(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 393 995**

(51) Int. CI.:

C07K 14/435 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **03709469 .5**
(96) Fecha de presentación: **01.04.2003**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1495047**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2005**

(54) Título: **Fragmentos de péptidos activos sintéticos**

(30) Prioridad:

02.04.2002 US 113946

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:

04.01.2013

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

04.01.2013

(73) Titular/es:

FUNDACAO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ (100.0%)
AVENIDA BRASIL, 4365
MANGUINHOS, CEP-21045-900 RIO, BR

(72) Inventor/es:

TENDLER, MIRIAM;
GARRAT, RICHARD, CHARLES;
KATZ, NAFTALE;
SIMPSON, ANDREW, JOHN, GEORGE;
DE BARRIENTOS, FRANK, JEFFERSON, ALARCON;
VILAR, MÔNICA, MAGNO y
ALMEIDA, MARILIA, SIRIANNI, DOS SANTOS

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Fragmentos de péptidos activos sintéticos

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a fragmentos de péptidos que tienen una o más secuencias de aminoácidos compartidas y/o similares respecto de las secuencias de aminoácidos de porciones específicas de la proteína de 14 kDa de *S. mansoni* (Sm14) o FABPs relacionadas (Proteínas de Unión de Ácidos Grasos), y dichos fragmentos de péptidos funcionan como regiones epitópicas continuas o discontinuas de la molécula o imitan su actividad biológica. Más en particular, la presente invención se refiere a un método para construir fragmentos de péptidos activos, fragmentos de péptidos, composición inmunógena y equipo de ensayo de diagnóstico mediante el uso de dichos fragmentos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Sm14, que pertenece a la familia de Proteínas de Unión de Ácidos Grasos (FABPs), es un antígeno de reacción cruzada que muestra un nivel elevado de protección contra la esquistosomiasis y fasciolosis.

Los patógenos son organismos infecciosos, tales como bacterias, virus, protozoos, helmintos, o cualquier parásito que provoca enfermedades infecciosas al hospedador, en general expresando antígenos específicos que son reconocidos por los sistemas inmunitarios de los hospedadores como extraños, y se convierten en el objetivo de la respuesta inmunológica para eliminar el patógeno infeccioso.

En general, existen sitios específicos en los antígenos, los epítopos de unión o simplemente epítopos, que se unen a una porción complementaria de una proteína celular, es decir, el sitio receptor. Así, los antígenos de los patógenos se unen a menudo a receptores celulares en la célula de un hospedador como parte del proceso de infección del hospedador por el patógeno. Existe una complementariedad similar entre los anticuerpos del hospedador generados contra un antígeno y los determinantes antigénicos del antígeno propiamente dicho. Estas regiones de la molécula antigénica, sin embargo, pueden ser diferentes de las que son importantes para la invasión de la célula hospedadora. Para inmunizar al hospedador y reducir la eficacia del patógeno de provocar una exposición al hospedador, se han ideado varias estrategias de vacunación.

Hasta hace poco tiempo, como se describe en el Instituto de Medicina, "Vaccine supply and innovation", Washington, D.C.: National Academy Press (1985), se han empleado varias estrategias para desarrollar vacunas seguras y eficaces que consisten en patógenos atenuados vivos, patógenos muertos, componentes de patógenos, o toxinas modificadas (toxoides).

Hay disponibles vacunas contra diversos virus, bacterias, y protozoos patógenos, tales como viruela, fiebre amarilla, sarampión, difteria y malaria. Con respecto a los helmintos patógenos que son gusanos parásitos y provocan enfermedades humanas y veterinarias, tales como esquistosomiasis y fasciolosis, en la actualidad no se usan vacunas en programas de prevención y control. Estas enfermedades no son transmisibles directamente de una persona (o animal) a otra, y el helminto necesita un hospedador intermedio y condiciones ambientales para completar su complejo ciclo vital. Todavía existe un gran vacío en el conocimiento de las variables que influyen en la dinámica de la transmisión de estas enfermedades con respecto a las vacunas y al diseño de los protocolos de vacunación. En otras palabras, y basándose en el conocimiento actual de los parámetros epidemiológicos que modulan e influyen en la eficacia de la vacunación contra estas enfermedades, se puede afirmar que todavía no se han establecido ni los niveles individuales preferentes de protección requeridos por una vacuna, ni el número de individuos a vacunar y/o proteger en una población dada.

En la actualidad, el uso de vacunas compuestas de componentes de patógenos o de parásitos atenuados para la inmunización humana se considera poco práctico y potencialmente peligroso. La preocupación de usar tales mezclas complejas e indefinidas proviene del hecho de que la mayoría de los componentes estimulan respuestas inmunitarias no funcionales, y ciertos componentes pueden ser incluso perjudiciales para los sujetos vacunados, al poder generarse productos tóxicos de peroxidación de lípidos por el ataque inmunitario contra otros antígenos del parásito, en particular antígenos de superficie.

Estas consideraciones han llevado a los investigadores a buscar métodos alternativos para una inmunización eficaz, y se ha hecho un gran esfuerzo para purificar proteínas naturales de fuentes naturales o para producirlas de manera sintética mediante medios químicos o de manera alternativa mediante el uso de la tecnología del ADN recombinante.

Los intentos de vacunar modelos animales contra esquistosomiasis con homogenizados llevaron a los investigadores a descubrir un extracto salino (ES) que presenta buenos resultados para conferir protección contra enfermedades provocadas por infecciones por *Schistosoma* en seres humanos.

La inmunidad protectora contra esquistosomas se informó en el uso de una "mezcla" de componentes de esquistosoma (denominada ES) liberada de forma temprana durante la incubación de gusano adulto S. mansoni vivo y recién perfundido en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Centrándose en los intentos de conseguir una protección contra la infección cercarial mediante la vacunación, se diseñó un modelo experimental, en dos hospedadores animales diferentes no relacionados, el ratón SW y el conejo NZ, que se sabe que son completamente susceptibles y parcialmente resistentes a la infección por *S. mansoni*, respectivamente.

Los estudios sobre la respuesta inmunitaria inducida en animales vacunados dirigidos a la identificación de los componentes protectores de ES funcionalmente relevantes, el sitio y el mecanismo de la muerte del parásito, así como los marcadores de protección, han sido el centro de atención de los esfuerzos de los autores en los últimos años. Hasta el momento ha habido poca información sobre la composición molecular de ES, así como sobre la identificación y el aislamiento de sus componentes protectores. (véase: Tendler, M. y Scapin, M. (1979). "The presence of Schistosoma mansoni antigens in solutions used for storing adult worms". Rev. Inst. Med. Trop. 21(6): 293-296; Tendler, M et al. (1982). "Immunogenic and protective activity of an extract of Schistosoma mansoni". Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 77(3): 275-283).

La Patente de EE.UU. 4.396.600 expedida el 2 de agosto de 1983 a nombre de Luigi Messineo y Mauro Scarpin describía un extracto de gusanos adultos de Schistosoma mansoni obtenidos mediante incubación en tampón de cloruro sódico-fosfato sódico 0,15 M de pH 5,8. El extracto contiene proteínas, carbohidratos, y ácidos nucleicos y/o subproductos de este último componente, y se resuelve en cuatro fracciones principales (I-IV) mediante cromatografía en gel en columnas de Sephadex G-100 y G-200. Los ensayos de inmunodifusión con extracto sérico anti-total de conejo revelan tres líneas de precipitación que corresponden a las fracciones I y II y una con III o IV. Se descubrió que los conejos inmunizados con este extracto total eran totalmente o parcialmente (al menos un 77%) resistentes a una infección por exposición. El material antigénico del extracto salino es una vacuna eficaz para el tratamiento y la inmunización de esquistosomiasis y otras infecciones por esquistosoma.

Otro estudio publicado es "A 14-KDa Schistosoma mansoni Polypeptide is Homologous to a gene family of fatty Acid Binding Proteins" - The Journal of Biological Chemistry - vol. 266, Nº 13, ejemplar del 5 de mayo, págs. 8447-8454, 1991; D. Moser, M. Tendler, G. Griffiths, y Mo-Quen Klinkert. Este estudio describe la secuenciación del gen y la demostración de la actividad funcional de Sm-14 como una proteína que se une a lípidos.

Así, se han clonado, secuenciado, y caracterizado los antígenos de esquistosoma presentes en el ES y otros antígenos de helminto relacionados, y se han preparado las proteínas recombinantes correspondientes. Los ejemplos son: Sm14 (Patente de EE.UU. 5.730.984 concedida a la Fundación Oswaldo Cruz el 24 de marzo de 1998; Fh-15 (Perez *et al*. (1992). "*Fasciola hepatica*: Molecular cloning. Nucleotide sequence and expression of gene encoding a polypeptide homologous to a *Schistosoma mansoni* Fatty Acid-Binding Protein". J. Exp. Parasitol. 74(4): 400-407.

Sin embargo, las vacunas que se basan en el uso de proteínas que pertenecen al patógeno, estén alteradas o no, no siempre son fácilmente obtenibles. Las dificultades en la extracción, la purificación, el análisis cuantitativo y la modificación de tales proteínas son problemas habituales con este tipo de vacunas. Existen soluciones para algunos de estos casos, pero estas pueden dar como resultado responsabilidades adicionales para el proceso de producción de proteínas, lo cual va en contra del principio general de que una vacuna debería tener un coste relativamente bajo y debería ser accesible mundialmente. Se proporciona información adicional sobre Sm14 en Brito C. F. et al., Base de datos Medline, Nº de acc. del NCBI 10744504, y Thaumaturgo N. et al., Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Vol. 96, Supl. 2001, páginas 79-83.

Como alternativa, aunque no sin sus propias deficiencias, es el uso de péptidos sintéticos como vacunas.

Hubo intentos de combinar porciones epitópicas de más de un antígeno para generar sus propiedades inmunológicas. Un ejemplo de esta aproximación se describe en la Patente de EE.UU. 5.219.566 concedida a la Universidad John Hopkins el 15 de junio de 1993, y se refiere a la construcción de polipéptidos basada en la identificación de regiones epitópicas que son comunes a dos proteínas de *S. mansoni*. Los polipéptidos tienen epítopos que son compartidos por las proteínas de 200 y 38 kDa de *S. mansoni* y son capaces de unirse a los epítopos proteicos, pero no a los epítopos de glicano expresados en la superficie de la esquistosómulas vivas de *S. mansoni*. El epítopo (o epítopos) de la proteína de 38 kDa se expone a la superficie de la esquistosómula mientras el epítopo de la proteína de 200 kDa aparentemente no se expone a la superficie de esquistosómula. Se incluye en la invención una proteína de fusión que tiene porciones de cualquier proteína bacteriana que se expresa bien, en particular mediante el uso de porciones del extremo amino-terminal de la enzima beta-galactosidasa. Se menciona que el subgrupo particular de antígenos de gusanos adultos se seleccionó basándose en su reactividad aumentada con los sueros de ratones vacunados en comparación con los ratones infectados de manera crónica.

Aunque muchos antígenos de helmintos están disponibles y se han estudiado con respecto a su potencial protector, solamente seis antígenos de *Schistosoma mansoni* fueron seleccionados por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como candidatos para vacunas contra enfermedades provocadas por esquistosomas (véase el Informe de Progreso 1975-94, Puntos Destacados 1993-94 - 20 Años de Progreso, Investigación de Enfermedades Tropicales

de la OMS, Ginebra, 1995). Los antígenos seleccionados son: GST-28 kDa (también conocido como Sh28-GST) - una Glutatión S-Transferasa, que se localiza en la esquistosómula o en el parénquima del gusano adulto y en el dorso del gusano adulto; Paramiosina-97 kDa - una proteína muscular de gusanos adultos o esquistosómula; Sm23-23 kDa - una proteína de la membrana de gusanos adultos; IrV5-62 kDa - una proteína que es homóloga a miosina y está presente en todas las fases del parásito; TPI-28 kDa - una Triosa Fosfato Isomerasa y rSm14 -14 kDa - de gusanos adultos y que pertenece a la familia de Proteínas de Unión de Ácidos Grasos.

De estos seis candidatos de vacunas contra *S. mansoni* inicialmente seleccionados por la OMS, se han aprobado posteriormente cuatro para la producción a gran escala de antígeno de grado GMP y para ensayos clínicos de fase I/II en seres humanos. Dos de estos, Sh28-GST y Sm14, son los más cercanos a alcanzar esta realidad, y GST ya está en ensayos clínicos de fase II para *S. haematobium* en Senegal y Sm14 en las etapas finales del aumento de producción. Además, Sm14 es el único candidato de vacuna que se ha demostrado que produce una protección inmunitaria significativa contra dos enfermedades helmínticas relevantes de importancia humana y veterinaria, concretamente Esquistosomiasis y Fasciolosis.

Sm14 es así una oportunidad única para atacar la segunda enfermedad parasitaria más prevalente en seres humanos - Esquistosomiasis - y la infección por helmintos más importante del ganado - Fasciolosis - y por lo tanto representa una estrategia atractiva para el desarrollo de vacunas contra helmintos.

Sin embargo, aunque se ha conseguido cierto éxito, estas moléculas son bastante grandes.

Un método que está actualmente bajo investigación exhaustiva es el uso de péptidos sintéticos que corresponden a segmentos de las proteínas del organismo patógeno contra los que se dirige una respuesta inmunitaria. Cuando estos péptidos son capaces de generar una respuesta inmunitaria neutralizante, parecen ser inmunógenos ideales. Generan una respuesta específica y en general no conducen a efectos perjudiciales en el hospedador. Sin embargo, puede ser difícil predecir qué fragmentos de péptidos serán inmunógenos y conducirán al desarrollo de una respuesta neutralizante. Podría ser deseable desarrollar inmunógenos que generen una respuesta hacia epítopos neutralizantes específicos sin provocar respuestas hacia epítopos irrelevantes que podrían "diluir" la respuesta específica o conducir a la formación de complejos inmunitarios perjudiciales, lo que incluye las reacciones autoinmunitarias.

Tal método se lleva a cabo mediante la identificación de porciones específicas y discretas de las proteínas implicadas en las interacciones proteína-proteína relevantes para la respuesta inmunitaria, y la construcción de péptidos biológicamente activos basados en las secuencias de aminoácidos identificadas.

La unión de proteínas o las interacciones proteína-proteína se pueden definir ampliamente como un ejemplo de reconocimiento molecular en el que las superficies de dos macromoléculas (proteínas) o un péptido y una proteína presentan interacciones superficiales discretas que implican una complementariedad química y de forma. Tales interacciones discretas surgen cuando los residuos de una proteína (o péptido) están localizados espacialmente cerca de los residuos de otra proteína y existen fuerzas atractivas entre los residuos, tales como fuerzas de Van der Waals, puentes salinos, enlaces de hidrógeno, e interacciones hidrofóbicas. La disposición tridimensional de tipos específicos de residuos permite que se dé la unión como consecuencia de un gran número de las interacciones débiles anteriormente mencionadas, que juntas conducen a una energía de unión significativa entre las diferentes proteínas.

Los giros hipervariables que se dan en las regiones determinantes de la complementariedad de los anticuerpos, por ejemplo, al interaccionar con los epítopos del antígeno pueden emplear la gran diversidad de interacciones químicas descritas anteriormente. La superficie de unión o cavidad del anticuerpo (paratopo) está formada por la distribución espacial de los residuos que constituyen el dominio variable de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo, y en particular las regiones hipervariables responsables de la complementariedad con el antígeno. El ajuste adecuado del epítopo del antígeno en el paratopo del anticuerpo depende de la forma y de la naturaleza química de ambos componentes. La afinidad de un anticuerpo determinado por su antígeno depende de la suma de las fuerzas atractivas y repulsivas entre el epítopo y el paratopo. Sin embargo, debido a que un anticuerpo posee dos paratopos, y dado que muchos antígenos tienen una naturaleza multivalente, la avidez global del anticuerpo dependerá del número total de paratopos y epítopos implicados en la interacción.

Se observa una amplia diversidad de topografías para los sitios de combinación de los anticuerpos. Pueden tener superficies relativamente planas (habituales en el caso de antígenos proteicos), surcos (como a menudo es el caso para los péptidos) o cavidades (en el caso de haptenos de moléculas pequeñas). A menudo las partes expuestas, flexibles y sumamente sobresalientes de un antígeno proteico (que a menudo corresponden a los giros superficiales de la estructura), son los epítopos inmunodominantes, y existen pruebas que sugieren que existe flexibilidad tanto en el antígeno como en el anticuerpo que es necesaria para un ajuste "inducido" óptimo en la formación del complejo.

De forma similar para otros tipos de reconocimiento molecular importantes en la respuesta inmunitaria, los elementos estructurales individuales de las proteínas implicadas son fundamentales para la especificidad. Esto es cierto, por ejemplo, en las interacciones de HLA con péptidos procesados y en la interacción del receptor de la célula

T con tales complejos HLA-péptido.

Mediante la identificación de las porciones específicas discretas que confieren propiedades antigénicas a una proteína particular, se pueden construir péptidos biológicamente activos para imitar antígenos del patógeno y actuar sobre las células mamíferas mediante la unión a los sitios receptores de esas células para alterar o afectar a su función o comportamiento, o para prevenir o alterar el efecto que los antígenos del patógeno tendrían de otra manera en esas células. Tales moléculas imitadas serían útiles como agentes para afectar a las células de la misma manera que la proteína natural. De manera alternativa, tales péptidos se pueden unir a un anticuerpo soluble.

Como tales, los péptidos activos derivados de esta manera pueden generar respuestas inmunitarias de linfocitos T y/o linfocitos B. Por lo tanto, el documento WO91/09621 describe un fragmento peptídico que alberga secuencias de aminoácidos del antígeno de 28 kDa de *Schistosoma mansoni* que comparte al menos un epítopo que induce una respuesta específica de linfocitos T y al menos un epítopo que induce una respuesta específica de linfocitos B. El fragmento peptídico descrito en esa solicitud de patente corresponde a 2^n repeticiones de los aminoácidos 115-131 de la proteína de 28 kDa de *Schistosoma mansoni*. Se menciona que la ventaja de usar tal fragmento peptídico es inducir respuestas tanto humorales como celulares, mientras la proteína original (28 kDa de *S. mansoni*) no induce casi ninguna respuesta humoral. También se menciona que el fragmento peptídico confiere una protección de alrededor del 40-50% en los modelos animales (ratas).

El documento EP 251 933 propone un procedimiento para aislar un fragmento peptídico que alberga al menos un epítopo del polipéptido de 28 kDa de *S. mansoni* sometiendo, en condiciones proteolíticas controladas, al polipéptido de 28 kDa de *S. mansoni* a la acción de la proteasa V8. El solicitante menciona que los fragmentos peptídicos preferidos son los de 8 kDa y de 6 kDa que albergan la actividad antigénica anti-esquistosoma mostrada por la proteína de 28 kDa. Las secuencias de aminoácidos de los fragmentos peptídicos no se describieron en la solicitud de patente.

Se considera que las vacunas sintéticas que comprenden un fragmento peptídico de un tamaño suficiente son de una importancia crucial en la obtención de la porción o porciones activas del antígeno completo que pueden ser reconocidas por el sistema inmunitario y provocar la formación de los anticuerpos correspondientes. Se pueden construir péptidos biológicamente activos que funcionan como el epítopo o que imitan una proteína biológicamente activa. De manera alternativa, se pueden construir péptidos biológicamente activos que interaccionan con receptores y por lo tanto bloquean la unión de un antígeno del patógeno o proteína biológicamente activa a un receptor.

La Patente de EE.UU. 5.019.383 describe una vacuna sintética que comprende un residuo peptídico acoplado a uno o más grupos alquilo o alquenilo de una longitud de al menos 12 átomos de carbono u otra sustancia lipófila. Se describe que el residuo peptídico contiene una secuencia de 6 aminoácidos que corresponde a la secuencia de tales aminoácidos en un antígeno proteico o alérgeno en el que se halla la hidrofobicidad media local más grande del antígeno o alérgeno. Además, se menciona que los grupos alquilo o alquenilo son el portador en el que se coloca el residuo peptídico, y dicho portador tiene una importancia crucial en proporcionar a la porción activa de la cadena peptídica sintética un tamaño suficiente de manera que el antígeno sintético o alérgeno sintético completo pueda ser reconocido por el sistema inmunitario y provocar la formación de los anticuerpos correspondientes. También se describe que el residuo peptídico sintético tiene una longitud de cadena de como mínimo seis aminoácidos, preferiblemente doce aminoácidos, y puede contener una cadena infinitamente larga de aminoácidos o sus componentes, que se puede caracterizar por la presencia de otros epítopos del mismo o de diferentes antígenos o alérgenos.

Otro ejemplo de una aproximación de péptidos activos se describe en la solicitud de patente WO93/2354 que se refiere a moléculas de ácido nucleico que contienen secuencias de nucleótidos que codifican enzimas aminopeptidasa de helminto, y fragmentos antigénicos y variantes funcionalmente equivalentes de los mismos, su uso en la preparación de vacunas para el uso contra parásitos helmínticos, y los polipéptidos sintéticos codificados por ellas. La invención del documento WO93/23542 se basa en el papel de las aminopeptidasas integrales de membrana de mamíferos en la escisión de péptidos pequeños que son los productos finales de la digestión.

Brevemente, la identificación de las regiones epitópicas de antígenos de patógenos o proteínas biológicamente activas se puede usar en la construcción de compuestos biológicamente activos que comprenden secuencias de aminoácidos equivalentes o compartidas. Además, se pueden diseñar compuestos biológicamente activos, tales como péptidos, basándose en las secuencias de aminoácidos de las proteínas biológicamente activas cuyas regiones epitópicas se conocen.

Sin embargo, los péptidos son básicamente fragmentos de cadenas polipeptídicas de un tamaño limitado, que a veces pueden estar modificados con respecto a la secuencia original de aminoácidos tal como se halla en la proteína originaria de la que procede el fragmento. Esto presenta una serie de problemas. Los factores tales como la solubilidad del péptido, la degradación, la agregación, la estabilidad conformacional, entre otros, son importantes dado el objetivo final deseado para el péptido.

Tal como se discutió anteriormente, Sm14 es una proteína de interés particular. Es un antígeno de reactividad

cruzada que confiere protección contra esquistosomiasis y fasciolosis (véase Tendler, M. et al. (1996). "A *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine". Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 269-273 y la Patente de EE.UU. 5.730.984). Los datos presentados en estas publicaciones demuestran la eficacia de Sm14 para conferir niveles elevados de protección contra las infecciones por helmintos.

Así, el antígeno Sm14 es una proteína activa especialmente adecuada que se puede usar para diseñar péptidos biológicamente activos basándose en la determinación de sus epítopos de reactividad cruzada.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención, como se define en las reivindicaciones, se refiere a fragmentos de péptidos que tienen una o más secuencias de aminoácidos compartidas y/o similares respecto de las secuencias de aminoácidos de porciones específicas de la proteína de 14 kDa de *S. mansoni*, Sm14, o FABPs relacionadas, y dichos fragmentos de péptidos funcionan como las regiones epitópicas continuas o discontinuas de Sm14

Un objetivo de la invención es preparar péptidos activos que tienen secuencias de aminoácidos idénticas o sustituidas de manera adecuada respecto de las secuencias de aminoácidos de una o más regiones epitópicas del antígeno Sm14 o FABPs relacionadas.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones inmunógenas capaces de conferir una protección al menos parcial contra la infección por helmintos patógenos, y así servir como vacunas contra los mismos.

Aún otro objetivo de la presente invención es proporcionar un ensayo de diagnóstico para el diagnóstico de la infección por helmintos mediante el uso de péptidos activos que tienen secuencias de aminoácidos similares o modificadas de manera adecuada respecto de las halladas en las porciones epitópicas del antígeno Sm14 o FABPs relacionadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 ilustra la alineación de secuencias de miembros de la familia de FABP usada para la comparación de Sm14 y Fh15 con otras FABPs.

La FIGURA 2A ilustra esquemáticamente la arquitectura básica de las FABPs.

La FIGURA 2B ilustra esquemáticamente el diagrama de cintas del modelo molecular para Sm14 construido basándose en las estructuras tridimensionales de las moléculas homólogas de adipocito de ratón, intestino de rata, y músculo humano. Las cadenas de las láminas β en la región C-terminal de la molécula (del residuo 85 en adelante) se muestran con un sombreado gris más claro. Los residuos mostrados con una representación de barras y esferas son idénticos en Sm14 y Fh15, y están expuestos al disolvente. La Figura se produjo con el programa RIBBONS (véase Carson, M. (1987). J. Mol. Graphics. 5:. 103-106).

La FIGURA 3 muestra la alineación de secuencias de FABPs resaltando las láminas β (el gris claro indica las láminas β y el gris oscuro indica las torsiones β) y la posición de los residuos de Sm14 que indican una importancia inmunógena (# indica los residuos que son accesibles al disolvente, y estos residuos están localizados en las posiciones siguientes: 1, 18, 22, 26, 41, 43, 48, 63, 66, 86, 88, 89, 90, 93, 99, 106, 109, 111, 119, 120, 121 y 122; $ indica los residuos que no son accesibles al disolvente, y dichos residuos están localizados en las posiciones siguientes: 42, 49, 80, 94, 114, 125). Estos son idénticos a los indicados en la Figura 1.

La FIGURA 4 muestra la identidad de secuencia local en comparaciones por parejas entre proteínas de unión de ácidos grasos humanas y de parásito. La identidad de secuencia se calcula en una ventana desplazable de 21 residuos y se representa como una función del residuo central para las comparaciones de Sm14 con FABP de adipocito humano (serie 1), proteína de unión de ácido retinoico celular I (serie 2), proteína de unión de ácido retinoico celular II (serie 3), proteína de unión de retinol celular I (serie 4), Fh15 (serie 5), FABP intestinal (serie 6), FABP hepática (serie 7), FABP muscular (serie 8), proteína mielina P2 (serie 9) y homólogo de FABP relacionado con la psoriasis (serie 10). Hacia el extremo C-terminal (después de la posición de alineación 90) la curva que corresponde a la comparación entre Sm14 y Fh15 es claramente distinguible del resto.

La FIGURA 5 ilustra esquemáticamente la formación de los fragmentos del epítopo discontinuo. Como se puede observar, se eligen dos regiones que participan en un epítopo discontinuo predicho para formar los componentes de un péptido sintético continuo.

La FIGURA 6 proporciona información general sobre giros β mostrando una representación gráfica (diagrama de Ramachandran) para las conformaciones preferidas de los residuos del giro β n+1 y n+2 localizados entre las láminas β, para los diferentes tipos de giros (I, II, I', II'). Las preferencias para los diferentes tipos de aminoácidos en las cuatro posiciones de residuos que participan en el giro β se han establecido en la técnica anterior (por ejemplo,

Wilmot C.M. y Thornton J.M. (1988) "Analysis and Prediction of the different types of β-turn in proteins" J Mol Biol 203, 221-232).

La FIGURA 7 es la nomenclatura y composición de elementos de giros β de la Figura 6.

La FIGURA 8 representa esquemáticamente algunas de las regiones de Sm14 que son de interés inmunológico/antigénico. Las regiones indicadas como 1*-2* (que comprenden la conexión entre las cadenas β 1 y 2 y están compuestas de dos hélices α) y 9-10 pertenecen a la familia 1 como se define en el texto. Las indicadas como 6-7 y 8-9 (que son conexiones entre las cadenas β correspondientes) pertenecen a la familia 2.

La FIGURA 9 muestra la relación entre la estructura tridimensional de Sm14 y los péptidos seleccionados para los ensayos de vacunación. Específicamente, las regiones de la superficie molecular que corresponden a los residuos epitópicos identificados por Tendler et al. (1996) se muestran (parte superior, centro) en forma de barras. En el centro (izquierda y derecha) se muestra (en gris) cómo estos residuos se cartografían en la superficie molecular (en blanco). Los péptidos simples y las fusiones de dos péptidos tienen el objetivo de representar la superficie molecular que corresponde a los residuos epitópicos tan bien como sea posible. Las partes de la superficie molecular correspondiente a los péptidos 1.1 y 2.1 se muestran en gris, y las correspondientes a 1.2 y 2.2 en negro (parte inferior, izquierda y derecha).

La FIGURA 10 muestra la representación de elementos de la estructura secundaria de Sm14 que fue el molde para modelar los péptidos de la invención. Los residuos sin sombrear indican las conexiones entre los elementos de la estructura secundaria; ($) indica los residuos inaccesibles al disolvente de los epítopos; (#) indica los residuos accesibles al disolvente de los epítopos. Los péptidos de la invención se pueden localizar fácilmente con referencia a las Tablas 1 y 2.

La FIGURA 11 muestra un primer experimento de vacunación contra *S. mansoni.* Se proporciona el porcentaje de protección, {(C-V)/C}x100}, de ratones suizos no relacionados tras la vacunación y exposición posterior con 100 cercarias. De izquierda a derecha, las barras corresponden a la vacunación con el péptido 1.2, péptido 1.3, péptido 1.4, péptido 2.1, péptido 2.2, péptido 2.3, péptido 2.4, péptido 2.5, péptido 2.6, r-Sm14, extracto salino (ES) administrado a través de la planta del pie, ES administrado por vía inguinal, adyuvante y PBS, respectivamente. Todos los péptidos se administraron por vía inguinal. Todos los péptidos se administraron en presencia del adyuvante monofosforil lípido A + dicorinomicolato de trehalosa (MPL-TDM, Ribi ImmunoChem Research Inc.) + Alumbre.

La FIGURA 12 muestra un segundo experimento de vacunación contra *S. mansoni.* Se proporciona el porcentaje de protección como en la Figura 9. De izquierda a derecha, las barras corresponden al péptido 1.1, péptido 1.3, péptido 1.4, péptido 2.1, péptido 2.5, r-Sm14, adyuvante y PBS, respectivamente. En este experimento se administraron todas las muestras a través de la planta del pie. Todos los péptidos se administraron en presencia de adyuvante: monofosforil lípido A + dicorinomicolato de trehalosa (MPL-TDM, Ribi ImmunoChem Research Inc.) + Alumbre.

La FIGURA 13 muestra la protección en porcentaje de 10 ratones suizos no relacionados tras la vacunación y exposición posterior con tres metacercarias de *F. hepatica*. Debido al número limitado de parásitos usados para la exposición, los animales se consideran protegidos cuando presentan una inmunidad estéril, es decir, no hay presentes gusanos adultos tras el sacrificio. La protección media se proporciona, por tanto, como el porcentaje de los animales estériles en el momento del sacrificio. De izquierda a derecha, las barras corresponden al péptido 1.1, péptido 1.3, péptido 1.4, péptido 2.1, péptido 2.5, r-Sm14 + adyuvante, r-Sm14, adyuvante y PBS, respectivamente. El adyuvante usado fue monofosforil lípido A + dicorinomicolato de trehalosa (MPL-TDM, Ribi ImmunoChem Research Inc.) + Alumbre.

La FIGURA 14 ilustra las FABPs de parásitos. La alineación muestra los elementos de la estructura secundaria de Sm14 y los residuos que tienen un papel relevante en provocar una respuesta inmunógena (# indica los residuos accesibles al disolvente y $ indica los residuos que son inaccesibles al disolvente).

La FIGURA 15 representa esquemáticamente la posición de los residuos de cisteína en los péptidos y su papel en la limitación del movimiento conformacional (los trazos indican Cα).

La FIGURA 16A muestra los datos de la transferencia de Western relacionados con extractos de diferentes helmintos.

La FIGURA 16B también muestra los datos de transferencia de Western relacionados con extractos de diferentes helmintos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Por comodidad, a continuación se proporciona el significado de ciertos términos y frases empleadas en la memoria descriptiva, ejemplos, y reivindicaciones adjuntas.

La expresión "proteína activa" se refiere a proteínas que se unen a receptores celulares y por lo tanto alteran o afectan a la función o comportamiento de las células, o previenen o alteran el efecto que otra proteína biológicamente activa tendría de otra manera en esas células. Un antígeno patógeno puede ser una proteína biológicamente activa si, tras la unión a una célula hospedadora, altera o afecta a la función o actividad de una célula o impide que otro agente lo haga.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "epítopo neutralizante" se refiere a la porción de un antígeno patógeno contra la que los anticuerpos tienen una actividad neutralizante. Es decir, los anticuerpos específicos para un epítopo neutralizante hacen que el patógeno sea no infeccioso y/o inactivo.

La expresión "sitio receptor" se refiere a la porción del receptor que interacciona con una proteína que se une al receptor.

La expresión "péptidos activos" se refiere a moléculas proteicas que imitan proteínas biológicamente activas o impiden la interacción entre proteínas biológicamente activas y los receptores, en los que los receptores pueden ser moléculas del sistema inmunitario, lo que incluye anticuerpos.

Los términos "corresponde" y "correspondiente" se refieren al nivel de identidad compartida entre dos secuencias de aminoácidos, y los términos "homólogos", "homología", y "similitud de secuencia" son usados a menudo de manera intercambiable por los expertos en la técnica para referirse a secuencias de aminoácidos relacionadas.

Se ha discutido ampliamente en la presente memoria que el estado de la técnica enseña que se ha verificado que la proteína Sm14 ofrece protección en los modelos animales (ratones suizos y conejos de Nueva Zelanda) que han sido infectados con *Schistosoma mansoni* y estimulados previamente con Sm14. Además, los experimentos paralelos en los que los modelos animales se infectaron con *Fasciola hepatica*, agente causal de la Fasciolosis, tras haberlos estimulado previamente con Sm14, demostraron también la existencia de una reactividad cruzada protectora.

Sm14 pertenece a la familia de Proteínas de Unión de Ácidos Grasos intracelulares - las FABPs, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 1 y cuya estructura tridimensional se puede representar esquemáticamente como se muestra en la Figura 2A.

Fh15, de *Fasciola hepatica*, también pertenece a la familia de Proteínas de Unión de Ácidos Grasos intracelulares. Su secuencia de aminoácidos se proporciona también en la Figura 1, y también se representa esquemáticamente en la Figura 2A.

La Figura 1 muestra además las secuencias de aminoácidos de una serie de FABPs del hospedador (humano). A partir de la figura se puede verificar que Sm14 y Fh15 muestran un grado de identidad de secuencia que es de un orden similar al observado entre Sm14 y muchas de las FABPs (hospedador) restantes. Esto es del orden del 35 al 40%.

De manera específica, en la Figura 1 las primeras nueve secuencias son todas de proteínas procedentes de tejidos humanos: mielina P2 de nervio periférico; FABP de adipocito, aFABP; proteína de unión de retinol celular I, cRBPI; proteínas de unión de ácido retinoico celular I y II, cRABP1 y cRABP2; homólogo de FABP relacionado con la psoriasis, pFABP-hom; FABP intestinal, iFABP; FABP hepática, lFABP; FABP cardiaca, hFABP. También se muestran las FABPs de adipocito de ratón e intestino de rata, ya que se usaron junto con hFABP para la construcción de modelos moleculares para Sm14 y Fh15 (Tendler, M. *et al*. (1996). "A Schistosoma mansoni fatty acid binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine". Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 269-273). Las cadenas de las láminas β de una FABP se indican mediante los bloques sombreados y numerados de manera consecutiva; las dos hélices α (h1 y h2) se marcan mediante las barras oscuras. Los residuos idénticos en las dos secuencias de los parásitos (Sm14 y Fh15) están recuadrados. El subgrupo de estos residuos que están conservados en no más de tres de las secuencias humanas se indican mediante asteriscos (para los residuos expuestos) o mediante el símbolo de porcentaje (para los residuos inaccesibles al disolvente).

Como se puede observar a partir de la Figura 1, la alineación de las FABPs del hospedador y del parásito (Sm14 y Fh15) junto con dos secuencias de estructura tridimensional conocida (aFABP e iFABP) permite la definición de regiones que son estructuralmente equivalentes. Esto se usó en la construcción del modelo de Sm14 y Fh15 descrito en Tendler, M. *et al*. (1996). "A *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine". Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 269-273 y también se ha usado en la construcción de modelos para FABPs de *Schistosoma japonicum* (Sj14), *Fasciola gigantica* (Fg15) y *Echinoccocus granulosus* (Eg15) basándose en la alineación mostrada en la Figura 3.

Sm14 está tan estrechamente relacionada con varias proteínas humanas, que incluyen la proteína mielina P2 (≅ 42% de identidad de secuencia) y FABP de músculo cardiaco (≅ 42%), como lo está con Fh15 (≅ 44%), que es una FABP de *Fasciola hepatica.* Sin embargo, existen pruebas sólidas de la inmunorreactividad cruzada entre las dos proteínas de parásitos, y al mismo tiempo no existen informes de que los pacientes con *S. mansoni* desarrollen

reacciones autoinmunitarias. Por lo tanto, es interesante determinar las características específicas de estas dos FABPs de parásitos, en cuanto a las regiones de la secuencia de aminoácidos y estructura, que son responsables de dicha reactividad cruzada.

A pesar de esta observación, las moléculas Sm14 y Fh15 no exhiben alteraciones simples y coordinadas en tamaño o secuencia continua cuando se comparan con sus homólogos humanos. No obstante, Sm14 sí muestra una disminución notable de la conservación con las secuencias humanas hacia el extremo C-terminal (desde aproximadamente el residuo 85 hacia adelante), mientras las dos secuencias de parásitos muestran aproximadamente un 47% de identidad media en la misma región. En general, esta es la región menos conservada de la molécula en la familia de FABPs en conjunto (Jones et al. (1988) EMBO J. 7, 1597-1604; Sacchettini J.C. et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 5815-5819; Muller-Fahrow, A. et al. (1991) Eur. J. Biochem. 199, 271-276)). Existe así una diferencia notable entre las proteínas de los parásitos y sus homólogos humanos, ya que la región C-terminal de los primeros muestra un nivel inusual de conservación de secuencias. Esto se muestra en la Figura 4, en la que se calcula la conservación media en una ventana desplazable de 21 residuos como una función de la posición en la secuencia para comparaciones emparejadas que implican Sm14 y otra FABP diferente. Solamente en el caso de la comparación entre Sm14 y Fh15 existe un pico máximo en el gráfico observado hacia el extremo C-terminal. Las cadenas β de esta región (del residuo 85 en adelante) se muestran con un sombreado gris más claro en la Figura 2B para distinguirlas del resto de la molécula. De hecho, la reactividad cruzada de estas dos proteínas ya se ha demostrado experimentalmente (véase Perez et al (1992) y Tendler et al (1996).

Los autores (Tendler, M. *et al*. (1996). "A Schistosoma mansoni fatty acid binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine". Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 269-273) han descrito modelos moleculares construidos para Sm14 y para Fh15, y han demostrado que las dos moléculas adoptan la misma topología tridimensional que otros miembros de la familia de FABP. La arquitectura básica de las FABPs se representa en la Figura 2A.

Tal como se muestra en la Figura 2B, el modelo molecular de Sm14 consiste en un barril β antiparalelo de 10 cadenas con conexiones intercatenarias cortas que en general forman giros inversos (giros β). Las cadenas 7-10 del barril con sus giros de conexión constituyen básicamente la porción C-terminal de la molécula. Cuando los residuos conservados (es decir, idénticos) en Sm14 y Fh15 pero presentes en no más de tres de nueve secuencias humanas se representaron sobre la estructura 3D modelada, se identificaron dos epítopos probables y se seleccionaron para el propósito de la presente invención. Estos son discontinuos, ya que están constituidos por residuos que están espacialmente cercanos en la estructura tridimensional pero distantes en la secuencia de aminoácidos. Veintidós de estos residuos estaban expuestos en la superficie, y así contribuyen potencialmente a la antigenicidad mediada por las células B. De estos 22 residuos, 13 procedieron de la porción C-terminal de la proteína, que se demuestra que presenta un grado elevado de conservación poco habitual. Los residuos invariables externos no están distribuidos aleatoriamente alrededor de la superficie de la molécula de Sm14, sino que están agrupados en los extremos superior e inferior del barril (Figura 2B) y constituyen potencialmente epítopos discontinuos funcionales que presentan una variación significativa respecto de las proteínas humanas. La agrupación de 13 de los 22 residuos expuestos conservados en la región C-terminal, junto con las pruebas de la Figura 4, indica la importancia de la región C-terminal (junto con los residuos de otras partes de la molécula que se juntan para formar epítopos discontinuos) para la antigenicidad. De hecho, las cuatro conexiones intercatenarias que están incluidas en la parte C-terminal de la estructura muestran picos pronunciados en la accesibilidad de la cadena principal, un fenómeno correlacionado a menudo con los determinantes antigénicos.

En la presente descripción se describe un método para la unificación de dos péptidos diferentes derivados de la molécula Sm14, que son distantes en estructura primaria (secuencia de aminoácidos) pero espacialmente cercanos en estructura terciaria. Dichos péptidos pertenecen al mismo epítopo discontinuo predicho. Además de unificar simplemente los péptidos en un único péptido más largo, la presente invención describe además un método para modificar la secuencia de aminoácidos de dichos péptidos de manera que el péptido resultante adopta una estructura tridimensional que es similar a las regiones correspondientes de la molécula originaria (Sm14) o de manera que la estructura puede ser accesible energéticamente al péptido en disolución o de manera que la estructura pueda ser adquirida por el péptido tras la formación del complejo con las moléculas del sistema inmunitario, tales como los anticuerpos. Esta aproximación es aplicable a otros antígenos proteicos que presentan epítopos discontinuos.

Según la presente descripción, el método para la construcción de péptidos basándose en las estructuras tridimensionales de moléculas homólogas en las que dichos péptidos son capaces de imitar o impedir la interacción entre los patógenos de helminto y los receptores, y dicho método consiste en:

(i) seleccionar las regiones de la proteína originaria que contienen una densidad espacial elevada de residuos que forman epítopos continuos o discontinuos;

(ii) dar prioridad al mantenimiento de los residuos epitópicos previamente predichos, responsables de la estimulación de la respuesta inmunitaria/antigénica deseada, en la secuencia peptídica seleccionada;

(iii) elaborar secuencias que, a la vez que mantienen un porcentaje elevado de residuos epitópicos previamente identificados, tienen un tamaño limitado que varía de 8 a 28 residuos;

(iv) se pueden elegir dos péptidos, que pueden corresponder a regiones que son distantes en la estructura primaria (secuencia de aminoácidos) pero espacialmente cercanas en la estructura terciaria (tridimensional), y dichas regiones se eligen basándose en que la estructura tridimensional indica que se pueden unir fácilmente suponiendo que conserven sus estructuras originales.

(v) se pueden hacer modificaciones en el péptido, ya proceda de un único tramo continuo de aminoácidos o proceda de la manera descrita en (iv), para favorecer la conformación tridimensional que se observa en la proteína original, y tales modificaciones pueden incluir sustituciones de aminoácidos así como inserciones o deleciones de aminoácidos;

(vi) se pueden usar residuos, tales como ½-cistinas, para limitar la libertad conformacional del péptido final.

En la etapa (iv), un requisito mínimo es que el extremo C-terminal de un péptido debería estar espacialmente cercano al extremo N-terminal del segundo péptido, pero no hace falta conservar necesariamente el orden de los péptidos tal como existe en la proteína original.

Los expertos en la técnica pueden llevar a cabo fácilmente la determinación de la secuencia de aminoácidos mediante el uso de métodos muy conocidos. En general, se puede llevar a cabo la secuenciación del ADN de material genético relevante, y la secuencia de aminoácidos se puede deducir a partir de esa información. Los expertos en la técnica pueden llevar a cabo la secuenciación del material genético, que incluye el cADN, y así se puede determinar fácilmente si una secuencia de aminoácidos corresponde o no corresponde a otra. La determinación de si las secuencias son correspondientes se puede basar en una comparación de la secuencia de aminoácidos o del ácido nucleico, y/o la estructura de la proteína, entre las proteínas de interés. En el caso relevante para la presente invención, la determinación de la secuencia de aminoácidos del antígeno patógeno (Sm14) demuestra que corresponde a (es homólogo a) los miembros de una familia de Proteínas de Unión de Ácidos Grasos (FABPs).

Mediante la determinación del número de residuos de aminoácidos idénticos y sustituidos de manera conservativa compartidos entre las dos moléculas una vez alineadas mediante técnicas habituales, y conociendo la longitud de la alineación, un experto en la técnica puede determinar si dos secuencias son correspondientes o no. Dependiendo de la longitud de las secuencias, las dos secuencias corresponden (son homólogas) si comparten aproximadamente al menos un 80% de aminoácidos idénticos y sustituidos de manera conservativa, de los cuales al menos alrededor del 28% son aminoácidos idénticos y entre alrededor del 30-42% son sustituciones conservativas.

El péptido se sintetiza e imita el patógeno o la proteína biológicamente activa. El péptido se formula en forma de una composición farmacéutica que se administra, por ejemplo, como agente terapéutico para provocar la actividad que las proteínas nativas tienen sobre las células.

Los ejemplos siguientes son ilustrativos de la invención y representan las realizaciones preferidas. Los expertos en la técnica pueden conocer, o pueden descubrir simplemente mediante el uso de la experimentación rutinaria, otros materiales adecuados y técnicas tales como las secuencias de aminoácidos y los métodos de producción anteriormente mencionados.

EJEMPLO 1 - Método para la obtención del Péptido

Se usó la estructura tridimensional de Sm14, tal como se construyó mediante modelado de homología comparativa y se describió en Tendler et al. (1996), como base para obtener fragmentos peptídicos para la síntesis y los ensayos de vacunación posteriores. Se debería indicar que en los estudios previos se describieron epítopos discontinuos probables responsables de la inmunorreactividad cruzada entre Sm14 y Fh15, y se ha proporcionado anteriormente un resumen de estos resultados.

Los residuos que se predijo que participan en tales epítopos se identificaron basándose en el hecho de que son idénticos en las dos moléculas de parásito, y aún así están poco conservados en los homólogos humanos. Debido al hecho de que pocos de los residuos epitópicos predichos estaban presentes en tramos continuos de la secuencia de aminoácidos, se elaboró una estrategia de diseño para incorporar más de un segmento continuo en un único péptido unificado.

Para ayudar a obtener segmentos de la cadena polipeptídica que fueran de mayor interés para la incorporación en los péptidos con el propósito de la vacunación, primero se estudió la conservación de la secuencia local de las proteínas de unión de ácidos grasos del parásito y del hospedador. Esto se llevó a cabo calculando la identidad de secuencia local en porcentaje entre dos secuencias cualquiera en una ventana desplazable de 21 residuos. Las comparaciones se realizaron entre Sm14 y Fh15 y entre Sm14 y nueve homólogos de la proteína de unión de ácidos grasos humana.

La FIGURA 4 muestra los resultados de las comparaciones de secuencias realizadas entre nueve proteínas de unión

de ácidos grasos humanas y Sm14. Tras el cálculo de la identidad de secuencia en una ventana desplazable de 21 residuos, se puede observar fácilmente que en general la similitud local entre Sm14 y los homólogos humanos se reduce rápidamente hacia el extremo C-terminal. Esta ausencia de conservación de secuencia en la parte C-terminal de la molécula se ha comentado previamente y contrasta directamente con el patrón observado cuando se comparan las dos FABPs de parásito, Sm14 y Fh15, en las que el tercio C-terminal de la molécula muestra la mayor conservación de secuencia global. Así, son evidentes los patrones diferentes de conservación de residuos cuando se compara Sm14 procedente del parásito con sus homólogos del hospedador, o de manera alternativa con el homólogo de reactividad cruzada de un parásito relacionado. Esto ocurre a pesar del hecho de que la identidad total en porcentaje a lo largo de la secuencia completa puede ser muy similar en ambos casos (42% al comparar Sm14 con FABP cardiaca o la proteína mielina P2 y 44% con Fh15).

Este resultado sugiere que los péptidos elegidos juiciosamente que portan los residuos epitópicos predichos previamente (Tendler, M. *et al*. (1996). "A *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine". Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 269-273) y procedentes principalmente de la región C-terminal de la molécula, pueden ser lo suficientemente diferentes de los homólogos humanos para disminuir el riesgo de reactividad cruzada indeseable. Al mismo tiempo, eligiendo los péptidos de manera que se incluya un número razonable de residuos conservados en Sm14 y Fh15, se desea incrementar la probabilidad de la inducción eficaz de una respuesta inmunitaria protectora contra ambos parásitos.

Esto es claramente un factor importante cuando se considera el uso de tales péptidos como vacunas anti-helmínticas multivalentes.

Basándose en el análisis secuencial anterior junto con la estructura tridimensional predicha, se seleccionaron dos regiones de la molécula para la obtención de péptidos con énfasis en el tercio C-terminal de la molécula. La primera región está compuesta por dos segmentos; una hélice α (localizada en la conexión larga entre las cadenas β 1 y 2) junto con la conexión entre las cadenas β 9 y 10. Los péptidos procedentes de esta región de la molécula se denominarán en lo sucesivo como la familia número 1. La segunda región procede del lado opuesto del barril β que forma la estructura básica de la molécula y también es discontinua, y en este caso consiste en dos horquillas β. La primera horquilla está compuesta por las cadenas β 6 y 7, y la segunda por las cadenas β 8 y 9, en ambos casos con sus giros de conexión (giros β de tipo I y tipo II', respectivamente). Los péptidos procedentes de esta región se denominarán familia 2.

Para cada familia, los dos segmentos individuales elegidos se seleccionaron basándose en su proximidad espacial en la estructura tridimensional, y no por su proximidad en cuanto a la secuencia de aminoácidos. Además, en la elección de la longitud exacta de cada segmento componente se tuvieron en cuenta varios criterios adicionales. Estos incluyeron 1) un intento de incluir un número máximo de los residuos predichos en los estudios previos para formar parte de los epítopos discontinuos, 2) un intento de mantener el péptido tan pequeño como fuera posible, 3) para facilitar la unión de los dos segmentos en un único péptido con referencia a la estructura tridimensional de la proteína intacta y 4) dando preferencia a los segmentos que producen un número significativo de contactos internos.

Los criterios tercero y cuarto se introdujeron para que los dos segmentos de una familia dada se pudieran unir en un único péptido, de tal manera que se conservase la posibilidad de mantener la estructura original tal como se observa en la molécula completa y como se ilustra en la Figura 5. Esto no implica de ninguna manera que el péptido adoptara de manera natural tal estructura en disolución. De hecho, parece improbable dado el pequeño tamaño de los péptidos resultantes y la flexibilidad conformacional conocida de tales moléculas en disolución. Más bien, es un intento de asegurar que tal conformación es accesible energéticamente, por ejemplo por medio de un ajuste inducido tras la formación del complejo con el anticuerpo.

El péptido de fusión resultante, compuesto de los dos segmentos componentes de una familia dada, se modificó posteriormente en un intento de favorecer la estructura nativa. Se realizaron modificaciones basándose en las frecuencias conocidas de presencia de residuos de aminoácidos en los giros β y mediante el uso del análisis de calidad de contacto atómico tal como está implementado en el programa gráfico WHATIF (Vriend, G. (1990) J. Mol. Graph. 8, 52-56; Sibanda et al. (1985) Nature 316, 170-174). En el segundo caso, los residuos que pasaron a estar expuestos a un medio químico desfavorable como resultado de ser extraídos del contexto de la estructura completa se sustituyeron, de forma que el péptido ya no es idéntico en cuanto a la secuencia de aminoácidos al observado en el propio Sm14, pero sigue correspondiendo a él. Además, esta aproximación no conduce a la conclusión de que tales sustituciones deban ser conservativas en cuanto a la naturaleza química de los aminoácidos implicados. De hecho, dado que con frecuencia se esperará que los residuos hidrófobos que están enterrados en la estructura nativa pasen a estar expuestos en el péptido, a menudo será necesario hacer sustituciones no conservativas e incluso deleciones o inserciones. Se proporciona cierta información con respecto a los tipos de giros β en las Figuras 6 y 7.

En el caso de la familia 1, esto dio como resultado cuatro péptidos. El péptido 1.1 procedió de la horquilla β compuesta de las cadenas 9 y 10, de los residuos 118 a 125. El péptido 1.2 procedió de la primera hélice α de la estructura, de los residuos 15 a 24. El péptido 1.3 fue una fusión directa de 1.1 y 1.2, compuesto de 18 residuos y 1.4 procedió de 1.3 mediante la sustitución de cuatro residuos de aminoácidos, basándose en los criterios descritos

anteriormente.

De manera específica, 1.4 se ha modificado para introducir dos residuos de glicocola en su centro dirigidos a favorecer un doblamiento en la cadena principal del péptido. Los estudios de modelado indicaron que las glicocolas en esta posición, que asumen la conformación de un giro de tipo I', serían capaces de unir los dos fragmentos a la vez que mantendrían su estructura original tal como se observa en la proteína completa. Se hicieron dos sustituciones adicionales en los residuos hidrófobos de 1.3; la Phe de la posición 10 se sustituyó por una Ser, y la Leu de la posición 17 por Val. Estos residuos normalmente están ocultos dentro del núcleo hidrófobo de la molécula completa, y su sustitución por residuos menos hidrófobos se guió mediante la opción de calidad de contacto atómico de WHATIF. Después de transformar 1.3 en 1.4, el índice de calidad se elevó desde 0,23 hasta 0,54, lo que sugiere que las sustituciones son razonables, asumiendo la conformación esperada para estas regiones en el propio Sm14. Este caso ejemplifica cómo se usa en la práctica el uso de la estructura tridimensional de Sm14 para la modificación de péptidos, que es parte de la presente invención. Esto implica el uso de la sustitución del residuo final del primer péptido (1.1) y el primer residuo del segundo (1.2) por glicocolas para inducir un giro inverso y también sustituciones no conservativas.

En el caso de la familia 2, se diseñaron seis péptidos mediante el uso de una estrategia similar. El péptido 2.1 (residuos 85 a 94) procedió de la horquilla β entre las cadenas 6 y 7. De forma similar, el péptido 2.2 procedió de la horquilla entre las cadenas 8 y 9. El péptido 2.3 es una fusión simple de 2.1 y 2.2, mientras los péptidos 2.4 y 2.5 son modificaciones alternativas del mismo. En el péptido 2.4 la asparagina de la posición 3 del péptido 2.3 se sustituye por fenilalanina, la glutamina de la posición 10 por serina, se hace una inserción de cuatro residuos (Asp-Pro-Thr-Gly) entre Gln10 e Ile11 y el residuo Asp18 del péptido 2.3 se sustituye por Ala22 en 2.4. En el péptido 2.5 se hace una inserción más pequeña de dos residuos entre las posiciones 10 y 11 de 2.3 junto con las sustituciones indicadas en la Tabla 2. En ambos casos la inserción de residuos entre los dos fragmentos correspondientes a 2.1 y 2.2 se hizo con la intención de unir los fragmentos con giros β. En el caso de 2.4 el tipo de giro elegido fue el tipo I, y en el caso de 2.5, el tipo I'.

Según la presente invención, se llevan a cabo modificaciones alternativas en los fragmentos originales cuando se desea, por ejemplo para introducir estabilidad conformacional para el péptido.

El péptido 2.6 es idéntico en composición de aminoácidos a 2.5, pero su secuencia se ha aleatorizado y se usó como un control en los ensayos de inmunización para determinar el efecto inespecífico de un péptido de secuencia de aminoácidos no relacionada pero de idéntico contenido de aminoácidos.

Todas las secuencias peptídicas finales se proporcionan en las Tablas 1 y 2, y los cuatro péptidos que procedieron directamente de Sm14 (1.1, 1.2, 2.1 y 2.2) se muestran esquemáticamente en la Figura 8 y se cartografían en su estructura modelo en la Figura 9. En ella, las secuencias con respecto a la secuencia de aminoácidos de Sm14 original se pueden localizar mediante referencia a las siguientes tablas junto con la Figura 10.

Tabla 1 - Secuencias de aminoácidos de los péptidos usados en los ensayos de inmunización.

Familia 1

Péptido	Secuencia	Comentarios
1.1	VTVGDVTA (SEQ ID Nº:1)	Giro entre las cadenas β 9 y 10
1.2	NFDAVMSKLG (SEQ ID Nº:2)	Primera hélice α (entre las cadenas β 1 y 2)
1.3	VTVGDVTANFDAVMSKLG (SEQ ID Nº:3)	Unión de 1.1 y 1.2
1.4	VTVGDVTGGSDAVMSKLG (SEQ ID Nº:4)	1.3 modificado

Tabla 2 - Secuencias de aminoácidos de los péptidos usados en los ensayos de inmunización.

Familia 2

Péptido	Secuencia	Comentarios
2.1	EKNSESKLTQ (SEQ ID Nº:5)	Giro entre las cadenas β 6 y 7
2.2	IVREVDGDTMKTT (SEQ ID Nº:6)	Giro entre las cadenas β 8 y 9
2.3	EKNSESKLTQIVREVDGDTMKTT (SEQ ID Nº:7)	Unión de 2.1 y 2.2
2.4	EKFSESKLTSDPTGIVREVDGATMKTT (SEQ ID Nº:8)	2.3 modificado
2.5	EKFSESKLTFDGIVREVDGATMKTT (SEQ ID Nº:9)	Modificación alternativa de 2.3
2.6	KIGTSVFGTRTSKFDATEMVLDKEE (SEQ ID Nº:10)	2.5 aleatorizado

La Figura 9 representa la relación entre la estructura tridimensional de Sm14 y los péptidos seleccionados para los ensayos de vacunación según el Ejemplo 1. En el centro, en la parte superior, se muestra una representación de cintas del modelo de la molécula Sm14. Los residuos conservados en Sm14 y Fh15 (pero infrecuentes en los homólogos humanos) y también expuestos al disolvente, se destacan en la representación de barras. A la izquierda (arriba) se indica la contribución de estos residuos (de la familia 1) a la superficie accesible del lado izquierdo de la molécula, y debajo, cómo los péptidos 1.1 y 1.2 intentan reproducir esta superficie. A la derecha, se proporciona una representación análoga para la familia 2.

EJEMPLO 2 - Síntesis de Péptidos

Los péptidos según la presente invención se sintetizaron mediante procedimientos habituales (del estado de la técnica) y se proporcionaron en forma de amidas C-terminales como péptidos libres con una pureza mayor de 97%

EJEMPLO 3 - Expresión de Sm14 Recombinante (r-Sm14)

Para proporcionar experimentos de control, se obtuvo la proteína Sm14 recombinante expresada por la construcción pRSETA-6xHis-Sm14 tras la transformación de *E. coli* BL21(DE3) químicamente competente como se describe en Ramos C. R. R *et al*., Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 96, Supl.: 131-135, 2001.

Materiales y Métodos

Se adquirió el sistema de expresión pRSET A,B,C de Invitrogen. Se obtuvo el pET3-His (Chem & Tsonwin 1994) del Instituto Nacional de Genética, Japón. Todos los reactivos usados aquí fueron de grado analítico.

Expresión y Purificación de Sm14 recombinante

El Sm14 recombinante procedente del sistema de expresión pGEMEX (Promega) se purificó como se describió ("A *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine". Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 269-273 y Patente de EE.UU. 5.730.984).

Las proteínas Sm14 recombinantes expresadas mediante las construcciones pRSETA-Sm14, pET3-His-Sm14 y pRSETA-6Xhis-Sm14 se obtuvieron tras la transformación de *E. coli* BL21(DE3) químicamente competente. Los clones transformados se cultivaron en LB líquido (medio Luria Bertani) a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0,6 a 600 nm. En este punto, se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM. Los cultivos se cultivaron durante otras 3 h en las mismas condiciones descritas y las células se recogieron mediante centrifugación a 2.000 g. El Sm14 se expresó en los cuerpos de inclusión en todos los casos. Las células resuspendidas en tris-HCl 50 mM de pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM se rompieron mediante una prensa de French y el Sm14 insoluble se recuperó mediante centrifugación. Los cuerpos de inclusión

se lavaron mediante centrifugación con la disolución previa que contenía además urea 2 M y finalmente se disolvieron en urea 8 M a temperatura ambiente durante 2 h en el mismo tampón. Los sobrenadantes clarificados se diluyeron 200 veces vertiéndolos en una disolución de replegamiento (tris-HCl 50 mM de pH 8,0, 500 ml de NaCl, imidazol 5 mM) mediante agitación a temperatura ambiente durante 18-24 h. El volumen total se clarificó mediante centrifugación y se cargó en una columna C10 (Amersham Pharmacia) que contenía 5 ml de resina cargada de Ni^{+2} (Amersham Pharmacia) equilibrada previamente con el tampón de replegamiento a 1 ml/min. La columna se lavó con 10-20 volúmenes de tampón de replegamiento que contenía imidazol 20 mM, y la proteína adsorbida se eluyó mediante imidazol 1 M en el tampón de replegamiento. Se recogieron fracciones de 1 ml. La caracterización de las fracciones se realizó mediante SDS-PAGE y transferencia de Western según los protocolos descritos (Harlow & Lane 1988, Ausubel et al. 1989, Sambrook et al. 1989).

EJEMPLO 4 - Experimentos de Inmunización contra *S. mansoni*

En este experimento, se inmunizaron ratones suizos no relacionados con dos dosis intradérmicas/subcutáneas a un intervalo de 7 días, seguido de una inyección de refuerzo, 21 días más tarde. En el caso de los péptidos, se usó una dosis de 70 µg en presencia del adyuvante monofosforil lípido A + dimicolato de trehalosa (MPL-TDM, Ribi ImmunoChem Research Inc.) y $Al(OH)_3$ para todas las inyecciones. Los péptidos usados de acuerdo con la presente invención fueron los preparados como se discutió en el Ejemplo 1, con la excepción del péptido 1.1.

Para los experimentos de control con r-Sm14 (preparado según el Ejemplo 3) y Extracto Salino (ES) (como se describió en la Patente de EE.UU. 4.396.600) las dosis usadas fueron 10 µg y 300 µg, respectivamente. En el caso de ES, se emplearon dos vías de administración, a través de la región inguinal y la planta del pie. Para todos los demás antígenos, se usó solamente la vía inguinal.

Para los ensayos de protección contra *S. mansoni*, los animales se expusieron de manera subcutánea a 100 cercarias, 60 días tras la última inmunización y se perfundieron 45 días más tarde. La protección total se calculó mediante la fórmula {(C-V)/C} x 100, en la que C es el número medio de gusanos en los animales de control y V es el número medio de gusanos en los animales vacunados.

Los resultados de este primer experimento de vacunación contra *S. mansoni* en ratones suizos (Figura 11) estableció un incremento aparentemente significativo de la protección después de administrar extracto salino (uno de los controles estándar utilizados), a través de la planta del pie en comparación con la vía inguinal. Durante este experimento inicial, los péptidos también se administraron de manera inguinal. Como consecuencia, se estableció un segundo protocolo para los péptidos más prometedores, pero empleando la planta del pie como vía de administración elegida.

La Figura 11 muestra claramente un grado elevado de diferenciación y selectividad entre los nueve péptidos usados en el primer experimento, y los niveles de protección variaron mucho desde un máximo de ligeramente más del 40% (péptidos 1.4 y 2.1) hasta la ausencia de protección (2.5 y 2.6). Esto implica una respuesta inmunitaria específica hacia las diferentes secuencias de aminoácidos, y no una reacción genérica a la inmunización mediante cualquier péptido exógeno. Esto se ve recalcado por el hecho de que el péptido 2.6, que no está relacionado con Sm14 (ya que fue generado mediante aleatorización de secuencia de 2.5) no condujo a protección.

La Figura 11 también demuestra que los péptidos de la primera familia, que ofrecieron los niveles más elevados de protección, fueron 1.3 y 1.4, y ambos corresponden a diferentes variaciones de fusiones de los péptidos más pequeños 1.1 y 1.2. En un segundo experimento (véase el ejemplo siguiente), el péptido 1.1, que se había excluido del ensayo inicial, posteriormente demostró ser tan eficaz como los péptidos de fusión, 1.3 y 1.4 (véase la Figura 12). De la segunda familia, el péptido más pequeño 2.1, de una longitud total de 10 residuos, ofreció los mayores niveles de protección (42,1%). Los miembros restantes de la segunda familia produjeron progresivamente niveles inferiores de protección (Figura 11) que cayeron hasta cero para los péptidos 2.5 y 2.6.

EJEMPLO 5 - Experimentos de Inmunización Adicionales contra *S. mansoni*

En este experimento se empleó un protocolo idéntico al del Ejemplo 4 para un subgrupo de péptidos que incluían los que parecían más prometedores (1.1; 1.3; 1.4 y 2.1) junto con 2.5 como control, pero empleando la planta del pie como vía de administración.

Se expuso a los animales de manera subcutánea con 100 cercarias, 60 días tras la última inmunización y se perfundieron 45 días más tarde. La protección total se calculó mediante la fórmula {(C-V)/C} x 100, en la que C es el número medio de gusanos en los animales de control y V es el número medio de gusanos en los animales vacunados.

En este segundo experimento (Figura 12), en el que solamente se ensayó un número limitado de péptidos, el comportamiento de los péptidos más protectores (1.1, 1.3, 1.4 y 2.1) fue equivalente al observado para la proteína completa recombinante (r-Sm14) y comparable al informado previamente (Tendler, M. *et al*. (1996). "A *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine". Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 269-273.) lo que demuestra que puede ser posible reproducir la respuesta inmunitaria protectora

generada contra Sm14, con moléculas mucho más pequeñas derivadas de él y que corresponden a menos del 10% de su peso molecular total. El péptido 1.1, que consiste en ocho residuos, es el más pequeño de todos los péptidos ensayados, y aún así dio lugar a niveles protectores cercanos al 50%. En estos ensayos contra *S. mansoni* parece ganarse relativamente poco incrementando el tamaño de este péptido, ya que 1.3 y 1.4 produjeron resultados muy similares en términos de protección.

Esto implica que la mayoría de la capacidad inmunógena de estos péptidos de fusión mayores es debida a sus secuencias N-terminales, que son idénticas a 1.1 y que corresponden a los residuos 118 a 125 del Sm14 original. El péptido 1.1 procede así de la región C-terminal de la molécula, y su importante papel inmunógeno es coherente con la observación realizada anteriormente con respecto a la conservación de residuos en esta región de la molécula.

El hecho de que el tercio C-terminal de la molécula contribuye a los epítopos más importantes de Sm14 está apoyado adicionalmente por el hecho de que el péptido 2.1 (que corresponde a los residuos 85 a 94) también proporciona niveles elevados de protección (42,1% en el primer experimento y 50% en el segundo). Sin embargo, en este caso existe una diferencia notable cuando se compara con la primera familia. Al generar los péptidos de fusión mayores, añadiendo la secuencia de 2.2 a 2.1 en diversos formatos diferentes, los péptidos resultantes son menos protectores. Una explicación potencial para esto puede ser que las respuestas humorales a los péptidos, que deberían ser específicas de la confirmación, pueden ser ineficaces si los péptidos asumen estructuras que ocultan, ocluyen o alteran la estructura del epítopo.

Actualmente se sabe poco sobre la naturaleza de la respuesta inmunitaria inducida por Sm14, aunque se cree que incluye contribuciones tanto humorales como celulares. El componente celular de esta respuesta se ha correlacionado con la resistencia, la susceptibilidad y la patología mediada por hipersensibilidad de tipo retardado (DTH). También se sabe que IL-10 es una molécula clave en la regulación de la respuesta de células T en la esquistosomiasis. Un estudio de población llevado a cabo por Brito *et al.* (Brito CF, Caldas IR, Coura Filho P, Correa-Oliveira R, Oliveira SC., "CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14KDA Schistosoma mansoni fatty acid-binding protein.", Scand J Immunol. junio de 2000; 51(6):595-601. PMID: 10849370 [PubMed - catalogado en MEDLINE]) en un área endémica de esquistosomiasis brasileña demostró que los niveles más elevados de respuesta proliferativa hacia Sm14 se observaron principalmente en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de individuos normales endémicos sin infectar. Esto sugiere que la actividad de las células T contra el antígeno Sm14 debería ser el mismo mecanismo asociado a la resistencia natural contra la infección.

Por otra parte, las respuestas humorales en la esquistosomiasis se han asociado a diversos mecanismos efectores o reguladores. IgG e IgE están implicados directamente en la destrucción *in vitro* de las larvas de esquistosoma en asociación con los macrófagos y las plaquetas. Según Brito *et al* (Brito CF, Fonseca CT, Goes AM, Azevedo V, Simpson AJ, Oliveira SC. "Human IgG1 and IgG3 recognition of Schistosoma mansoni 14kDa fatty acid-binding recombinant protein.", Parasite Immunol. enero de 2000; 22(1):41-8.) los tipos prevalentes de anticuerpos contra Sm14 en los sueros de diferentes formas clínicas de esquistosomiasis son IgG1 e IgG3. También sugieren que la función efectora inducida por estas moléculas de inmunoglobulinas podría ser un componente crítico del sistema inmunitario implicado en la protección inducida por Sm14.

EJEMPLO 6 - Experimentos de Inmunización contra *F. hepatica*

Este ejemplo se refiere al uso de algunos de los péptidos descritos en el Ejemplo 1 para la vacunación contra *Fasciola hepatica* en el modelo de ratones suizos. Para el ensayo de protección contra *Fasciola hepatica*, cada grupo (10 ratones suizos no relacionados/grupo) recibió dosis intradérmicas/subcutáneas a través de la planta del pie mediante el uso de un protocolo idéntico al descrito anteriormente para *S. mansoni.* Los animales se vacunaron con 70 µg de uno de los subgrupos de péptidos descritos anteriormente (1.1, 1.3, 1.4, 2.1 y 2.5), emulsificados en adyuvante de Ribi (MPL-TDM) y $Al(OH)_3$ o 10 µg de r-Sm14 (en presencia o ausencia de adyuvante), o una cantidad equivalente de adyuvante solo. Los grupos vacunados y no vacunados de control se expusieron simultáneamente de manera oral con 3 metacercarias de *F. hepatica* 60 días después de la inmunización y el sacrificio de todos los animales se llevó a cabo 30 días después de la exposición.

La Figura 13 muestra los resultados de los ensayos de vacunación en ratones suizos después de la exposición con tres metacercarias de *F. hepatica*.

Tal como se anticipó a partir de datos publicados previamente (Tendler, M. *et al*. (1996). "A *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine". Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 269-273), r-Sm14 en presencia o ausencia de adyuvante es capaz de ofrecer una protección del 100% a ratones suizos no relacionados bajo el protocolo de vacunación proporcionado, que está limitado por el número de metacercarias que se pueden usar para la exposición. En comparación, los animales que fueron vacunados solamente con adyuvante o los animales de control que no recibieron vacuna estuvieron muertos o infectados con al menos un gusano adulto al final del experimento (30 días tras la infección por exposición). Del grupo limitado de péptidos seleccionados para los ensayos de vacunación en *F. hepatica*, los péptidos 1.4 y 2.1 fueron los más eficaces, y generaron una protección del 100% con el protocolo adoptado, similar a la alcanzada con la proteína

completa. En este caso, los péptidos 1.1 y 1.3 fueron menos eficaces (66,7% y 50%, respectivamente) y el péptido 2.5 fue el menos eficaz de todos (protección del 12,5%).

En términos generales, estos resultados son coherentes con los de *S. mansoni.* Sin embargo, en el caso de la primera familia, sí parece haber cierta ganancia al usar el péptido de fusión diseñado 1.4 sobre el péptido más simple 1.1. En este caso, parece que también existe una ganancia considerable en la introducción de las glicocolas entre los dos segmentos peptídicos originales, lo que sugiere que la flexibilidad adicional puede, de hecho, ayudar al péptido a asumir una conformación inmunológicamente relevante. En el caso de la familia 2, una vez más el péptido más grande 2.5 fue efectivamente inactivo, mientras el más pequeño 2.1 (que es casi idéntico a su extremo N-terminal) generó una protección del 100%.

EJEMPLO 7 - La presencia de FABPs relacionadas con Sm14 en otros helmintos de importancia médica y veterinaria.

La Figura 14 muestra la alineación de varias FABPs de diferentes parásitos, resaltando los elementos de la estructura secundaria y los residuos que se predice que participan en los epítopos discontinuos de Sm14. Estos residuos, por tanto, tienen potencialmente reactividad cruzada hacia todos los parásitos enumerados en la alineación.

Para demostrar la presencia de moléculas de reactividad cruzada relacionadas con Sm14 en otros helmintos, se ensayaron extractos de dichos helmintos de la siguiente manera.

Se ensayaron extractos de los nueve helmintos siguientes: el trematodo *Echinostoma paraensei*; los cestodos *Hymenolepis diminuta*, *Dipylidium caninum* y *Taenia saginata*; los nematodos *Aspiculuris tetraptera*, *Toxocara* sp., *Ascaris suum* (machos), *A. suum* (hembras) y *Toxocara canis*. Cuatro de estos extractos (*A. suum* machos y hembras, *E. paraensei* y *T. saginata*) contenían un componente de proteína que fue reconocido por el anticuerpo anti-rSm14 policlonal monoespecífico, como se muestra en la Figura 16A. En el caso de los extractos procedentes de *A. suum* macho y hembra, el componente de reactividad cruzada posee un peso molecular de poco más de 14 kDa, como se muestra en la Figura 16B. Las bandas de proteínas detectadas en este experimento son extremadamente similares a las observadas en los controles (extracto salino, ES, de parásitos macho y hembra), en otras palabras, no presentan diferencias en cuanto a la expresión como se ha observado en casos previos.

Tal como se indicó previamente, las FABPs ya se han descrito en varios helmintos diferentes (que incluyen trematodos, cestodos y nematodos). Tales moléculas poseen secuencias de aminoácidos y estructuras tridimensionales conservadas de una especie a otra. Como ejemplo, Sm14 y Fh15 (FABP de *Fasciola hepatica*) comparten un 44% de identidad de secuencia, que se cree que es responsable de la resistencia heteróloga observada entre las dos especies. Un ejemplo adicional es la FABP de *Ascaris suum*, As-p18, que presenta un 28% de identidad de secuencia con Sm14 y una estructura tridimensional predicha muy similar.

La Figura 16B también muestra que un componente de 14 kDa de *E paraensei* es reconocido por el suero anti-rSm14, y este último se obtiene de conejos inoculados previamente con la molécula recombinante.

El extracto final que muestra inmunorreactividad cruzada con suero anti-rSm14 fue el de *Taenia saginata.* La Figura 16B también muestra que en este caso la banda de proteína reconocida tiene un peso molecular de aproximadamente 14 kDa.

Estos resultados demuestran que la molécula Sm14 presenta reactividad cruzada inmunitaria con otras proteínas de la misma familia (FABPs de *A. suum*, *E. paraensei* y *T. saginata*.) Además, en el caso de la infección por *F. hepatica*, ya se ha demostrado la eficacia de Sm14 como vacuna contra la fasciolosis (véanse los ejemplos previos). Esto demuestra la eficacia del uso de Sm14 como una vacuna anti-helminto bivalente para el uso contra esquistosomiasis y fasciolosis.

El hecho de que a) los datos anteriores demuestren el fenómeno de la reactividad cruzada inmunitaria entre el suero anti-rSm14 y las FABPs procedentes de otros parásitos helmintos diversos, b) la Figura 14 muestre que muchos de los residuos identificados en Sm14 que pertenecen a los epítopos discontinuos están conservados en las secuencias de FABPs de otros helmintos parásitos, c) el hecho de que tales moléculas estén bien distribuidas entre los parásitos helmintos, d) el hecho de que la estructura tridimensional de tales FABPs esté extremadamente bien conservada, indica que se puede aplicar la molécula Sm14 como base molecular para una vacuna multivalente anti-helmintos.

Los resultados de los Ejemplos de la presente invención demuestran que los péptidos sin acoplar confieren protección contra ambos parásitos que son equivalentes a los observados con la molécula originaria.

Los resultados presentados en estos ejemplos también proporcionan pruebas de que es posible simplificar considerablemente la molécula Sm14 y todavía inducir una respuesta inmunitaria protectora para *S. mansoni* y *F. hepatica* en los animales experimentales. Esto representa el desarrollo de una vacuna peptídica bivalente anti-helminto, que proporciona varias ventajas en cuanto a la estabilidad química, la seguridad y la reproducibilidad de la fabricación, que tienen consecuencias importantes para la administración eficaz en regiones endémicas.

En el caso de las respuestas humorales, las conformaciones tridimensionales accesibles al péptido son relevantes para su eficacia y, principalmente, es interesante incluir tantas regiones de un epítopo discontinuo como sea posible en un único péptido.

Con respecto a la Figura 15, representa la posición de los residuos de cisteína en los péptidos y su papel en la limitación del movimiento conformacional. Se estudiaron los residuos que limitan la movilidad conformacional con respecto a los elementos de la estructura secundaria. De manera específica, la Figura 15 muestra el resultado de la adición de cisteína como herramienta para la limitación de la movilidad espacial. Se descubrió que las cisteínas, cuando están presentes por parejas en la secuencia, por ejemplo en un medio oxidante, forman cistinas (puente disulfuro), uniendo fragmentos peptídicos que podrían estar distantes en la estructura conformacional en disolución.

El resultado demuestra que la presencia de FABPs en helmintos es una norma, siendo el helminto un trematodo, un cestodo o un nematodo. Además de esto, existe la confirmación de la importancia de las FABPs como base para la vacunación, ya que exhiben epítopos inmunógenos y desarrollan funciones importantes en la fisiología de los microorganismos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundación Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

<120> FRAGMENTOS DE PÉPTIDOS ACTIVOS SINTÉTICOS

<130> P1339

<140>
<141>

<160> 10

<170>

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Giro entre las cadenas β 9 y 10

<400> 1
Val Thr Val Gly Asp Val Thr Ala
1 5

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primera hélice α (entre las cadenas β 1 y 2)

<400> 2
Asn Phe Asp Ala Val Met Ser Lys Leu Gly
1 5 10

<210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Unión de 1.1 y 1.2

<400> 3
Val Thr Val Gly Asp Val Thr Ala Asn Phe Asp Ala Val Met Ser
1 5 10 15
Lys Leu Gly

<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: 1.3 modificado

<400> 4

Val Thr Val Gly Asp Val Thr Gly Gly Ser Asp Ala Val Met Ser
1 5 10 15
Lys Leu Gly

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Giro entre las cadenas β 6 y 7

<400> 5
Glu Lys Asn Ser Glu Ser Lys Leu Thr Gln
1 5 10

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Giro entre las cadenas β 8 y 9

<400> 6
Ile Val Arg Glu Val Asp Gly Asp Thr Met Lys Thr Thr
1 5 10

<210> 7
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Unión de 2.1 y 2.2

<400> 7
Glu Lys Asn Ser Glu Ser Lys Leu Thr Gln Ile Val Arg Glu Val
1 5 10 15
Asp Gly Asp Thr Met Lys Thr Thr
20

<210> 8
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: 2.3 modificado

<400> 8
Glu Lys Phe Ser Glu Ser Lys Leu Thr Ser Asp Pro Thr Gly Ile
1 5 10 15
Val Arg Glu Val Asp Gly Ala Thr Met Lys Thr Thr
20 25

<210> 9
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Modificación alternativa de 2.3

<400> 9

```
Glu Lys Phe Ser Glu Ser Lys Leu Thr Phe Asp Gly Ile Val Arg
1               5                  10                  15
Glu Val Asp Gly Ala Thr Met Lys Thr Thr
            20                  25
```

<210> 10
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: 2.5 aleatorizado

<400> 10

```
Lys Ile Gly Thr Ser Val Phe Gly Thr Arg Thr Ser Lys Phe Asp
1               5                  10                  15
Ala Thr Glu Met Val Leu Asp Lys Glu Glu
            20                  25
```

REIVINDICACIONES

1. Fragmentos de péptidos en los que el fragmento de péptido contiene la secuencia de aminoácidos VTVGDVTA que procede de una proteína de 14 kDa de Schistosoma mansoni (Sm14) o su recombinante (rSm14).

2. Fragmentos de péptidos en los que el fragmento de péptido contiene la secuencia de aminoácidos NFDAVMSKLG que procede de una proteína de 14 kDa de Schistosoma mansoni (Sm14) o su recombinante (rSm14).

3. Fragmentos de péptidos en los que el fragmento de péptido contiene la secuencia de aminoácidos VTVGDVTANFDAVMSKLG que procede de una proteína de 14 kDa de Schistosoma mansoni (Sm14) o su recombinante (rSm14).

4. Fragmentos de péptidos en los que el fragmento de péptido contiene la secuencia de aminoácidos VTVGDVTGGSDAVMSKLG que procede de una proteína de 14 kDa de Schistosoma mansoni (Sm14) o su recombinante (rSm14).

5. Fragmentos de péptidos en los que el fragmento de péptido contiene la secuencia de aminoácidos EKNSESKLTQ que procede de una proteína de 14 kDa de Schistosoma mansoni (Sm14) o su recombinante (rSm14).

6. Fragmentos de péptidos en los que el fragmento de péptido contiene la secuencia de aminoácidos IVREVDGDTMKTT que procede de una proteína de 14 kDa de Schistosoma mansoni (Sm14) o su recombinante (rSm14).

7. Fragmentos de péptidos en los que el fragmento de péptido contiene la secuencia de aminoácidos EKNSESKLTQIVREVDGDTMKTT que procede de una proteína de 14 kDa de Schistosoma mansoni (Sm14) o su recombinante (rSm14).

8. Fragmentos de péptidos en los que el fragmento de péptido contiene la secuencia de aminoácidos EKFSESKLTSDPTGIVREVDGATMKTT que procede de una proteína de 14 kDa de Schistosoma mansoni (Sm14) o su recombinante (rSm14).

9. Fragmentos de péptidos en los que el fragmento de péptido contiene la secuencia de aminoácidos EKFSESKLTFDGIVREVDGATMKTT que procede de una proteína de 14 kDa de Schistosoma mansoni (Sm14) o su recombinante (rSm14).

10. Composiciones inmunógenas que consisten en uno o más de los fragmentos de péptido definidos en las reivindicaciones anteriores y un vehículo farmacéutico, y dichas composiciones inmunógenas son capaces de conferir al menos protección parcial contra la infección por helmintos patógenos, y así servir como vacunas contra los mismos.

11. La composición inmunógena según la reivindicación 10 en la que los helmintos patógenos son *Schistosoma mansoni* y/o *Fasciola hepatica.*

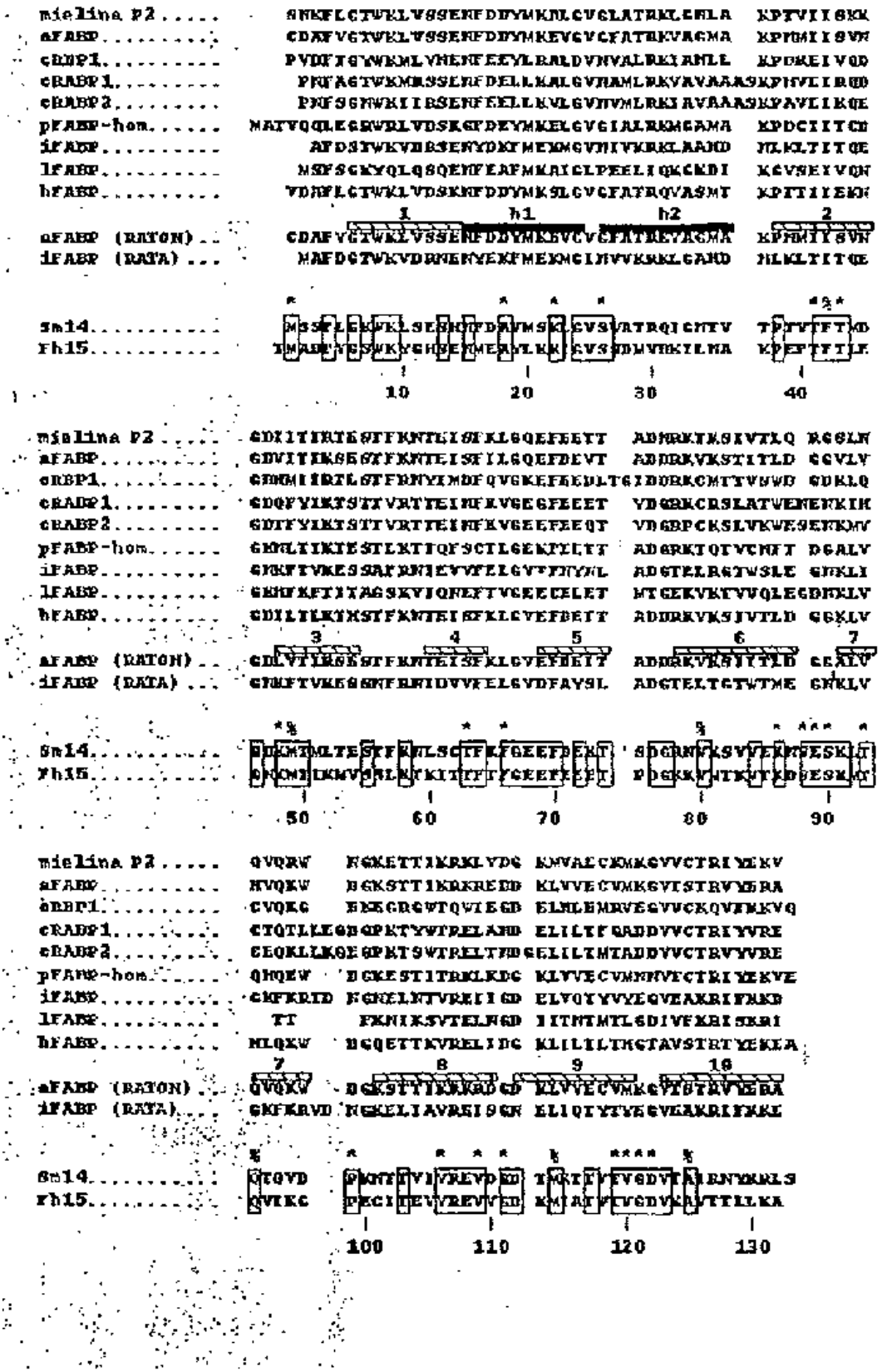


FIGURA 1

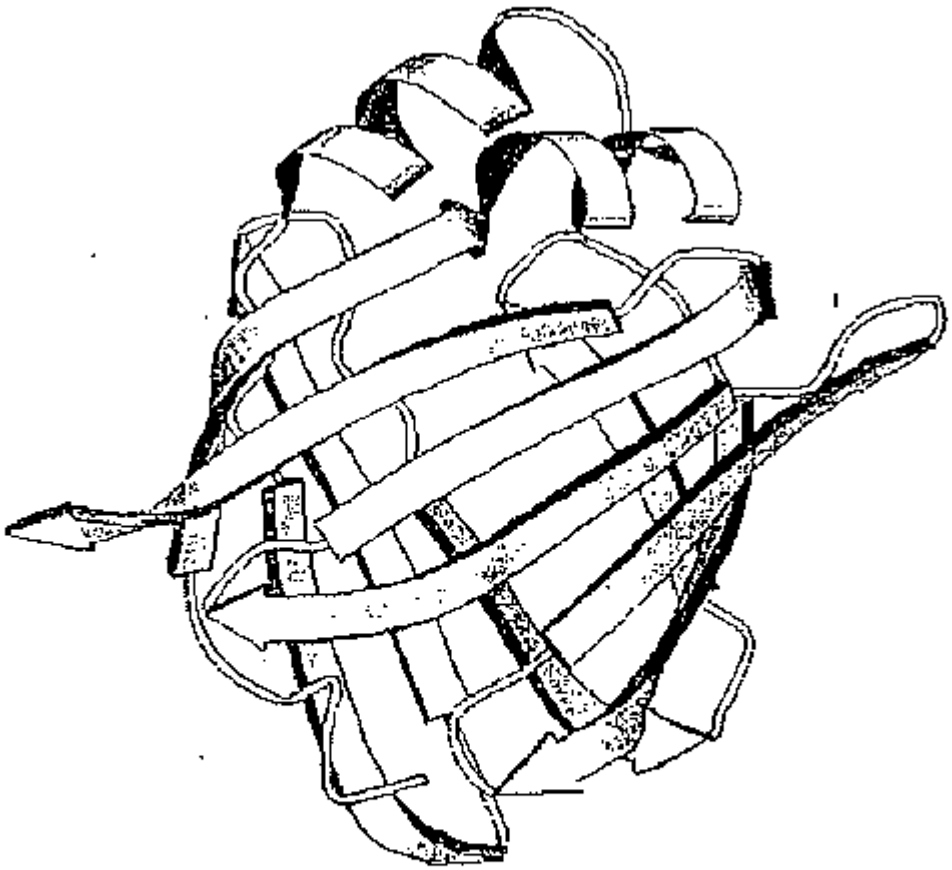


FIGURA 2A

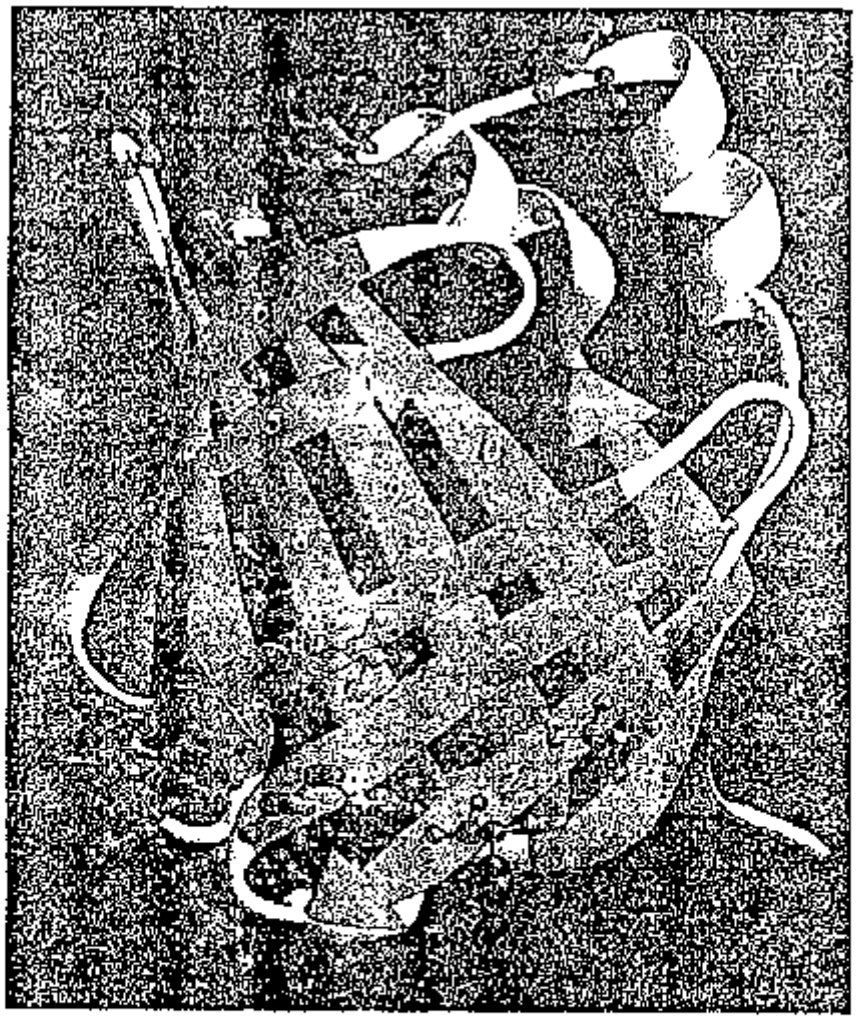


FIGURA 2B

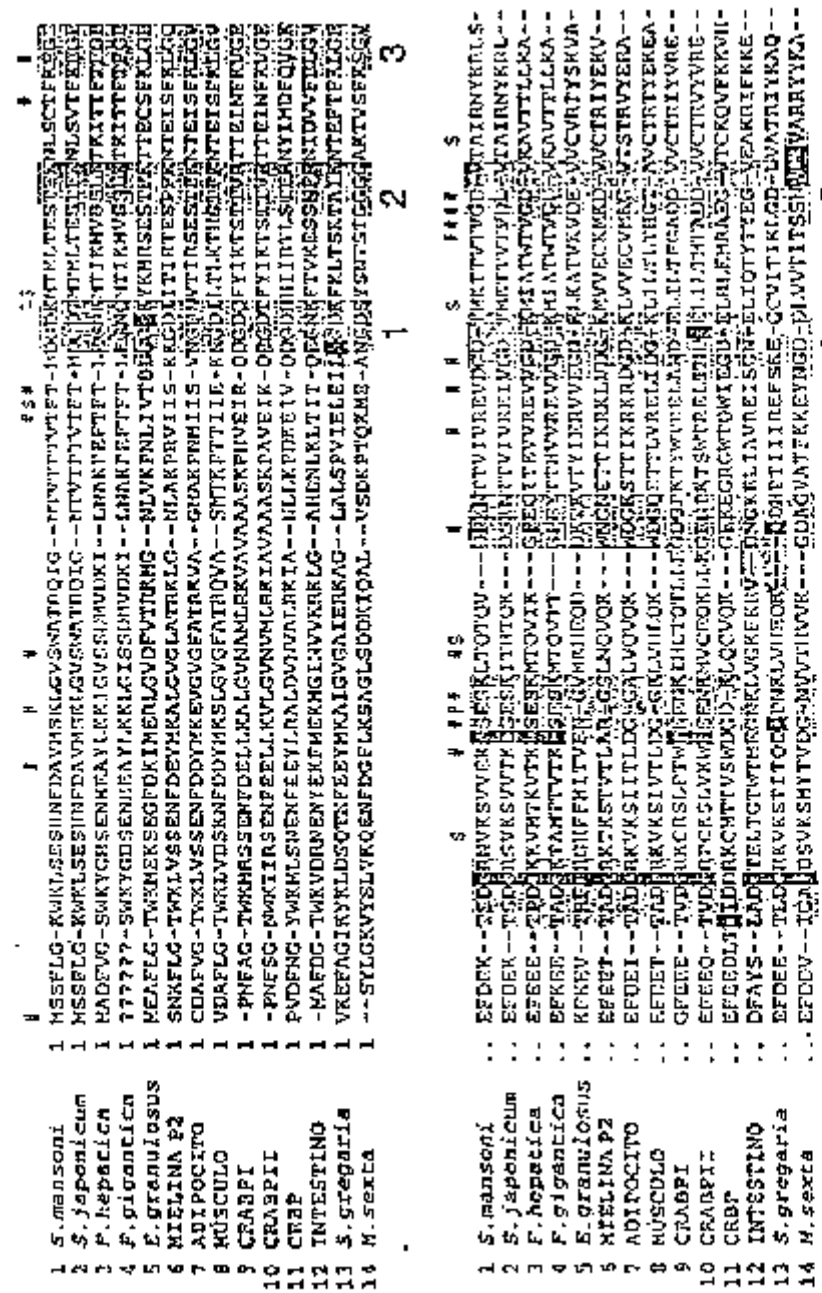


FIGURA 3

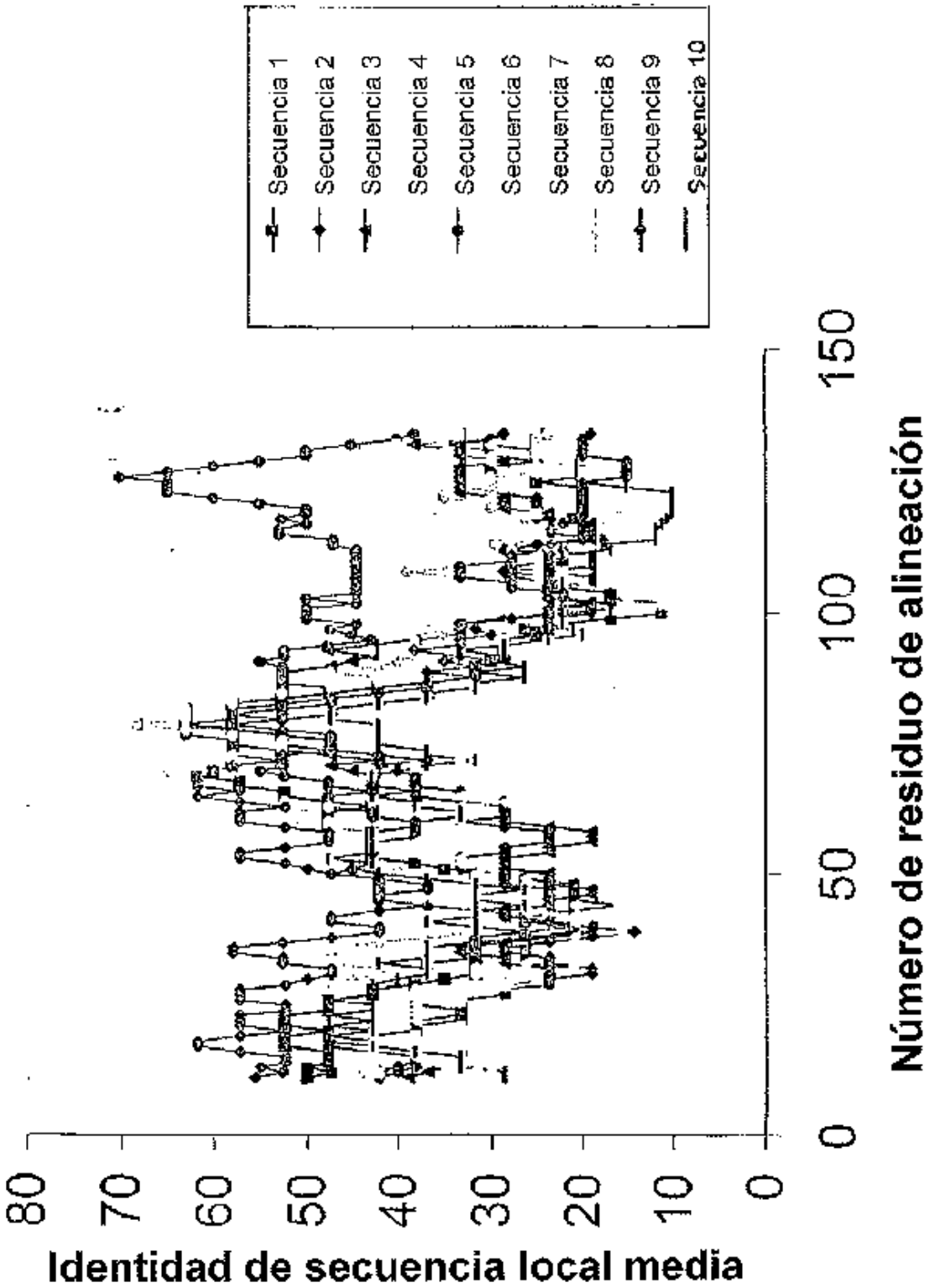

Secuencia 1
Secuencia 2
Secuencia 3
Secuencia 4
Secuencia 5
Secuencia 6
Secuencia 7
Secuencia 8
Secuencia 9
Secuencia 10
Identidad de secuencia local media
Número de residuo de alineación
0
10
20
30
40
50
60
70
80
0
50
100
150

FIGURA 4

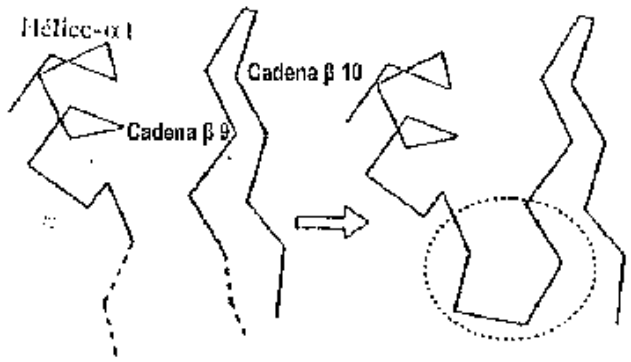


FIGURA 5

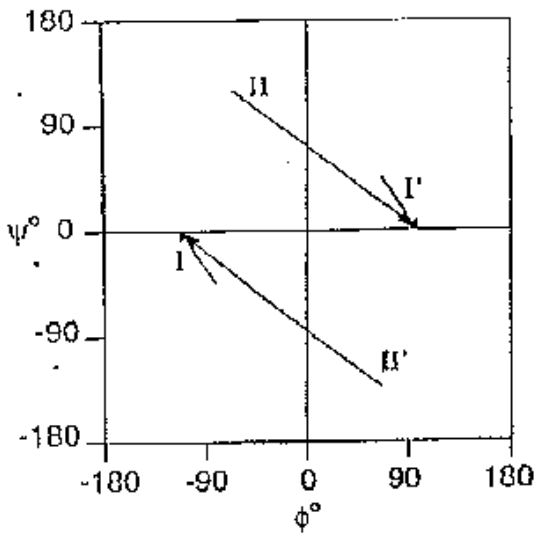


FIGURA 6

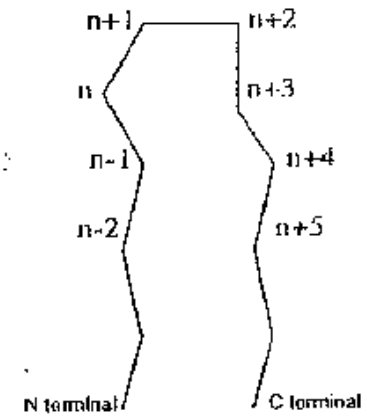


FIGURA 7

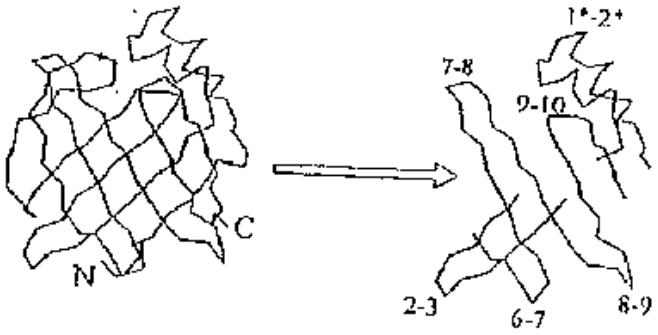


FIGURA 8

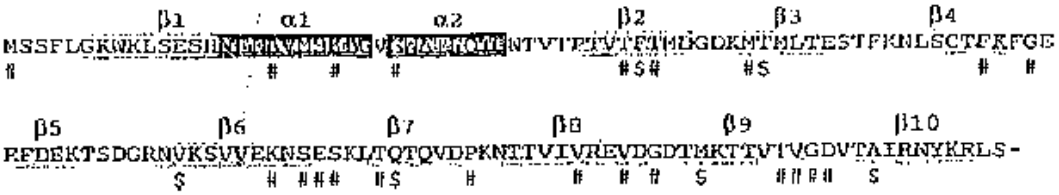
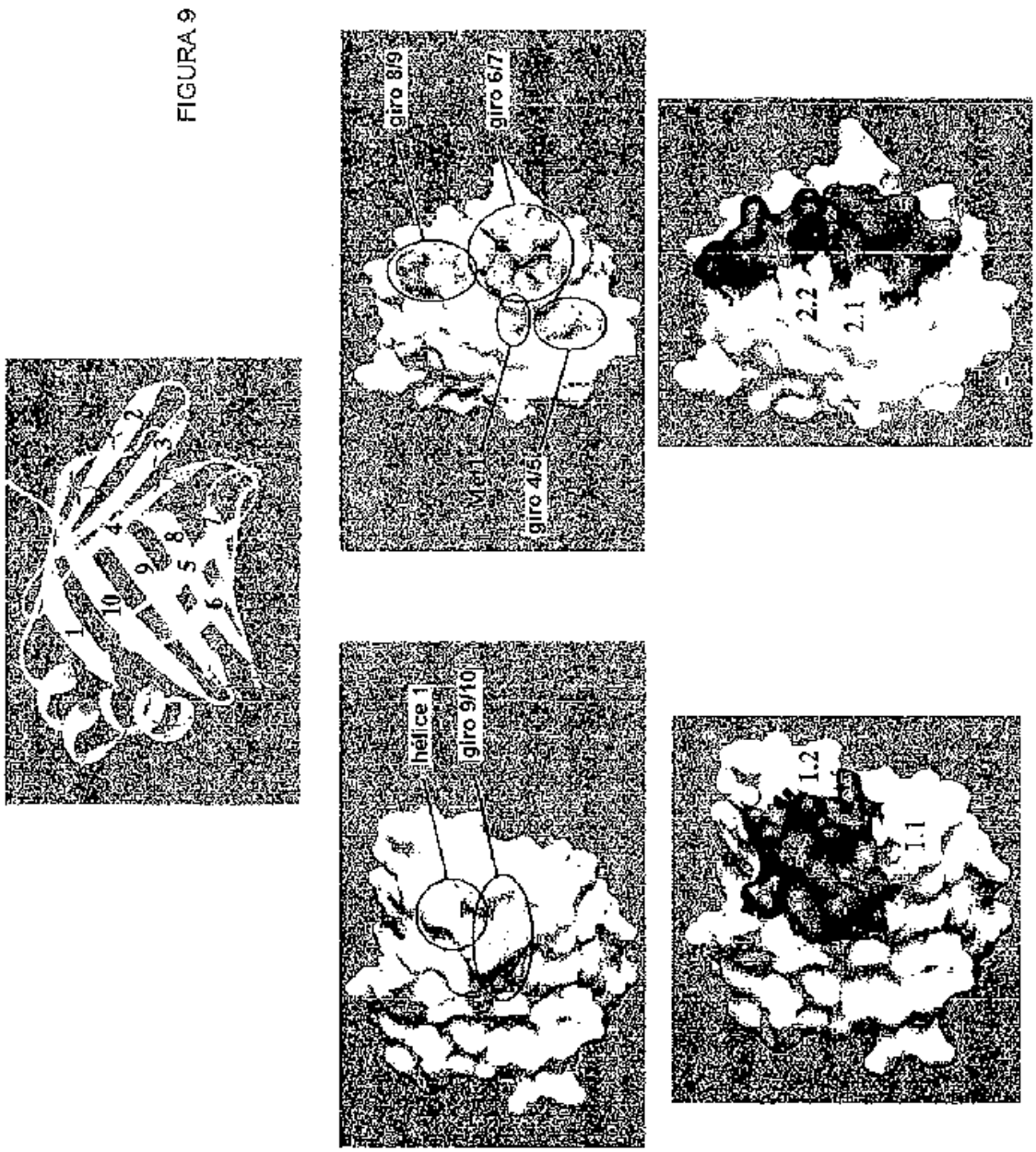


FIGURA 10

FIGURA 9


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
giro 8/9
giro 6/7
giro 4/5
hélice 1
giro 9/10
2.2
2.1
1.2
1.1

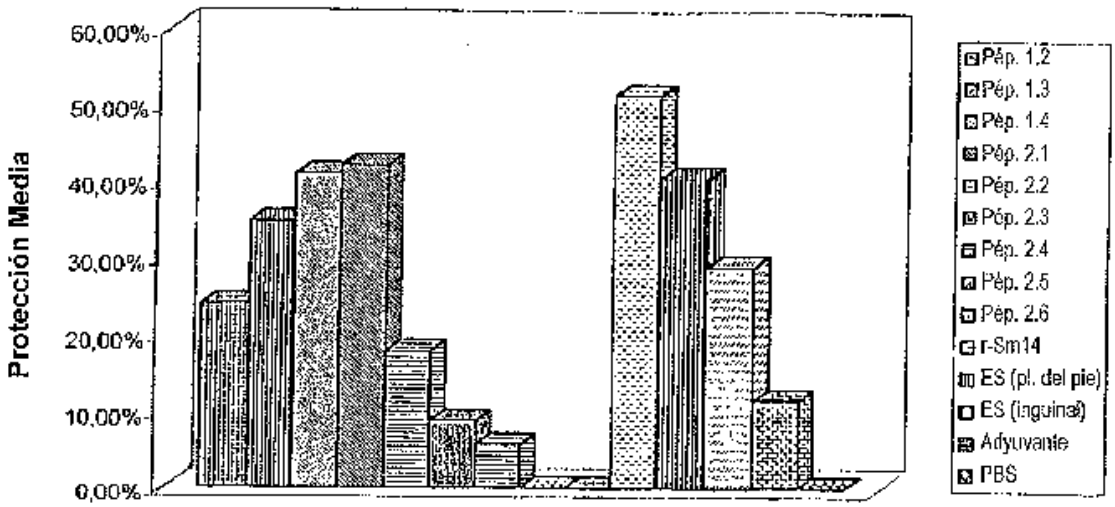


FIGURA 11

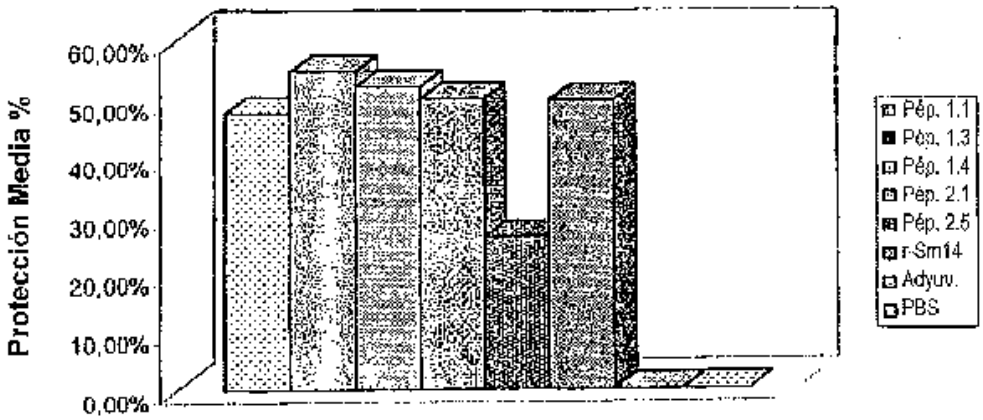


FIGURA 12

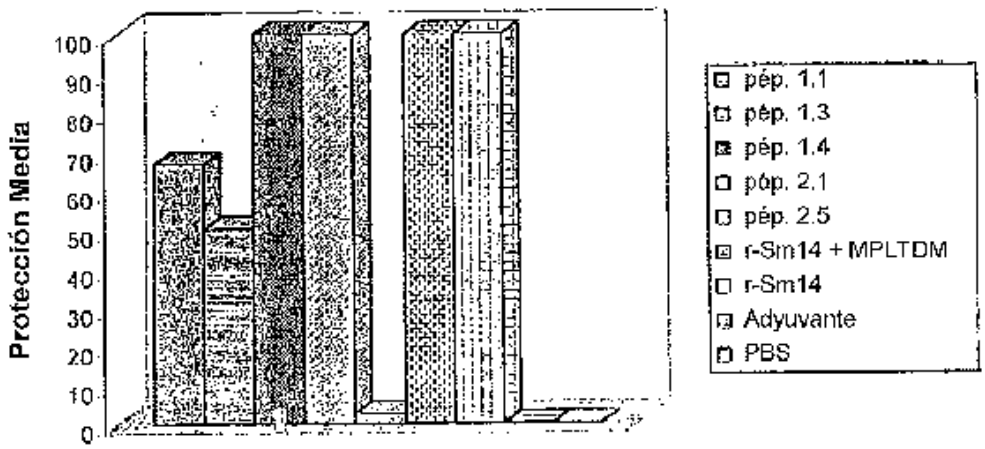


FIGURA 13

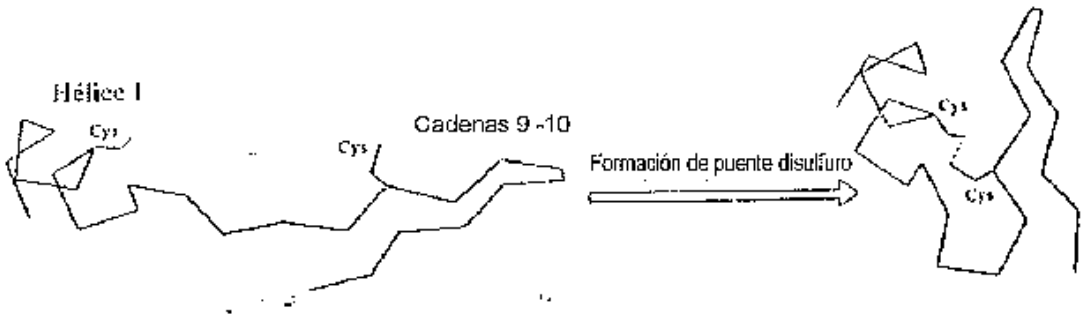


FIGURA 15

FIGURA 14

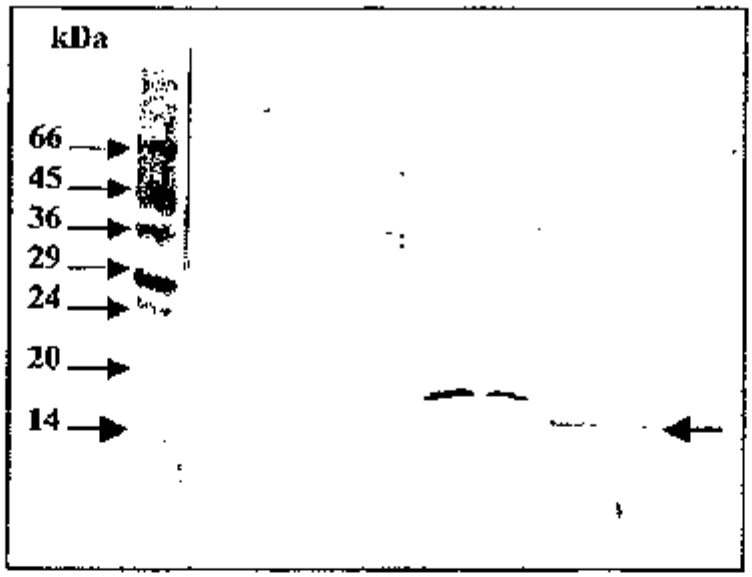


FIGURA 16A

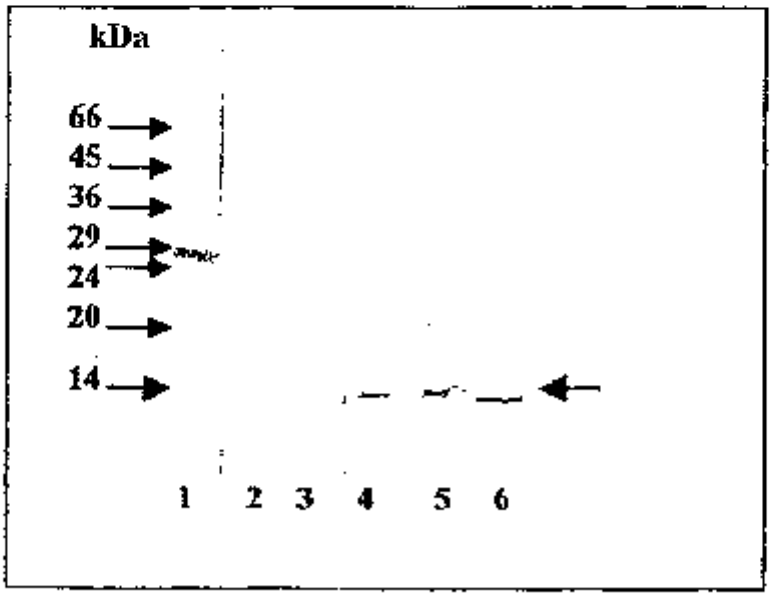


FIGURA 16B