(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 369 055**

(51) Int. CI.:

A61K 45/00	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01)
C07K 7/08	(2006.01)
C07K 7/23	(2006.01)
C07K 1/00	(2006.01)
A61K 38/10	(2006.01)
A61K 39/39	(2006.01)
A61K 39/385	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **09179823 .1**

(96) Fecha de presentación: **21.06.1999**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2181715**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **05.05.2010**

(54) Título: **EPÍTOPOS DE CÉLULAS T AUXILIARES COMO ESTIMULANTES INMUNITARIOS PARA INMUNÓGENOS PEPTÍDICOS SINTÉTICOS.**

(30) Prioridad:
20.06.1998 US 100412

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.11.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.11.2011

(73) Titular/es:
UNITED BIOMEDICAL, INC.
25 DAVIDS DRIVE
HAUPPAUGE, NEW YORK 11788, US

(72) Inventor/es:
Wang, Chang Yi

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Epítopos de células T auxiliares como estimulantes inmunitarios para inmunógenos peptídicos sintéticos

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere a un inmunógeno peptídico que comprende un nuevo epítopo de células T auxiliares (Th) artificial conectado covalentemente a un sitio antigénico diana deseado que comprende epítopos de células B y opcionalmente una secuencia estimulante inmunitaria general. El epítopo de Th artificial imparte al inmunógeno peptídico la capacidad de inducir fuertes respuestas inmunitarias mediadas por células T auxiliares y la producción de anticuerpos dirigidos contra el "sitio antigénico diana". La invención también proporciona la sustitución ventajosa de proteínas portadoras y sitios de células T auxiliares derivados de patógenos en inmunógenos peptídicos establecidos mediante los nuevos epítopos de células T auxiliares artificiales para una inmunogenicidad mejorada.

Se han desarrollado muchas reglas para predecir las secuencias de aminoácidos de epítopos de células T. Sin embargo, debido a que no hay una teoría unificadora central sobre cómo o qué hace a una secuencia de aminoácidos particular útil como un epítopo de células T, las reglas son empíricas y no son aplicables universalmente. Estando al tanto de estas reglas, se desarrollaron los nuevos epítopos de células T auxiliares artificiales de la presente invención, no obstante, mediante investigación empírica.

Los inmunógenos peptídicos de la presente invención son útiles para ocasionar respuestas por anticuerpos en un huésped inmunizado a un sitio antigénico diana deseado, incluyendo sitios tomados de organismos patógenos y sitios tomados de autoantígenos normalmente inmunosilenciosos y dianas asociadas a tumores. De acuerdo con esto, los péptidos de la invención son útiles en diversas aplicaciones médicas y veterinarias, tales como: vacunas para proporcionar inmunidad de una enfermedad infecciosa; inmunoterapias para tratar trastornos resultantes de procesos fisiológicos normales que funcionan mal; inmunoterapias para tratar el cáncer y como agentes para intervenir en procesos fisiológicos normales para producir resultados deseables.

Por ejemplo, los nuevos epítopos de células T auxiliares artificiales de la presente invención proporcionan nuevos inmunógenos peptídicos cortos que producen anticuerpos dirigidos a hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) y son útiles para la anticoncepción, el control de tumores dependientes de hormonas, la prevención del olor sexual y la inmunocastración. Se ha encontrado que los nuevos epítopos de Th artificiales de la presente invención provocan una respuesta inmunitaria cuando se combinan con epítopos de células B diana de diversos microorganismos/proteínas/péptidos. Además de LHRH, se ha encontrado que los epítopos de Th artificiales de la presente invención son útiles cuando se conectan a otros sitios antigénicos diana incluyendo somatostatina para la promoción del crecimiento en animales de granja; IgE para el tratamiento de la alergia; el receptor CD4 de células T auxiliares para el tratamiento y la prevención de la infección por HIV y trastornos inmunitarios; proteína de la cápsida del virus de la fiebre aftosa para la prevención de la fiebre aftosa; epítopos del virión del HIV para la prevención y el tratamiento de infección por HIV; el antígeno de circumsporozoitos de *Plasmodium falciparum* para la prevención y el tratamiento de la malaria; y proteína de transporte de ésteres colesterílicos (CETP) para la prevención y el tratamiento de la arteriosclerosis.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Se sabe que la mayoría de las respuestas inmunes por anticuerpos están mediadas por células, requiriendo la interacción cooperativa entre células que presentan antígenos, células B (células que producen anticuerpos que también funcionan como células que presentan antígenos) y células T auxiliares (Th). Por consiguiente, la inducción de una respuesta por anticuerpos eficaz requiere que las células B reconozcan el sitio antigénico diana (epítopo de células B) de un inmunógeno del sujeto y las células T auxiliares reconozcan un epítopo de Th. Generalmente, el epítopo de células T auxiliares sobre un inmunógeno del sujeto es diferente de su epítopo o epítopos de células B (Babbitt et ál., Nature, 1985; 317: 359-361). El epítopo de células B es un sitio sobre la diana deseada reconocido por células B que en respuesta producen anticuerpos para el sitio diana deseado. Se entiende que la conformación natural de la diana determina el sitio al que se une directamente el anticuerpo. Sin embargo, el reconocimiento de proteínas por células T auxiliares es mucho más complejo y peor entendido. (Cornette et ál., en Methods in Enzymology, vol 178, Academic Press, 1989, pp 611-634).

Bajo las presentes teorías, la provocación de una respuesta de células Th requiere que el receptor de células T auxiliares reconozca no la diana deseada sino un complejo sobre la membrana de la célula que presenta antígeno formado entre un fragmento peptídico procesado de la proteína diana y un complejo de histocompatibilidad principal (MHC) de clase II asociado. Así, se requiere el procesamiento peptídico de la proteína diana y un reconocimiento triple para la respuesta de células T auxiliares. El complejo de tres partes es particularmente difícil de definir ya que los residuos de contacto del MHC clase II críticos están situados variablemente dentro de diferentes péptidos de unión del MHC (epítopos de Th) y estos péptidos son de longitudes variables con diferentes secuencias de aminoácidos (Rudensky et ál., Nature, 1991; 353:622-627). Además, las propias moléculas del MHC clase II son

altamente diversas dependiendo de la constitución genética del huésped. De hecho, se ha observado que ciertos péptidos solo se unen a los productos de alelos del MHC clase II particulares. Así, es difícil identificar epítopos del Th promiscuos, es decir, aquellos que son reactivos a través de especies y a través de individuos de una sola especie. Se ha encontrado que la reactividad de los epítopos de Th es diferente incluso entre individuos de una población.

Los múltiples y variados factores para cada una de las etapas constituyentes del reconocimiento de células T: el procesamiento peptídico apropiado por la célula que procesa el antígeno, la presentación del péptido por una molécula del MHC clase II genéticamente determinada y el reconocimiento del complejo molécula del MHC/péptido por el receptor sobre células T auxiliares han hecho difícil determinar los requisitos para los epítopos de Th promiscuos que proporcionan amplia capacidad de respuesta (Bianchi et ál., EP 0427347; Sinigaglia et ál., capítulo 6 en Immunological Recognition of Peptides in Medicine and Biology, ed., Zegers et ál., CRC Press, 1995, pp 79-87).

Está claro que para la inducción de anticuerpos, el inmunógeno debe comprender tanto el determinante de células B como el determinante o los determinantes de células Th. Comúnmente, para incrementar la inmunogenicidad de una diana, la respuesta de Th se proporciona al acoplar la diana a una proteína portadora. Las desventajas de esta técnica son muchas. Es difícil fabricar conjugados de péptido-proteína portadora bien definidos, seguros y eficaces por las siguientes razones:

1. El acoplamiento químico son reacciones aleatorias que introducen heterogeneidad de tamaño y composición, p. ej. conjugación con glutaraldehído (Borras-Cuesta et ál., Eur J Immunol, 1987; 17: 1213-1215);

2. la proteína portadora introduce un potencial para respuestas inmunitarias no deseables tales como reacciones alérgicas y autoinmunes (Bixler et ál., WO 89/06974);

3. el péptido-proteína portadora grande ocasiona respuestas inmunes irrelevantes predominantemente mal dirigidas a la proteína portadora en lugar de al sitio diana (Cease et ál., Proc Natl Acad Sci USA, 1987; 84: 4249-4253); y

4. la proteína portadora también introduce un potencial para la supresión epitópica en un huésped que previamente ha sido inmunizado con un inmunógeno que comprende la misma proteína portadora. Cuando un huésped se inmuniza subsiguientemente con otro inmunógeno en el que la misma proteína portadora está acoplada a un hapteno diferente, la respuesta inmunitaria resultante se mejora para la proteína portadora pero se inhibe para el hapteno (Schutze et ál., J Immunol, 1985; 135: 2319-2322).

Para evitar estos riesgos, es deseable reemplazar las proteínas portadoras. El auxilio de células T puede suministrarse a un péptido antigénico diana mediante la unión covalente a un determinante de Th promiscuo bien caracterizado. Th promiscuos conocidos se derivan de antígenos de potentes agentes patógenos tales como la proteína F del virus del sarampión (Greenstein et ál., J Immunol, 1992; 148: 3970-3977) y el antígeno superficial del virus de la hepatitis B (Partidos et ál., J Gen Virol 1991; 72: 1293-1299). Los presentes inventores han mostrado que muchos de los Th promiscuos conocidos son eficaces para potenciar un péptido escasamente inmunogénico, tal como el decapéptido hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) (US 5.759.551). Se han desarrollado otros péptidos quiméricos que comprenden epítopos de Th promiscuos conocidos con péptidos sintéticos escasamente inmunogénicos para generar inmunógenos potentes (Borras-Cuesta et ál., 1987). Péptidos quiméricos de epítopos de células Th/B promiscuos bien diseñados son capaces de provocar respuestas de Th con respuestas por anticuerpos resultantes dirigidas al sitio de la célula B en la mayoría de los miembros de una población genéticamente diversa (US 5.759.551).

Una revisión de los epítopos de Th promiscuos muestra que varían en tamaño de aproximadamente 15 a 50 residuos de aminoácido (US 5.759.551) y a menudo comparten características estructurales comunes con secuencias prominentes específicas. Por ejemplo, una característica común es la presencia de hélices anfipáticas. Estas son estructuras alfa-helicoidales con residuos de aminoácido hidrófobos que dominan una cara de la hélice y residuos cargados y polares que dominan las caras circundantes (Cease et ál., 1987). Los epítopos de Th promiscuos conocidos también contienen frecuentemente patrones de aminoácidos primarios adicionales tales como un residuo cargado, -Gly-, seguidos por de dos a tres residuos hidrófobos, seguidos a su vez por un residuo cargado o polar (Rothbard y Taylor, EMBO J, 1988; 7:93-101). Los epítopos de Th con este patrón se denominan secuencias de Rothbard. También se ha encontrado que los epítopos de Th promiscuos obedecen a menudo a la regla del 1, 4, 5, 8, donde un residuo cargado positivamente es seguido por residuos hidrófobos en las posiciones cuatro, cinco y ocho, de acuerdo con una hélice anfipática que tiene las posiciones 1, 4, 5 y 8 situadas sobre la misma cara. Este patrón de aminoácidos hidrófobos y cargados y polares puede repetirse dentro de un solo epítopo de Th (Partidos et ál., J Gen Virol, 1991; 72:1293-99). La mayoría de, si no todos, los epítopos de células T promiscuos conocidos contienen al menos una de las periodicidades descritas anteriormente.

Epítopos de Th promiscuos derivados de patógenos incluyen epítopos de células T auxiliares del antígeno superficial y central de hepatitis B (Th de HBsAg y Th de HBc), los epítopos de células T auxiliares de toxina pertussis (Th de PT), los epítopos de células T auxiliares de toxina del tétanos (Th de TT), los epítopos de células T auxiliares de proteína F del virus del sarampión (Th de MVF), los epítopos de células T auxiliares de proteína de la membrana externa principal de *Chlamydia trachomatis* (Th de CT), los epítopos de células T auxiliares de la toxina de la difteria (Th de DT), los epítopos de células T auxiliares de circumsporozoitos de *Plasmodium falciparum* (Th de PF), los epítopos de células T auxiliares de fosfato de triosa isomerasa de *Schistosoma mansoni* (Th de SM) y los epítopos de células T auxiliares de TraT de *Escherichia coli* (Th de TraT). Las secuencias de estos epítopos de Th derivados de patógenos pueden encontrarse en US 5.759.551 como SEQ ID NOS:2-9 y 42-52 en la misma, en Stagg et ál., Immunology, 1993; 79;1-9; y en Ferrari et ál., J Clin Invest, 1991; 88: 214-222.

El uso de tales sitios derivados de patógenos para la inmunopotenciación de sitios de células B peptídicos para la aplicación a LHRH se ha descrito en US 5.759.551, para HIV en Greenstein et ál. (1992), para malaria en EP 0 427 347, para rotavirus en Borras-Cuesta et ál. (1987) y para sarampión en Partidos et ál. (1991).

Epítopos de Th útiles también pueden incluir epítopos de Th combinatorios. En Wang et ál. (WO 95/11998) se describió una clase particular de epítopos de Th combinatorios, una "biblioteca de antígenos sintéticos estructurada" (SSAL). Los epítopos de SSAL comprenden una multitud de epítopos de Th con secuencias de aminoácidos organizadas alrededor de un armazón estructural de residuos invariantes con sustituciones en posiciones específicas. Las secuencias de la SSAL se determinan al retener residuos relativamente invariantes mientras se varían otros residuos para proporcionar el reconocimiento de los diversos elementos de restricción del MHC. Esto puede ser efectuado por los residuos responsables de la estructura única del péptido de Th, y variando los restantes residuos de acuerdo con elementos de restricción del MHC conocidos. Están disponibles listas de las posiciones invariantes y variables con los aminoácidos preferidos de elementos de restricción del MHC para obtener motivos de unión al MHC. Estos pueden consultarse al diseñar epítopos de Th de SSAL (Meister et ál., Vaccine, 1995; 13:581-591).

Los miembros de la SSAL pueden producirse simultáneamente en una sola síntesis de péptidos en fase sólida en tándem con el epítopo de células B señalado como diana y otras secuencias. Las secuencias de la biblioteca de epítopos de Th se diseñan para mantener los motivos estructurales de un epítopo de Th promiscuo y, al mismo tiempo, acomodar la reactividad a una gama más amplia de haplotipos. Por ejemplo, el epítopo de Th degenerado "TH1 de SSAL1" (WO 95/11998) se modeló después de que se diseñara un epítopo promiscuo tomado de la proteína F del virus del sarampión (Partidos et ál., 1991). TH1 de SSAL1 se diseño para ser usado en tándem con un antígeno diana, LHRH. Como el epítopo del sarampión del que se derivaba, TH1 de SSAL1 se diseñó para seguir la secuencia de Rothbard y las reglas del 1, 4, 5, 8 y es una mezcla de cuatro péptidos:

1	5	10	15	
Asp-Leu-Ser-Asp-Leu-Lys-Gly-Leu-Leu-Leu-His-Lys-Leu-Asp-Gly-Leu				(SEQ ID NO:2)
Glu Ile	Glu Ile Arg	Ile Ile Ile	Arg Ile Glu	Ile (SEQ ID NO:3)
Val	Val	Val Val Val	Val	Val (SEQ ID NO:4)
Phe	Phe	Phe Phe Phe	Phe	Phe (SEQ ID NO:5)

Un residuo cargado Glu o Asp se añade en la posición 1 para incrementar la carga que rodea la cara hidrófoba de la Th. La cara hidrófoba de la hélice anfipática se mantiene a continuación mediante residuos hidrófobos en 2, 5, 8, 9, 10, 13 y 16. Las posiciones en 2, 5, 8, 9, 10 y 13 se varían para proporcionar una fachada con la capacidad de unirse a una amplia gama de elementos de restricción del MHC. El efecto neto de la característica de SSAL es aumentar la gama de sensibilidad inmunitaria de los elementos de restricción. El efecto neto de la característica de SSAL es aumentar la gama de sensibilidad inmunitaria del Th artificial (WO 95/11998).

Se han realizado otros intentos de diseñar “epítopos de Th artificiales ‘idealizados’” que incorporen todas la propiedades y características de epítopos de Th promiscuos conocidos. También se han construido varios inmunógenos peptídicos que comprenden estos epítopos de Th promiscuos artificiales, incluyendo aquellos en forma de SSAL. Los sitios de Th artificiales se han combinado con secuencias peptídicas tomadas de autoantígenos y antígenos extraños para proporcionar respuestas por anticuerpos mejoradas a dianas específicas para un sitio (WO 95/11998; Alexander et ál., Immunity, 1994, 1:751; Del Guercio et ál., Vaccine, 1997, 15:441) que se han descrito como altamente eficaces. Tales inmunógenos peptídicos se prefieren para proporcionar respuestas por anticuerpos eficaces y seguras, y por su inmunopotencia, que surge de una sensibilidad ampliamente reactiva impartida por los sitios de Th promiscuos idealizados descritos.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un epítopo de células T auxiliares seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31 y 32. El epítopo de células T auxiliares de la presente invención es útil para preparar una composición de péptido inmunogénico que comprende un epítopo de células T auxiliares artificial promiscuo conectado a un epítopo de células B peptídico sintético o “sitio antigénico diana”. El péptido inmunogénico comprende un epítopo de células T auxiliares (Th) artificial y un sitio antigénico diana que contiene epítopos de células B y, opcionalmente, una secuencia estimulante inmunitaria general. La presencia de un epítopo de Th artificial en el péptido inmunogénico imparte al mismo una capacidad para inducir una fuerte respuesta inmunitaria mediada por células T auxiliares con la producción de un alto nivel de anticuerpos dirigidos contra el "sitio antigénico diana". La presente invención proporciona además la sustitución ventajosa de proteínas portadoras y sitios de células T auxiliares derivados de patógenos en inmunógenos peptídicos establecidos con epítopos de células T auxiliares artificiales diseñados para mejorar su inmunogenicidad. Los nuevos inmunógenos peptídicos cortos con los epítopos de Th artificiales de la presente invención producen un alto nivel de anticuerpos dirigidos a hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) útil para la anticoncepción, el control de tumores dependientes de hormonas, la prevención del olor sexual y la inmunocastración.

Los epítopos de Th artificiales se desarrollaron empíricamente, conscientes de las reglas conocidas para predecir epítopos de células T promiscuos. En ausencia de una teoría unificadora que explique el mecanismo de los epítopos de Th, estas reglas "predictivas" sirven meramente como guías para diseñar epítopos de Th artificiales eficaces. Se ha encontrado que los epítopos de Th artificiales de la presente invención son útiles cuando están conectados a sitios antigénicos diana y opcionalmente con una secuencia inmunoestimulante. Los péptidos inmunogénicos de la presente invención pueden representarse mediante las fórmulas:

$(A)_n$-(Sitio antigénico diana)-$(B)_o$-$(Th)_m$-X

o

$(A)_n$-$(B)_o$-$(Th)_m$-$(B)_o$-(Sitio antigénico diana)-X

o

$(A)_n$-$(Th)_m$-$(B)_o$-(Sitio antigénico diana)-X

o

(Sitio antigénico diana)-$(B)_o$-$(Th)_m$-$(A)_n$-X

o

$(Th)_m$-$(B)_o$-(Sitio antigénico diana)-$(A)_n$-X

en las que: A es un aminoácido o una secuencia inmunoestimulante general, p. ej., el dominio de invasina (Inv) (SEQ ID NO:78), cuando n es más de uno, las A individuales pueden ser iguales o diferentes;

B se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos, -NHCH(X)CH_2SCH_2CO-, -NHCH(X)CH_2SCH_2CO(εN)Lys-, -NHCH(X)CH_2S-succinimidil(εN)Lys- y -NHCH(X)CH_2S-(succinimidil)-;

Th es un epítopo de células T auxiliares artificial seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31 y 32;

"Sitio antigénico diana" es un epítopo de células B deseado, un hapteno peptídico, o un análogo inmunológicamente reactivo del mismo;

X es un aminoácido α-COOH, -$CONH_2$;

n es de 0 a 10;

m es de 1 a 4; y

o es de 0 a 10.

Un ejemplo de un hapteno peptídico como un sitio antigénico diana es LHRH (SEQ ID NO: 77).

Las composiciones de la presente invención comprenden péptidos capaces de producir respuestas por anticuerpos en un huésped inmunizado a un sitio antigénico diana deseado. El sitio antigénico diana puede derivarse de organismos patógenos y autoantígenos normalmente inmunosilenciosos y dianas asociadas a tumores tales como LHRH.

De acuerdo con esto, las composiciones de la presente invención son útiles en muchas aplicaciones médicas y veterinarias diversas. Estas incluyen vacunas para proporcionar inmunidad protectora de una enfermedad infecciosa, inmunoterapias para el tratamiento de trastornos resultantes del mal funcionamiento de procesos fisiológicos normales, inmunoterapias para el tratamiento del cáncer y agentes para intervenir deseablemente en y modificar procesos fisiológicos normales.

Algunos de los antígenos diana que pueden conectarse covalentemente a los epítopos de Th de la presente invención incluyen: LHRH para anticoncepción, el control de tumores dependientes de hormonas y la inmunocastración; somatostatina para la promoción del crecimiento en animales de granja; IgE para el tratamiento de la alergia; el receptor CD4 de células T auxiliares para el tratamiento y la prevención de la infección por HIV y trastornos inmunitarios; proteína de la cápsida del virus de la fiebre aftosa como una vacuna para la prevención de la fiebre aftosa; antígeno de CS de Plasmodium para la prevención de la malaria; CETP para la prevención y el tratamiento de la arteriosclerosis; y epítopos del virión de HIV para la prevención y el tratamiento de infección por HIV.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Se han proporcionado epítopos de Th artificiales idealizados. Estos se modelan sobre dos epítopos de Th naturales conocidos y prototipos peptídicos de SSAL, divulgados en W0 95/11998. Las SSAL incorporan motivos de unión a la molécula del MHC combinatorios (Meister et ál., 1995) destinados a ocasionar amplias respuestas inmunitarias entre los miembros de una población genéticamente diversa. Los prototipos peptídicos de SSAL se diseñaron basándose en los epítopos de Th de los antígenos del virus del sarampión y el virus de la hepatitis B, modificados al introducir múltiples motivos de unión al MHC. El diseño de los otros epítopos de Th se modeló según otros epítopos de Th conocidos al simplificar, añadir y/o modificar múltiples motivos de unión al MHC para producir una serie de nuevos epítopos de Th artificiales. Los sitios de Th artificiales promiscuos recientemente adaptados se incorporaron en inmunógenos peptídicos sintéticos que tenían una variedad de sitios antigénicos diana. Los péptidos quiméricos resultantes eran capaces de estimular respuestas por anticuerpos eficaces en los sitios antigénicos diana.

El epítopo auxiliar artificial de SSAL mostrado en la Tabla 1b como "Th2 de SSAL2" (SEQ ID NOS:26-30) se modeló según un epítopo promiscuo procedente del antígeno superficial del virus de la hepatitis B, SEQ ID NO:23, correspondiente a los residuos 19-33 del antígeno superficial de la hepatitis B (HBsAg) (Greenstein et ál. 1992). El Th modélico derivado de patógeno se modificó hasta SEQ ID NO:24 al añadir tres Lisinas para mejorar la solubilidad en agua; la Asp C-terminal se suprimió en SEQ ID NO:25 para facilitar la síntesis de péptidos quiméricos en los que se introducía Gly-Gly como espaciadores. El Th2 de SSAL2 (SEQ ID NOs: 26-30) se modificó adicionalmente desde SEQ ID NO:24 al variar los residuos cargados positivamente de la misma en las posiciones 1, 2, 3 y 5 para variar la carga que rodea la cara hidrófoba de la estructura helicoidal. Un aminoácido cargado en la posición 3 variable también aportaba un residuo requerido para generar el epítopo de Th idealizado, Th2 de SSAL2 (SEQ ID NOS:26-30), que obedecía a la regla de 1, 4, 5, 8 (residuos subrayados). La cara hidrófoba de la hélice anfipática consiste en residuos hidrófobos en las posiciones 4, 6, 7, 10, 11, 13, 15 y 17 de SEQ ID NOS:26-30.

Los residuos de la secuencia de Rothbard se muestran en negrita para el prototipo Th2 de SSAL2 (SEQ ID NOS:26-30).

SEQ ID NOS:31 y 32 se simplificaron del prototipo Th2 de SSAL2 idealizado (SEQ ID NOS:26-30) según se describe anteriormente. Por ejemplo, residuos hidrófobos variables se reemplazaron por aminoácidos simples, tales como Ile o Met (SEQ ID NO : 31). La deleción de la Asp C-terminal se incorporó como una característica de SEQ ID NO: 32. Modificaciones adicionales incluían la sustitución de los extremos C mediante un motivo de unión al MHC común AxTxIL (Meister et ál, 1995).

Cada uno de los nuevos epítopos de Th artificiales, SEQ ID NOS: 31 y 32, se acoplaron a una variedad de sitios antigénicos diana para proporcionar inmunógenos peptídicos. Los sitios antigénicos diana incluyen las hormonas peptídicas LHRH y somatostatina, epítopos de células B procedentes de inmunoglobulina IgE, la proteína de la cápsida de VP1 del virus de la fiebre aftosa; el antígeno CS de Plasmodium falciparum; y proteína de transporte de ésteres colesterílicos (CETP). Los resultados muestran que se producían anticuerpos anti-sitio diana eficaces reactivos cruzadamente con un grupo diverso de autoantígenos y antígenos extraños. Lo más importante, las respuestas por anticuerpos se dirigían a los sitios antigénicos diana y no a los nuevos epítopos de Th. Los resultados para los nuevos inmunógenos peptídicos para LHRH se muestran en las Tablas 2 y 3. Los resultados de inmunogenicidad también mostraban que los anticuerpos producidos eran eficaces contra LHRH pero no contra los propios epítopos de Th. Ha de enfatizarse que la LHRH es un sitio antigénico diana carente de epítopos de células T (Sad et ál., Immunology, 1992; 76: 599-603 y US 5.759.551). Así, los nuevos epítopos de Th artificiales de la

presente invención representan una nueva clase de epítopos de células T auxiliares promiscuos.

Los epítopos de Th artificiales de la presente invención son secuencias contiguas de aminoácidos (aminoácidos naturales o no naturales) que comprenden un sitio de unión a moléculas del MHC clase II. Son suficientes para mejorar o estimular una respuesta por anticuerpos al sitio antigénico diana. Puesto que el epítopo de Th puede consistir en segmentos de aminoácidos continuos o discontinuos, no todos los aminoácidos del epítopo de Th están necesariamente implicados en el reconocimiento del MHC.

Los epítopos de Th promiscuos de la invención están conectados covalentemente al extremo N o C del sitio antigénico diana, para producir inmunógenos peptídicos quiméricos de Th/sitio de células B. El término "inmunógeno peptídico", según se usa en la presente memoria, se refiere a moléculas que comprenden epítopos de Th conectados covalentemente a un sitio antigénico diana, ya sea a través de enlaces peptídicos convencionales a fin de formar un solo péptido mayor o a través de otras formas de conexión covalente, tal como un tioéster. De acuerdo con esto, los epítopos de Th (SEQ ID NOS: 31 y 32) están enlazados covalentemente al sitio antigénico diana (p. ej., SEQ ID NO:77) bien a través de acoplamiento químico o bien a través de síntesis directa. Los epítopos de Th pueden enlazarse directamente al sitio diana o a través de un espaciador, p. ej., Gly-Gly o (ε-N)Lys. Además de separar físicamente el epítopo de Th del epítopo de células B (p. ej., SEQ ID NOS : 71, 72, 87, 92, 98, 99, 101, 102, 103, 106), el espaciador puede romper cualesquiera estructuras secundarias artificiales creadas por la conexión del epítopo de Th con el sitio antigénico diana y de ese modo eliminar cualquier interferencia con las respuestas de células Th y/o B. También puede ser útil un espaciador de bisagra flexible que mejora la separación de los dominios de Th e IgE. Las secuencias de bisagra flexible a menudo son ricas en prolina. Una bisagra flexible particularmente útil se proporciona mediante la secuencia Pro-Pro-Xaa-Pro-Xaa-Pro (SEQ ID NO:79) modelada a partir de la región de bisagra flexible encontrada en cadenas pesadas de inmunoglobulina. Xaa en la misma es cualquier aminoácido, preferiblemente ácido aspártico. La separación conformacional proporcionada por el espaciador (Véanse SEQ ID NOS:80 y 82) permite interacciones más eficaces entre el inmunógeno peptídico presentado y las células Th y las células B apropiadas. Así, las respuestas inmunitarias al epítopo de Th se mejoran para proporcionar una reactividad inmunitaria aumentada.

Los inmunógenos de conjugado peptídico de la invención opcionalmente también pueden comprender una secuencia peptídica inmunoestimulante general, por ejemplo, un dominio de una proteína invasina (Inv) procedente de la bacteria *Yersinia* spp (Brett et ál., Eur J Immunol, 1993, 23: 1608-1614). Esta propiedad inmunoestimulante resulta de la capacidad de este dominio de invasina para interactuar con las moléculas de integrina ß1 presentes en células T, particularmente células T inmunitarias o de memoria activadas. Una realización preferida del dominio de invasina (Inv) para la conexión a un epítopo de Th promiscuo se ha descrito previamente en US 5.759.551. El dominio de Inv mencionado tiene la secuencia:

Thr-Ala-Lys-Ser-Lys-Lys-Phe-Pro-Ser-Tyr-Thr-Ala-Thr-Tyr-Gln-Phe (SEQ ID NO:78)

o es un homólogo inmunoestimulante del mismo procedente de la región correspondiente en proteína de invasina de otras especies de *Yersinia*. Tales homólogos pueden contener así sustituciones, deleciones o inserciones de residuos de aminoácido para ajustarse a la variación de cepa a cepa, con tal de que los homólogos retengan las propiedades inmunoestimulantes. La secuencia inmunoestimulante general puede estar conectada opcionalmente al epítopo de Th con una secuencia espaciadora.

Los conjugados peptídicos de esta invención, es decir, inmunógenos peptídicos que comprenden los epítopos de Th artificiales descritos, pueden representarse mediante las fórmulas:

$(A)_n$-(Sitio antigénico diana)-$(B)_o$-$(Th)_m$-X

o

$(A)_n$-$(B)_o$-$(Th)_m$-$(B)_o$-(Sitio antigénico diana)-X

o

$(A)_n$-$(Th)_m$-$(B)_o$-(Sitio antigénico diana)-X

o

(Sitio antigénico diana)-$(B)_o$-$(Th)_m$-$(A)_n$-X

o

$(Th)_m$-$(B)_o$-(Sitio antigénico diana)-$(A)_n$-X

en las que: A es opcional y es un aminoácido o una secuencia inmunoestimulante general, cuando n >1, cada A puede ser igual o diferente;

B se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos, -NHCH(X)CH_2SCH_2CO-, -NHCH(X)CH_2SCH_2CO(ε-N)Lys-, - NHCH(X)CH_2S-succinimidil(ε-N)Lys- y -NHCH(X)CH_2S-(succinimidil)-;

Th es un epítopo de células T auxiliares artificial (SEQ ID NOS: 31 and 32) ;

"Sitio antigénico diana" es un epítopo de células B o un hapteno peptídico deseado, o un análogo del mismo;

X es un aminoácido α-COOH o -$CONH_2$;

n es de 0 a 10;

m es de 1 a 4; y

o es de 0 a 10.

Los inmunógenos peptídicos de la presente invención comprenden de aproximadamente 25 a aproximadamente 100 residuos de aminoácido, preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 80 residuos de aminoácido.

Cuando A es un aminoácido, puede ser cualquier aminoácido no presente en la naturaleza o cualquiera presente en la naturaleza. Aminoácidos no presentes en la naturaleza incluyen, pero no se limitan a, D-aminoácidos, β-alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido γ-aminobutírico, homoserina, citrulina y similares. Aminoácidos presentes en la naturaleza incluyen alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Por otra parte, cuando n es mayor de uno y dos o más de los grupos A son aminoácidos, entonces cada aminoácido puede ser independientemente igual o diferente.

Cuando A es una secuencia de dominio de invasina, es preferiblemente un epítopo inmunoestimulante procedente de la proteína invasina de una especie de *Yersinia* descrito en la presente como SEQ ID NO:77.

En una realización en la que n es 3, cada A es a su vez una secuencia de invasina (Inv), glicina y glicina.

B es opcional y es un espaciador que comprende uno o más aminoácidos presentes en la naturaleza o no presentes en la naturaleza. En $(B)_o$, cuando o > 1, cada B puede ser igual o diferente. B puede ser Gly-Gly o Pro-Pro-Xaa-Pro-Xaa-Pro (SEQ ID NO:79) o εNLys o -NHCH(X)CH_2SCH_2CO-, -NHCH(X)CH_2SCH_2CO(εNLys)-, -NHCH(X)CH_2S-succinimidil-εNLys- y -NHCH(X)CH_2S-(succinimidil)-. Th es un epítopo de células T auxiliares promiscuo seleccionado del grupo SEQ ID NOS: 31 y 32.

Los inmunógenos peptídicos de esta invención pueden elaborarse mediante métodos químicos bien conocidos por el técnico de experiencia normal. Véase, por ejemplo, Fields et ál., Capítulo 3 de Synthetic Peptides: A User's Guide, ed. Grant, W.H. Freeman & Co., Nueva York, NY, 1992, p.77. Los péptidos pueden sintetizarse usando la síntesis de péptidos en fase sólida de Merrifield automatizada bien con t-Boc o bien con Fmoc para proteger el α-NH_2 o aminoácidos de cadena lateral. Equipos para la síntesis de péptidos están disponibles comercialmente. Un ejemplo es un Applied Biosystems Peptide Synthesizer Modelo 430A o 431.

Después del montaje completo del inmunógeno peptídico deseado, la resina se trata de acuerdo con procedimientos estándar para segmentar el péptido de la resina y desbloquear los grupos funcionales en las cadenas laterales de aminoácido. El péptido libre se purifica mediante HPLC y se caracteriza bioquímicamente, por ejemplo, mediante análisis de aminoácidos, mediante secuenciación o mediante espectrometría de masas. Métodos de purificación y caracterización de péptidos son bien conocidos para un experto normal en la técnica.

Otros medios químicos para generar inmunógenos peptídicos que comprenden los epítopos de Th de la invención incluyen la ligación de péptidos haloacetilados y cisteinilados a través de la formación de una conexión "tioéter". Por ejemplo, puede añadirse una cisteína al extremo C de un péptido que contiene Th y el grupo tiol de la cisteína puede usarse para formar un enlace covalente con un grupo electrófilo tal como un grupo α- o ε-NH_2 modificado con cloroacetilo en N^{α} o uno derivado con maleimida de un residuo de lisina, que a su vez está enlazado al extremo N de un péptido del sitio antigénico diana. De este modo, pueden obtenerse conjugados de epítopos de Th/sitios de células B.

El inmunógeno en cuestión también puede polimerizarse. La polimerización puede efectuarse, por ejemplo, mediante la reacción entre glutaraldehído y los grupos -NH_2 de los residuos de lisina usando una metodología habitual. Mediante otro método, el inmunógeno lineal de Th/sitio de células B puede polimerizarse o copolimerizarse mediante la utilización de una cisteína adicional añadida al extremo N de los constructos lineales. El grupo tiol de la cisteína N-terminal puede usarse para la formación de un enlace "tioéter" con un aminoácido modificado con haloacetilo o un grupo α- o ε-NH_2 derivado con maleimida de un residuo de lisina que está enlazado al extremo N de una molécula con núcleo de polilisina ramificado (p. ej., K_2K, K_4K_2K o $K_8K_4K_2K$). El inmunógeno en cuestión también puede polimerizarse como una estructura ramificada a través de la síntesis del constructo peptídico deseado sobre una resina con núcleo de polilisina ramificado (Wang, et ál., Science, 1991; 254:285-288).

Los conjugados peptídicos sintéticos más largos pueden sintetizarse alternativamente mediante técnicas de clonación de ácidos nucleicos conocidas. Cualquier manual estándar sobre tecnología de clonación molecular proporciona protocolos detallados para producir péptidos que comprenden los epítopos de Th de la invención mediante la expresión de DNA recombinante y RNA. Para construir un gen que exprese un péptido de Th/sitio antigénico diana de esta invención (p. ej., SEQ ID NOS:36-64, 106, 71-76 y 80-82), la secuencia de aminoácidos se traduce inversamente en una secuencia de ácido nucleico, preferiblemente usando codones optimizados para el organismo en el que se expresará el gen. Posteriormente, se elabora un gen que codifica el péptido, típicamente al sintetizar oligonucleótidos solapados que codifican el péptido y elementos reguladores necesarios. El gen sintético se monta y se inserta en el vector de expresión deseado. Las secuencias de ácido nucleico sintéticas abarcadas por esta invención incluyen las que codifican los epítopos de Th de la invención y péptidos que comprenden esos epítopos de Th, los homólogos inmunológicamente funcionales de los mismos y constructos de ácido nucleico caracterizados por cambios en las secuencias no codificantes que no alteran las propiedades inmunogénicas del péptido o el epítopo de Th codificado por el mismo. El gen sintético se inserta en un vector de clonación adecuado y se obtienen y se caracterizan recombinantes. Los epítopos de Th y los péptidos que comprenden los epítopos de Th se expresan a continuación bajo condiciones apropiadas para el sistema de expresión y el huésped seleccionados. El epítopo de Th o el péptido se purifica y se caracteriza mediante métodos estándar.

Los inmunógenos peptídicos de la invención pueden usarse solos o en combinación para ocasionar respuestas por anticuerpos a hormona liberadora de hormona luteinizante. La hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) u hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) es una hormona maestra para la regulación de la reproducción sexual tanto en machos como en hembras. La LHRH regula la liberación de LH y FSH que a su vez controlan la espermatogénesis, la ovulación y el estro, el desarrollo sexual. La LHRH controla finalmente la secreción de las hormonas masculinas andrógeno y testosterona y la secreción de las hormonas femeninas estrógeno y progesterona, que son por sí mismas esenciales para la fertilidad en machos y hembras, respectivamente. (Basic and Clinical Endocrinology, eds. FS Greenspan y JD Baxter, Appleton & Lange:Norwalk CT. 1994).

Se sabe desde hace mucho que la inmunización activa contra LHRH ejerce múltiples efectos en machos, incluyendo LH y FSH disminuidas en suero y pituitaria, testosterona reducida en suero, supresión de la espermatogénesis y atrofia reversible de las gónadas y órganos sexuales accesorios. (Véanse, por ejemplo, Fraser et ál., J. Endocrinol., 1974; 63:399-405; Giri et ál., Exp. Molec. Pathol., 1991; 54:255-264; Ladd et ál., J. Reprod. Immunol., 1989; 15:85-101; y las referencias citadas en las mismas). La inmunización contra LHRH ha resultado útil como un anticonceptivo en machos y tiene potencial como un tratamiento para el cáncer de próstata (Thau, Scand J Immunol, 1992; 36 Supl 11:127-130; y US 5.759.551).

La intervención inmunitaria sobre el eje gonadal hipotalopituitario mediante inmunización activa contra LHRH también puede usarse para inhibir hormonas sexuales en hembras. Puesto que la LHRH regula la producción de FSH por la pituitaria anterior que a su vez regula la producción de estrógeno por los ovarios, bloqueando la acción de LHRH, es una terapia para enfermedades dependientes de hormonas sexuales en mujeres. Por ejemplo, el desarrollo y el mantenimiento ectópico de tejidos endometriales fuera de la musculatura uterina está mediado por estrógeno. Por lo tanto, bloquear la acción de LHRH es útil como un tratamiento de la endometriosis. Por otra parte, por analogía con el cáncer de próstata, los tumores de la mama conducidos por estrógeno también deben ser sensibles a inmunoterapia de LHRH. En efecto, se ha observado que una vacuna que induce anti-LHRH reduce eficazmente los niveles en suero de LH y FSH en mujeres, una ilustración del potencial de este método para efectuar la anticoncepción y el tratamiento de trastornos dependientes de hormonas (Gual et ál., Fertility and Sterility, 1997; 67: 404-407).

Además de proporcionar tratamientos para un número de enfermedades importantes e infertilidad reversible tanto en hombres como en mujeres, la inmunoterapia basada en LHRH proporciona un medio para la anticoncepción reversible en animales macho y hembra (p. ej. perros, gatos, caballos y conejos) así como mitiga el comportamiento no deseable conducido por andrógeno, tal como calor, marcaje territorial y agresión.

Finalmente, la castración inmunológica (p. ej., inhibición basada en anticuerpos de la acción de LHRH) tiene aplicación en la industria ganadera. La carne de animales macho no se procesa en cortes primarios debido a la presencia de un aroma y sabor desagradables, conocidos como olor sexual. El olor sexual se elimina convencionalmente mediante castración mecánica; sin embargo, la castración de animales alimentarios macho ya

no se considera humanitaria. Es más, la castración mecánica da como resultado un comportamiento de crecimiento más pobre y lesiones en partes del cuerpo, también conocidas como marcas de la res muerta, en comparación con los machos no castrados. Mientras tanto, el comportamiento de crecimiento y las marcas de la res muerta de los animales inmunocastrados están menos afectados que los de animales castrados (Bonneau et ál., J Anim Sci, 1994; 72: 14-20 y US 5.573.767). Por lo tanto, la castración inmunológica es preferible a la castración mecánica.

La LHRH (o GnRH) es una automolécula que debe conectarse a un componente de Th a fin de generar anticuerpos anti-LHRH (Sad et ál., Immunology, 1992; 76: 599-603). Se han probado varias formas inmunogénicas de LHRH. Por ejemplo, se han producido inmunógenos de LHRH mediante conjugación a proteínas portadoras o conectados mediante síntesis peptídica a potentes sitios de Th derivados de organismos patógenos (W0 94/07530, US 5.759.551, Sad et ál., 1992). Inmunógenos peptídicos de LHRH mejorados que comprenden LHRH y epítopos de Th artificiales se ejemplifican en los EJEMPLOS 1-3.

Esta invención también proporciona composiciones que comprenden sistemas de aporte farmacéuticamente aceptables para la administración de los inmunógenos peptídicos. Las composiciones comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de uno o más de los inmunógenos peptídicos de esta invención. Cuando se formulan así, las composiciones de la presente invención que comprenden LHRH o un homólogo de la misma como sitio antigénico diana se usan para el tratamiento del cáncer de próstata, la prevención del olor sexual, la inmunocastración de animales, el tratamiento de la endometriosis, el cáncer de mama y otros cánceres ginecológicos afectados por las hormonas esteroideas gonadales, y para la anticoncepción en machos y hembras. La utilidad de los péptidos de la invención que tienen sitios antigénicos diana distintos de LHRH variarán de acuerdo con la especificidad del sitio antigénico diana.

Los inmunógenos peptídicos de la invención pueden formularse como composiciones inmunogénicas usando adyuvantes, emulsionantes, portadores farmacéuticamente aceptables u otros ingredientes proporcionados habitualmente en composiciones de vacuna. Adyuvantes o emulsionantes que pueden usarse en esta invención incluyen alumbre, adyuvante incompleto de Freund (IFA), liposina, saponina, escualeno, L121, Emulsigen, lípido monofosforilado A (MPL), bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA), QS21, e ISA 720, ISA 51, ISA 35 o ISA 206, así como los otros adyuvantes y emulsionantes eficaces. Tales formulaciones son fácilmente determinadas por un experto normal en la técnica y también incluyen formulaciones para liberación inmediata y/o liberación sostenida. Las presentes vacunas pueden administrarse mediante cualquier ruta conveniente, incluyendo una ruta subcutánea, oral, intramuscular, intraperitoneal u otra parenteral o enteral. De forma similar, los inmunógenos pueden administrarse en una sola dosis o en dosis múltiples. Los esquemas de inmunización son fácilmente determinados por un operario de experiencia normal.

La composición de la presente invención contiene una cantidad eficaz de uno o más de los inmunógenos peptídicos de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Tal composición en una forma unitaria de dosificación adecuada contiene de aproximadamente 0,5 µg a aproximadamente 1 mg del inmunógeno peptídico por kg de peso corporal. Cuando se aporta en múltiples dosis, puede dividirse convenientemente en una cantidad apropiada por dosis. Por ejemplo, la dosis, p. ej. 0,2-2,5 mg; preferiblemente 1 mg, puede administrarse mediante inyección, preferiblemente de forma intramuscular. Esto puede estar seguido por dosis repetidas (refuerzo). La dosificación dependerá de la edad, el peso y la salud general del sujeto, como en bien conocidos en las técnicas de las vacunas y la terapéutica.

Vacunas que comprenden mezclas de los inmunógenos peptídicos en cuestión, particularmente mezclas que comprende sitios de Th derivados de Th de HBsAg, es decir, SEQ ID NOS: 31 y 32, pueden proporcionar una inmunoeficacia mejorada en una población más amplia y así proporcionar una respuesta inmunitaria aumentada a LHRH u otro sitio antigénico diana.

La respuesta inmunitaria a conjugados peptídicos de Th/LHRH u otros conjugados de Th/sitio antigénico diana puede aumentarse mediante aporte a través del atrapamiento en o sobre micropartículas biodegradables del tipo descrito por O'Hagan et ál. (Vaccine, 1991; 9:768). Los inmunógenos pueden encapsularse con o sin un adyuvante, y tales micropartículas pueden portar un adyuvante inmunoestimulante. Las micropartículas también pueden coadministrarse con los inmunógenos peptídicos para potenciar respuestas inmunitarias

Como un ejemplo específico, la invención proporciona un método para inducir anticuerpo anti-LHRH al administrar composiciones farmacéuticas que comprenden inmunógenos peptídicos de Th/LHRH a un mamífero durante un tiempo y bajo condiciones que producen un estado infértil en el mamífero. Según se usa en la presente memoria, un estado infértil es aquel estado que evita la concepción. La infertilidad puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica, p. ej. la evaluación de la espermatogénesis o la ovulación, así como mediante modelado estadístico de datos de animales experimentales. Otros indicadores de infertilidad en machos incluyen la reducción de testosterona en suero hasta niveles de castración e involución de los testículos. La dosis apropiada de la composición es de aproximadamente 0,5 µg a aproximadamente 1 mg de cada péptido por kg de peso corporal. Esta dosificación puede dividirse convenientemente en cantidades apropiadas.

De forma similar, las realizaciones de LHRH de esta invención se refieren a un método para tratar un carcinoma dependiente de andrógenos al administrar las composiciones peptídicas en cuestión al mamífero durante un tiempo y bajo condiciones que prevengan el crecimiento adicional del carcinoma. La dosis unitaria apropiada es de aproximadamente 0,5 µg a 1 mg de cada péptido por kg de peso corporal. Esta se divide convenientemente en cantidades apropiadas por aplicación cuando se administra en múltiples dosis.

Además, las realizaciones de LHRH se refieren a un método para mejorar las cualidades organolépticas y la ternura de la carne procedente de animales domésticos mientras que mantiene el comportamiento de crecimiento ventajoso de los animales enteros. Las hormonas esteroideas androgénicas de los animales enteros son responsables del crecimiento rápido pero su presencia está acompañada por esteroides no androgénicos (p. ej., 5□androstenona) y escatol (un producto del metabolismo microbiano del triptófano) que imparten sabor y aroma desagradables a la carne. Esta condición, conocida como olor sexual en el caso de los cerdos, resta valor a la calidad de la carne. Sin embargo, mediante la inmunización activa de machos jóvenes con composiciones que comprenden péptidos de la invención, en un esquema que efectúa la inmunocastración en las semanas inmediatamente anteriores a la matanza, pueden retenerse muchas de las ventajas de los machos no castrados mientras que se proporciona carne con sabor y ternura mejorados.

La eficacia de la composición peptídica de la presente invención que comprende el sitio antigénico diana, LHRH, puede probarse mediante el procedimiento descrito en los Ejemplos 1-3.

Otros sitios antigénicos diana que también se han usado en los inmunógenos peptídicos de la presente invención se describen en los Ejemplos 4-9. Las composiciones de inmunógenos peptídicos son útiles para inducir respuestas inmunitarias en mamíferos contra antígenos diana específicos y proporcionan la prevención o el tratamiento de una enfermedad, o intervienen para modificar útilmente las condiciones fisiológicas.

EJEMPLO 1

INMUNIZACIÓN DE RATAS CON INMUNÓGENOS PEPTÍDICOS QUE CONTIENEN LHRH

Los péptidos listados en las Tablas 2a y 2b se sintetizaron y se probaron como se describe posteriormente.

A. Síntesis de péptidos. Los péptidos listados en las Tablas 2a y 2b se sintetizaron individualmente mediante la técnica de síntesis en fase sólida de Merrifield en sintetizadores de péptidos automatizados de Applied Biosystems (Modelos 430, 431 y 433A) usando la química del Fmoc. La preparación de constructos peptídicos que comprenden bibliotecas de antígenos sintéticos estructuradas (SSAL), p. ej., el sitio Th artificial denominado SEQ ID NO:6-8, se efectuó al proporcionar una mezcla de los aminoácidos deseados seleccionados para una posición dada. Después del montaje completo del péptido o los péptidos combinatorios deseados, la resina se trató de acuerdo con un procedimiento estándar usando ácido trifluoroacético para segmentar el péptido de la resina y desbloquear los grupos protectores de las cadenas laterales de aminoácido.

Los péptidos segmentados, extraídos y lavados se purificaron mediante HPLC y se caracterizaron mediante espectrometría de masas y HPLC en fase inversa.

Se sintetizaron péptidos para tener el péptido antigénico diana de LHRH (SEQ ID NO:77) en tándem con cada uno de los epítopos de Th diseñados según se lista en las Tablas 2a y 2b. Los epítopos de Th eran los mostrados en las Tablas 1a y 1b (SEQ ID NOS:6, 12-19, 105, 20-22 y 31-35). Con propósitos de comparación, también se sintetizaron y se probaron inmunógenos peptídicos de la técnica anterior que comprenden sitios Th modélicos (SEQ ID NOS:36 y 65) y sitios Th prototípicos (SEQ ID NOS:37-40 y 66-70) y un conjugado de péptido/proteína portadora, KLH-LHRH (Tabla 2b). Los constructos peptídicos Th/LHRH e Inv/Th/LHRH se sintetizaron con gly-gly como un espaciador entre el sitio antigénico diana y el epítopo de Th, y con o sin gly-gly como un espaciador entre el epítopo de Th y la secuencia inmunoestimulante de Inv. Además, SEQ ID NOS:80-82 se sintetizaron con SEQ ID NO:79 como un espaciador entre el sitio Th y el sitio antigénico diana. Los resultados para los inmunógenos peptídicos SEQ ID NOS:80-82 no están todavía disponibles.

B. Protocolos para la inmunización. Los inmunógenos peptídicos de LHRH mostrados en las Tablas 2a y 2b se evaluaron sobre grupos de 5 a 10 ratas según se especifica mediante el protocolo de inmunización experimental esbozado posteriormente y mediante ensayos serológicos para la determinación de la inmunogenicidad sobre muestras de suero:

Animales:	ratas Sprague-Dawley, macho
Tamaño del Grupo:	5-10 ratas/grupo
Inmunógeno:	inmunógeno peptídico individual
Dosis:	cantidad en µg según se especifique, en 0,5 ml
Adyuvantes:	(1) Adyuvante incompleto de Freund (IFA);
	o
	(2) Alumbre (Hidróxido de aluminio);
	Un adyuvante por inmunógeno por grupo
Esquema de Dosis:	0, 3 y 6 semanas o 0, 3 semanas según se especifique
Ruta:	intramuscular

Se recogió sangre y se procesó en suero, y se almacenó antes del ELISA y el radioinmunoensayo (RIA) para la determinación de valores de testosterona en suero.

C. Método para la determinación de la inmunogenicidad. Las actividades de los anticuerpos se determinaron mediante ELISA (ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas) usando placas de microvaloración de fondo plano de 96 pocillos que se revistieron con el péptido de LHRH (SEQ ID NO:77) como inmunoabsorbente. Partes alícuotas (100 µl) de la solución de inmunógeno peptídico a una concentración de 5 µg/ml se incubaron durante 1 hora a 37˚C. Las placas se bloquearon mediante otra incubación a 37˚C durante 1 hora con una solución de gelatina al 3%/PBS. A continuación, las placas bloqueadas se secaron y se usaron para el ensayo. Partes alícuotas (100 µl) de los inmunosueros de prueba, partiendo de una dilución 1:100, en un tampón de dilución de muestras y diluciones en serie de diez veces, se añadieron a las placas revestidas con péptido. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37˚C.

Las placas se lavaron seis veces con TWEEN® al 0,05% en PBS. Se añadieron 100 µl de anticuerpo anti(IgG de rata) caprino marcado con peroxidasa de rábano picante a diluciones apropiadas en tampón de dilución de conjugados (tampón de fosfato que contiene NaCl 0,5 M, y suero caprino normal). Las placas se incubaron durante 1 hora a 37˚C antes de lavarse como anteriormente. Se añadieron a continuación partes alícuotas (100 µl) de solución de sustrato de o-fenilendiamina. Se dejó que se desarrollara el color durante 5-15 minutos antes de que la reacción cromática enzimática se detuviera mediante la adición de 50 µl de H_2SO_4 2 N. La A_{492nm} del contenido de cada pocillo se leyó en un lector de placas. Las valoraciones de ELISA se calcularon basándose en el análisis de regresión lineal de las absorbancias, con un corte A_{492nm} fijado en 0,5. Este valor de corte era riguroso ya que los valores para muestras de control normales diluidas manejadas con cada ensayo eran menores de 0,15.

D. Determinación de la eficacia de los inmunógenos. Los inmunógenos se evaluaron con respecto a la eficacia mediante RIA para los valores de testosterona en suero. Los niveles de testosterona en suero se midieron usando un estuche para RIA de Diagnostic Products (Los Ángeles, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El límite de detección inferior para la testosterona variaba de 0,01 a 0,03 nmol/l. Cada muestra se analizó por duplicado. Las muestras de suero se puntuaron como nivel de castración cuando el nivel de testosterona estaba por debajo de los límites de detección y como "cerca de la castración" a < 0,1 nmol/l. Los resultados se verificaron mediante comparación con niveles de testosterona en suero procedente de ratas castradas mecánicamente.

E. Resultados. Los resultados procedentes de muestras de suero recogidas a las semanas 10 u 12 se presentan en las Tablas 2a y 2b. (Los péptidos de las Tablas están ordenados por la derivación de sus epítopos de Th, como se hacía en las Tablas 1a y 1b.) Los datos de ELISA (no mostrados) demostraban que la inmunización por todos los inmunógenos listados daba como resultado respuestas por anticuerpos en todos los animales. La eficacia de las respuestas por anticuerpos anti-péptido, resultantes de la reactividad cruzada con LHRH natural, se estableció al determinar los niveles de testosterona en suero. Esos resultados se resumen en las columnas de la derecha de las Tablas 2a y 2b como número de animales que tienen testosterona en suero a niveles de castración por animales totales del grupo.

Los resultados muestran que los péptidos de la invención, ya sea con un IFA adyuvante fuerte y administrados 3 veces a una alta dosis, o con un alumbre adyuvante débil y administrados dos veces a una dosis baja, eran eficaces para producir la inmunocastración. La inmunogenicidad de los sitios de Th SEQ ID NOS:6, 9 y 15 se aumentó

mediante la adición de la secuencia del dominio de Inv. Véanse las comparaciones entre SEQ ID NOS:41, 44 y 45, 46 y SEQ ID NOS:53 y 60. No obstante, la adición de las secuencias del dominio de Inv no siempre da como resultado un aumento en la inmunogenicidad, p. ej., compárense SEQ ID NOS:51 y 52, SEQ ID NOS:61 y 62, y SEQ ID NOS:74 y 75. Dos péptidos de la invención (SEQ ID NOS: 50 y 76) se probaron solo a una dosis baja con el adyuvante débil y no provocaban la inmunocastración, pero los resultados con otros péptidos, p. ej., SEQ ID NO:73, indican que habrían sido eficaces a una dosis superior con un adyuvante fuerte. Muchos de los inmunógenos peptídicos de LHRH de la presente invención eran significativamente más eficaces para inducir la inmunocastración que el conjugado de péptido-proteína portadora KLH/LHRH o los inmunógenos peptídicos que tienen Th de HBsAg (SEQ ID Nos:65 y 66-70). Véase la Tabla 2b.

Además, los inmunógenos peptídicos de la presente invención se sintetizaban más fácilmente que la proteína de conjugado de péptido/portador o los inmunógenos peptídicos que tienen los epítopos de Th prototípicos más complejos de la técnica anterior (SEQ ID NOS:2-5 o 26-30). Con todo, se obtenía una inmunogenicidad equivalente o aumentada con menos dosis o inferiores con los inmunógenos peptídicos que comprenden los epítopos de Th artificiales de la presente invención.

Un análisis serológico de las respuestas por anticuerpos de ratas que habían recibido los péptidos de LHRH de la invención demostraba que las respuestas por anticuerpos a los péptidos estaban dirigidas específicamente al sitio antigénico diana y no a los nuevos sitios Th artificiales. Esta es una ventaja clara de estos inmunógenos peptídicos sobre los conjugados de péptido/proteína portadora convencionales. Muestras de suero procedentes de ratas que se habían inmunizado con los inmunógenos peptídicos mostrados en la Tabla 3, con dosis de 25 µg sobre alumbre a las 0 y 3 semanas, se compararon con respecto a las reactividades con el sitio diana de LHRH y con el epítopo de Th mediante ELISA usando el péptido de LHRH (SEQ ID NO:77) y el epítopo de Th apropiado (SEQ ID NO:15 y 18, 31 o 34) como sustratos en fase sólida en ELISA basados en péptidos. Los resultados para estos ELISA se presentan en la Tabla 3 que muestra que a pesar de la sensibilidad a alta concentración al resto de LHRH de los conjugados peptídicos de Th/LHRH, las reactividades para los sitios Th artificiales estaban a niveles de fondo.

EJEMPLO 2

MEZCLA DE PÉPTIDOS DE LHRH PARA LA INDUCCIÓN DE UNA INMUNOCASTRACIÓN MÁS AMPLIA EN RATAS

Establecer las eficacias relativas de los diversos constructos de epítopo de Th artificial/LHRH que se muestran anteriormente en el Ejemplo 1 permitía la selección de los más eficaces para el montaje en una mezcla de péptidos de inmunogenicidad mejorada. Una mezcla de inmunógenos peptídicos de Th/LHRH es más eficaz que cualquier péptido individual dentro de la mezcla (US 5.795.551). Por otra parte, una mezcla de constructos individuales que portan epítopos de Th promiscuos derivados de Th de MVF (SEQ ID NO:1) y Th de HBsAg (SEQ ID NOS:23-25) proporciona una respuesta más amplia en una población genéticamente diversa que una composición peptídica que tienen epítopos de Th derivados solo de un epítopo de Th promiscuo. Por lo tanto, se montó una composición peptídica que comprendía una mezcla de péptidos de la invención derivados de Th de MVF y Th de HBSAg y la eficacia de la mezcla se probó y se comparó con composiciones que comprendían los péptidos individuales de la mezcla.

Grupos de 6 u 8 ratas macho se inmunizaron con dosis de 25 µg (dosis total) de las composiciones peptídicas indicadas en la Tabla 4. Los péptidos de la mezcla se combinaron en proporciones equimolares. Los péptidos se formularon con alumbre al 0,4% y se administraron intramuscularmente durante las semanas 0 y 3. Los niveles de testosterona en suero se siguieron durante 22 semanas y los resultados se puntuaron como el número de animales con nivel de castración de testosterona por número total de animales del grupo. Estos resultados se presentan en la Tabla 4. Demostraban que las dosis bajas de composiciones peptídicas, dadas con un adyuvante relativamente ineficaz, alcanzaban niveles de castración de testosterona para la semana 5, y que esta respuesta se mantenía a lo largo de la semana 22. Por otra parte, la mezcla de péptidos se comportaba significativamente mejor que una de las composiciones peptídicas que comprendían un péptido individual. Puede suponerse que la mezcla habría mostrado una inmunogenicidad aumentada sobre la otra composición, ya que los números de animales experimentales habían sido mayores y más representativos de una población verdadera.

EJEMPLO 3

MEZCLA DE PÉPTIDOS DE LHRH Y FORMULACIONES PARA LA INMUNOCASTRACIÓN DE CERDOS

Se ha mostrado que un grupo de animales de prueba es más ampliamente sensible a una mezcla de inmunógenos peptídicos con diferentes epítopos de Th que a una composición que contiene un solo inmunógeno peptídico. Sin embargo, para la prevención del olor sexual en cerdos, es necesario que los inmunógenos peptídicos de LHRH inmunopotentes sean suficientemente potentes para ocasionar la respuesta deseada en la mayoría de los animales mientras que sean aceptables para el uso en animales alimentarios. Es importante que no haya un efecto inmediato

adverso para la velocidad de crecimiento y que no se deje residuo del inmunógeno peptídico o el adyuvante en la carne o se provoquen lesiones en las partes comercializables de la res muerta.

A fin de evaluar la inmunogenicidad útil de una mezcla de péptidos de LHRH de la invención, la mezcla se administró a cerdos en tres formulaciones bien en alumbre al 0,4%, IFA o ISA 206/DDA. ISA 206/DDA es una emulsión de aceite/agua en la que se dispersa bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) en MONTANIDE® ISA 206 a 30 mg/ml (MONTANIDE® ISA 206 es una solución oleosa metabolizable suministrada por SEPPIC Inc. de Fairfield, NJ). La suspensión oleosa se emulsifica a continuación a una relación en volumen de 1:1 en una solución acuosa de péptido que se ha ajustado con respeto a la concentración de péptido a fin de proporcionar la dosis de péptido deseada en 0,5 ml de la preparación final.

El protocolo de inmunización era como sigue:

Animales:	Cerdos cruzados Yorkshire Hampshire, machos, 3-4 semanas de edad no castrados
Tamaño del Grupo:	2-3 animales/grupo
Inmunógeno:	Mezcla equimolar de SEQ ID NOS:57-58, 71 y 75
Dosis:	400 µg de péptido o péptidos en 0,5 ml
Adyuvantes:	(1) Alumbre al 0,4%,
	(2) IFA,
	(3) ISA 206/DDA
Esquema:	0, 4 y 13 semanas o 0, 4 semanas
Ruta:	Intramuscular

La eficacia de las formulaciones de inmunógeno peptídico se verificó al ensayar las muestras de suero de cerdo recogidas a lo largo del transcurso del estudio, los resultados se presentan gráficamente en las Figs 1-3. Los ensayos incluían un RIA para la determinación de la presencia de anticuerpos reactivos cruzadamente con LHRH natural en solución, según se describe posteriormente, y un RIA para testosterona según se describe en el EJEMPLO 1. Además, el área media de la sección transversal de los testículos se determinó mediante palpación con un calibre.

Antisueros para el RIA anti-LHRH se diluyeron 1:100 en albúmina de suero bovino (BSA) al 1%, pH 7,4. Un volumen igual de sueros diluidos se añadió hasta 100 µl de [^{125}I]-LHRH (New England Nuclear Company, Boston, MA) diluida en BSA al 1% para contener aproximadamente 15.000 cpm para 5,25 pg de LHRH. La solución se incubó durante la noche a temperatura ambiente y LHRH unida a anticuerpo se precipitó con 400 µl de polietilenglicol al 25% (PM 8.000) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7,6, y 200 µl de 5 mg/ml de gammaglobulina bovina en PBS. Las concentraciones de anticuerpo anti-LHRH se expresan como nmol de LHRH yodada unida por litro de suero (Ladd et ál., 1988, Am J Reprod Immunol, 17:121-127).

Los cerdos respondían inmunológicamente a las tres formulaciones, según se muestra por la presencia de anticuerpo anti-LHRH y la supresión concomitante de testosterona.

La preparación de alumbre era la menos eficaz, produciendo un nivel inferior de respuestas por anticuerpos. Un animal de este grupo no alcanzaba el nivel de castración de testosterona hasta la semana 11 y ninguno de los dos animales de este grupo manifestaba una involución completa de los testículos. Los animales del grupo del alumbre no recibían inmunizaciones en la semana 13, y los efectos del tratamiento se invertían.

Los animales del grupo de IFA presentaban niveles superiores de respuestas por anticuerpos, alcanzando y manteniendo dos de los tres un nivel de castración de testosterona para la semana 6. Sin embargo, al administrar una dosis de refuerzo a la semana 13, el cerdo que menos respondía de los tres fallaba en la respuesta e invertía hasta un nivel normal de testosterona y a testículos no involucionados. Los dos animales menos sensibles de este grupo alcanzaban una involución completa de los testículos para la semana 23.

Ambos cerdos del grupo de ISA 206/DDA proporcionaban niveles altos y relativamente uniformes de respuestas por anticuerpos. Los niveles de inmunocastración de testosterona en este grupo se alcanzaban para la semana 9 y se

mantenían establemente hasta la semana 12. Ambos animales eran sensibles al refuerzo en la semana 13 y mantenían niveles de castración de testosterona. Los testículos de ambos animales eran indetectables para la semana 23.

A partir de los resultados obtenidos, la formulación de ISA 206/DDA es así la más preferida para la prevención del olor sexual. Se alcanzan efectos altos y uniformes sobre los dos animales con la formulación de ISA 206/DDA. Por otra parte, la formulación es más aceptable en cerdos en comparación con la formulación de IFA que provocaba lesiones, aparentemente debido a que la formulación de IFA no se metaboliza fácilmente.

EJEMPLO 4

INMUNÓGENOS DE SOMATOSTATINA PARA LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO EN ANIMALES DE GRANJA

Los inmunógenos de la invención pueden usarse individualmente o en combinación para producir anticuerpos para somatostatina. La somatostatina es un inhibidor principal del crecimiento somático total. Es una hormona peptídica cíclica de catorce aminoácidos (SEQ ID NO: 80, Tabla 5) y su estructura se conserva a través de las especies. La somatostatina inhibe la liberación de muchas hormonas gastrointestinales así como inhibe la liberación de hormona del crecimiento, insulina y hormonas tiroideas, afectando de ese modo tanto a la capacidad del animal para absorber nutrientes como a su capacidad subsiguiente para dirigir estos nutrientes al crecimiento tisular. Se ha mostrado que la neutralización de somatostatina mediante inmunización estimula el crecimiento en ovejas, cabras, pollos y cerdos (Spencer, Dom Anim Endocr, 1986; 3:55; Spencer et ál., Reprod Nutr Develop, 1987; 27(2B):581; Laarveld et ál., Can J Anim Sci, 1986, 66:77) y ganado vacuno (Lawrence et ál., J Anim Sci, 1986, 63(Suppl): 215).

Además de estimular la velocidad de crecimiento y conducir a una reducción de 20% en el tiempo de alzado de manos (Spencer, 1986; Spencer et ál., 1987) la inmunización activa contra somatostatina también tiene un efecto beneficioso sobre la eficacia de conversión de alimento, es decir, además del ahorro en pienso en virtud del crecimiento más rápido, los animales utilizan realmente su alimento más eficazmente durante el período de crecimiento, al menos en parte como resultado de cambios en la movilidad intestinal (Fadlalla et ál., J Anim Sci, 1985, 61:234). El tratamiento no tiene ningún efecto notable sobre la composición de la res muerta (Spencer et ál., 1987) pero existen indicaciones de que, cuando se sacrifican, a iguales pesos, los animales tratados pueden ser menos grasos y más magros. Reuniendo todos los datos experimentales, la inmunización activa eficaz a somatostatina (según se evidencia por la presencia de anticuerpos anti-somatostatina) es una herramienta potente, segura y eficaz para mejorar el crecimiento (Spencer, 1986).

Sin embargo, la somatostatina es un péptido corto y un autoantígeno y no es inmunogénica por sí misma (véase la Tabla 5). No obstante, varias formas inmunogénicas de somatostatina se han diseñado y probado según se presenta en la bibliografía. Por ejemplo, la somatostatina se ha conjugado con portadores proteínicos para mejorar la inmunopotencia. Sin embargo, los portadores proteínicos son demasiado costoso para un uso económico en animales de granja. Es más, la inmunización eficaz con somatostatina depende mucho de cómo se conjugue el portador a la somatostatina. En la mayoría de los casos, se emplea glutaraldehído como el portador para acoplar con los residuos de lisina presentes en la somatostatina y el glutaraldehído. Las dos lisinas en la somatostatina disponibles para el acoplamiento residen dentro de un bucle funcional 12-mero. La conjugación de estas lisinas puede dar como resultado un pérdida significativa de la estructura de la somatostatina natural. Como resultado, se reduce la reactividad cruzada a somatostatina natural con los anticuerpos. Por otra parte, con portadores proteínicos, la mayoría de las respuestas inmunes se dirige al portador más que a la somatostatina (la masa de la molécula o moléculas portadoras es mucho mayor que la de la somatostatina). La inmunización con conjugados portadores de péptido pequeño ha conducido frecuentemente a inmunosupresión inducida por el portador (Schutz et ál., J Immunol, 1985, 135:2319). De acuerdo con esto, hay una necesidad de un modo diferente de mejorar la inmunogenicidad que sea más adecuado para el uso en animales de granja. La vacuna debe ser económica y capaz de estimular una respuesta inmunitaria temparana y fuerte a somatostatina y evitar la inmunosupresión inducida por portador.

Los inmunógenos peptídicos de somatostatina/epítopo de Th mostrados en la Tabla 5 se sintetizaron y se administraron a ratas. El efecto de la inmunización se determinó mediante ELISA de péptidos según se describe en el EJEMPLO1. Se usó somatostatina ciclada en uno de los inmunógenos peptídicos (SEQ ID NO:80) probados y en el ensayo como el sustrato en fase sólida en ELISA. Para ciclar completamente la somatostatina, el péptido segmentado se disolvió en DMSO al 15% en agua durante 48 h para facilitar la formación de enlaces disulfuro interiores.

A partir de los resultados mostrados en la Tabla 5, está claro que la somatostatina sola carece de inmunogenicidad mientras que los inmunógenos peptídicos de la presente invención producían altas concentraciones de anticuerpos específicos para somatostatina en los huéspedes inmunizados. Las respuestas anti-somatostatina generadas para SEQ ID NO:81-83, SEQ ID NO:84-86 y SEQ ID NO:87 con epítopos de Th (SEQ ID NOS:6,7,8 y 31) muestran la eficacia de los epítopos de Th. Sin embargo, una comparación estrecha con las concentraciones de anticuerpos para la inmunogenicidad muestra que es preferible poner el epítopo de Th en el extremo C. Los resultados para SEQ

ID NOS:84-86 con el epítopo de Th como SEQ ID NOS:6,7,8 muestran que se producía un nivel temprano superior de anticuerpos. Los resultados de la Tabla 5 ilustran la fuerte respuesta por anticuerpos a la inmunización con composiciones de Th/somatostatina artificiales, estableciendo de ese modo la utilizad de estos péptidos de esta invención para la promoción del crecimiento en animales de granja.

EJEMPLO 5

COMPOSICIÓN PEPTÍDICA PARA LA PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN POR HIV

Inmunógenos peptídicos que comprenden sitios de Th artificiales idealizados de la presente invención y un sitio antigénico diana reactivo cruzadamente con un complejo de receptor/correceptor de células huésped para HIV pueden usarse para producir anticuerpos para ese complejo de células huésped en el huésped inmunizado. Dicho complejo que está situado sobre la superficie de linfocitos huésped que expresan CD4 comprende CD4 asociado con un dominio receptor de quemoquina. Este complejo es el receptor primario para la entrada de HIV en células T. Los anticuerpos dirigidos a este complejo de CD4 bloquea las interacciones entre HIV y su receptor, y las interacciones entre CD4-Clase II y células T que expresan CD4 y otras células T activadas. Así, los anticuerpos dirigidos a este complejo tienen amplias actividades neutralizadoras contra aislados primarios de HIV-1, HIV-2 y SIV e intervienen en la inmunosupresión de respuestas inmunitarias mediadas por células CD4+ (WO 97/46697).

Los inmunógenos peptídicos relevantes para el sitio antigénico del complejo de CD4 pueden formularse individualmente o en combinación para la generación, mediante inmunización activa en mamíferos, incluyendo seres humanos, de altas concentraciones de anticuerpos séricos para el complejo de CD4. Estos anticuerpos son útiles para la prevención y el tratamiento de infección por virus de inmunodeficiencia así como para el tratamiento de respuestas inmunes no deseables tales como rechazo de trasplantes, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y psoriasis.

Se diseñó un inmunógeno peptídico artificial de epítopo de Th/sitio antigénico diana con una secuencia modificada a partir del dominio similar a CDR2 de CD4 como el sitio antigénico diana. El sitio modificado comprende una secuencia peptídica tomada del dominio similar a CDR2 de CD4 humano (aminoácidos 39-66 de acuerdo con el sistema de numeración de Maddon et ál., Cell, 1985; 42:93; y Littman et ál., Cell, 1988; 55:541) modificado como sigue: (1) la inserción de un residuo de cisteína en el lado del extremo N de la posición 39 de las secuencias de CD4 presentes en la naturaleza, (2) la inserción de un residuo de cisteína en el lado del extremo C de la posición 66 de las mismas, y (3) la formación de un enlace disulfuro entre las cisteínas insertadas para producir una estructura cíclica.

Se proporciona el sitio diana optimizado y modificado (es decir, ciclado) para CDR2 de CD4 de la siguiente secuencia:

1. Cys-Asn-Gln-Gly-Ser-Phe-Leu-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser-Lys-Leu-Asn-Asp-Arg-Ala-Asp-Ser-Arg-Arg-Ser-Leu-Trp- Asp-Gln-Gly-Asn-Cys

2. (SEQ ID NO:88)

Para completar la ciclación, el péptido modificado se disolvió en DMSO al 15% en agua durante 48 h para facilitar la formación de enlaces disulfuro internos entre las cisteínas. SEQ ID NO:84 se incorporó al inmunógeno peptídico: (SEQ ID NO:6,7,8)-GG-(SEQ ID NO:88) (SEQ ID NO:89-91)

Se evaluó la inmunogenicidad en cobayas de SEQ ID NO:85 formulada en ISA 206/DDA, 100 µg/dosis, administrada a las semanas 0, 3, 6. La inmunogenicidad se determinó mediante ELISA de péptidos según se describe en el EJEMPLO 1. El péptido del sitio antigénico diana ciclado se usó como el sustrato en fase sólida en el ELISA. El conjugado marcado era específico para IgG de cobaya. Seis de seis cobayas se seroconvirtieron satisfactoriamente mediante la reactividad de ELISA obtenida. Es significativo que se encontrara que SEQ ID NO:85 fuera altamente inmunogénica y es funcional en un animal grande.

Una composición inmunogénica que comprende SEQ ID NO:85 se formuló en IFA, 300 µg/dosis, y se administró a un cerdo mediante inyección intramuscular las semanas 0, 3 y 6. El cerdo seroconvertido y el suero procedente de la semana 8 se probó con respecto a la actividad de neutralización contra un aislado primario de HIV-1. La actividad de neutralización se probó sobre VL135 de HIV-1, un aislado primario de subtipo B, mediante el Ensayo de Neutralización de Microplacas MT-2 (Hanson et ál., J Clin Microbiol, 1990; 28: 2030; WO 97/46697). La muestra de suero de cerdo proporcionaba 50% de neutralización del virus con una dilución de 1:249, y 90% de neutralización con una dilución de 1:97. Por lo tanto, la inmunización de un huésped animal grande con una composición de inmunógeno peptídico de la presente invención producía anticuerpos que se unían al receptor de la célula huésped que comprende CD4 y neutraliza HIV.

EJEMPLO 6

COMPOSICIÓN PEPTÍDICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ALERGIA

Se proporcionan inmunógenos peptídicos que comprenden los sitios de Th artificiales idealizados de la invención y un sitio antigénico diana que reacciona cruzadamente con un sitio efector sobre el tercer dominio constante (CH3) de la cadena pesada épsilon (ε) de IgE. Los inmunógenos pueden usarse para producir autoanticuerpos para el sitio efector de IgE en el huésped inmunizado. Ese sitio efector de CH3 de IgE se modifica a partir de un segmento del dominio CH3 de la cadena pesada épsilon (ε) de IgE humana (aminoácidos 413-435 (Dorrington y Bennich, 1978; 41:3)). Se modifica a partir de la de la secuencia de IgE presente en la naturaleza como sigue: (1) inserción de un residuo de cisteína en el lado del extremo N en la posición 413, (2) sustitución de la cisteína natural en la posición 418 de la secuencia de IgE natural por serina, (3) inserción de cisteína en el lado del extremo C en la posición 435, y (4) formación de un enlace disulfuro entre las cisteína de los extremos N y C para producir una estructura cíclica. Mediante este procedimiento, se optimiza el sitio antigénico diana para IgE humana. 3. **Cys**-Gly-Glu-Thr-Tyr-Gln-Ser-Arg-Val-Thr-His-Pro-His-4. Leu-Pro-Arg-Ala-Leu-Met-Arg-Ser-Thr-Thr-Lys-**Cys** (SEQ ID NO.:92)

Las sustituciones de aminoácidos de la secuencia natural se muestran en negrita. Los resultados muestran que los anticuerpos policlonales producidos tienen especificidad para el sitio efector de CH3 de IgE en el huésped inmunizado. Evitan la sensibilización de células cebadas y basófilos por IgE, previniendo de ese modo la iniciación y activación de células cebadas/basófilos y conduciendo a la regulación a la baja de la síntesis de IgE. Es más, los anticuerpos producidos por péptidos mostrados en la Tabla 6 que comprenden este sitio antigénico diana son reactivos cruzadamente con IgE humana, y estos anticuerpos son seguros y no anafilactogénicos. Por otra parte, los anticuerpos no se reticulan a IgE unida al receptor de alta afinidad para inducir la desgranulación.

Los conjugados peptídicos relacionados con el sitio antigénico de CH3 de IgE pueden formularse individualmente o en combinación y usarse para inmunizar mamíferos, incluyendo seres humanos, para generar altas concentraciones de anticuerpos séricos, que son útiles para la prevención y el tratamiento de los síntomas alérgicos.

Los inmunógenos peptídicos que incorporan el sitio diana de CH3 de IgE modificado (SEQ ID NO:92) se muestran en la Tabla 6 como SEQ ID NOS: 93-99. Estos inmunógenos peptídicos se usaron para inmunizar grupos de 3 cobayas usando 100 µg/dosis, formulados en CFA en la semana 0, IFA en las semanas 3 y 6, y administrados intramuscularmente. Para comparación, un grupo de dos animales se inmunizó con un congugado de péptido/proteína portadora de KLH a 200 µg/dosis, administrada de forma similar. Se muestran los resultados de ELISA de muestras de suero recogidas en la semana 8. En el ELISA, una proteína de mieloma de IgE humana (American Biosystem, Inc. nº cat. A113) se usó como el inmunoadsorbente en fase sólida. El procedimiento usado era idéntico a los ELISA basados en péptidos descritos previamente, excepto que el mieloma de IgE se usó como el inmunoadsorbente en fase sólida. Así, los resultados demuestran reactividad cruzada con IgE humana. Los resutados de ELISA también demuestran que todos los constructos eran inmunogénicos con reactividad cruzada para IgE humana, proporcionando los inmunógenos peptídicos de la presente invención una inmunogenicidad superior. La inclusión de la secuencia del dominio de Inv (SEQ ID NO:78) aumentaba la inmunogenicidad, según se muestra por la inmunogenicidad aumentada de SEQ ID NO:99 sobre SEQ ID NO:98.

Para probar los anticuerpos anti-IgE humana en ensayos para la actividad biológica y la seguridad, se produjeron sueros hiperinmunes de cobaya contra SEQ ID NO:98 y 99. El procedimiento es como se describe anteriormente, excepto que los animales también recibían una dosis de refuerzo del inmunógeno peptídico en IFA durante la semana 10. Los anticuerpos para IgG de cobaya se purificaron y la capacidad de los anticuerpos purificados para inhibir la sensibilización de basófilos humanos por IgE específica para alérgeno se determinó como sigue.

Anticuerpos para IgG de cobaya se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A (ImmunoPure® Immobilized Recomb® Protein A, Pierce) a partir de suero recogido las semanas 8 y 12. El suero procedente de los animales inmunizados con SEQ ID NOS 98, 99 se reunió. Los anticuerpos eluidos se prepararon a una concentración estándar de 8 mg/ml en tampón de PIPES 25 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,2. Una preparación de anticuerpo de control se preparó a partir del suero reunido de cobayas inmunizadas con un inmunógeno peptídico irrelevante. Estos anticuerpos se usaron en ensayos que miden la reducción en la sensibilización mediada por IgE de basófilos humanos. Los basófilos humanos se prepararon a partir de la sangre venosa de voluntarios usando centrifugación a través de gradientes de densidad de Percoll (MacGlashan. J Allergy Clin Immunol, 1993; 91:605-615). Los leucocitos que formaban bandas se recogieron, se lavaron y se resuspendieron en 0,1 ml de tampón de PAGCM según se describe (MacGlashan, 1993), excepto que el tampón de PAGCM usado para suspender las células se elaboraba con agua que contenía 44% de D_20. La IgE usada para el ensayo era específica del alérgeno, bien IgE específica de BPO humana o bien IgE humana quimérica que tiene dominios variables injertados con especificidad para glicoproteína de HIV gp120. La IgE específica de alérgeno a 0,25 µg/ml se preincubó durante 15 minutos a 37˚C con un volumen igual del anticuerpo purificado a 8 mg/ml. El volumen total era 0,1 ml. La mezcla de anticuerpo se añadió a las células y se incubó durante 20 minutos para permitir la sensibilización de los basófilos por IgE no complejada. Los basófilos sensibilizados se estimularon a continuación mediante la adición del alérgeno, bien BPO_{21}-HSA o bien un polipéptido gp120 según se describe (MacGlashan, 1993). Después de un período de

incubación apropiado (habitualmente 45 minutos), los basófilos se separaron del sobrenadante y el sobrenadante se ensayó con respecto al contenido de histamina mediante una técnica fluorimétrica automatizada (Siraganian, Anal Biochem, 1974; 57: 383-394). Todas las reacciones se realizaron por duplicado. El porcentaje de histamina liberada se calculó a partir de la relación de muestra a histamina total menos de ambas la cantidad de liberación espontánea de histamina. Se comparó la liberación de histamina por anticuerpo experimental con la liberación de histamina por el anticuerpo de control de especificidad irrelevante y se obtuvo la relación. (Los ensayos de liberación de histamina sobre basófilos humanos fueron amablemente realizados bajo condiciones codificadas por el Dr. Donald W. MacGlashan, The Johns Hopkins University School of Medicine, Johns Hopkins Asthma and Allergy Center, Baltimore). La inhibición específica de la liberación de histamina por la anti-IgE específica del sitio era 61% y 71% para los anticuerpos purificados a partir de sangrados tomados las semanas 8 y 12, respectivamente.

Estos anticuerpos policlonales inducidos activamente se probaron a continuación adicionalmente con respecto a la seguridad. Se probaron con respecto a la capacidad o incapacidad para reticular la IgE unida a receptor e inducir la liberación espontánea de histamina en ausencia de alérgeno. Esto establece si son o no anticuerpos anti-IgE no anafilactogénicos. Una preparación de anti-SEQ ID NO:98 de cobaya se probó mediante estimulación directa de basófilos sensibilizados por IgE, en ausencia de alérgeno, para evaluar su capacidad para reticular IgE unida a receptor e inducir la desgranulación. La liberación de histamina por anti-SEQ ID NO:98 era equivalente al nivel de liberación espontánea de histamina por las células donantes. Basándose en este resultado, se concluyó que un anticuerpo de especificidad para el sitio antigénico diana de SEQ ID NO:98, es decir, SEQ ID NO:92, no es anafilactogénico.

La preparación de anti-SEQ ID NO:98 de la semana 12 también se evaluó con respecto a la especificidad para IgE, para determinar el potencial de estos anticuerpos para la inmunosupresión específica de un isotipo. La reactividad cruzada de anticuerpos de cobaya anti-SEQ ID NO:98 para IgE e IgG humanas se comparó mediante ELISA. El procedimiento se describe para IgE humana. Para ELISA de IgG humana, se usó IgG humana como el inmunoabsorbente en fase sólida.

Las placas de ELISA de IgE se revistieron con el mieloma de IgE humana a 5 µg/ml. Para el ELISA de IgG, las placas se revistieron con IgG purificada humana (IgG humana de calidad para reactivos de Sigma), también a 5 µg/ml. El anti-SEQ ID NO:98 de cobaya purificado se probó con respecto a la reactividad en ambos ELISA a concentraciones de 0,5 y 0,1 µg/ml. Los resultados se compararon con anticuerpos purificados a partir de suero de cobaya de control y con un control “no de anticuerpo”. Los valores de A_{490} obtenidos para anticuerpo anti-SEQ ID NO:98 sobre IgE eran 1,126 a 0,5 µg/ml y 0,344 a 0,1 µg/ml. Los valores de A_{490} obtenidos para anticuerpo anti-SEQ ID NO:98 sobre IgG eran iguales a los valores del anticuerpo de control y el fondo. Esto muestra que no había reactividad cruzada del anti-SEQ ID NO:98 de cobaya con IgG humana.

La composición de inmunógeno peptídico de la presente invención no producía anticuerpos que reconocieran anticuerpos de IgG y por lo tanto son específicos en isotipo para IgE. Así, puede concluirse que la inmunización activa con inmunónenos de Th/ sitio antigénico diana de IgE de la invención produce anticuerpos anti-IgE seguros y no anafilactogénicos. Los anticuerpos era eficaces para inhibir la sensibilización mediada por IgE, y presentaban un potencial inmunosupresor específico para anticuerpos de isotipo IgE.

EJEMPLO 7

COMPOSICIÓN PEPTÍDICA PARA LA PREVENCIÓN DE LA FIEBRE AFTOSA

Inmunógenos peptídicos que comprenden sitios de Th artificiales idealizados de la invención y un sitio antigénico diana reactivo cruzadamente con el "Bucle G-H" sobre la proteína de la cápsida VP1 del virus de la fiebre aftosa (FMDV) pueden usarse para producir anticuerpos neutralizadores para FMDV.

La fiebra aftosa (FMD, del inglés “foot-and-mouth disease”) es la enfermedad más económicamente importante del ganado doméstico. Las especies de pezuña hendida como ganado vacuno, cerdos, ovejas y cabras son propensas. Se han descrito siete serotipos distintos: A, O, C, Asia, y los tipos sudafricanos SAT-1, 2 y 3, cada uno de los cuales puede subdividirse en múltiples subtipos. Los virus de los serotipos A, O y Asia-1 son los más comunes. Los virus del serotipo A son los más variables, teniendo más de 30 subtipos. No hay protección cruzada entre serotipos, de modo que los animales recuperados de infección con o vacunados contra un virus de un serotipo son todavía propensos a la infección con virus de los seis serotipos restantes. Es más, el grado de variación antigénica dentro de un serotipo es tal que una vacuna elaborada contra un subtipo puede no ser protectora para otro subtipo dentro del mismo serotipo (Brown, Vaccine, 1992; 10:1022-1026).

Se ha mostrado que péptidos específicos para serotipos correspondientes a la región 141-160 (el bucle G-H) de las proteínas de la cápsida VP1 de aislados pertenecientes a los siete serotipos de FMDV producen niveles protectores de anticuerpos neutralizadores específicos de un tipo en cobayas (Francis et ál., Immunology, 1990; 69:171-176). Claramente, esta región contiene un sitio inmunogénico dominante que también porta la especificidad serotípica del

virus. Las observaciones iniciales de inmunogenicidad para estos péptidos VP1 141-160 se llevan a cabo usando péptidos sintéticos conjugados a proteína portadora KLH (hemocianina de lapa de ojo de cerradura), un procedimiento que anula la ventaja de fabricar un inmunógeno sintético bien definido. Sin embargo, el desarrollo de inmunógenos sintéticos de VP1 fue avanzado por DiMarchi y Brook (Patente de EE.UU. Nº 4.732.971), que mostraban que dos secuencias de VP1 procedentes de un aislado de subtipo O, empalmadas en un constructo quimérico Pro-Pro-Ser-141-158-Pro-Cys-Gly 200-213 (SEQ ID NO:100), producían niveles de anticuerpo que protegían al ganado vacuno de la estimulación. No obstante, la eficacia de este efecto estaba limitada por la baja inmunogenicidad del inmunógeno peptídico y por su estrecha especificidad serotípica. La aplicación práctica demanda que una formulación de vacuna proporcione protección de exposición tanto homotípica como heterotípica, con pequeñas cantidades de inmunógeno peptídico.

El sitio inmunodominante del Bucle G-H optimizado para la inmunogenicidad y la capacidad para inducir anticuerpos ampliamente neutralizadores se incorpora como un sitio antigénico diana en los inmunógenos peptídicos de la presente invención. El sitio es homólogo a las posiciones de aminoácido 134-169 en la proteína VP1 de FMDV de la cepa A12 (Robertson et ál, J Virol, 1985; 54:651-660) y se extiende más allá de cualquier extremo del Bucle G-H. El sitio diana se modificó adicionalmente mediante: (1) sustitución de Asp en la posición 134 y Gln en la posición 157 por cisteínas, (2) formación de un enlace disulfuro entre las cisteínas sustituyentes para producir una estructura cíclica, y (3) construcción de una SSAL del mismo usando las secuencias de VP1 correspondientes procedentes de una selección de subtipos. Los sitios antigénicos diana optimizados para la VP1 de FMDV están ejemplificados por los péptidos listados en la Tabla 7. Los dos inmunógenos peptídicos, SEQ ID NO:101 y SEQ ID NO:102, son sitios antigénicos diana de SSAL compilados a partir de cepas de serotipos de FMDV O y Asia, respectivamente. Los sitios antigénicos diana de ambos serotipos O y Asia se acoplaron a los epítopos de Th de la presente invención, SEQ ID NO: 31. La secuencia del dominio de Inv (SEQ ID NO:78) también se incorporó a la SEQ ID NO:102.

Estos dos inmunógenos peptídicos de SSAL se sintetizaron y se usaron para hiperinmunizar grupos de tres cobayas Duncan Hartley (hembras, 9 semanas de edad, 450 g, libres de virus).Cada animal fue inmunizado con 100 µg por dosis del constructo sintético indicado emulsificado en CFA en la semana 0 o IFA en las semans 3 y 6. Los animales se sangraron las semanas 0, 5 y 10 para la prueba.

Se obtuvieron muestras de suero de los sangrados a las cinco y 10 semanas y se reunieron de cada grupo. Los sueros reunidos se evaluaron con respecto a la reactividad para el epítopo neutralizador de VP1 mediante el ELISA basado en péptido usando un péptido que tiene las secuencias para el epítopo neutralizador (VP1 134-169) como el inmunoadsorbente en fase sólida. También se determinó su capacidad para neutralizar las cepas de FMDV A1 A12FP, AFL, A23, O-1JH, O-1F2 y Asia-1. La actividad neutralizadora del virus de una dilución 1:100 de una muestra de suero se determinó al observar la neutralización sobre una serie de cargas virales de entrada crecientes, usando partes alícutas (10.000 MPD50) de las cepas de virus mencionadas anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 7. El método de prueba realizado (Morgan y Moore, Am J Vet Res, 1990; 51:40-45) demostraba que la inmunización con los antígenos peptídicos de la presente invención proporcionaba sueros que reducían en 2,5 Log10 las microplacas de FMDV con una dilución 1:100. Los resultados también son altamente predictivos de la inmunidad protectora contra la infección por FMDV.

Según se muestra mediante la Tabla 7, se producían altas concentraciones de antipéptido contra los sitios antigénicos diana (> 5 Log10) para la semana 5. Se observó una neutralización amplia y eficaz de las siete cepas probadas pertenecientes a tres serotipos de FMDV diferentes (es decir, A, O, Asia), a pesar de las amplias variaciones entre estas cepas y serotipos.

Esto demuestra adicionalmente la eficacia de los epítopos de Th artificiales de la presente invención para estimular respuestas por anticuerpos eficaces contra un epítopo procedente de un patógeno extraño.

EJEMPLO 8

COMPOSICIÓN PEPTÍDICA DE UNA VACUNA DE ESPOROZOITOS PARA LA MALARIA

Se proporcionan inmunógenos peptídicos que comprenden los sitios de Th artificiales idealizados y un antígeno diana de circumsporozoito (CS) procedente de *Plasmodium falciparum*, un parasito de malaria humana. La proteína CS es el antígeno superficial principal de la fase de esporozoito del parásito. Se han documentado estudios inmunológicos y datos de secuencia sobre un gran número de genes de CS de plasmodia de ser humano, simio y roedor que muestran que todas las proteínas de CS contienen una región central, que consiste en una serie de repeticiones en tándem, que abarcan múltiples copias de un epítopo de células B inmunodominante. En *P. falciparum,* el epítopo repetitivo se representa como

$(Asn\text{-}Ala\text{-}Asn\text{-}Pro)_n$ (SEQ ID NO:103)

Los anticuerpos dirigidos contra las repeticiones de la proteína de CS de los parásitos de la malaria humana, *P.*

falciparum y *P. vivax*, inhiben la invasión de hepatocitos por esporozoitos y abolen su infectividad. Por lo tanto, las repeticiones del epítopo de CS han sido el antígeno diana de vacunas subunitarias usadas en diversos experimentos de la vacuna de la malaria humana (Nussenzweig et ál., Adv. Immunol., 1989, 45:283; Hoffman et ál., Science, 1991, 252:520). Sin embargo, uno de los inconvenientes de las diversas vacunas sintéticas de la malaria actualmente en los experimentos clínicos es su baja inmunogenicidad. Así, sigue teniendo que desarrollarse una vacuna potencial de la malaria. (Calvo-Calle et ál., J Immunol, 1994, 150:1403)

Para vencer el problema de la inmunogenicidad asociado con las repeticiones de la proteína de CS de *P. falciparum*, los epítopos de Th artificiales mostrados en la Tabla 1 se incorporan en los inmunógenos peptídicos de CS. Por ejemplo, el constructo peptídico (SEQ ID NOS:15,18)-εNLys-(Asn-Ala-Asn-Pro)$_4$(SEQ ID NOS:104, 152) se sintetiza y se usa como el inmunógeno clave en una vacuna de la malaria para producir potentes anticuerpos protectores en animales pequeños, primates (p. ej., mandriles) y seres humanos contra esporozoitos de *P. falciparum*.

EJEMPLO 9

COMPOSICIÓN PEPTÍDICA PARA LA PREVENCIÓN Y EL TRATAMIENTO DE ATEROSCLEROSIS Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

La proteína de transporte de ésteres colesterílicos (CETP) media en la transferencia de ésteres colesterílicos desde HDL hasta proteínas ricas en TG tales como VLDL y LDL, y también el intercambio recíproco de TG desde VLDL y LDL (Tall, J Internal Med, 1995, 237:5-12; Tall, J Lipid Res, 1993, 34:1255; Hesler et ál., J Biol Chem, 1987, 262:2275; Quig et ál., Ann Rev Nutr, 1990, 10:169). La CETP puede representar un papel en la modulación de los niveles de ésteres colesterílicos y triglicérido asociados con diversas clases de lipoproteínas. Una alta actividad de transferencia de ésteres colesterílicos de CETP se ha correlacionado con niveles incrementados de colesterol asociado con LDL y colesterol asociado con VLDL, que a su vez se correlacionan con un riesgo incrementado de enfermedad cardiovascular (véase, p. ej., Tato et ál., Arterioscler Thromb Vascular Biol, 1995, 15:112).

La CETP aislada de plasma humano es una glicoproteína hidrófoba que tiene 476 aminoácidos. Un cDNA que codifica CETP humana se ha clonado y secuenciado (Drayna et ál., Nature, 1987, 327:632). Se ha producido un anticuerpo monoclonal TP2 (primeramente denomindo 5C7) que inhibe completamente la actividad de transferencia de ésteres colesterílicos y triglicéridos de la CETP y, en una extensión menor, la actividad de transferencia de fosfolípidos (Hesler et ál., J Biol Chem, 1988, 263:5020). El epítopo de TP2 se localizaba en los 26 aminoácidos carboxiloterminales, es decir, los aminoácidos de Arg451 a Ser476 de CETP humana (véase, Hesler et ál., 1988):

Arg Asp Gly Phe Leu Leu Leu Gln Met Asp
Phe Gly Phe Pro Glu His Leu Leu Val Asp
Phe Leu Gln Ser Leu Ser

(SEQ ID NO:106)

Se presentó que TP2 inhibía tanto la actividad de CETP humana y de conejo in vitro como la CETP de conejo in vivo (Yen et ál., J Clin Invest, 1989, 83:2018). Un análisis adicional de la región de CETP unida por TP2 revelaba que los aminoácidos entre Phe463 y Leu475

Phe Gly Phe Pro Glu His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser

(SEQ ID NO:107)

son necesarios para la unión de TP2 y para neutralizar la unión de lípidos neutros a CETP y la actividad de transferencia (véase Wang et ál., J Biol Chem, 1992, 270:612).

Un número de estudios in vivo que utilizan modelos animales o humanos ha indicado que la actividad de CETP puede afectar al nivel de HDL que contiene colesterol en circulación. Una actividad incrementada de transferencia de ésteres colesterílicos de la CETP puede producir una disminución en los niveles de HDL-C con relación a los niveles de LDLC y/o VLDLC y bajo HDL que a su vez se correlaciona con una propensión incrementada a la arteriosclerosis. Por lo tanto, el descubrimiento de compuestos y métodos para controlar la actividad de CETP será ventajoso para prevenir o tratar la enfermedad cardiovascular.

Rittershaus et ál., WO96/34888, propusieron el uso de una composición peptídica que comprendía un epítopo de

células T auxiliares inmunogénico "universal" o "de amplia gama" conectado, preferiblemente de modo covalente, a una porción de epítopo de células B tal como una encontrada en la porción carboxiloterminal de CETP humana implicada en una unión a lípidos neutros o una actividad de transferencia de CETP. A fin de mejorar la inmunogenicidad del sitio funcional sobre CETP humana, es decir, los aminoácidos carboxiloterminales de CETP humana (SEQ ID NOS:96 and 97), se sintetizaron análogos peptídicos del mismo conectados a los péptidos antigénicos que comprenden epítopos de Th artificiales de la Tabla 1 y péptidos antigénicos diana de CETP. Estos antígenos peptídicos, mostrados en la Tabla 8, se usan para producir anticuerpos para CETP en animales pequeños, primates y seres humanos. Los anticuerpos anti-CETP controlan la actividad de CETP. De ese modo, se espera que los péptidos antigénicos de CETP provoquen una acumulación en plasma reducida de colesterol asociado a LDL y proporcionen protección y tratamiento de la arteriosclerosis y la enfermedad cardíaca coronaria.

EJEMPLO 10

COMPOSICIÓN PEPTÍDICA COMO COMPONENTE DE VACUNA PARA HIV PARA LA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZADORES CONTRA HIV

El avance en el desarrollo de una vacuna eficaz para HIV-1 se ha calibrado en gran parte al medir la capacidad para inducir linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+ específicos del virus medibles y anticuerpos neutralizadores, los principales indicadores de una respuesta inmunitaria protectora. Se observó una fuerte correlación entre la protección contra la infección y los niveles de Abs neutralizadores en primates no humanos infectados con HIV-1 o HIV simiesco (SHIV). Sin embargo, se ha hecho poco avance en la generación de anticuerpos neutralizadores durante las últimas décadas. Parte del problema es la respuesta por anticuerpos neutralizadores débil generada por vacunas de HIV-1 candidatas. Un artículo reciente titulado "Toward an HIV Type 1 vaccine that generates potent, broadly cross-reactive neutralizing antibodies" de Montefiori et ál (AIDS Res and Hum Retrovir, 1999, 15:689-698) proporciona una revisión del estado de la técnica de las dificultades encontradas para el desarrollo de vacunas para HIV.

En un esfuerzo por mejorar la respuesta por anticuerpos neutralizadores contra HIV, los presentes inventores se embarcaron en diseños de antígenos sintéticos destinados a obtener anticuerpos neutralizadores potentes. Los antígenos sintéticos emplean epítopos de Th artificiales especialmente diseñados como el elemento estimulante inmunitario del constructo conectado covalentemente a epítopos de células B neutralizadores de HIV (p. ej. Korber et ál, HIV Mol Immunol Database 1997, Part III Antibody Binding Sites) o mimétopos neutralizadores (p. ej. Scala et ál, J Immunol 1999, 162: 6155-6161) previamente reconocidos por anticuerpos bien monoclonales o bien policlonales.

Entre los epítopos de células B neutralizadores de HIV, se diseñó una secuencia de consenso V3 artificial (SEQ ID NO: 125) que comprendía un armazón óptimo del determinante neutralizador principal de V3 de gp120 de HIV (Wang, C.Y., US 5.763.160). Estos incluyen el aminoácido más frecuente para cada una de las posiciones de aminoácido dentro del armazón basado en análisis de secuencias de aminoácidos de más de 1.000 aislados de HIV de los subtipos A a G, junto con secuencias derivadas de epítopos lineales o conformacionales de las regiones HIV gp120/gp41 de HIV mostradas aquí en las Tablas 9 y 10 en SEQ ID NOS:125, 126-129, 148-153. Los mimétopos neutralizadores de Scala et ál (SEQ ID NOS:130-135) también se sintetizan como péptidos de la invención, SEQ ID NOS:136-147, según se muestra en la Tabla 9.

Los constructos peptídicos inmunogénicos de la invención mostrados en la Tabla 10 son completamente sintéticos y se sintetizaron mediante el método en fase sólida esbozado en el Ejemplo 1. Estos constructos peptídicos inmunogénicos ilustran adicionalmente la utilidad del Th artificial de la presente invención en el desarrollo de una vacuna para HIV.

Cada péptido de la Tabla 10 puede representarse mediante la fórmula $(A)_n$-$(Th)_m$-$(B)_o$-(epítopo neutralizador de HIV B)-X o (epítopo neutralizador de HIV)-$(B)_o$-$(Th)_m$-$(A)_n$-X. Los epítopos neutralizadores de HIV incluyen SEQ ID NOS: 125 y 130-135. Los péptidos inmunogénicos comprenden uno o más sitios Th derivados de Th artificial (según se muestra en la Tabla 1). Cada péptido de este ejemplo tienen espaciadores de Gly-Gly o (ε-N)Lys entre elementos inmunogénicos, pero los péptidos de la invención pueden tener otros espaciadores o no tener espaciadores.

Los péptidos de estos ejemplos pueden comprender un sitio inmunoestimulante de Inv opcional (SEQ ID NO: 27). Sin embargo, se entiende que la invención no está limitada al uso de Inv como un elemento inmunoestimulante adicional.

Constructos peptídicos representativos de la invención que se listan en la Tabla 10 (SEQ ID NOS: 148-153) se sintetizaron, se segmentaron, se ciclaron y se purificaron como se describe en el Ejemplo 1. Cada constructo peptídico se formuló para la inmunización en animales pequeños tales como cobayas o en animales mayores tales como cerdos o mandriles para la evaluación de su inmunogenicidad. Cada uno de los péptidos se suspendió en un volumen de 0,5 ml que contenía emulsionantes o adyuvantes representativos tales como ISA51, ISA720, DDA o lípido monofosforilado A (MPL). La dosis era 100 µg de péptido para cobayas o 300 µg de pétido para cerdos o

mandriles y los animales se inmunizaron intramuscularmente.

Los animales recibían inyecciones las semanas 0, 3 y 6 según se especifica en la Tabla 10. Sangrados de prueba a las 5, 8, 10 y 11 semanas después de la inmunización inicial se evaluaron con respecto a las reactividades con epítopos diana mediante ELISA de péptidos de epítopos de células B según se describe en el Ejemplo 1, y se probaron artificialmente con respecto a su capacidad para neutralizar HIV-1 según se describe con detalle en el Ejemplo 5.

Todos los péptidos probados obtenían fuertes reactividades cruzadas dirigidas al sitio con el correspondiente péptido diana, según se muestra por concentraciones Log10 en los ELISA de péptidos anti-epítopos B de más de 4. la neutralización de HIV-1 también se observó para sueros inmunes obtenidos de cobayas y mandriles. Esta reactividad funcional por los sueros de mandril es notable en tanto que la neutralización de HIV humano por los sueros de mandril es casi un sistema humano. Los resultados son indicadores fuertes de la eficacia de un constructo peptídico de la invención como un agente para la prevención y/o la inmunoterapia de infección por HIV mediante inmunización activa.

Tabla 1

Epítopos de Th Modélicos, Prototípicos e Idealizados Artificiales

a. Th de MVF y epítopos de Th derivados del mismo (sólo para referencia)

Identificador de Th		Secuencia de Aminoácidos
Th de MVF	SEQ ID NO:1	LSEIKGVIVHRLEGV
Th1 de SSAL1	SEQ ID NO:2	DLSDLKG**LLL**HKLDGL
	SEQ ID NO:3	EI EIR **III** RIE I
	SEQ ID NO:4	V V **VVV** V V
	SEQ ID NO:5	F F **FFF** F F
SEQ ID NO:6		ISEIKGVIVHKIEGI
SEQ ID N0:7		MT RT TRM TM
SEQ ID NO:8		L L V
SEQ ID NO:6		ISEIKGVIVHKIEGI
SEQ ID NO:9		T RT TR T
SEQ ID NO:10		MSEIKGVIVHKLEGM
SEQ ID NO:11		LT MRT TRM TV
SEQ ID NO:6		ISEIKGVIVHKIEGI
SEQ ID NO:12		ITEIRTVIVTRIETI
SEQ ID NO:13		MSEMKGVIVHKMEGM
SEQ ID NO:14		LTEIRTVIVTRLETV
SEQ ID NO:15		ISISEIKGVIVHKIEGILF
SEQ ID NO:16		MT RT TRM TM
SEQ ID NO:17		L L V
SEQ ID NO:15		ISISEIKGVIVHKIEGILF
SEQ ID NO:18		T RT TR T
SEQ ID NO:19		ISLSEIKGVIVHKLEGMLF
SEQ ID NO:105		MT MRT TRM TV
SEQ ID NO:123		ISLTEIRTVIVTRLETVLF
SEQ ID NO:124		I I I
SEQ ID NO:15		ISISEIKGVIVHKIEGILF
SEQ ID NO:20		ISITEIRTVIVTRIETILF
SEQ ID NO:21		ISMSEMKGVIVHKMEGMLF
SEQ ID NO:22		ISLTEIRTVIVTRLETVLF

b. Th de HbsAg, Prototipo y derivados

Identificador de Th		Secuencia de Aminoácidos
Th de HbsAg	SEQ ID NO:23	FFLLTRILTIPQSLD
	SEQ ID NO:24	KKKFFLLTRILTIPQSLD
	SEQ ID NO:25	FFLLTRILTIPQSL
Th2 de SSAL2	SEQ ID NO:26	KKKLFLLTKLLTLPQSLD
	SEQ ID NO 27	RRRIKII RII I L IR
	SEQ ID NO:28	VRVV VV V I V
	SEQ ID NO:29	F FF FF F V F
	SEQ ID NO:30	F
SEQ ID NO:31		KKKIITITRIITIITTID
SEQ ID NO:32		KKKIITITRIITIITTI
SEQ ID NO:33 *		KKKMMTMTRMITMITTID
SEQ ID NO:34 *		FITMDTKFLLASTHIL
SEQ ID NO:35 *		KKKFITMDTKFLLASTHIL

* sólo para referencia

Tabla 2

Inmunogenicidad de Péptidos de LHRH					
a. Derivados de Th de MVF (sólo para referencia)					
SEQ ID NO:	Descripción del Péptido Antigénico	Formulaciones			
		nº castrados		nº castrados	
36	(SEQ ID NO:1)-GG-(LHRH)[a]	400 µg/dosis de IFA (0, 3, 6 wpi)	8/10	400 µg/dosis de Alumbre (0, 3, 6 wpi)	5/5
37	(SEQ ID NO:2)-GG-(LHRH)[a]	400 µg/dosis de IFA(0, 3, 6 wpi)	9/10	400 µg/dosis de Alumbre (0.3,6wpi)	2/5
38	(SEQ ID NO:3)-GG-(LHRH)[a]				
39	(SEQ ID NO:4)-GG-(LHRH)[a]				
40	(SEQ ID NO:5)-GG-(LHRH)[a]				
41	(SEQ ID NO:6)-GG-(LHRH)[a]	400 µg/dosis de IFA (0, 3,6wpi)	6/6	25 µg/dosis de Alumbre (0, 3, 6 wpi)	3/8
42	(SEQ ID NO:7)-GG-(LHRH)[a]				
43	(SEQ ID NO:8)-GG-(LHRH)[a]				

(continuación)

Inmunogenicidad de Péptidos de LHRH					
a. Derivados de Th de MVF (sólo para referencia)					
SEQ ID NO:	Descripción del Péptido Antigénico	Formulaciones			
41 44	(SEQ ID NO:6)-GG-(LHRH)[a] (SEQ ID NO:9)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0, 3, 6 wpi)	1/6
45 46	(Inv)[b]-GG-(SEQ ID NO:6)-GG-(LHRH)[a] (Inv)[b]-GG-(SEQ ID NO:9)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3wpi)	5/5
47 48	(SEQ ID NO:10)-GG-(LHRH)[a] (SEQ ID NO:11)-GG-(LHRH)[a]	100 µg/dosis de IFA (0, 3, 6 wpi)	4/6	25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	1/8
45	(Inv)[b] -GG-(SEQ ID NO:6) - GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	2/6
49	(SEQ ID NO:12)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	5/6
50	(SEQ ID NO:13)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	0/6
51	(SEQ ID NO:14)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	5/6
52	(Inv)[b]-GG-(SEQ IDNO:14)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	3/6
53 54 55	(SEQ ID NO:15)-GG-(LHRH)[a] (SEQ ID NO:16)-GG-(LHRH)[a] (SEQ ID NO:17)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3wpi)	4/8

(continuación)

Inmunogenicidad de Péptidos de LHRH					
a. Derivados de Th de MVF (sólo para referencia)					
SEQ ID NO:	Descripción del Péptido Antigénico	Formulaciones			
53 56	(SEQ ID NO:15)-GG-(LHRH)[a] (SEQ ID NO:18)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	6/6
57 58	(Inv)[b] -GG-(SEQ IDNO:15)-GG-(LHRH)[a] (Inv)[b]-GG-(SEQ IDNO:18)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	6/6
59	(SEQ ID NO:19)-GG-(LHRH)[a]	100 µg/dosis de IFA (0, 3, 6 wpi)	6/6	25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	14/14
106	(SEQ ID NO:105)-GG-(LHRH)[a]				
53	(SEQ ID NO:15)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	1/6
60	(Inv)[b]-(SEQ ID NO:15)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	4/6
61	(SEQ ID NO:20)-GG-(LHRH)[a]	N. D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	4/6
62	(Inv)[b]-GG-(SEQ IDNO:20)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	2/6
63	(Inv)-(SEQ ID NO:21)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	1/6
64	(SEQ ID NO:22)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	4/6

(continuación)

b. Derivado de Th de HBsAg					
SEQ ID NO:	Descripción del Péptido Antigénico	Formulaciones			
		nº castados		nº castrados	
65*	(SEQ ID NO:23)-GG-(LHRH)[a]	400 µg/dosis de IFA (0, 3, 6 wpi)	10/10	400 µg/dosis de Alumbre (0,3,6 wpi)	0/5
66* 67* 68* 69* 70*	(SEQ ID NO:26)-GG-(LHRH)[a] (SEQ ID NO:27)-GG-(LHRH)[a] (SEQ ID NO:28)-GG-(LHRH)[a] (SEQ ID NO;29)-GG-(LHRH)[a] (SEQ ID NO:30)-GG-(LHRH)[a]	400 µg/dosis de IFA (0, 3, 6 wpi)	9/10	400 µg/dosis de Alumbre (0,3,6 wpi)	2/5
71	(SEQ ID NO:31)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	8/8
72	(SEQ ID NO:32)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	4/6
73*	(SEQ ID NO:33)-GG-(LHRH)[a]	100 µg/dosis de IFA(0, 3, 6 wpi)	4/6	25 µg/dosis de Alumbre (0,3wpi)	0/6
74*	(SEQ ID NO:34)-GG-(LHRH)[a] b	100 µg/dosis de IFA(0, 3, 6 wpi)	6/6	25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	5/8
75*	(Inv)-GG-(SEQ ID NO:34)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3wpi)	4/6
76*	(SEQ ID NO:35)-GG-(LHRH)[a]	N.D.		25 µg/dosis de Alumbre (0,3 wpi)	0/8
	KLHc-(LHRH)[a]	N.D.		50 µg/dosis de Alumbre (0,3wpi)	2/8

[a] LHRH = EHWSYGLRPG (SEQ ID NO:77)

[b] INV = Dominio de invasina (SEQ ID NO:78)

[c] KLH = Hemocianina de lapa de ojo de cerradura

[d] Espaciador de bisagra = PPXPXP (SEQ ID NO:79)

[*] sólo para referencia

Tabla 3

Evaluación de la Especificidad a Anticuerpos para el Sitio Antigénico Diana		
SEQ ID NO:	Reactividad a LHRH[a]	Reactividad a Th[b]
53 y 56*	6/6	0/6[c]
71	8/8	0/8[d]
74*	4/8	0/8[e]

[a] Número de animales con concentraciones de anti-LHRH

> 1:1000/animales totales inmunizados. El péptido de ELISA era SEQ ID NO:77.

[b] Número de animales con reactividad anti-Th

> 0,100 A_{490}/ animales totales inmunizados. Los sueros se diluyeron 1:100 y todos los valores de A_{490} estaban en valores de fondo para los péptidos de Th respectivos.

[c] El péptido de ELISA era una mezcla de dos péptidos: SEQ ID NOS:15 y 18.

[d] El péptido de ELISA era SEQ ID NO:31.

[e] El péptido de ELISA era SEQ ID NO:34.

* sólo para referencia

Tabla 4

Evaluación de Composiciones Peptídicas de Th/LHRH Artificiales que Incluyen Mezcla (sólo para referencia)							
Inmunógeno[a]	0 wpi	5 wpi	8 wpi	10 wpi	14 wpi	18 wpi	22 wpi
SEQ ID NO:64 + Alumbre	0/8b	3/8	8/8	8/8	7/8	5/8	3/8
SEQ ID NOS:57 y 58 + Alumbre	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
SEQ ID NO:64 + SEQ ID NOS:57 y 58 + Alumbre	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6

[a] Composiciones peptídicas de LHRH individuales o la composición peptídica mixta de LHRH se formularon en alumbre. Esquema de inmunización: 25 µg/dosis de a 0 y 3 wpi.

[b] Número de animales inmunocastrados/número total de animales en el grupo. Los animales se valoraron como inmunocastrados cuando los valores de testosterona en suero eran de < 0,1 nmol/l a indetectables.

Tabla 5 Inmunogenicidad de Péptidos Antigénicos de Somatostatina

SEQ ID NO:	Descripción del Péptido Antigénico	Adyuvante	Inmunogenicidad		
			WPI[b]	n que responde=4	Log10 Concentración por ELISAc
80	Somatostatina	Alumbre al 0,4% (0,2,4 WPI)	6 6	0 0	- -
81, 82, 83*	(SEQ ID NOS:6,7,8)-GG-(Somatostatina)	Alumbre al 0,4% (0,3,6 WPI)	5 8	1/4 4/4	2,38 3,33
84, 85, 86*	(Somatostatina)-GG-(SEQ ID NOS: 6, 7, 8)	Alumbre al 0,4% (0,3,6 WPI)	5 8	3/4 4/4	3,24 3,12
87	(SEQ ID NO:31)-GG-Somatostatina	Alumbre al 0,4% (0,3,6 WPI)	8	4/4	3,12

[a] Secuencia de somatostatina: AGCKNFFWKTFTSC (SEQ ID NO:80)

[b] WPI = Semanas después de la inmunización.

[c] Resultados de la prueba para sueros reunidos procedentes de animales reactivos a ELISA.

* sólo para referencia

Tabla 6

Inmunogenicidad de Péptidos Antigénicos de IgE-CH3			
SEQ ID NO:	Descripción del Péptido Antigénico	Inmunogenicidad	
		Nº respondedores	Log10 ELISA[b]
93,94*	(SEQ ID NOS:15,18)-GG-(SEQ ID NO:92)[a]	3/3	3,30
95,96,97*	(SEQ ID NOS:6,7,8)-GG-(SEQ ID NO:92)[a] 3/3	3.32	
98	(SEQ ID NO:31)-GG-(SEQ ID NO:92)[a]	3/3	2,35
99	Invc-GG-(SEQ ID NO:31)-GG-(SEQ ID NO:92)[a]	3/3	3,28
	KLH[d]-(SEQ ID NO:92)[a]	2/2	0,49

[a]Sitio IgE-CH3 modificado (SEQ ID NO:92)

[b]Media para los animales del grupo

[c]Péptido del dominio de invasina (SEQ ID NO:78)

[d]Hemocianina de Lapa de Ojo de Cerradura

* sólo para referencia

Tabla 7

Th y Péptidos Antigénicos Diana de SSAL Artificiales para Inmunogenicidad y Amplitud Mejoradas de Neutralización de FMDV

SEQ ID NO:	Péptido Antigénico Diana	WPI	Nº de Animales Respondedores (n=3)	Log10 Conc. por ELISA de Anti-FMDV-VP1[d]	Log10 de FMDV (MPD_{50}) Neutralizado por Suero [d,e]						
					A_{12} FP	0-1 (JH)	A-FL	O-1 P2	A-23	Asia 1	A 1
101	(SEQ ID NO:31)-GG-$O_{SSAL\ Completa}$ [134-158(T→C)[a] -169], ciclada	5	3	5,158	3,0	4,5	2,0				5,0
								2,5	4,5	6,0	
102	Inv-GG-(SEQ ID NO:31)-GGAsia$_{SSAL}$ [134(T→C)[b]-158(R→C)c -169], ciclada	5	3	5,256	3,0	4,5	2,0				4,5
								1,0	3,0	2,5	
		10	3								

[a] T_{158} de la secuencia natural se reemplazó por C.

[b] T_{134} de la secuencia natural se reemplazó por C.

[c] R_{158} de la secuencia natural se reemplazó por C.

[d] Reactividades de sueros reunidos procedentes de animales reactivos por ELISA.

[e] Suero para ensayos de neutralización diluidos 1:100.

TABLA 8

PÉPTIDOS ANTIGÉNICOS DE CETP	
SEQ ID NO	DESCRIPCIÓN DEL PÉPTIDO ANTIGÉNICO
110,111*	(SEQ ID NOS:15,18)-εNLys-(SEQ ID NO:106)
112,113*	(SEQ ID NOS:15,18)-εNLys-(SEQ ID NO:107)
114	(SEQ ID NO:31)-εNLys-(SEQ ID NO:107)
115*	(SEQ ID NO:22)-εNLys-(SEQ ID NO:107)
116,117*	(SEQ ID NO:15,18)-εNLys-(SEQ ID NO:108)[a]
118,119*	(SEQ ID NO:15,18)-εNLys-(SEQ ID NO:109)[b]
Nota: [a] = Phe Gly Phe Pro Lys His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser (SEQ ID NO:108) [b] = Leu Asp Gly Cys Leu Leu Leu Gln Met Asp Phe Gly Phe Pro Lys His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser (SEQ ID NO:109) * sólo para referencia	

Tabla 9 (sólo para referencia)

Secuencia de aminoácidos de Epítopos Neutralizadores de HIV (SEQ ID NO)	Descripción de Epítopos de Th	Código del Péptido	Secuencias de aminoácidos de Constructos Peptídicos Representativos
ESVEINCTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYATGD	Th lib de MVF Simplificado (SEQ ID No: 15,18)	p2846b	ISISEIKGVIVHKIEGILF-(εN)K-ESVEINCTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYATGD T RT TR T (SEO ID NO:126.127)
(SEQ ID NO:125)	Th de MVF Simplificado [I, L] (SEQ ID No: 110,111)	p2868b	ISLTEIRTVIVTRLETVLF--(εN)K-ESVEINCTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYATGD I I I (SEO ID NO:128.129)
KSSGKLISL (SEQ ID NO:130)	Th de MVF Simplificado (SEQ ID No: 15,18)	p2942	KSSGKLISL-(εN)K-ISISEIKGVIVHKIEGILF T RT TR T 'SEQ ID NO:136,137)
CNGRLYCGP (SEQ ID NO:131)	Th de MVF Simplificado (SEQ ID No: 15,18)	p2937	CNGRLYCGP-(εN)K-ISISEIKGVIVHKIEGILF T RT TR T (SEQ ID NO:138,139)
(C)GTKLVCFAA (SEQ ID NO:132)	Th de MVF Simplificado (SEQ ID No:15,18)	p2939	(C)GTKLVCFAA-(εN)K-ISISEIKGVIVHKIEGILF T RT TR T (SEQ ID NO:140,141)
KRIVIGPQT (SEQ ID NO:133)	Th de MVF Simplificado (SEQ ID No: 15,18)	p2944	KRIVIGPQT-(εN)K-ISISEIKGVIVHKIEGILF T RT TR T (SEQ ID NO:142,143)
CAGGLTCSV (SEQ ID NO:134)	Th de MVF Simplificado (SEQ ID No: 15,18)	p2940	CAGGLTCSV-(εN)K-ISISEIKGVIVHKIEGILF T RT TR T (SEQ ID NO:144,145)
(C)SGRLYCHESW (SEQ ID NO:135)	Th de MVF Simplificado (SEQ ID No: 15,18)	p2941	(C)SGRLYCHESW-(εN)K-ISISEIKGVIVHKIEGILF T RT TR T (SEQ ID NO:146,147)

Tabla 10

Inmunogenicidad de Péptidos Representativos (sólo para referencia)								
Especie	Grupo	Adyuvante y Esquema de Inmunización	Código del Péptido	Descripción de Constructos Peptídicos Representativos	WPI	Log10 Conc. por ELISA sobre Antígeno	Conc. en Suero por Ensayo de Neutralización (HIV-1 MN/H9)	
							50% de Inhib.	90% de Inhib.
Cobaya	1	Emulsión de aceite en agua (0, 3, 6 WPI)	p2846 b (Seq ID Nos.148, 149)	IS(1,4,9 lib Th simplificado PALINDRÓMICO) LF-"V3" Todos Consenso	5	4,461	3972	425
					8	4,383	10276	535
					10	4,245	4245	1006
	2	Emulsión de aceite en agua (0, 3, 6 WPI)	p2868 (Seq ID Nos.150, 151)	lib[1, L] - (ε N)K-"V3" Todos Consenso	5	4,489	1198	206
					8	4,291	3295	1092
					10	4,239	4233	1147
Mandril	1	Emulsión de aceite en agua (0, 3, 6 WPI)	p2868 (Seq ID Nos.150, 151)	lib[1, L] - (ε N)K-"V3" Todos Consenso	8	4,375	948	152
					11	superior	23745	2811

Las siguientes páginas contienen realizaciones preferidas. De acuerdo con esto, el término “punto”, según se usa en la presente memoria, se refiere a tal “realización preferida”.

Realizaciones preferidas:

1. Un epítopo de células T auxiliares seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 6-22, 105, 123, 124, 31-35.

2. Un epítopo de células T auxiliares de acuerdo con el punto 1, para preparar un inmunógeno peptídico representado por la fórmula

$(A)_n$-(Sitio antigénico diana)-$(B)_o$-$(Th)_m$-X

o

$(A)_n$-$(B)_o$-$(Th)_m$-$(B)_o$-(Sitio antigénico diana)-X

o

$(A)_n$-$(Th)_m$-$(B)_o$-(Sitio antigénico diana)-X

o

(Sitio antigénico diana)-$(B)_o$-$(Th)_m$-$(A)_n$-X

o

$(Th)_m$-$(B)_o$-(Sitio antigénico diana)-$(A)_n$-X

en la que:

A es un aminoácido o una secuencia inmunoestimulante general, cuando n es más de uno, las A individuales pueden ser iguales o diferentes;

B se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos, -NHCH(X)CH_2SCH_2CO-, -NHCH(X)CH_2SCH_2CO(εN)Lys-, -NHCH(X)CH_2S-succinimidil(εN)Lys- y -NHCH(X)CH_2S-(succinimidil)-;

Th es un epítopo de células T auxiliares artificial seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 6-22, 105, 31-35 o un análogo del mismo;

"Sitio antigénico diana" es un epítopo de células B, un hapteno peptídico o un análogo inmunológicamente reactivo del mismo;

X es un aminoácido α-COOH o $CONH_2$;

n es de 1 a aproximadamente 10;

m es de 1 a aproximadamente 4; y

o es de 0 a aproximadamente 10.

3. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con el punto 2, en el que la secuencia inmunoestimulante es SEQ ID NO:78.

4. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con el punto 2, en el que B se selecciona del grupo que consiste en Gly-Gly, (ε-N)Lys, Pro-Pro-Xaa-Pro-Pro, -NHCH(X)CH_2SCH_2CO-, -NHCH(X)CH_2SCH_2CO(ε-N)Lys-, -NHCH(X)CH_2S-succinimidil(ε-N)Lys- y –NHCH(X)CH_2S-(succinimidil)-

5. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con el punto 4, en el que B es Gly-Gly.

6. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con el punto 4, en el que B es (ε-N)Lys.

7. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con los puntos 1, 2, 3, 4, 5 o 6, en el que el sitio antigénico diana es el antígeno repetitivo de *Plasmodium falciparum*: (Asn-Ala-Asn-Pro)p (SEQ ID NO:103)

8. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con el punto 7, en el que p=4.

9. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con el punto 7, seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 104, 105.

10. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con los puntos 1, 2, 3, 4, 5 o 6, en el que el sitio antigénico diana se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 106, 107, 108 y 109, un epítopo de CETP.

11. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con el punto 10, seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOS:110 - 119.

12. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con los puntos 1, 2, 3, 4, 5 o 6, en el que el sitio antigénico diana se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 125, 131, 132, 133, 134 y 135, un epítopo de HIV.

13. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con el punto 12, seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOS:126 - 129, 136-151.

14. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con el punto 13, seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOS:148 - 151.

15. Un método para producir un inmunógeno peptídico al conectar covalentemente un epítopo de células T auxiliares a un sitio antigénico diana seleccionado del grupo que consiste en epítopos de células B de un antígeno y un hapteno peptídico.

16. Un método para producir un inmunógeno peptídico de acuerdo con el punto 15, conectando adicionalmente el epítopo de células T auxiliares y el sitio antigénico diana conectados covalentemente a una secuencia

inmunoestimulante.

17. Un método para producir un inmunógeno peptídico de acuerdo con el punto 16, en el que la secuencia inmunoestimulante es SEQ ID NO:78.

18. Un método para producir un inmunógeno peptídico de acuerdo con el punto 17, en el que B se selecciona del grupo que consiste en Gly-Gly, (ε-N)Lys, Pro-Pro-Xaa-Pro-Pro, -NHCH(X)CH_2SCH_2CO-, -NHCH(X)CH_2SCH_2CO(ε-N)Lys-, -NHCH(X)CH_2S-succinimidil(ε-N)Lys- y -NHCH(X)CH_2S-(succinimidil)-.

19. Un método para producir un inmunógeno peptídico de acuerdo con el punto 18, en el que B es Gly-Gly.

20. Un método para producir un inmunógeno peptídico de acuerdo con el punto 19, en el que B es (ε-N)Lys.

21. Un método para inducir respuesta de células T auxiliares al emplear un inmunógeno peptídico del punto 1.

22. Un método para inducir respuesta de células T auxiliares al emplear un inmunógeno peptídico del punto 2.

23. Un método para inducir respuesta de células T auxiliares al emplear un inmunógeno peptídico del punto 3.

24. Un método para inducir respuesta de células T auxiliares al emplear un inmunógeno peptídico del punto 4.

25. Un método para inducir respuesta de células T auxiliares al emplear un inmunógeno peptídico del punto 5.

26. Un método para inducir respuesta de células T auxiliares al emplear un inmunógeno peptídico del punto 6.

27. Un método para inducir respuesta de células T auxiliares al emplear un inmunógeno peptídico del punto 7.

28. Un método para inducir respuesta de células T auxiliares al emplear un inmunógeno peptídico del punto 8.

29. Un método para inducir respuesta de células T auxiliares al emplear un inmunógeno peptídico del punto 9.

30. Un método para inducir respuesta de células T auxiliares al emplear un inmunógeno peptídico del punto 10.

31. Un método para inducir respuesta de células T auxiliares al emplear un inmunógeno peptídico del punto 11.

32. Un método para inducir respuesta de células T auxiliares al emplear un inmunógeno peptídico del punto 12.

33. Un método para inducir respuesta de células T auxiliares al emplear un inmunógeno peptídico del punto 13.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNITED BIOMEDICAL INC

<120> EPÍTOPOS DE CÉLULAS T AUXILIARES ARTIFICIALES COMO INMUNOESTIMULANTES PARA INMUNÓGENOS PEPTÍDICOS SINTÉTICOS

<130> 77362 ST/OH/NW

<150> EP 99 928 826

<151> 1999-06-21

<160> 152

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 1

Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val
1 5 10 15

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 2

Asp Leu Ser Asp Leu Lys Gly Leu Leu Leu His Lys Leu Asp Gly Leu
1 5 10 15

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 3

Glu Ile Ser Glu Ile Arg Gly Ile Ile Ile His Arg Ile Glu Gly Ile
1 5 10 15

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 4

Asp Val Ser Asp Val Lys Gly Val Val Val His Lys Val Asp Gly Val
1 5 10 15

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 5

Asp Phe Ser Asp Phe Lys Gly Phe Phe Phe His Lys Phe Asp Gly Phe
1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 6

Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile
1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 7

Met Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Met Glu Thr Met
1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 8

Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Leu Glu Gly Val
1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 9

Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr Ile
1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 10

Met Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Leu Glu Gly Met
1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 11

Leu Thr Glu Met Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Met Glu Thr Val
1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 12

Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr Ile
1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 13

Met Ser Glu Met Lys Gly Val Ile Val His Lys Met Glu Gly Met
1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 14

Leu Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Leu Glu Thr Val
1 5 10 15

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 15

Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly
1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 16

<211> 19

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 16

Ile Ser Met Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Met Glu Thr
1 5 10 15

Met Leu Phe

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 17

Ile Ser Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Leu Phe

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 18

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 19

Ile Ser Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Leu Glu Gly
1 5 10 15

Met Leu Phe

<210> 20

<211> 19

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 20

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 21

Ile Ser Met Ser Glu Met Lys Gly Val Ile Val His Lys Met Glu Gly
1 5 10 15

Met Leu Phe

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 22

Ile Ser Leu Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Leu Glu Thr
1 5 10 15

Val Leu Phe

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 23

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp
1 5 10 15

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 24

Lys Lys Lys Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser
1 5 10 15

Leu Asp

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 25

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
1 5 10

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 26

Lys Lys Lys Leu Phe Leu Leu Thr Lys Leu Leu Thr Leu Pro Gln Ser
1 5 10 15

Leu Asp

<210> 27

<211> 18

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 27

Arg Arg Arg Ile Lys Ile Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Pro Leu Ser
1 5 10 15

Ile Arg

<210> 28

<211> 18

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 28

Lys Lys Lys Val Arg Val Val Thr Lys Val Val Thr Val Pro Ile Ser
1 5 10 15

Val Asp

<210> 29

<211> 18

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 29

Lys Lys Lys Phe Phe Phe Phe Thr Lys Phe Phe Thr Phe Pro Val Ser
1 5 10 15

Phe Asp

<210> 30

<211> 18

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 30

Lys Lys Lys Leu Phe Leu Leu Thr Lys Leu Leu Thr Leu Pro Phe Ser
1 5 10 15

Leu Asp

<210> 31

<211> 18

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 31

Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr
1 5 10 15

Ile Asp

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 32

Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr
1 5 10 15

Ile

<210> 33

<211> 18

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 33

Lys Lys Lys Met Met Thr Met Thr Arg Met Ile Thr Met Ile Thr Thr
1 5 10 15

Ile Asp

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 34

Phe Ile Thr Met Asp Thr Lys Phe Leu Leu Ala Ser Thr His Ile Leu
1 5 10 15

<210> 35

<211> 19

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 35

Lys Lys Lys Phe Ile Thr Met Asp Thr Lys Phe Leu Leu Ala Ser Thr
1 5 10 15

His Ile Leu

<210> 36

<211> 27

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 36

Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val Gly
1 5 10 15

Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 37

<211> 28

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 37

Asp Leu Ser Asp Leu Lys Gly Leu Leu Leu His Lys Leu Asp Gly Leu
1 5 10 15

Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 38

<211> 28

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 38

Glu Ile Ser Glu Ile Arg Gly Ile Ile Ile His Arg Ile Glu Gly Ile
1 5 10 15

Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 39

<211> 28

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 39

Asp Val Ser Asp Val Lys Gly Val Val Val His Lys Val Asp Gly Val
1 5 10 15

Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 40

<211> 28

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 40

Asp Phe Ser Asp Phe Lys Gly Phe Phe Phe His Lys Phe Asp Gly Phe
1 5 10 15

Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 41

<211> 27

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 41

Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile Gly
1 5 10 15

Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 42

<211> 27

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 42

Met Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Met Glu Thr Met Gly
1 5 10 15

Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 43

<211> 27

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 43

Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Leu Glu Gly Val Gly
1 5 10 15

Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 44

<211> 27

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 44

Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr Ile Gly
1 5 10 15

Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 45

<211> 45

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 45

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
1 5 10 15

Gly Gly Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly
20 25 30

Ile Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
35 40 45

<210> 46

<211> 45

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 46

```
Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
1               5                   10                  15

Gly Gly Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
            20                  25                  30

Ile Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
        35                  40                  45
```

<210> 47

<211> 27

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 47

```
Met Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Leu Glu Gly Met Gly
1               5                   10                  15

Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
            20                  25
```

<210> 48

<211> 27

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 48

```
Leu Thr Glu Met Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Met Glu Thr Val Gly
1               5                   10                  15

Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
            20                  25
```

<210> 49

<211> 27

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 49

```
Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr Ile Gly
1               5                   10                  15

Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
            20                  25
```

<210> 50

<211> 27

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 50

```
Met Ser Glu Met Lys Gly Val Ile Val His Lys Met Glu Gly Met Gly
1               5                   10                  15

Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
            20                  25
```

<210> 51

<211> 27

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 51

```
Leu Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Leu Glu Thr Val Gly
1               5                   10                  15

Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
            20                  25
```

<210> 52

<211> 45

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 52

```
Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
1               5                   10                  15

Gly Gly Leu Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Leu Glu Thr
            20                  25                  30

Val Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
        35                  40                  45
```

<210> 53

<211> 31

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 53

```
Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly
1               5                   10                  15

Ile Leu Phe Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
            20                  25                  30
```

<210> 54

<211> 31

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 54

```
Ile Ser Met Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Met Glu Thr
1               5                   10                  15

Met Leu Phe Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
            20                  25                  30
```

<210> 55

<211> 31

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 55

```
Ile Ser Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Leu Glu Gly
1               5                   10                  15

Val Leu Phe Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
            20                  25                  30
```

<210> 56

<211> 31

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 56

```
Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
1               5                   10                  15

Ile Leu Phe Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
            20                  25                  30
```

<210> 57

<211> 49

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 57

```
Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
1               5                   10                  15

Gly Gly Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile
            20                  25                  30

Glu Gly Ile Leu Phe Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro
        35                  40                  45

Gly
```

<210> 58

<211> 49

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 58

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
1 5 10 15

Gly Gly Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile
20 25 30

Glu Thr Ile Leu Phe Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro
35 40 45

Gly

<210> 59

<211> 31

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 59

Ile Ser Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Leu Glu Gly
1 5 10 15

Met Leu Phe Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25 30

<210> 60

<211> 47

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 60

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
1 5 10 15

Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly
20 25 30

Ile Leu Phe Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
35 40 45

<210> 61

<211> 31

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 61

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25 30

<210> 62

<211> 49

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 62

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
1 5 10 15

Gly Gly Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile
20 25 30

Glu Thr Ile Leu Phe Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro
35 40 45

Gly

<210> 63

<211> 47

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 63

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
1 5 10 15

Ile Ser Met Ser Glu Met Lys Gly Val Ile Val His Lys Met Glu Gly
20 25 30

Met Leu Phe Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
35 40 45

<210> 64

<211> 31

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 64

Ile Ser Leu Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Leu Glu Thr
1 5 10 15

Val Leu Phe Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25 30

<210> 65

<211> 27

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 65

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Gly
1 5 10 15

Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 66

<211> 30

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 66

Lys Lys Lys Leu Phe Leu Leu Thr Lys Leu Leu Thr Leu Pro Gln Ser
1 5 10 15

Leu Asp Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25 30

<210> 67

<211> 30

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 67

Arg Arg Arg Ile Lys Ile Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Pro Leu Ser
1 5 10 15

Ile Arg Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25 30

<210> 68

<211> 30

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 68

Lys Lys Lys Val Arg Val Val Thr Lys Val Val Thr Val Pro Ile Ser
1 5 10 15

Val Asp Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25 30

<210> 69

<211> 30

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 69

Lys Lys Lys Phe Phe Phe Phe Thr Lys Phe Phe Thr Phe Pro Val Ser
1 5 10 15

Phe Asp Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25 30

<210> 70

<211> 30

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 70

Lys Lys Lys Leu Phe Leu Leu Thr Lys Leu Leu Thr Leu Pro Phe Ser
1 5 10 15

Leu Asp Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25 30

<210> 71

<211> 30

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 71

Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr
1 5 10 15

Ile Asp Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25 30

<210> 72

<211> 29

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 72

Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr
1 5 10 15

Ile Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 73

<211> 30

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 73

Lys Lys Lys Met Met Thr Met Thr Arg Met Ile Thr Met Ile Thr Thr
1 5 10 15

Ile Asp Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25 30

<210> 74

<211> 28

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 74

Phe Ile Thr Met Asp Thr Lys Phe Leu Leu Ala Ser Thr His Ile Leu
1 5 10 15

Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 75

<211> 46

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 75

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
1 5 10 15

Gly Gly Phe Ile Thr Met Asp Thr Lys Phe Leu Leu Ala Ser Thr His
20 25 30

Ile Leu Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
35 40 45

<210> 76

<211> 31

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 76

Lys Lys Lys Phe Ile Thr Met Asp Thr Lys Phe Leu Leu Ala Ser Thr
1 5 10 15

His Ile Leu Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25 30

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> LHRH

<400> 77

Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
1 5 10

<210> 78

<211> 16

<212> PRT

<213> Especie de Yersinia

<400> 78

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
1 5 10 15

<210> 79

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (3)..(3)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (5)..(5)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 79

Pro Pro Xaa Pro Xaa Pro
1 5

<210> 80

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 80

Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys
1 5 10

<210> 81

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 81

Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile Gly
1 5 10 15

Gly Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys
20 25 30

<210> 82

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 82

Met Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Met Glu Thr Met Gly
1 5 10 15

Gly Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys
20 25 30

<210> 83

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 83

```
Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Leu Glu Gly Val Gly
1               5                   10                  15

Gly Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys
            20                  25                  30
```

<210> 84

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 84

```
Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys Gly Gly
1               5                   10                  15

Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile
            20                  25                  30
```

<210> 85

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial.

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 85

```
Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys Gly Gly
1               5                   10                  15

Met Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Met Gly Thr Met
            20                  25                  30
```

<210> 86

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 86

```
Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys Gly Gly
1               5                   10                  15

Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Leu Glu Gly Val
            20                  25                  30
```

<210> 87

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 87

```
Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr
1               5                   10                  15

Ile Asp Gly Gly Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr
            20                  25                  30

Ser Cys
```

<210> 88

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 88

Cys Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp
1 5 10 15

Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Cys
20 25 30

<210> 89

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 89

Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile Gly
1 5 10 15

Gly Cys Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn
20 25 30

Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Cys
35 40 45

<210> 90

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 90

Met Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Met Glu Thr Met Gly
1 5 10 15

Gly Cys Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn
20 25 30

Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Cys
35 40 45

<210> 91

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 91

```
Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Leu Glu Gly Val Gly
1               5                   10                  15

Gly Cys Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn
            20                  25                  30

Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Cys
        35                  40                  45
```

<210> 92

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 92

```
Cys Gly Glu Thr Tyr Gln Ser Arg Val Thr His Pro His Leu Pro Arg
1               5                   10                  15

Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Cys
            20                  25
```

<210> 93

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 93

```
Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly
1               5                   10                  15

Ile Leu Phe Gly Gly Cys Gly Glu Thr Tyr Gln Ser Arg Val Thr His
            20                  25                  30

Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Cys
        35                  40                  45
```

<210> 94

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 94

```
Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
1               5                   10                  15

Ile Leu Phe Gly Gly Cys Gly Glu Thr Tyr Gln Ser Arg Val Thr His
            20                  25                  30

Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Cys
        35                  40                  45
```

<210> 95

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 95

```
Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile Gly
1               5                   10                  15

Gly Cys Gly Glu Thr Tyr Gln Ser Arg Val Thr His Pro His Leu Pro
            20                  25                  30

Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Cys
        35                  40
```

<210> 96

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 96

```
Met Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Met Glu Thr Met Gly
1               5                   10                  15

Gly Cys Gly Glu Thr Tyr Gln Ser Arg Val Thr His Pro His Leu Pro
            20                  25                  30

Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Cys
        35                  40
```

<210> 97

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 97

```
Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Leu Glu Gly Val Gly
1               5                   10                  15

Gly Cys Gly Glu Thr Tyr Gln Ser Arg Val Thr His Pro His Leu Pro
            20                  25                  30

Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Cys
        35                  40
```

<210> 98

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 98

Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr
1 5 10 15

Ile Asp Gly Gly Cys Gly Glu Thr Tyr Gln Ser Arg Val Thr His Pro
20 25 30

His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Cys
35 40 45

<210> 99

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 99

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
1 5 10 15

Gly Gly Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile
20 25 30

Thr Thr Ile Asp Gly Gly Cys Gly Glu Thr Tyr Gln Ser Arg Val Thr
35 40 45

His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Cys
50 55 60

<210> 100

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 100

```
Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Pro Pro
1               5                   10                  15

Ser Val Pro Asn Leu Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys Val
            20                  25                  30

Ala Arg Thr Pro Cys Gly
        35
```

<210> 101

<211> 56

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 101

```
Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr
1               5                   10                  15

Ile Asp Gly Gly Cys Lys Tyr Gly Glu Asn Ala Val Thr Asn Val Arg
            20                  25                  30

Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys Ala Ala Arg Cys Leu Pro Thr
        35                  40                  45

Ser Phe Asn Tyr Gly Ala Ile Lys
    50                  55
```

<210> 102

<211> 72

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 102

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
1 5 10 15

Gly Gly Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile
20 25 30

Thr Thr Ile Asp Gly Gly Cys Thr Tyr Gly Thr Gln Pro Ser Arg Arg
35 40 45

Gly Asp Met Ala Ala Leu Ala Gln Arg Leu Ser Arg Cys Leu Pro Thr
50 55 60

Ser Phe Asn Tyr Gly Ala Val Lys
65 70

<210> 103

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 103

Asn Ala Asn Pro
1

<210> 104

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 104

Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly
1 5 10 15

Ile Leu Phe Lys Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro
20 25 30

Asn Ala Asn Pro
35

<210> 105

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 105

Ile Ser Met Thr Glu Met Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Met Glu Thr
1 5 10 15

Val Leu Phe

<210> 106

<211> 26

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 106

Arg Asp Gly Phe Leu Leu Leu Gln Met Asp Phe Gly Phe Pro Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
20 25

<210> 107

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 107

Phe Gly Phe Pro Glu His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
1 5 10 15

<210> 108

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 108

Phe Gly Phe Pro Lys His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
1 5 10 15

<210> 109

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 109

Leu Asp Gly Cys Leu Leu Leu Gln Met Asp Phe Gly Phe Pro Lys His
1 5 10 15

Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
20 25

<210> 110

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 110

Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly
1 5 10 15

Ile Leu Phe Lys Arg Asp Gly Phe Leu Leu Leu Gln Met Asp Phe Gly
20 25 30

Phe Pro Glu His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 111

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 111

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe Lys Arg Asp Gly Phe Leu Leu Leu Gln Met Asp Phe Gly
20 25 30

Phe Pro Glu His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 112

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 112

Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly
1 5 10 15

Ile Leu Phe Lys Phe Gly Phe Pro Glu His Leu Leu Val Asp Phe Leu
20 25 30

Gln Ser Leu Ser
35

<210> 113

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 113

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe Lys Phe Gly Phe Pro Glu His Leu Leu Val Asp Phe Leu
20 25 30

Gln Ser Leu Ser
35

<210> 114

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 114

Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr
1 5 10 15

Ile Asp Lys Phe Gly Phe Pro Glu His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln
20 25 30

Ser Leu Ser
35

<210> 115

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 115

Ile Ser Leu Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Leu Glu Thr
1 5 10 15

Val Leu Phe Lys Phe Gly Phe Pro Glu His Leu Leu Val Asp Phe Leu
20 25 30

Gln Ser Leu Ser
35

<210> 116

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 116

Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly
1 5 10 15

Ile Leu Phe Lys Phe Gly Phe Pro Lys His Leu Leu Val Asp Phe Leu
20 25 30

Gln Ser Leu Ser
35

<210> 117

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 117

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe Lys Phe Gly Phe Pro Lys His Leu Leu Val Asp Phe Leu
20 25 30

Gln Ser Leu Ser
35

<210> 118

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 118

Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly
1 5 10 15

Ile Leu Phe Lys Leu Asp Gly Cys Leu Leu Leu Gln Met Asp Phe Gly
20 25 30

Phe Pro Lys His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 119

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 119

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe Lys Leu Asp Gly Cys Leu Leu Leu Gln Met Asp Phe Gly
20 25 30

Phe Pro Lys His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
35 40 45

<210> 120

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> misc

<222> (22)..(22)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<220>

<221> misc

<222> (24)..(24)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 120

Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly
1 5 10 15

Ile Leu Phe Pro Pro Xaa Pro Xaa Pro Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu
20 25 30

Arg Pro Gly
35

<210> 121

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (22)..(22)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (24)..(24)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 121

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe Pro Pro Xaa Pro Xaa Pro Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu
20 25 30

Arg Pro Gly
35

<210> 122

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (21)..(21)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (23)..(23)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 122

Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr
1 5 10 15

Ile Asp Pro Pro Xaa Pro Xaa Pro Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg
20 25 30

Pro Gly

<210> 123

<211> 19

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 123

Ile Ser Leu Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Leu Glu Thr
1 5 10 15

Val Leu Phe

<210> 124

<211> 19

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 124

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 125

<211> 31

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 125

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

Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln Ala Phe Tyr Ala Thr Gly Asp
20 25 30

<210> 126

<211> 51

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (20)..(20)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 126

Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly
1 5 10 15

Ile Leu Phe Xaa Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn
20 25 30

Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln Ala Phe Tyr Ala
35 40 45

Thr Gly Asp
50

<210> 127

<211> 51

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (20)..(20)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 127

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe Xaa Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn
20 25 30

Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln Ala Phe Tyr Ala
35 40 45

Thr Gly Asp
50

<210> 128

<211> 51

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (20)..(20)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 128

```
Ile Ser Leu Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Leu Glu Thr
1               5                   10                  15

Val Leu Phe Xaa Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn
            20                  25                  30

Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln Ala Phe Tyr Ala
        35                  40                  45

Thr Gly Asp
    50
```

<210> 129

<211> 51

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (20)..(20)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 129

```
Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
1               5                   10                  15

Val Ile Phe Xaa Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn
            20                  25                  30

Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln Ala Phe Tyr Ala
        35                  40                  45

Thr Gly Asp
    50
```

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 130

Lys Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ser Leu
1 5

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 131

Cys Asn Gly Arg Leu Tyr Cys Gly Pro
1 5

<210> 132

<211> 10

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 132

Cys Gly Thr Lys Leu Val Cys Phe Ala Ala
1 5 10

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 133

Lys Arg Ile Val Ile Gly Pro Gln Thr
1 5

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 134

Cys Ala Gly Gly Leu Thr Cys Ser Val
1 5

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 135

Cys Ser Gly Arg Leu Tyr Cys His Glu Ser Trp
1 5 10

<210> 136

<211> 29

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (10)..(10)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 136

Lys Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ser Leu Xaa Ile Ser Ile Ser Glu Ile
1 5 10 15

Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile Leu Phe
20 25

<210> 137

<211> 29

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (10)..(10)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 137

Lys Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ser Leu Xaa Ile Ser Ile Thr Glu Ile
1 5 10 15

Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr Ile Leu Phe
20 25

<210> 138

<211> 29

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (10)..(10)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 138

Cys Asn Gly Arg Leu Tyr Cys Gly Pro Xaa Ile Ser Ile Ser Glu Ile
1 5 10 15

Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile Leu Phe
20 25

<210> 139

<211> 29

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (10)..(10)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 139

Cys Asn Gly Arg Leu Tyr Cys Gly Pro Xaa Ile Ser Ile Thr Glu Ile
1 5 10 15

Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr Ile Leu Phe
20 25

<210> 140

<211> 30

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (11)..(11)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 140

Cys Gly Thr Lys Leu Val Cys Phe Ala Ala Xaa Ile Ser Ile Ser Glu
1 5 10 15

Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile Leu Phe
20 25 30

<210> 141

<211> 30

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (11)..(11)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 141

Cys Gly Thr Lys Leu Val Cys Phe Ala Ala Xaa Ile Ser Ile Thr Glu
1 5 10 15

Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr Ile Leu Phe
20 25 30

<210> 142

<211> 29

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (10)..(10)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 142

Lys Arg Ile Val Ile Gly Pro Gln Thr Xaa Ile Ser Ile Ser Glu Ile
1 5 10 15

Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile Leu Phe
20 25

<210> 143

<211> 29

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (10)..(10)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 143

Lys Arg Ile Val Ile Gly Pro Gln Thr Xaa Ile Ser Ile Thr Glu Ile
1 5 10 15

Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr Ile Leu Phe
20 25

<210> 144

<211> 29

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (10)..(10)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 144

Cys Ala Gly Gly Leu Thr Cys Ser Val Xaa Ile Ser Ile Ser Glu Ile
1 5 10 15

Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile Leu Phe
20 25

<210> 145

<211> 29

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (10)..(10)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 145

Cys Ala Gly Gly Leu Thr Cys Ser Val Xaa Ile Ser Ile Thr Glu Ile
1 5 10 15

Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr Ile Leu Phe
20 25

<210> 146

<211> 31

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (12)..(12)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 146

Cys Ser Gly Arg Leu Tyr Cys His Glu Ser Trp Xaa Ile Ser Ile Ser

1 5 10 15

Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly Ile Leu Phe
20 25 30

<210> 147

<211> 31

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (12)..(12)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 147

Cys Ser Gly Arg Leu Tyr Cys His Glu Ser Trp Xaa Ile Ser Ile Thr
1 5 10 15

Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Gly Ile Leu Phe
20 25 30

<210> 148

<211> 52

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 148

Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Gly
1 5 10 15

Ile Leu Phe Gly Gly Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn
20 25 30

Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln Ala Phe Tyr
35 40 45

Ala Thr Gly Asp
50

<210> 149

<211> 52

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 149

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe Gly Gly Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn

20 25 30

Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln Ala Phe Tyr
35 40 45

Ala Thr Gly Asp
50

<210> 150

<211> 50

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (20)..(20)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 150

Ile Ser Leu Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Leu Glu Thr
1 5 10 15

Val Leu Phe Xaa Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn
20 25 30

Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln Ala Phe Tyr Ala
35 40 45

Thr Gly
50

<210> 151

<211> 50

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC_

<222> (20)..(20)

<223> X o Xaa es cualquier aminoácido.

<400> 151

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
1 5 10 15

Val Ile Phe Xaa Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn
20 25 30

Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln Ala Phe Tyr Ala
35 40 45

Thr Gly
50

<210> 152

<211> 36

<212> PRT

<213> *Plasmodium falciparum*

<400> 152

```
Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
1               5                  10                  15

Ile Leu Phe Lys Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro
            20                  25                  30

Asn Ala Asn Pro
        35
```

REIVINDICACIONES

1. Un epítopo de células T auxiliares seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31 y 32.

2. Un inmunógeno peptídico representado por la fórmula

$(A)_n$-(Sitio antigénico diana)-$(B)_o$-$(Th)_m$-X

o

$(A)_n$-$(Th)_m$-$(B)_o$-(Sitio antigénico diana)-X

o

$(A)_n$-$(B)_o$-$(Th)_m$-$(B)_o$-(Sitio antigénico diana)-X

o

(Sitio antigénico diana)-$(B)_o$-$(Th)_m$-$(A)_n$-X

o

$(Th)_m$-$(B)_o$-(Sitio antigénico diana)-$(A)_n$-X

en la que:

A es un aminoácido o una secuencia inmunoestimulante general, cuando n >1, las A individuales pueden ser iguales o diferentes;

B se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos, -NHCH(X)CH_2SCH_2CO-, -NHCH(X)CH_2SCH_2CO(ε-N)Lys-, -NHCH(X)CH_2S-succinimidil(ε-N)Lys- y -NHCH(X)CH_2S-(succinimidil)-;

Th es un epítopo de células T auxiliares artificial (SEQ ID NOS: 31 y 32) ;

"Sitio antigénico diana" es un epítopo de células B, un hapteno peptídico, o un análogo inmunológicamente reactivo del mismo;

X es un aminoácido α-COOH o $CONH_2$;

n es de 0 a 10;

m es de 1 a 4; y

o es de 0 a 10.

3. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la secuencia inmunoestimulante es SEQ ID No: 78.

4. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con la reivindicación 2, en el que B se selecciona del grupo que consiste en Gly-Gly, (ε-N)Lys, Pro-Pro-Xaa-Pro-Xaa-Pro, -NHCH(X)CH_2SCH_2CO-, -NHCH(X)CH_2SCH_2CO(ε-N)Lys-, -NHCH(X)CH_2S-succinimidil(ε-N)Lys- y -NHCH(X)CH_2S-(succinimidil)-, en donde Xaa es cualquier aminoácido.

5. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con la reivindicación 4, en el que B es Gly-Gly.

6. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con la reivindicación 4, en el que B es (ε-N)Lys.

7. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 4, 5 o 6, en el que el sitio antigénico diana es el antígeno repetitivo de *Plasmodium falciparum*:

$(Asn\text{-}Ala\text{-}Asn\text{-}Pro)_p$ (SEQ ID NO: 103),

en el que p=4.

8. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 4, 5 o 6, en el que el sitio antigénico diana se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 106, 107, 108 y 109, un epítopo de CETP.

9. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con la reivindicación 8, que consiste en SEQ ID NO: 114.

10. A inmunógeno peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 4, 5 o 6, en el que el sitio antigénico diana consiste en SEQ ID NO: 77, un epítopo de LHRH.

11. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con la reivindicación 10, seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 71 y 72.

12. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 4, 5 o 6, en el que el sitio antigénico diana consiste en SEQ ID NO: 92, un epítopo de IgE-CH3.

13. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con la reivindicación 12, seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 98 y 99.

14. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 4, 5 o 6, en el que el sitio antigénico diana consiste en SEQ ID NO: 80, un epítopo de somatostatina.

15. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con la reivindicación 14, que consiste en SEQ ID NO: 87.

16. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 4, 5 o 6, en el que el sitio antigénico diana es un epítopo de FMDV.

17. Un inmunógeno peptídico de acuerdo con la reivindicación 16, seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 101 y 102.

18. Un método para producir un inmunógeno peptídico al conectar covalentemente un epítopo de células T auxiliares de acuerdo con la reivindicación 1 a un sitio antigénico diana seleccionado del grupo que consiste en epítopos de células B de un antígeno y un hapteno peptídico.

19. Un método para producir un inmunógeno peptídico de acuerdo con la reivindicación 18, conectando adicionalmente el epítopo de células T auxiliares y el sitio antigénico diana conectados covalentemente a una secuencia inmunoestimulante.

20. Un método para producir un inmunógeno peptídico de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la secuencia inmunoestimulante es SEQ ID NO: 78.

21. Un método para producir un inmunógeno peptídico de acuerdo con la reivindicación 20, en el que B se selecciona del grupo que consiste en Gly-Gly, (ε-N)Lys, Pro-Pro-Xaa-Pro-Xaa-Pro, -NHCH(X)CH_2SCH_2CO-, -NHCH(X)CH_2SCH_2CO(ε-N)Lys-, -NHCH(X)CH_2S-succinimidil(ε-N)Lys- y -NHCH(X)CH_2S(succinimidil)-, en donde Xaa es cualquier aminoácido.

22. Un método para producir un inmunógeno peptídico de acuerdo con la reivindicación 21, en el que B es Gly-Gly.

23. Un método para producir un inmunógeno peptídico de acuerdo con la reivindicación 21, en el que B es (ε-N)Lys.

24. Un método para inducir una respuesta de células T auxiliares in vitro al emplear un inmunógeno peptídico que comprende el epítopo de células T auxiliares de acuerdo con la reivindicación 1.

25. Un método para inducir una respuesta de células T auxiliares in vitro al emplear un inmunógeno peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 17.