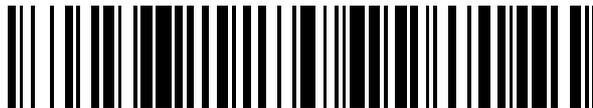


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 880**

21 Número de solicitud: 201231063

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08** (2006.01)

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61P 33/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**06.07.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**06.02.2014**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070481**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (50.0%)  
HOSPITAL REAL CUESTA DEL HOSPICIO S/Nº  
18071 Granada ES y  
UNIVERSIDAD DE PANAMÁ (50.0%)**

72 Inventor/es:

**OSUNA CARRILLO DE ALBORNOZ, Antonio;  
GONZÁLEZ GONZÁLEZ, Gloria Maribel;  
YING, Argentina y  
ESKILDSEN, Gilberto**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

54 Título: **COMPOSICIÓN BASADA EN POLIPÉPTIDOS PARA EL TRATAMIENTO DE MIASIS**

57 Resumen:

Composición basada en polipéptidos para el tratamiento de miasis.

La presente invención describe fragmentos de péptidos homólogos a aquellos presentes en la secuencia de la arginina quinasa que pueden conferir inmunidad protectora en mamíferos contra la infección por larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis. La presente invención también describe composiciones basadas en dichos péptidos para su uso como vacuna frente a miasis.

ES 2 441 880 A1

## **DESCRIPCIÓN**

### **COMPOSICIÓN BASADA EN POLIPÉPTIDOS PARA EL TRATAMIENTO DE MIASIS**

5

#### **CAMPO DE LA INVENCION**

Esta invención se refiere a composiciones para su uso como vacunas que comprenden fragmentos polipeptídicos para el tratamiento de miasis.

10

#### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 Los insectos dípteros, y las moscas en particular, transmiten enfermedades que representan un grave peligro para la salud de personas y animales. A una escala global, provocan pérdidas de producción de aves de corral y ganado que se estima que representan miles de millones de dólares. El crecimiento y rendimiento de casi todos los animales de granja se ven adversamente afectados por moscas, especialmente cuando están presentes en números altos. Los animales infectados se vuelven nerviosos y se reduce drásticamente el consumo de alimentos. El resultado: reducciones significativas de producción de carne y leche, calidad de piel deteriorada y graves pérdidas económicas.

20

25 Las moscas que no pican, a menudo se alimentan de secreciones de los ojos, nariz y cualquier herida pequeña de ganado, esto distrae a los animales del pasto, provocando una reducción en crecimiento y productividad. Las moscas que no pican no son vectores biológicos de ningún organismo patológico específico, pero debido a sus hábitos de alimentación y reproducción y la estructura de sus patas y aparato bucal, pueden actuar como vectores mecánicos para una gran gama de patógenos, desde virus hasta helmintos.

30

Las moscas que pican pueden provocar irritación a animales domésticos, y también son vectores para la transmisión de enfermedades. Sin embargo, debido a que se alimentan de sangre, también pueden provocar anemia e hipersensibilidad. Por tanto algunos consideran que las moscas que pican son un problema incluso más grave en la producción de ganado que las moscas que no pican.

35

Sin embargo, algunas moscas que no pican provocan daño significativo por sí mismas en virtud de su propensión para provocar "miasis" en animales propensos. La miasis

40

es una enfermedad que afecta animales y seres humanos, provocada por larvas de insectos del género dípteros, en particular moscas y entre ellas *Dermatobia hominis*, comúnmente conocida como tórsalo.

- 5 Las condiciones climáticas, tales como temperatura y humedad a niveles encontrados en regiones tropicales y ecuatoriales, particularmente en determinadas estaciones del año, favorecen la proliferación de insectos, en particular insectos dípteros o moscas, en grandes cantidades y por lo tanto de los casos de miasis.
- 10 Existe, por tanto, la necesidad de producir nuevas formulaciones mejoradas útiles en el tratamiento y la prevención de miasis.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

- 15 En un primer aspecto, la invención proporciona un péptido que puede generar una respuesta inmunitaria protectora frente a una infección por larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis que comprende:

- a) la secuencia de SEQ ID NO 1,
- b) una variante de (a) que es homóloga en al menos el 70% a la SEQ ID NO 1, más preferiblemente homóloga en al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99% a la SEQ ID NO 1 y que puede generar una respuesta inmunitaria protectora frente a una infección por larvas de insectos dípteros que provocan miasis, o
- c) un fragmento de (a) o (b) o una mezcla el mismo, de al menos 6 aminoácidos de longitud que puede generar una respuesta inmunitaria protectora frente a una infección por larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis.

- Un segundo aspecto se refiere a polinucleótidos (de aquí en adelante polinucleótido de la invención) que tienen una secuencia seleccionada de:

- a) la secuencia de ADN de SEQ ID NO 11 o la secuencia complementaria a la misma;
- b) una secuencia que se hibrida selectivamente con dicha secuencia (a) o un fragmento de la misma; o
- c) una secuencia que codifica para un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la codificada por dicha secuencia (a) o (b).

Un tercer aspecto de la invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de los mismos que pueden unirse a una cualquiera de las secuencias peptídicas mencionadas anteriormente.

- 5 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una composición veterinaria o farmacéutica (de aquí en adelante “composición farmacéutica”) que comprende cualquiera de los péptidos y/o anticuerpos o fragmentos de los mismos mencionados anteriormente. Otra realización se refiere a la composición farmacéutica para su uso en terapia. Otra realización más se refiere a la composición farmacéutica para su uso  
10 en el tratamiento o la prevención de la enfermedad miasis provocada por larvas de insectos dípteros capaces de provocar dicha enfermedad.

En una realización preferida de la invención, la composición farmacéutica es una composición útil como vacuna, en la que esta composición de vacuna puede usarse  
15 para proteger mamíferos, preferiblemente un ser humano, más preferiblemente un mamífero que pertenece a la subfamilia biológica bovina, caprina, ovina o equina, contra la infección producida por larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis.

- 20 En un aspecto preferido, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende cualquiera de los péptidos mencionados anteriormente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona la composición de vacuna que  
25 comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a una cualquiera de las secuencias peptídicas mencionadas anteriormente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización más preferida de la invención, la enfermedad miasis se provoca por  
30 larvas de insectos dípteros que pertenecen a una cualquiera de las siguientes familias: *Calliphoridae* (moscas azules), *Oestridae* (moscardón), *Sarcophagidae* (moscas de la carne) o *Gasterophilidae*.

En una realización preferida adicional de la invención, la miasis se provoca por  
35 insectos dípteros que pertenecen a la familia *Oestridae*, preferiblemente al género

*Oestrus*, *Dermatobia* o *Hypoderma*; más preferiblemente a las especies *Oestrus ovis* Linnaeus, *Dermatobia hominis*, *Hypoderma spp* (rezno) o *Gasterophilus spp*.

En una realización más preferida de la invención, la miasis se provoca por insectos dípteros que pertenecen a la familia *Calliphoridae*, preferiblemente al género *Cochliomyia*, *Lucilla* o *Chrysomya*.

En otra realización de la invención, la miasis se provoca por insectos dípteros que pertenecen a la familia *Calliphoridae*, preferiblemente al género *Cordylobia* o *Chrysomya*; más preferiblemente, a las especies *Cordylobia anthropophaga* o *Chrysomya bezziana*.

La invención también se refiere a un vector recombinante, tal como un vector de expresión, que comprende un polinucleótido de la invención operativamente unido a una secuencia reguladora, por ejemplo un promotor; una célula huésped que se transforma con un polinucleótido de la invención; y un procedimiento de producción de un polipéptido adecuado para su uso como composición farmacéutica, preferiblemente como vacuna, que comprende mantener una célula huésped transformada con un polinucleótido de la invención en condiciones para proporcionar la expresión del péptido.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de vacunación de un sujeto humano o un animal contra una infección producida por una larva de insecto díptero capaz de provocar miasis, en el que el animal es preferiblemente un mamífero que pertenece a la subfamilia biológica bovina, caprina, ovina o equina.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1:** Esta figura muestra el número de larvas encontradas en 6 terneros sometidos a prueba, 3 de los cuales se vacunaron con dos dosis intradérmicas de 1 mg/kg de peso de la SEQ ID NO 1 usando montanida como adyuvante. A los 3 animales no vacunados control sólo se les inoculó adyuvante (montanida).

**Figura 2:** Esta figura muestra el título de anticuerpo frente un antígeno total de larvas de *Dermatobia* medido en un grupo de conejos inmunizados por vía intradérmica con la secuencia antigénica SEQ ID NO 1 usando montanida como adyuvante. Los triángulos representan animales inmunizados y los rombos animales control. El eje de

abscisas representa los días transcurridos desde la inmunización y el de ordenadas el logaritmo del título de anticuerpo.

**Figura 3:** Esta figura muestra una alineación de los péptidos identificados como SEQ ID NO 1 y 2 con la isoforma de arginina cinasa de *Dermatobia hominis* (gi|23093854|gb|AAN11983.1|)

**Figura 4:** Esta figura muestra un análisis de inmunotransferencia usando los sueros de animales infectados de manera natural a diferentes diluciones como anticuerpos primarios.

**Figura 5:** Esta figura muestra una alineación de múltiples secuencias entre secuencias peptídicas de SEQ ID NO 3 a SEQ ID NO 10 con isoforma de arginina cinasa de *Dermatobia hominis* (gi|23093854|gb|AAN11983.1|)

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La arginina quinasa es una enzima crucial para el metabolismo de los insectos y otros invertebrados que se ha propuesto como una diana farmacológica pesticida. En este documento, se presentan fragmentos de péptidos novedosos homólogos a aquellos presentes en la secuencia de la arginina quinasa que pueden conferir inmunidad protectora en mamíferos contra la infección por larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a péptidos adecuados para conferir inmunidad protectora en mamíferos frente a una infección provocada por larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis (a continuación "péptidos de la invención"), en los que dichos péptidos comprenden una secuencia seleccionada del siguiente grupo:

a) la secuencia de cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 10,

b) una variante de (a) que es homóloga en al menos el 70% a una cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 10, más preferiblemente homóloga en al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99% a una cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 10 y que pueda generar una respuesta inmunitaria protectora en un mamífero frente a una infección por larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis, o

c) un fragmento de (a) o (b) o una mezcla de los mismos, de al menos 6 aminoácidos de longitud que puede generar una respuesta inmunitaria

protectora en un mamífero frente a una infección por larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis.

En un aspecto preferido de la presente invención el péptido se selecciona de una cualquiera de las siguientes secuencias:

- 5
- a) la secuencia de SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2,
  - b) una variante de (a) que es homóloga en al menos el 70% a una cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2, más preferiblemente homóloga en al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99
  - 10 % a una cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2 y, que puede generar una respuesta inmunitaria protectora en un mamífero frente a una infección por larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis, o
  - c) un fragmento de (a) o (b) o una mezcla de los mismos, de al menos 6 aminoácidos de longitud que puede generar una respuesta inmunitaria
  - 15 protectora en un mamífero frente a una infección por larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis.

En un aspecto más preferido de la presente invención el péptido de la invención se selecciona de una cualquiera de las siguientes secuencias:

- 20
- a) una secuencia que comprende SEQ ID NO 1 o una secuencia que consiste esencialmente en SEQ ID NO 1 o una secuencia que consiste en SEQ ID NO 1;
  - b) una variante de (a) que es homóloga en al menos el 70% a SEQ ID NO 1, más preferiblemente homóloga en al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el
  - 25 97%, el 98% o el 99% a SEQ ID NO 1 y que puede generar una respuesta inmunitaria protectora en un mamífero frente a una infección por larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis, o
  - c) un fragmento de (a) o (b) o una mezcla de los mismos, de al menos 6 aminoácidos de longitud que puede generar una respuesta inmunitaria
  - 30 protectora en un mamífero frente a una infección por larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis.

Los péptidos de la invención se identificaron tal y como se indica en el ejemplo 1, sometiendo un homogenizado de larvas L2 y L3 de *Dermatobia hominis* a SDS-PAGE

35 al 12% (por duplicado) e inmunotransferencia de tipo Western según la metodología convencional (Towbin *et al.*, 1979) usando los sueros de animales infectados de

manera natural a diferentes diluciones como anticuerpos primarios. Se digirieron las bandas con el potencial inmunogénico más alto, en comparación con los sueros positivos, con tripsina y entonces se analizaron con MALDI TOF EM/EM.

5 Los péptidos de la invención fueron finalmente identificados alineando las masas experimentales obtenidas por MALDI TOF EM/EM (huella de péptido) contra la digestión teórica de la base de datos completa usando el motor de búsqueda Mascot (www.matrixscience.com; Matrix Science Ltd., Londres, R.U.). Adicionalmente, los autores de la presente invención confirmaron, tal como se ilustra en el ejemplo 3, que  
10 estos péptidos, concretamente la SEQ ID NO 1, podían reducir significativamente las lesiones provocadas por *Dermatobia hominis* en animales infectados y por tanto, que estos péptidos pueden conferir inmunidad en mamíferos contra la enfermedad miasis provocada por larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis, particularmente la enfermedad provocada por larvas de insectos dípteros que  
15 pertenecen a la especie *Dermatobia hominis*. En este sentido, se hace referencia a la figura 1 en la que el número de larvas de insectos dípteros en los animales vacunados en comparación con el grupo control (animales infectados sin vacunar) se ha reducido significativamente.

20 En el contexto de la presente invención, se define enfermedad miasis como una enfermedad animal o humana provocada por larvas de insectos dípteros parásitos que se alimentan del tejido vivo o necrótico del huésped.

Los insectos dípteros (larvas de insectos dípteros) que pueden provocar miasis  
25 pertenecen a cualquiera de las siguientes familias: *Calliphoridae* (moscas azules), *Oestridae* (moscardón), *Sarcophagidae* (moscas de la carne) o *Gasterophilidae*. Se consideran que éstas son las cuatro familias principales capaces de provocar miasis en ganado y además, ocasionalmente, en seres humanos.

30 Tal como ya se mencionó anteriormente, la arginina cinasa es una enzima crucial para el metabolismo de los insectos y otros invertebrados y ciertamente compartida por todas las especies de las familias mencionadas anteriormente de insectos dípteros. Tal como se ilustra en las figuras 3 y 5, todos los péptidos de la invención, preferiblemente las secuencias SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 10, más preferiblemente la  
35 SEQ ID NO 1 ó 2, comparten un porcentaje de identidad significativo con determinados fragmentos de la secuencia de aminoácidos de arginina cinasa de *D.*

*melanogaster* con número de registro de Genbank AAN1983.1; obsérvese que esta secuencia (AAN1983.1) tiene un grado significativo de homología con cualquier otra secuencia de arginina cinasa relacionada. Este resultado establece claramente la utilidad de los péptidos de la invención para conferir inmunidad protectora en

5 mamíferos frente a la infección producida por cualquier larva de insecto díptero que puede provocar miasis, particularmente la miasis provocada por cualquier larva de insecto díptero que pertenece a una cualquiera de las familias mencionadas anteriormente.

10 En una realización particular de la invención, las larvas que pueden producir miasis pertenecen a la familia *Oestridae* y pertenecen a uno cualquiera del siguiente grupo de géneros: *Oestrus*, *Dermatobia*, *Hypoderma* o *Gasterophilus*; más preferiblemente a las especies *Oestrus ovis Linnaeus*, *Dermatobia hominis*, *Hypoderma spp* (rezno) o *Gasterophilus spp*. En una realización más preferida la presente invención se refiere a

15 larvas de la especie *Dermatobia hominis*.

En otra realización particular de la presente invención, las larvas que pueden producir miasis pertenecen a la familia *Calliphoridae*, preferiblemente al género *Cordylobia* o *Chrysomya*; más preferiblemente a las especies *Cordylobia anthropophaga* o

20 *Chrysomya bezziana*.

Un péptido para su uso en la presente invención consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 10 o una variante de la misma, o en un fragmento de cualquiera de estas

25 secuencias. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos expuesta es la SEQ ID NO 1 o una variante o fragmento de la misma.

En el contexto de la presente invención, se entiende como variante aquella secuencia aminoacidica con un grado de homología de al menos el 70% de una cualquiera de las

30 SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 10 capaz de producir inmunidad protectora frente a miasis, particularmente frente a miasis provocada por cualquiera de las larvas mencionadas anteriormente.

A lo largo de toda la longitud de una cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO 1 a

35 SEQ ID NO 10, una variante será preferiblemente homóloga en al menos el 70% a esa secuencia basándose en la identidad de aminoácidos. Más preferiblemente homóloga

en al menos el 85 o el 90% y más preferiblemente al menos el 95, el 97, el 98 o el 99% a una cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 10 con respecto a la región entera, basándose en la identidad de aminoácidos.

5 Los fragmentos de los péptidos de la invención incluyen preferiblemente cualquier región de 6 aminoácidos de longitud de una cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 10. Las variantes de estas regiones serán preferiblemente homólogas en al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80% o el 90% y más preferiblemente el 95% a estas regiones, basándose en la identidad de aminoácidos.

10

Los péptidos de la invención pueden modificarse por ejemplo mediante la adición de residuos de histidina para ayudar a su identificación o purificación o mediante la adición de una secuencia señal para promover su secreción a partir de una célula.

15 Un péptido de la invención puede marcarse con un marcador de revelado.

El marcador de revelado puede ser cualquier marcador adecuado que permite detectar el péptido. Los marcadores adecuados incluyen radioisótopos, enzimas, anticuerpos, polinucleótidos y ligadores tales como biotina.

20

Los péptidos marcados de la invención pueden usarse en ensayos inmunitarios mediados por células o serológicos para la detección de reactividad inmunitaria frente a dichos polipéptidos en animales y seres humanos usando protocolos convencionales. El péptido marcado puede usarse para identificar y/o aislar proteínas "auxiliares" que están implicadas en la unión de los péptidos de la invención.

25

Un péptido o péptido marcado de la invención o fragmento del mismo también puede fijarse a una fase sólida, por ejemplo la superficie de un tira reactiva o pocillo de inmunoensayo.

30

Tales péptidos inmovilizados y/o marcados pueden envasarse en kits en un recipiente adecuado incluyendo opcionalmente reactivos adecuados adicionales, controles o instrucciones y similares. Los kits pueden usarse para identificar componentes que interaccionan con los péptidos.

35

Los péptidos de la invención pueden prepararse por medios sintéticos o de manera recombinante tal como se describe a continuación.

5 Los péptidos de la invención pueden introducirse en una célula mediante expresión *in situ* del péptido a partir de un vector de expresión recombinante. El vector de expresión lleva opcionalmente un promotor inducible para controlar la expresión del péptido.

10 Tales sistemas de cultivo celular en los que se expresan los péptidos de la invención pueden usarse en sistemas de ensayo.

15 En un segundo aspecto de la presente invención, los anticuerpos o fragmentos de los mismos que pueden unirse a cualquiera de los péptidos de la invención también pueden usarse para conferir inmunidad protectora en un mamífero frente a la miasis provocada por un insecto díptero. Estos anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden obtenerse fácilmente a partir de antisueros.

20 Los antisueros frente a los péptidos de la invención pueden generarse mediante técnicas convencionales, por ejemplo, mediante inyección de cualquiera de los péptidos de la invención en un animal apropiado y recogida y purificación de antisueros de animales. Los anticuerpos que se unen a una cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 10 o una variante o fragmento de las mismas según la invención pueden identificarse mediante inmunoensayos convencionales. Los anticuerpos así obtenidos pueden usarse para aislar o purificar péptidos para la  
25 incorporación en las composiciones farmacéuticas de la invención.

A continuación, estos anticuerpos o fragmentos de los mismos se denominarán anticuerpos de la invención.

30 Polinucleótidos

Un polinucleótido de la invención puede hibridarse selectivamente con la secuencia codificante (a continuación "secuencia codificante de la invención") de una cualquiera de las secuencias peptídicas de la invención o con la secuencia complementaria a la secuencia codificante. Polinucleótidos de la invención incluyen variantes de la  
35 secuencia codificante de la invención que codifican para los péptidos de la invención debido a la degeneración del código genético y variantes que son la secuencia codificante de la invención o su complemento a lo largo de una región de al menos 20

o más nucleótidos contiguos tal como a lo largo de toda la longitud de la secuencia codificante o su complemento.

5 También pueden ser polinucleótidos de la invención aquellos que incluyen dentro de ellos nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conocen varios tipos diferentes de modificaciones (de polinucleótidos). Estos incluyen estructuras principales de fosforotioato y fosfato de metilo, adición de cadenas de acridina o polilisina a los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines de la presente invención, ha de entenderse que los polinucleótidos descritos en el presente  
10 documento pueden modificarse mediante cualquier método disponible en la técnica.

Los polinucleótidos de la invención pueden usarse para producir un cebador, por ejemplo un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda por ejemplo marcada con un marcador de revelado por medios  
15 convencionales usando marcadores radioactivos o no radioactivos, o pueden clonarse los polinucleótidos en vectores. Tales cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán al menos 15, preferiblemente al menos 20, por ejemplo al menos 25 ó 30 nucleótidos de longitud y también se abarcan por el término polinucleótidos de la invención tal como se usa en el presente documento.

20 Los polinucleótidos tales como un polinucleótido de ADN y cebadores según la invención pueden producirse de manera recombinante, sintética o por cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También pueden clonarse mediante técnicas convencionales. Normalmente se proporcionan los polinucleótidos en forma  
25 aislada y/o purificada.

En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos que implican una fabricación por etapas de la secuencia de ácido nucleico deseada de un nucleótido en un nucleótido.

30 Las técnicas para lograr esto, usando técnicas automáticas están fácilmente disponibles en la técnica.

Los polinucleótidos o cebadores de la invención pueden portar un marcador de  
35 revelado.

Los marcadores adecuados incluyen radioisótopos, marcadores enzimáticos u otros marcadores proteicos tales como biotina. Tales marcadores pueden añadirse a polinucleótidos o cebadores de la invención y pueden detectarse usando técnicas conocidas en sí mismas.

5

Los polinucleótidos de la invención pueden incorporarse en un vector. Puede usarse el vector para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible. Por tanto, en una realización adicional de la invención se proporciona un método de preparación de polinucleótidos introduciendo un polinucleótido de la invención en un vector que puede replicarse, introduciendo el vector en una célula huésped compatible y haciendo crecer la célula huésped en condiciones en las que provocan replicación del vector. El vector puede recuperarse a partir de la célula huésped.

10

15

Preferiblemente, un polinucleótido de la invención en un vector está operativamente unido a una secuencia control que puede proporcionar la expresión de la secuencia codificante mediante la célula huésped.

20

El término “operativamente unido” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que permite que funcionen de su manera pretendida.

25

Una secuencia control “operativamente unida” a una secuencia codificante está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias control.

30

Tales vectores pueden transformarse en una célula huésped adecuada para proporcionar la expresión de un polipéptido o fragmento de polipéptido de la invención.

Por tanto, un aspecto adicional de la invención proporciona un procedimiento para preparar un péptido o fragmento de péptido según la invención, procedimiento que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión tal como se describió anteriormente en condiciones para proporcionar la expresión del polipéptido o fragmento y recuperar el péptido o fragmento expresado.

35

Los vectores pueden ser, por ejemplo, vectores de plásmido, virus o fago dotados de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de dicho

polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, por ejemplo un gen de resistencia a ampicilina en el caso de un plásmido bacteriano.

- 5 Una realización adicional de la invención proporciona células huésped transformadas o transfectadas con los polinucleótidos o vectores para la replicación y expresión de polinucleótidos de la invención. Las células se elegirán para ser compatibles con dicho vector y serán preferiblemente bacterianas. Las células huésped también pueden ser células de un animal no humano o una planta transformada con un polinucleótido de la  
10 invención.

Los promotores y otras señales de regulación de expresión pueden seleccionarse para ser compatibles con la célula huésped para la cual se diseña el vector de expresión.

15 Formulación de vacuna y otras formulaciones médicas

- La presente invención también se refiere a una composición veterinaria o farmacéutica (composición farmacéutica de la invención) que comprende cualquiera de los péptidos, polinucleótidos o anticuerpos de la invención. En particular, la presente invención se refiere a la composición farmacéutica de la invención para su uso en terapia. Más  
20 particularmente, se refiere a la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad miasis provocada por larvas de insectos dípteros en mamíferos, preferentemente por moscas, preferiblemente en un ser humano, más preferiblemente en un mamífero que pertenece a la subfamilia biológica bovina, caprina, ovina o equina. Más particularmente, contra la miasis  
25 provocada por larvas de insectos dípteros que pertenecen a la especie *Dermatobia hominis*.

- En una realización particular de la presente invención, la composición farmacéutica de la invención comprende un péptido, un anticuerpo o fragmento del mismo que puede  
30 unirse a dicho péptido o una secuencia que codifica para dicho péptido, en el que la secuencia peptídica se selecciona de uno cualquiera del siguiente grupo:

- a) la secuencia de SEQ ID NO 1,  
b) una variante de (a) que es homóloga en al menos el 70% a SEQ ID NO 1, más preferiblemente homóloga en al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el  
35 97%, el 98% o el 99% a SEQ ID NO 1 y que puede generar una respuesta inmunitaria protectora en un mamífero frente a una infección por larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis, o

c) un fragmento de (a) o (b) o una mezcla de los mismos, de al menos 6 aminoácidos de longitud que puede generar una respuesta inmunitaria protectora en un mamífero frente a una infección por larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis.

5

En un aspecto aún más particular de la invención, la composición farmacéutica de la invención comprende un péptido, un anticuerpo o fragmento del mismo que puede unirse a dicho péptido o una secuencia que codifica para dicho péptido, en la que la secuencia peptídica comprende la SEQ ID NO 1 o una secuencia que consiste esencialmente en SEQ ID NO 1 o una secuencia que consiste en SEQ ID NO 1. Obsérvese que SEQ ID NO 1 pudo reducir significativamente el número de larvas dípteras en los animales vacunados en comparación con el grupo control tal como se muestra en la figura 1. Por tanto, este péptido es un excelente candidato para una composición veterinaria o farmacéutica, concretamente para una composición de vacuna.

10

15

20

Estas composiciones farmacéuticas de la invención adoptan la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen del 10% al 95% de principio activo, preferiblemente del 25% al 70%.

25

Adicionalmente, los péptidos, anticuerpos o polinucleótidos de la invención pueden formularse como vacunas (a continuación composición de vacuna de la invención). La composición de vacuna de la invención puede usarse en terapia, particularmente para el tratamiento o la prevención de la enfermedad miasis producida por larvas de insectos dípteros.

30

35

Por tanto, un aspecto particular de la presente invención se refiere a una composición de vacuna que comprende cualquiera de los péptidos, anticuerpos o polinucleótidos de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención en un mamífero, preferiblemente un ser humano, más preferiblemente un mamífero que pertenece a la subfamilia biológica bovina, caprina, ovina o equina, contra la infección de larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis; más particularmente, contra la enfermedad miasis provocada por larvas que pertenecen a la especie *Dermatobia hominis*.

En otro aspecto particular de la invención, la composición de vacuna de la invención comprende un péptido, un anticuerpo o fragmento del mismo que puede unirse a dicho péptido o una secuencia que codifica para dicho péptido, en la que la secuencia peptídica se selecciona de uno cualquiera del siguiente grupo:

- 5 a) la secuencia de SEQ ID NO 1,  
b) una variante de (a) que es homóloga en al menos el 70% a SEQ ID NO 1, más preferiblemente homóloga en al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99% a SEQ ID NO 1 y que puede generar una respuesta inmunitaria protectora en un mamífero frente a una infección por larvas de  
10 insectos dípteros capaces de provocar miasis, o  
c) un fragmento de (a) o (b) o una mezcla de los mismos, de al menos 6 aminoácidos de longitud que puede generar una respuesta inmunitaria protectora en un mamífero frente a una infección por larvas de insectos  
15 dípteros capaces de provocar miasis.

En un aspecto aún más particular de la invención, la composición de vacuna comprende un péptido, un anticuerpo o fragmento del mismo que puede unirse a dicho péptido o una secuencia que codifica para dicho péptido, en la que la secuencia peptídica es SEQ ID NO 1.

20 Normalmente, se preparan las vacunas como producto inyectable, o bien como disoluciones líquidas o bien suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su disolución o suspensión en líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o la proteína encapsularse en liposomas o  
25 en otros vehículos tales como ISCOM adecuados para la inmunización. El principio inmunogénico activo puede mezclarse con un excipiente que es farmacéuticamente aceptable y compatible con el principio activo. Los excipientes adecuados son por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades  
30 minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento de pH y/o adyuvantes que potencian la eficacia de la vacuna. Ejemplos de adyuvantes que pueden ser eficaces son montanida, adyuvante de Freund de alúmina, quitoseno, quitina, LPS, muramil dipéptido, liposomas o ISCOM. Otros adyuvantes alternativos a los mencionados  
35 anteriormente resultarán evidentes para el experto en la técnica.

Las vacunas se administran de manera convencional por vía parental mediante inyección, por ejemplo, por vía o bien subcutánea o bien intramuscular. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y en algunos casos formulaciones orales.

5

Cuando se liofiliza la composición de vacuna de la invención o la composición farmacéutica de la invención, puede reconstituirse el material liofilizado antes de la administración, por ejemplo como una suspensión. La reconstitución se realiza preferiblemente en tampón.

10

Los péptidos de la invención pueden formularse en la vacuna o composición de la invención como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con grupos amino libres del péptido) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico y maleico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, de potasio, de amonio, de calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina y procaína.

20

#### **Administración de vacuna y otras composiciones farmacéuticas**

Las vacunas y las composiciones farmacéuticas de la invención se administran de manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que será profilácticamente eficaz. La cantidad de antígeno por dosis que va a administrarse que está generalmente en el intervalo de 10 ug a 1 mg por kg de peso, particularmente para la composición de vacuna de la invención, depende del sujeto que va a tratarse, la capacidad del sistema inmunitario del sujeto para sintetizar anticuerpos, y el grado de protección deseado. Las cantidades precisas de principio activo que se requiere administrar pueden depender del criterio del médico y pueden ser diferentes para cada sujeto.

30

Las vacunas y las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse en un programa de dosis única, o preferiblemente en un programa de múltiples dosis. Un programa de múltiples dosis es uno en el que un ciclo principal de vacunación puede ser con 1-10 dosis separadas, seguido por otras dosis administradas a

35

intervalos de tiempo posteriores requeridos para mantener y/o reforzar la respuesta inmunitaria, por ejemplo a de 1 a 4 meses para una segunda dosis y si es necesario una(s) dosis posterior(es) tras varios meses. El régimen de dosificación también se determinará, al menos, en parte mediante la necesidad del individuo y dependerá del  
5 criterio del médico.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

## 10 **Ejemplos**

### **Ejemplo 1: Reconocimiento serológico de antígenos de *Dermatobia Hominis* usando inmunotransferencia.**

15 Se sometió un homogenizado de larvas L2 y L3 de *Dermatobia hominis* a SDS-PAGE al 12% (por duplicado) e inmunotransferencia de tipo Western según metodología convencional (Towbin *et al.*, 1979) usando los sueros de animales infectados de manera natural a diferentes diluciones como anticuerpos primarios. Se usaron sueros de animales no infectados como control negativo. Se usó el anticuerpo anti-vaca  
20 secundario marcado con peroxidasa a una dilución indicada por la empresa; se llevó a cabo el revelado con tetraclorhidrato de 3'3'-diaminobencidina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se tiñó el segundo gel con azul de Coomassie y se seleccionaron las bandas con el potencial inmunogénico más alto en comparación con los sueros positivos para identificar las proteínas de interés.

25

Se sometieron las rodajas de gel que contenían las proteínas de interés a digestión con tripsina y entonces se analizaron mediante EM/EM. Se identificaron las proteínas alineando las masas experimentales obtenidas mediante MALDI (huella de péptido) contra la digestión teórica de la base de datos entera usando el motor de búsqueda  
30 Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com); Matrix Science Ltd., Londres, R.U.).

### **Ejemplo 2: Selección de las secuencias peptídicas SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2**

Se identificaron los epítomos de antígeno con la herramienta EMBOSS ANTIGENIC (<http://liv.bmc.uu.se/cgi-bin/emboss/antigenic>). Una vez que se identificaron las  
35 secuencias peptídicas (de seq 1 a seq 10), se alinearon con creatinina cinasa AAD30974.1 mediante *Bos taurus* para descartar posibles homologías.

**Alineación de Seq. 1**

Puntuación = 26,5 bits (55), Esperado = 7e-06  
 Identidades = 10/14 (71%), Positivos = 11/14 (79%), Huecos = 2/14 (14%)

5 Consulta 1 LGF-LTFCPTNLGT 13  
 LG+ LT CP NLGT  
 Objeto 277 LGYVLT-CPSNLGT 289

**Alineación de Seq.2**

10 Puntuación = 16,8 bits (32), Esperado = 0,025  
 Identidades = 5/7 (71%), Positivos = 5/7 (71%), Huecos = 0/7 (0%)

Consulta 10 SHDDRLG 16  
 S DRLG  
 15 Objeto 337 SNADRLG 343

Puntuación = 11,7 bits (20), Esperado = 1,4  
 Identidades = 4/9 (44%), Positivos = 6/9 (67%), Huecos = 0/9 (0%)

20 Consulta 8 PFSHDDRLG 16  
 PF ++ LG  
 Objeto 270 PFMWNEHLG 278

25

Se sintetizaron péptidos sintéticos usando química en fase sólida de Fmoc para usarlos en ensayos de transferencia puntual e inmunizaciones experimentales, en los que demostraron ser antigénicos e inmunogénicos.

30 **Ejemplo 3: La secuencia peptídica SEQ ID NO 1 protege contra infección por miasis provocada por *Dermatobia Hominis*.**

Se inmunizó un grupo de seis terneros con dos inyecciones (1 mg/kg en peso) separadas a lo largo de 20 días con la SEQ ID NO 1 peptídica en 0,5 ml de montanida.  
 35 Se disolvieron los péptidos en una disolución de PBS y se formularon con la emulsión agua en aceite de montanida ISA 720 agitando con vórtex (Miles *et al.*, 2005). Se recogieron sueros semanalmente y se evaluaron para determinar los títulos de subclases de IgG y de IgG total. Se inoculó la misma cantidad de adyuvante en un grupo control de ternero. Se mantuvieron todos los animales en su entorno natural,  
 40 extrayendo sangre cada mes para evaluar el título de inmunoglobulina anti-péptido inoculado. Se evaluó la protección seis meses tras el inicio de la inmunización, contándose el número de lesiones provocadas por *Dermatobia* en la piel de los animales. En la figura 1 se muestra la reducción en el número de larvas en los animales vacunados en comparación con el grupo control.

45

Se inmunizó un grupo de conejos en paralelo de la misma manera (dosis, régimen y vía de administración) que los terneros, evaluándose el título de anticuerpo cada quince días frente un antígeno total de larvas de *Dermatobia*. Los resultados se muestran en la figura 2.

5

Los resultados indicados anteriormente demuestran que las composiciones farmacéuticas de la invención, particularmente las vacunas, pueden usarse para proteger mamíferos contra infección de insectos dípteros que provocan miasis.

10

Un experto en la técnica aprecia fácilmente que la presente invención se adapta bien para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como aquellos inherentes al mismo. Los ejemplos proporcionados en el presente documento son representativos de realizaciones preferidas, son a modo de ejemplo, y no pretenden ser limitativos del alcance de la invención.

15

**Reivindicaciones**

1. Péptido que comprende:
  - a) la secuencia SEQ ID NO 1; o
  - b) una variante de la secuencia de a) que sea homóloga en al menos el 70% a la SEQ ID NO 1, basándose en la identidad de la totalidad de los aminoácidos de dicha secuencia, y que puede generar una respuesta inmunitaria protectora frente a una infección por larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis.
2. Péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido comprende la SEQ ID NO 1.
3. Péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido consiste esencialmente en la SEQ ID NO 1.
4. Polinucleótido que comprende una secuencia seleccionada de cualquiera de las siguientes:
  - a) la secuencia SEQ ID NO 11 o su secuencia complementaria; o
  - b) una secuencia que hibrida selectivamente con la secuencia codificante de una cualquiera de las secuencias peptídicas de la reivindicación 1 apartado b).
5. Vector de expresión que comprende un polinucleótido según la reivindicación 4, operativamente unido a una secuencia reguladora.
6. Célula huésped transformada con un polinucleótido de la reivindicación 4.
7. Procedimiento de producción del péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende mantener una célula huésped transformada con un polinucleótido que codifique para un péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en condiciones para proporcionar la expresión del péptido.
8. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se una específicamente al péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
9. Composición veterinaria o farmacéutica que comprende el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y/o un anticuerpo o un fragmento del mismo tal y como se define en la reivindicación 8.
10. Composición veterinaria o farmacéutica según la reivindicación 9, para su uso en terapia.
11. Uso de la composición veterinaria o farmacéutica de la reivindicación 9, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención en un mamífero de una infección por larvas de insectos dípteros capaces de provocar miasis.
12. Uso de la composición veterinaria o farmacéutica según la reivindicación 11, donde las larvas de insectos dípteros pertenecen a una cualquiera de las siguientes familias: *Calliphoridae* (moscas azules), *Oestridae* (tábanos) o *Sarcophagidae* (moscas de la carne).
13. Uso de la composición veterinaria o farmacéutica según la reivindicación 12, donde las larvas de insectos dípteros pertenecen a la familia *Oestridae*.

14. Uso de la composición veterinaria o farmacéutica según la reivindicación 13, donde las larvas de insectos dípteros pertenecen a uno cualquiera de los siguientes géneros: *Oestrus*, *Dermatobia*, *Hypoderma* o *Gasterophilinae*.
- 5 15. Uso de la composición veterinaria o farmacéutica según la reivindicación 14, donde las larvas de insectos dípteros pertenecen a la especie *Dermatobia hominis*.
16. Composición veterinaria o farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 17. Composición veterinaria o farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en la que dicha composición veterinaria o farmacéutica es una vacuna.
- 15 18. Composición veterinaria o farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en la que el mamífero es un ser humano.
19. Composición veterinaria o farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en la que el mamífero pertenece a la subfamilia biológica bovina.
- 20

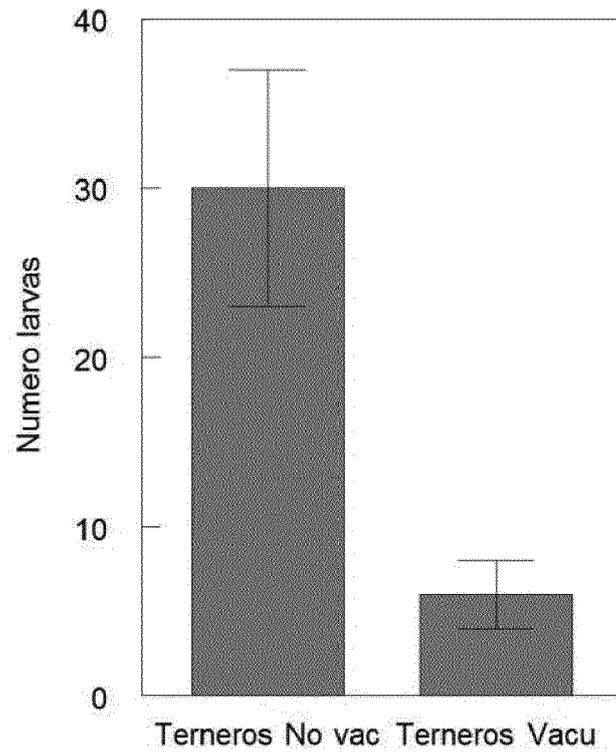


Figura 1

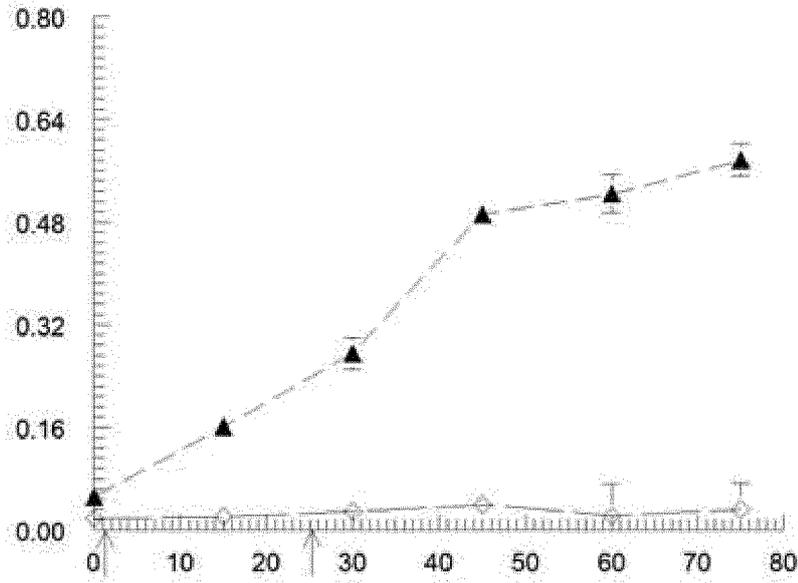
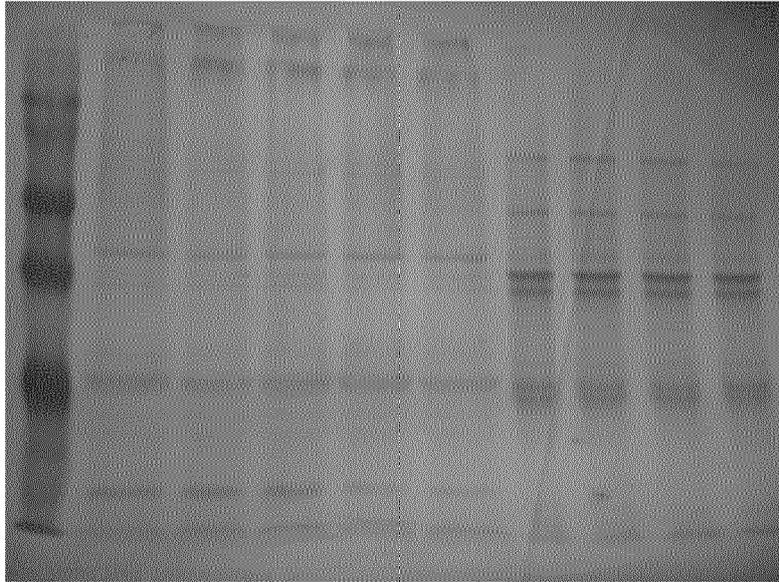


Figura 2





**Figura 4**



# ES 2 441 880 A1

## Listado De Secuencias

<110> Universidad de Granada  
<120> COMPOSICIÓN BASADA EN POLIPÉPTIDOS PARA EL TRATAMIENTO DE MIASIS  
<130> 153930  
<160> 12  
<170> PatentIn version 3.4

<210> 1  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Fragmento antigenico

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(13)  
<223> Fragmento antigenico

<400> 1

Leu Gly Phe Leu Thr Phe Cys Pro Thr Asn Leu Gly Thr  
1 5 10

<210> 2  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(16)  
<223> Fragmento antigenico

<400> 2

Asn Glu Ile Glu Lys Arg Val Pro Phe Ser His Asp Asp Arg Leu Gly  
1 5 10 15

<210> 3  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Fragmento antigenico

<400> 3

His Pro Ala Lys Asn Trp Gly Asp Val Ser Val Phe Gly Asn Leu Asp  
1 5 10 15

Pro Asn Gly Glu Phe Val Val Ser Thr Arg  
20 25

<210> 4

ES 2 441 880 A1

<211> 24  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Fragmento antigenico

<400> 4

Asn Trp Gly Asp Val Ser Val Phe Gly Asn Leu Asp Pro Asn Gly Glu  
1 5 10 15

Phe Val Val Ser Thr Arg Val Arg  
20

<210> 5  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Fragmento antigenico

<400> 5

Ser Leu Glu Gly Tyr Pro Phe Asn Pro Cys Leu Thr Glu Ala Gln Tyr  
1 5 10 15

Lys Glu Met Glu Gln Lys  
20

<210> 6  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Fragmento antigenico

<400> 6

Gly Thr Phe Tyr Pro Leu Thr Gly Met Ser Lys Asp Val Gln Gln Lys  
1 5 10 15

<210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Fragmento antigenico

<400> 7

Phe Leu Gln Ala Ala Asn Ala Cys Arg  
1 5

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

ES 2 441 880 A1

<220>

<223> Fragmento

<400> 8

Gly Ile Tyr His Asn Glu Asn Lys  
1 5

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento antigenico

<400> 9

Thr Phe Leu Val Trp Cys Asn Glu Glu Asp His Leu Arg  
1 5 10

<210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento antigenico

<400> 10

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

Pro Thr Asn Leu Gly Thr Thr Leu Arg  
20 25

<210> 11

<211> 39

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotidica codificante de la SEQ ID No 1

<400> 11

ctgggcttcc tgaccttctg cccaccaac ctgggcacc

39

<210> 12

<211> 48

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotidica codificante de la SEQ ID No 2

<400> 12

aacgagatcg agaagagagt gcccttcagc cagcagaca gactgggc

48