadecapéptido cuyos aminoácidos N-terminal y C-terminal son respectivamente aa_1 y aa_{15} ;

aa_2 es un resto de Val, Leu, Ile, Ala, Lys o Gly;

aa_{11} es un resto de Glu o Asp;

y los otros restos de aminoácidos aa_n distintos de aa_2 y aa_{11} pueden ser cualquiera de los 20 aminoácidos naturales con configuración L.

Por consiguiente, los péptidos del invento pueden tener desde 15 aminoácidos (caso de $R_1=H$ y $R_2=OH$) hasta 35 aminoácidos, cuando el péptido de 15 aminoácidos es prolongado por ambos extremos, representando así cada uno de R_1 y R_2 desde ninguno hasta 10 restos de aminoácidos. La estructura preferida es aquella en la que $R_1=H$ y $R_2=OH$, y es fácilmente soluble en agua.

- 4 -

Debe quedar claro que las características generales de los péptidos objeto del presente invento vienen definidas por:

- 5 i) la posición de la Pro (situada entre aa₅ y aa₆) en relación con los restos aa₂ y aa₁₁, representando cada uno de ellos los restos de aminoácidos anteriormente indicados; y
- 10 ii) la longitud de las cadenas peptídicas representadas por R₁ y R₂, que pueden ser iguales o diferentes; por tanto los péptidos objeto del invento pueden tener de 15 a 35 aminoácidos.

La síntesis química de estos péptidos se ha realizado mediante el método en fase sólida de Merrifield (Merrifield RB; J Am Chem Soc (1963), 85:2149) con la modificación Fmoc (Atherton E, Logan JC, Sheppard CR, J Chem Soc Perkin 15 Trans (1981), 1:538).

De acuerdo con esta técnica, la síntesis de los péptidos se realiza de la siguiente manera:

20 1. Preparación de la resina

La resina de gel de poliamida funcionalizada con sarcosina se trata con dietilendiamina durante unas 10 horas y de lava con abundante dimetilformamida (DMF). La resina se hace reaccionar luego con un brazo activado (linkage agent en 25 la literatura anglosajona), el éster penta-fluor-fenílico del ácido 4-hidroxi-metil-fenoxiacético. Una vez que se ha agregado este brazo, se realiza el ensayo de la ninhidrina de Kaiser para cerciorarse de la ausencia de grupos aminos libres y que, por tanto, debe resultar negativo.

30

2. Unión del primer aminoácido al brazo activado de la resina:

35 Se prepara el anhídrido simétrico del primer aminoácido con el grupo amino protegido con el grupo fluorenmetiloxicarbonilo (Fmoc). Cualquier otro grupo presente en la cadena lateral del aminoácido deberá ser igualmente protegido

- 5 -

con un grupo compatible con la tecnología de modificación Fmoc. Se deja que el anhídrido simétrico reaccione con la resina entre 80 y 100 minutos, utilizando dimetil-amino-piridina como catalizador. Se lava luego la resina con abundante dimetil-formamida (DMF) y se procede a retirar el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF. El grupo amino está ahora listo para reaccionar con el grupo carboxilo de un nuevo aminoácido.

10 3. Etapa de formación del péptido:

El resto de los aminoácidos se incorporan secuencialmente utilizando sus anhídridos simétricos o sus ésteres activos.

15 Los anhídridos simétricos se preparan a partir de los correspondientes aminoácidos activándolos con diciclohexilcarbodiimida en diclorometano. La diclorohexil-urea insoluble que se forma como subproducto se elimina por filtración; el diclorometano se elimina en un evaporador instantáneo rotatorio y el anhídrido simétrico presente en el residuo se disuelve en DMF y se agrega a la resina. Se deja que la reacción prosiga durante 60-90 minutos, y si el ensayo de la ninhidrina es negativo, ello muestra la ausencia de grupos aminos libres (Kaiser E, Colecott RL, Bossinger CD, Cook PI, 20 Anal Biochem (1970) 34:595). Si el ensayo de la ninhidrina es positivo, se repite esta etapa. En el caso de utilizar ésteres activos, el procedimiento es mucho más simple. El éster activo (3 a 6 de exceso molar con respecto a la resina) se disuelve directamente en DMF conteniendo una cantidad molar 25 de 1-hidroxi-benzotriazol equivalente a la del éster activo, y se agrega a la mezcla de la reacción.

Si el ensayo de la ninhidrina resulta negativo, se procede a retirar el grupo protector Fmoc con piperidina al 20% en DMF. El ciclo se repite con el resto de los aminoácidos de tal manera que se haga crecer la cadena polipeptídica 35 desde el aminoácido C-terminal a aminoácido N-terminal.

- 6 -

4. Etapa de liberación del péptido:

El aminoácido en posición C-terminal se libera de la resina en condiciones en las que el péptido es estable. El reactivo empleado es ácido trifluoroacético al 95%, conteniendo fenol, y etanoditiol en proporciones que dependen de los aminoácidos presentes en la muestra. Los grupos protectores de cadenas laterales del aminoácido se cortan también con este reactivo.

10

5. Purificación del péptido:

El péptido obtenido se purifica mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando una columna de C18 de fase inversa equilibrada con 0,1% en p/v de ácido trifluoroacético en agua, que constituye el disolvente de partida. Se estableció un gradiente lineal con el segundo disolvente (acetonitrilo conteniendo 0,1% (p/v) de ácido trifluoroacético) hasta que se alcanzó el 70% del último.

20

Características estructurales de los nuevos péptidos objeto del invento

Los péptidos sintetizados se han ensayado con respecto a la actividad citotóxica que inducen en células linfomononucleares procedentes de sangre periférica de donantes sanos. La incubación se realiza en presencia de distintas concentraciones. Los péptidos más activos son los que llevan la prolina entre aa₅ y aa₇, y junto con aa₂ y aa₁₁, adoptando los valores indicados anteriormente.

La incubación de los péptidos activos con células linfomononucleares obtenidas de sangre periférica aumenta su actividad citotóxica frente a células de las líneas K562 y Daudi utilizadas como células diana de tumores. Experimentos de control utilizando inmunomoduladores reconocidos, tal como Interleukin-2 recombinante humana, han mostrado una actividad similar, en la aniquilación de células diana K562 y células

- 7 -

Daudi, a la obtenida con los péptidos objeto de este invento. Se induce proliferación de las células linfomononucleares junto con un aumento en el número y proporción de células CD14+, CD56+ y CD11b+. Estos resultados indican que estos 5 péptidos pueden ser utilizados en inmunoterapia adoptiva para el cáncer, y también como reactivos para evaluar la capacidad de respuesta celular del sistema inmune.

Debido a su pequeño tamaño, si se comparan con proteínas y otras moléculas complejas, estos péptidos son presumiblemente menos tóxicos e inmunogénicos, y, por tanto, son adecuados como agentes terapéuticos en desórdenes clínicos que cursan con alteraciones del sistema inmune, como ocurre en cáncer, infecciones víricas e inmunodeficiencias. Podrían utilizarse también en situaciones de alto riesgo en pacientes 15 ancianos y en niños.

El invento se ilustra con algunos ejemplos.

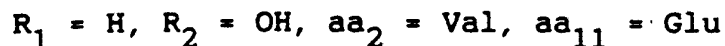
EJEMPLOS

20 Ejemplo 1

Síntesis del péptido

Asn-Val-Leu-Gly-Ala-Pro-Lys-Lys-Leu-Asn-Glu-Ser-Gln-Ala-Val

Este pentadecapéptido responde a la fórmula general anterior 25 cuando



y los restantes aminoácidos son los especificados en el ejemplo.

30

1. Preparación de la resina:

Doscientos mg de resina de gel de poliamida funcionalizada con sarcosina (0,3 mEq/g) se tratan con 7 ml de 35 etilendiamina durante 10 horas en un reactor con agitación continua, y se hacen 10 lavados con bastante dimetilformamida. Se hace reaccionar luego la resina con un brazo activado

HOJA SUSTITUIDA

- 8 -

o agente de unión. Para ello se añaden 125,4 mg del éster penta-fluor-fenílico del ácido 4-hidroxi-metil-fenoxiacético (HMPA) y 48,64 mg de hidroxibenzotriazol (HOBT), ambos disueltos en DMF, y se deja reaccionar durante 90 minutos. A continuación se hacen 10 lavados con DMF y se realiza el ensayo de la ninhidrina de Kaiser, para cerciorarse de la ausencia de grupos aminos libres.

2. Unión del primer aminoácido al brazo activado de la resina:

Se prepara el anhídrido simétrico de la valina con su grupo amino protegido por el grupo fluoren-metil-oxicarbonylo (Fmoc). A este fin, se deja que reaccionen 244,4 mg del aminoácido con 74,28 mg de dicloexilcarbodiimida (DCC), ambos disueltos en diclorometano. Al anhídrido simétrico, disuelto en DMF, se le deja reaccionar con la resina durante 80 a 100 minutos utilizando 4,4 mg de dimetil-amino-piridina como agente catalítico. A continuación se lava la resina con abundante dimetil-formamida (DMF) y se elimina el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF. El grupo amino está ahora listo para reaccionar con el grupo carboxilo de un nuevo aminoácido.

3. Incorporación de los catorce aminoácidos restantes:

Se añaden a la resina 154,65 mg del éster penta-fluor-fenílico de la alanina disuelto en DMF junto con 43,8 mg de 1-hidroxi-benzotriazol (HOBT). El resto de los aminoácidos se incorporan secuencialmente utilizando sus anhídridos simétricos o los ésteres activos para conseguir la reacción.

Los anhídridos simétricos se preparan a partir de los correspondientes aminoácidos activándolos con dicitclohexilcarbodiimida en diclorometano. Se deja que la reacción de copulación prosiga durante 90 minutos. Si el ensayo de la ninhidrina resulta negativo, se elimina el grupo protector

- 9 -

Fmoc con piperidina al 20% en DMF. Se repite el ciclo con el resto de los aminoácidos de tal manera que la cadena polipeptídica crece del aminoácido C-terminal al aminoácido N-terminal. A este fin, se utilizaron los ésteres penta-fluor-fenílicos de glutamina (173,16 mg), serina (171,21 mg), ácido glutámico (691,66 mg), asparagina (168,62 mg), leucina (168,33 mg), lisina (205,63 mg), lisina (205,63 mg), prolina (163,44 mg), alanina (154,65 mg), glicina (150,12 mg), leucina (168,33 mg), valina (163,33 mg) y asparagina (168,62 mg).

4. Etapa de liberación del péptido:

Después de eliminar el grupo Fmoc del último aminoácido incorporado, se rompe el enlace que une la valina con la resina, así como se escinden los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos de la secuencia. Esto se realiza mediante adición de 9 ml de la mezcla de corte (ácido trifluoroacético al 95%, fenol al 2,5% y etanoditiol al 2,5%) ya dejándolo reaccionar durante toda una noche. Se precipita el péptido por la adición de éter, y se hacen varios lavados con este disolvente. Se recupera el precipitado después de la evaporación completa del disolvente.

25 Ejemplo 2

Procediendo del mismo modo que en el Ejemplo 1 se sintetiza el péptido siguiente:

30 Ser-Leu-Lys-Asp-Asp-Pro-Ser-Val-Ser-Lys-Glu-Ile-Leu-Ala-Val

Este pentadecapéptido responde a la fórmula general anterior cuando

35 $R_1 = H, R_2 = OH, aa_2 = Leu, aa_{11} = Glu$

Los restantes aminoácidos son los especificados en

HOJA SUSTITUIDA

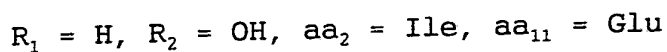
este ejemplo.

Ejemplo 3

5 Procediendo de modo análogo al del Ejemplo 1 se sintetiza el péptido siguiente:

Glu-Ile-Leu-Asn-Met-Pro-Asn-Leu-Asn-Glu-Glu-Gln-Arg-Asn-Val

10 Esta pentadecapéptido responde a la fórmula general anterior cuando



15 Los restantes aminoácidos son los especificados en este ejemplo.

Ejemplo 4

20 Asn-Gly-Phe-Ile-Gln-Ser-Leu-Lys-Asp-Asp-Pro-Ser-Val-Ser-Lys-Glu-Ile-Leu-Ala-Glu-Ala-Lys-Val

Este péptido, que consta de 23 restos de aminoácidos, corresponde a la fórmula general anterior cuando

25 $R_1 = \text{Asn-Gly-Phe-Ile-Gln}$, $R_2 = \text{Ala-Lys-Val}$, $aa_2 = \text{Leu}$, $aa_{11} = \text{Glu}$.

Los restantes aminoácidos son los especificados en este ejemplo.

30

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL PEPTIDO OBJETO DEL INVENTO

Generación de células con actividad citotóxica frente a células diana NK sensibles y NK resistentes.

35

1. Leucaféresis

Se obtuvieron por leucaféresis células mononucleares

- 11 -

de sangre periférica de donantes sanos, procesando 5 a 10 litros de sangre entera y empleando un separador celular de flujo continuo Fenwall CS-3000 (Fenwall Laboratories, Deerfield, Illinois, EE.UU.). Se obtuvo acceso al sistema vascular con un catéter venoso central de doble luz.

2. Activación de células mononucleares in vitro

Se lavaron y contaron células linfomononucleares separadas y se las volvió a suspender a una concentración de 2×10^6 por ml en un medio de RPMI-1640 que contenía 10 unidades de penicilina por ml, 200 mg de gentamicina por ml, 2mM de glutamina por ml y 2,5% de suero autólogo en una bolsa de cultivo PL-732 (Fenwall Laboratories, Deerfield, Illinois, EE.UU.).

El medio de incubación contenía 200 microgramos del péptido que se está estudiando.

Péptido número 1 (Péptido del Ejemplo 1).

Péptido número 2 (Péptido del Ejemplo 2).

Péptido número 3 (Péptido del Ejemplo 3).

Péptido número 4 (Péptido del Ejemplo 4).

Péptido de control (Ala-Asp-Ala-Gln-Gln-Asn-Lys-Phe-Asn-Lys-Asp-Gln-Gln-Ser-Val. En este pentadecapéptido falta la Prolina. Este péptido de control tiene en común con los péptidos objeto del invento solamente aa₁₁=Asp).

Las células se cultivan durante 4 días en una incubadora de aire húmedo a 37°C, 5% de CO₂ y 21% de O₂. Se extrae diariamente una muestra de un ml para estudios microbiológicos.

Los cambios en la capacidad citotóxica de las células linfomononucleares antes y después de la activación del péptido se miden con el ensayo de liberación de ⁵¹Cr, utilizando células diana de las líneas K562 y Daudi (Tabla I). Se evalúan también los cambios fenotípicos de las células linfomononucleares, antes y después de la activación del péptido, con anticuerpos mononucleares marcados con fluoresceína y con citometría de flujo automatizada (Tabla II). Es bien sabido

que las células linfomononucleares son muy heterogéneas, pero la presencia de marcadores de superficie (CD) permite la descripción de sus fenotipos (Weissman IL, Fathman CG, J Exp Med (1973) 137:504; Small M, Herzenberg CA, Weissman IL, Cell 5 Immunol (1975) 15:109).

Tabla I. Actividad citolítica inducida por péptidos frente a células diana K562 y Daudi. Se han obtenido células linfomononucleares de tres donantes sanos diferentes. (Valor medio $10 \pm$ error estándar).

<u>PEPTIDO</u>	<u>ACTIVIDAD CITOTOXICA (%)</u>	
	<u>DAUDI</u>	<u>K562</u>
Ninguno	9 \pm 3	19 \pm 5
15 Péptido nº 1	68 \pm 6	63 \pm 8
Péptido nº 2	62 \pm 8	62 \pm 7
Péptido nº 3	58 \pm 9	59 \pm 9
Péptido nº 4	56 \pm 6	58 \pm 7
Péptido de control	10 \pm 4	12 \pm 8

20

Tabla II. Fenotipos de las células linfomononucleares después de la activación del péptido. Se han obtenido células linfomononucleares de tres donantes sanos diferentes. (Valor medio \pm error estándar).

25

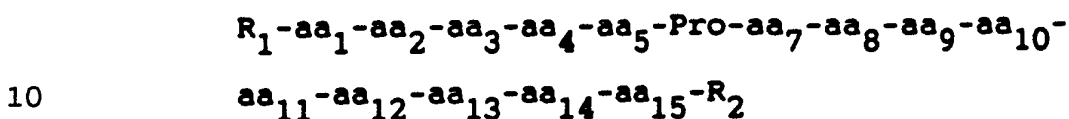
<u>PEPTIDO</u>	<u>CELULAS QUE EXPRESAN MARCADORES DE SUPERFICIE (%)</u>					
	<u>CD3</u>	<u>CD8</u>	<u>CD11b</u>	<u>CD14</u>	<u>CD16</u>	<u>CD56</u>
Ninguno	59 \pm 3	17 \pm 2	14 \pm 4	9 \pm 1	11 \pm 5	6 \pm 2
30 Péptido nº 1	60 \pm 1	17 \pm 1	23 \pm 5	17 \pm 4	22 \pm 7	18 \pm 6
Péptido nº 2	58 \pm 2	18 \pm 2	24 \pm 3	18 \pm 3	22 \pm 6	17 \pm 5
Péptido nº 3	59 \pm 3	17 \pm 2	23 \pm 4	18 \pm 3	21 \pm 5	18 \pm 5
Péptido nº 4	58 \pm 3	18 \pm 2	21 \pm 3	17 \pm 4	21 \pm 6	17 \pm 5
Péptido de control	60 \pm 2	17 \pm 2	13 \pm 4	9 \pm 2	12 \pm 4	6 \pm 2

35

REIVINDICACIONES

5

1.- Nuevos péptidos activos como inmunomoduladores que responden a la fórmula general



10

en la cual R_1 representa H, R_2 representa OH, o bien R_1 y R_2 representan cada uno de ellos un resto de aminoácido o cadenas peptídicas, iguales o diferentes, que contienen 2 a 10 restos de aminoácidos, de tal modo que cuando $R_1=H$ y $R_2=OH$, la fórmula representa un pentadecapéptido cuyos aminoácidos N-terminal y C-terminal son respectivamente aa_1 y aa_{15} ;

15

aa_2 es un resto de Val, Leu, Ile, Ala, Lys o Gly;

aa_{11} es un resto de Glu o Asp;

20

y los otros restos de aminoácidos aa_n distintos de aa_2 y aa_{11} pueden ser cualquiera de los 20 aminoácidos naturales con configuración L.

2. Síntesis de los péptidos según la reivindicación 1, siguiendo el método de fase sólida para la síntesis química de los péptidos.

25

3.- Uso de los péptidos según la reivindicación 1 en el tratamiento del cáncer.

4.- Uso de los péptidos según la reivindicación 1 en el tratamiento de afecciones causadas o acompañadas por inmunodepresión.

30

5.- Uso de los péptidos activos como inmunomoduladores según las reivindicaciones 1 y 2 como reactivos de laboratorio para el estudio de la inmunidad celular en sujetos sanos y enfermos, y como herramienta para el diagnóstico de cáncer, infecciones y enfermedades que cursen con disfunciones del sistema inmunitario.

35

6.- Uso de los péptidos según la reivindicación 1 en

- 14 -

la profilaxis de disfunciones del sistema inmunitario en sujetos sanos y ante situaciones de alto riesgo de pacientes ancianos y niños.

7.- Uso de los péptidos según la reivindicación 1 en el tratamiento de la inmunodeficiencia.

8.- Uso de los péptidos según la reivindicación 1 en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y degenerativas.

9.- Uso de los péptidos según la reivindicación 1 para la obtención de células linfomononucleares activadas destinadas a aplicarse en el diagnóstico y tratamiento de estados acompañados o causados por disfunciones inmunológicas.

10.- Uso de los péptidos según la reivindicación 1 en inmunoterapia adoptiva.

15

HOJA SUSTITUIDA

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	Chemical Abstracts, volume 107, No. 21, 23 November 1987 (Columbus, Ohio, US) F. Boras-Cuesta et al.: "Engineering of immunogenic peptides by co-linear synthesis of determinants recognized by B and T cells", see page 567, abstract 196073w, & Eur. J. Immunol. 1987, 17(8), 1213-15	1-10
T	Chemical Abstracts, volume 116, No. 4, 17 February 1992 (Columbus, Ohio, US), J.G. Guillet et al.: "Haplotype specific homology scanning algorithm to predict T-cell epitopes from protein sequences", see page 621, abstract 56809b, & J. Mol. Recognit. 1991, 4(1), 17-25	1-10

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. Claim numbers ~~(3-4, 6-8, 10)~~^{(3-4, 6-8, 10)*} because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Note: Although claims 3-4, 6-8, 10 are directed to a method for treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compounds. *partially

2. Claim numbers ¹ because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The general formulation of claim 1 is insufficiently clear for a complete search to be made. Consequently the search has been limited to the examples described in the text.

3. Claim numbers....., because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ²

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
3. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
4. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

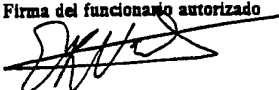
Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional Nº

PCT/ES 91/00087

I. CLASIFICACION DE LA INVENCIÓN (caso de ser aplicables varios símbolos de clasificación, indicarlos todos) ⁶		
Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP		
CIP.5 A 61 K 37/02	C 07 K 7/08 A 61 K 39/00	C 07 K 7/10 G 01 N 33/569 C 07 K 15/00
II. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA		
Documentación mínima consultada ⁷		
Sistema de clasificación	Símbolos de clasificación	
CIP.5	C 07 K A 61 K	G 01 N
Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda ⁸		
III. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES ⁹		
Categoría *	Identificación de los documentos citados, ¹¹ con indicación, en caso necesario, de los pasajes pertinentes ¹²	Nº de las reivindicaciones a las que se refieren ¹³
A	Chemical Abstracts, volumen 114, numero 7, 18 Febrero 1991 (Columbus, Ohio, US) J. Golvano et al.: "Polarity of immunogens: implications for vaccine design", ver página 508, resumen 60086q, & Euro. J. Immunol 1990, 20(10), 2363-66 ---	1-10
A	Chemical Abstracts, volumen 108, num. 23, 6 Junio 1988 (Columbus, Ohio, US) F. Borrás-Cuesta et al.: "Immunogenicity of synthetic peptides corresponding to regions of the major inner capsid protein of bovine rotavirus (BRV), ver página 507, resumen 202814c, & Ann. Inst. Pasteur/Virol 1987, 138(4), 437-50 --- -/-	1-10
<p>* Categorías especiales de documentos citados: ¹⁰</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente</p> <p>"E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma</p> <p>"L" documento que pueda plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada)</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada</p> <p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de prioridad y que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención</p> <p>"X" documento particularmente pertinente: la invención reivindicada no puede considerarse como nueva ni que implique una actividad inventiva</p> <p>"Y" documento particularmente pertinente: la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de parentes</p>		
IV. CERTIFICACION		
Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional	Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional	
11-04-1992	10.06.92	
Administración encargada de la búsqueda internacional	Firma del funcionario autorizado	
OFICINA EUROPEA DE PATENTES	 Els Vonk	

EPO FORM (P0436)

III. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES (CONTINUACION DE LOS DATOS INDICADOS EN LA SEGUNDA HOJA)		
Categoria *	Identificación de los documentos citados, con indicación, en caso necesario, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones a las que se refieran
A	<p>Chemical Abstracts, volumen 107, num. 21, 23 Noviembre 1987 (Columbus, Ohio, US) F. Boras-Cuesta et al.: "Engineering of immunogenic peptides by co-linear synthesis of determinants recognized by B and T cells", ver página 567, resumen 196073w, & Eur. J. Immunol. 1987, 17(8), 1213-15</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-10
T	<p>Chemical Abstracts, volumen 116, num. 4, 17 Febrero 1992 (Columbus, Ohio, US) J.G. Guillet et al.: "Haplotype specific homology scanning algorithm to predict T-cell epitopes from protein sequences", ver página 621, resumen 56809b, & J. Mol. Recognit. 1991, 4(1), 17-25</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-10

EPO FORM (P0437)

CONTINUACION DE LOS DATOS INDICADOS EN LA SEGUNDA HOJA**V. OBSERVACIONES CUANDO SE HA ESTIMADO QUE CIERTAS REIVINDICACIONES NO PUEDEN SER OBJETO DE BÚSQUEDA ¹**

A tenor del Artículo 17.2)a) ciertas reivindicaciones no han sido objeto de búsqueda por los motivos que a continuación se detallan:

1. Las reivindicaciones número (3-4, 6-8, 10)* se refieren a un objeto con respecto al cual esta administración no tiene obligación de proceder a la búsqueda, a saber:

Observación: Aunque las reivindicaciones 3-4, 6-8, 10 se refieran a un método de tratamiento del cuerpo humano, la búsqueda se ha efectuado basándose en los efectos que se atribuyen a los compuestos.

*-parcialmente

2. Las reivindicaciones número 1 se refieren a partes de la solicitud internacional que no cumplen con las condiciones prescritas en tal medida que no puede realizarse una búsqueda significativa, concretamente:

La fórmula general de la reivindicación 1 es demasiado oscura y vaga para permitir una búsqueda completa. Por consiguiente se limitó la búsqueda a los ejemplos descritos en el texto.

3. Las reivindicaciones número son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con las frases segunda y tercera de la Regla 6.4.a) del PCT.

VI. OBSERVACIONES CUANDO NO HAY UNIDAD DE LA INVENCION ²

La administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, es decir:

1. Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas dentro de plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones de la solicitud internacional que pueden ser objeto de búsqueda.
2. Dado que tan solo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro de plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones, respecto de las cuales las tasas han sido abonadas, siendo aquellas:
3. Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro de plazo por el solicitante. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones; la misma se halla cubierta por las reivindicaciones número:

4. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional la administración encargada de la búsqueda internacional no ha solicitado el pago de ninguna tasa de esta naturaleza.

Observación relativa a la protesta:

- Las tasas adicionales de búsqueda han sido pagadas bajo protesta del solicitante.
- No se ha realizado protesta alguna al procederse al pago de las tasas adicionales de búsqueda.