



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 325 243**

② Número de solicitud: 200800565

⑤ Int. Cl.:

**C07K 14/435** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **27.02.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **28.08.2009**

Fecha de la concesión: **19.04.2011**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:  
**08.06.2010**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **04.05.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**04.05.2011**

⑦ Titular/es: **Universidad de Granada  
Cuesta del Hospicio, s/n  
18071 Granada, ES**

⑦ Inventor/es: **Solano Parada, Jennifer;  
Burgos Poyatos, Miguel;  
Brazil dos Santos, Fátima y  
Osuna Carrillo de Albornoz, Antonio**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Antígeno recombinante.**

⑤ Resumen:

Antígeno recombinante.

Péptido recombinante de la subunidad catalítica de la proteína serina/treonina fosfatasa de *Angiostrongylus costaricensis* y péptidos activos empleados en la elaboración de una vacuna antihelmíntica intranasal.

ES 2 325 243 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Antígeno recombinante.

5 La presente invención se refiere a los ácidos nucleicos que codifican la subunidad catalítica de la proteína serina/treonina fosfatasa de *Angiostrongylus costaricensis*, la proteína, péptidos sintéticos, y los anticuerpos generados contra esta proteína y estos péptidos. La presente invención también se refiere a una composición que se usa como inmunógeno, generando respuesta inmune protectora frente a la infección de parásitos nemátodos.

10 **Estado de la técnica anterior**

El filum *Nematoda* engloba a muchos parásitos de importancia médica y veterinaria como: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichura*, *Enterobius vermicularis*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale* y *Strongyloides stercoralis*, y las filarias *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Loa-loa*, *Onchocerca volvulus*, *Mansonella* entre otros los cuales constituyen un verdadero problema de salud pública ampliamente diseminado en el mundo. Numerosas especies causan grandes pérdidas económicas en ganadería, como por ejemplo: *Teladorsagia circumcincta*, *T. trifurcata*, *Trichostrongylus vitrinus*, *T. capricola*, *Nematodirus filicollis*, *Strongyloides ramsoni*, *Oesophagostomum spp*, *Ascaris suum*, entre otros.

20 La mayoría de nematelmintos parásitos tienen en común en su ciclo biológico su paso por la pared intestinal hacia diferentes órganos o su fijación a nivel de la mucosa intestinal, originando pérdida de peso, diarreas y algunos casos hemorragias. Aunque la mortalidad es relativamente baja, la morbilidad es muy elevada.

Los antihelmínticos usados actualmente son compuestos químicos con baja eficacia, debido a la aparición cada vez mayor de nemátodos resistentes. Esta resistencia a los antihelmínticos crea la necesidad de desarrollar antiparasitarios más eficaces y específicos. Las vacunas han sido consideradas como la mejor alternativa para los antihelmínticos para el control de nemátodos gastrointestinales. De cualquier modo, a pesar de que existen varios antígenos que proveen diferentes grados de protección no hay vacunas contra nemátodos parásitos.

30 Los estudios actuales van encaminados a la búsqueda de proteínas con características inmunoprotectoras como posibles candidatas a ser usadas en vacunas.

Numerosos han sido los trabajos publicados donde se describen desde fracciones totales, antígenos excretados, antígenos purificados y o recombinantes así como diferentes adyuvantes o las formas de evaluación de la protección (Bethony *et al.*, Vaccines against blood-feeding nematodes of humans and livestock. *Parasitology*. 2006: 133 S63-79; Miller & Horoho, Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *J Anim Sci*. 2006. Apr: 84 Suppl: E124-32).

40 Uno de los primeros estudios sobre inmunoprotección con péptidos sintéticos fue realizado por Robinson *et al.*, (High levels of protection induced by a 40-mer synthetic peptide vaccine against the intestinal nematode parasite *Trichinella spiralis*. *Immunology*. 1995. Dec; 86(4):495-8), donde describen el empleo de un péptido de 40 aminoácidos (100 µg), vía subcutánea en combinación con el coadyuvante de Freund.

El coadyuvante usado, la vía de inoculación y la concentración de la proteína son factores importantes a tener en cuenta en el desarrollo de vacunas. Entre los coadyuvantes más utilizados en estos ensayos está el coadyuvante de Freund, QuilA, hidróxido de aluminio, hidróxido de berilio etc. Algunos de los cuales o han demostrado ineficacia o actualmente no se recomienda su empleo.

Hasta el momento los niveles de protección encontrados son en general bajos, por ejemplo en estudios realizados con *Haemonchus contortus*: Yanming *et al.*, (Vaccination of goats with recombinant galectin antigen induces partial protection against *Haemonchus contortus* infection. *Parasite Immunol*. 2007. Jun; 29(6):319-26) han empleado las proteínas rHco-gal-m and rHco-gal-f con coadyuvante de Freund en cabras, encontrando una reducción del 37% de la eliminación de huevos en heces, mientras que Reszka *et al.* 2007 utilizaron una aminopeptidase H11 recombinante (300 µg) vía intramuscular en ovejas obtienen una reducción del 30% de la carga parasitaria. En estudios anteriores, Redmond y Knox (Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. 2004. *Vaccine* 22:4252-4261) obtuvieron una reducción del 38% de la carga parasitaria en ovejas usando una cisteína proteinasa. Aunque para otros nemátodos se obtuvo una protección en ratas del 75% contra *Brugia malayi* empleando la proteína recombinante Bm-ALT-2 (Thirugnanam *et al.*, *Brugia malayi*: comparison of protective immune responses induced by Bm-alt-2 DNA, recombinant Bm-ALT-2 protein and prime-boost vaccine regimens in a jird model. *Exp Parasitol*. 2007. Aug; 116(4):483-91. Epub 2007 Mar 6) y una protección del 70% usando una pirofosfatasa inorgánica frente *Ascaris suum* en BALB/c (Islam, Pyrophosphatase of the roundworm *Ascaris suum* plays an essential role in the worm's molting and development. *Infect Immun*. 2005. Apr; 73(4):1995-2004). Frente a *Ancylostoma caninum* han sido probadas varias proteínas como candidatas a vacunas, Fujiwara y col, (Protection against hookworm infection elicited by vaccination with recombinant Ac-16 is mediated by reduction of worm fecundity and canine host blood loss. *Clin Vaccine Immunol*. 2007. Mar; 14(3):281-287) obtuvieron una reducción del 63% de los huevos encontrados en heces de perros inmunizados con la proteína Ac-16, Zhan *et al.*, (Biochemical characterization and vaccine potential of a heme-binding glutathione transferase from the adult hookworm *Ancylostoma caninum*. *Infect Immun*. 2005 Oct; 73(10):6903-11) emplearon una glutathion S-transferasa en perros obteniendo una

reducción del 39.4% e inmunizando con una metaloproteína recombinante Hotez *et al.* (Effect of vaccination with a recombinant fusion protein encoding an astacinlike metalloprotease (MTP-1) secreted by host-stimulated *Ancylostoma caninum* third-stage infective larvae. *J Parasitol.* 2003 Aug;89(4):853-5) obtuvieron una reducción del 32.3% de huevos en heces.

5

El mayor conocimiento en la relación parasito-hospedador ha permitido la identificación de antígenos considerados vitales para la supervivencia del nematodo como es el caso de las proteínas de excreción/secreción, Vercauteren *et al.* (Vaccination with an *Ostertagia ostertagi* polyprotein allergen protects calves against homologous challenge infection. *Infect Immun.* 2004 May; 72(5):2995-3001) utilizaron la *Ostertagia polyprotein* allergen (OPA) en su forma nativa y recombinante frente a *Ostertagia ostertagi* encontrando una reducción del 60% de huevos en heces en ganado vacuno en el grupo inoculado con la proteína nativa. Bungiro *et al.* (Purification and molecular cloning of and immunization with *Ancylostoma ceylanicum* excretory-secretory protein 2, an immunoreactive protein produced by adult hookworms. *Infect Immun.* 2004 Apr;72(4):2203-13) también emplearon una proteína de excreción/secreción, la AceES-2 frente a *Ancylostoma ceylanicum* en hámster obteniendo una reducción de la anemia al suministrar vía oral dicha proteína nativa.

10

15

Tsuji *et al.* (Recombinant Ascaris 16-Kilodalton protein-induced protection against *Ascaris suum* larval migration after intranasal vaccination in pigs. *J Infect Dis.* 2004 Nov 15;190(10):1812-20. Epub 2004 Sep 30), alcanzaron una protección del 58% al inocular cerdos por vía intranasal con la proteína recombinante As16 combinada con la toxina colérica.

20

Además de proteínas, también se han empleado genes como inmunomoduladores, Wang *et al.* (Vaccination of mice with DNA vaccine induces the immune response and partial protection against *T. spiralis* infection. *Vaccine.* 2006 Feb 20;24(8):1205-12. Epub 2005 Sep 19) obtuvieron una reducción significativa de larvas de *Trichinella spiralis* en músculo al inocular ratas con el gen TspE1, también se ha realizado este tipo de estudios frente a *Onchocerca vulvulus* usando el gen ALT-2 (Ramachandran *et al.* The larval specific lymphatic filarial ALT-2: induction of protection using protein or DNA vaccination. *Microbiol Immunol.* 2004;48(12):945-55) y frente a *Strongyloides stercoralis* usando el gen Sseat-6 que corresponde a una ATPasa, con el cual se obtuvo una alta protección (Kerepesi *et al.*, DNA immunization with Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase (Sseat-6) induces protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infect Immun.* 2005 Apr;73(4):2298-305).

25

30

La vacuna más eficaz hasta la fecha es una proteína de membrana de 110 KDa con actividad aminopeptidasa A y M fue llamada H11 (Graham *et al.*, Recombinant DNA molecules encoding aminopeptidase enzymes and their use in the preparation of vaccines against helminth infections. Patent Application No. WO93/23542.).

35

Aunque son muchos los modelos de vacunas ensayados, solo hay dos vacunas comerciales contra nematodos parásitos pulmonares Bovilis<sup>®</sup> Huskvac (Intervet) y Dictol (Schering Plough Animal Health). Si bien existen algunas más frente a protozoos parásitos de interés veterinario como por ejemplo: contra la coccidiosis en aves Paracox (Schering Plough Animal Health), Coccivax (Schering Plough Animal Health), Livacox (Biopharm, Czech Republic) y Immucox (Vetech); contra la toxoplasmosis en ovejas Toxovax (Intervet); contra la Giardiosis en perros Giardia (Vax Fort Dodge), contra anaplasmosis en ganado vacuno (Anaplaz Fort Dodge).

40

Sin embargo, dada la baja eficacia de las vacunas fabricadas empleando otras proteínas como componente inmunogénico, y la necesidad de hallar vacunas eficaces contra nematodos pulmonares, se hace inevitable encontrar otras proteínas y formulaciones eficaces contra dichos parásitos.

45

### Explicación de la invención

Los autores de la presente invención han descrito una proteína que permite la elaboración de una composición inmunogénica para fabricar una vacuna con una actividad inmunoprotectora que logra una protección de un 80-100% de actividad, dependiendo de la forma y modo de inmunización.

50

Así, empleando la subunidad catalítica de la proteína serina/treonina fosfatasa de *Angiostrongylus costaricensis*, produciendo la proteína de forma recombinante y, de forma sintética, un péptido capaz de actuar como inmunógeno, consiguiendo niveles de protección muy superiores a los encontrados hasta ahora.

55

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido que se selecciona de una lista que consiste en:

- a. péptido que consiste esencialmente en la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO:1
- b. fragmento de la secuencia aminoacídica SEQ ID NO:1 que consiste esencialmente en la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 ó SEQ ID NO:5
- c. péptido cuya secuencia aminoacídica presenta una identidad de, al menos, un 80% con la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 ó SEQ ID NO:5

60

65

para su uso como medicamento.

## ES 2 325 243 B1

Se entiende por “péptido que consiste esencialmente en”, tal y como se usa en esta memoria, un péptido aislado y/o recombinante que comprende una porción, o la totalidad, de una secuencia de aminoácidos determinada, y cuya función principal es la generación de inmunidad. Así, puede ser un polipéptido de fusión, que despliega la inmunogenicidad de toda o de una parte de la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa de serina/treonina de *Angiostrongylus costaricensis* y un polipéptido adicional.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias aminoacídicas que se comparan.

Cuando comparamos la secuencia de la subunidad catalítica de la proteína serina/treonina fosfatasa de *Angiostrongylus costaricensis* con la secuencia de la misma proteína en otras especies de nemátodos (Fig. 2), es evidente que existen ciertas regiones en que están más conservadas que otras. Esta información puede ser indicativa de que esas zonas son cruciales para mantener la estructura o función de la proteína. Tanto las regiones activas que determina la especificidad de las serina-proteasas como las cisteínas conservadas entre las que se establecen puentes disulfuro, importantes para la conformación de la proteína estarán perfectamente conservadas entre ambas proteínas, mientras que en otras regiones la divergencia es más aparente.

El término “homología”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente, a la semejanza entre los aminoácidos de dos o más proteínas o secuencias aminoacídicas.

Puesto que dos proteínas se consideran homólogas si tienen el mismo origen evolutivo o si tienen función y estructura similares, en general, se asume que valores superiores de similitud o identidad del 30% indican estructuras homólogas. Podemos considerar, por tanto, que porcentajes de identidad de, al menos, un 80%, incluirán las regiones activas conservadas entre los nemátodos y capaces de generar inmunidad.

En una realización más preferida de este aspecto de la invención, la secuencia aminoacídica del péptido presentará una identidad de, al menos, un 90% con la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 ó SEQ ID NO:5. En otra realización más preferida de este aspecto de la invención, la secuencia aminoacídica del péptido presentará una identidad de, al menos, un 95% con la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 ó SEQ ID NO:5. En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, la secuencia aminoacídica del péptido presentará una identidad de, al menos, un 98% con la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:4 ó SEQ ID NO:5.

En el contexto de la presente invención, la subunidad catalítica de la proteína serina/treonina fosfatasa de *Angiostrongylus costaricensis* se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO:1(Número de Acceso en GenBank AM041130),
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, o un 95%, con la SEQ ID NO:1

en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad inmunogénica de la subunidad catalítica de la proteína serina/treonina fosfatasa de *Angiostrongylus costaricensis*.

El diseño de péptidos sintéticos es conocido en el estado de la técnica. Así, el análisis de los datos de los sitios antigénicos determinados experimentalmente ha revelado que los residuos hidrofóbicos Cys, Leu y Val, si ocurren en la superficie de la proteína, tienen una gran tendencia a formar parte de los determinantes antigénicos. De esta manera se han desarrollado métodos semiempíricos que hacen uso de las propiedades físico-químicas de los residuos aminoacídicos y sus frecuencias y ocurrencia en segmentos de epitopos conocidos experimentalmente para determinar los determinantes antigénicos de una proteína.

Los péptidos sintéticos tienen varias ventajas con respecto a la producción de anticuerpos específicos y reactividad. La secuencia exacta del péptido sintetizado puede ser seleccionada a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína como se determina por la secuencia de aminoácidos de la proteína o la secuencia de aminoácidos predicha determinada a partir de la secuencia de DNA codificada por la proteína.

El uso de péptidos sintéticos específicos elimina la necesidad de la proteína de longitud completa en vacunación y producción de un ensayo para anticuerpos. Además, las técnicas sintéticas de péptidos en fase sólida de Marrield y co- ayudantes permiten producir químicamente los mismos para cantidades no limitadas esencialmente del péptido

## ES 2 325 243 B1

sintético de interés. Se ha producido un avance en dichas técnicas debido a la capacidad de los sintetizadores de péptidos automatizados.

5 En una realización particular de la invención, se selecciona el péptido que consiste en la SEQ ID NO:1 para su uso como medicamento.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un péptido, que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

10 En otro aspecto de la invención, se proporciona un péptido, que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un péptido, que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4.

15 En otro aspecto de la invención, se proporciona un péptido, que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5.

20 En otro aspecto de la invención, se proporciona un péptido que consiste en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 ó SEQ ID NO:5, o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, se proporciona un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

25 En otro aspecto de la invención, se proporciona un péptido con una secuencia aminoacídica que presenta una identidad con cualquiera de los péptidos que consisten esencialmente en las secuencias aminoacídicas de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 ó SEQ ID NO:5 de, al menos, un 80%. Más preferiblemente, presenta una identidad de al menos, un 90%. Más preferiblemente, presenta una identidad de al menos, un 95% y, aún más preferiblemente, presenta una identidad de al menos, un 98% con dichas secuencias aminoacídicas.

30 Los péptidos son útiles como vacunas para proteger contra futuras infecciones por nemátodos o para potenciar la respuesta inmune contra la infección por nemátodos en sujetos o animales ya infectados por nemátodos. Aunque cualquier sujeto humano puede ser vacunado con los péptidos, los sujetos más adecuados son personas o animales con riesgo de padecer la infección por nemátodos.

35 Los polipéptidos sintéticos también pueden prepararse por expresión en una célula hospedadora que contiene una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que se transcribe a los péptidos, unida operativamente a una secuencia de control de la expresión, o un vehículo o vector de clonación de ADN recombinante que contiene tal molécula de ADN recombinante. Alternativamente, los péptidos pueden expresarse por inyección directa de una simple molécula de ADN en una célula hospedadora. Generalmente, los péptidos sintéticos producidos conforme a la invención representan secuencias antigénicas protectoras. La expresión "antígeno protector", tal como se usa en la presente invención, define aquellos antígenos capaces de generar una respuesta inmune (inmunogénica) protectora del hospedador, es decir, una respuesta del hospedador, que conduce a la generación de moléculas efectoras inmunes, anticuerpos o células que esterilizan o reducen la fecundidad del parásito o lo dañan, inhiben o matan, "protegiendo" así al hospedador de una enfermedad clínica o sub-clínica y de una pérdida de productividad. Tal respuesta inmune protectora puede manifestarse comúnmente por la generación de anticuerpos que son capaces de inhibir la función metabólica del parásito, conduciendo a un impedimento de su crecimiento normal, falta de producción de huevos y/o muerte.

50 El polipéptido sintético así expresado puede ser un polipéptido de fusión que comprende una porción que despliega la inmunogenicidad de toda o de una parte de la subunidad catalítica de la proteína serina/treonina fosfatasa de *Angiostrongylus costaricensis*, y un péptido adicional codificado por el ADN de la molécula recombinante fusionado a él.

55 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporcionan moléculas de ácido nucleico que comprenden una o más secuencias de nucleótidos, que codifican a toda o una fracción del péptido codificado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 ó SEQ ID NO:5, o cualquiera de sus combinaciones.

60 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporcionan moléculas de ácido nucleico que comprenden una o más secuencias de nucleótidos, que codifican a toda o una fracción del péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, o sus fragmentos, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 ó SEQ ID NO:5, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso como medicamento.

65 La provisión de una molécula de ácido nucleico conforme a la invención hace así posible obtener el péptido de la subunidad catalítica de la proteína serina/treonina fosfatasa de *Angiostrongylus costaricensis*, o sus fragmentos inmunogénicos, en cantidades hasta ahora no disponibles, permitiendo de este modo el desarrollo de composiciones, y preferiblemente composiciones farmacéuticas.

En este aspecto de la invención se proporciona un método para preparar una proteína o péptido recombinante codificado por una molécula de ácido nucleico de la invención, que comprende el cultivo de una célula eucariótica o procariótica que contiene una molécula de ácido nucleico de la invención, en condiciones en que se expresa dicha proteína o péptido, y la recuperación de dicho péptido así producido.

5 Este método incluye los vectores de clonación y expresión que comprenden las moléculas de ácidos nucleicos de la invención. Tales vectores de expresión incluyen secuencias de control adecuadas, tales como, por ejemplo, elementos de control de la traducción (como códigos de iniciación y de parada) y de la transcripción (por ejemplo, regiones de promotor-operador, sitios de unión). Los vectores conforme a la invención pueden incluir plásmidos y virus (comprendiendo bacteriófagos y virus eucarióticos), de acuerdo con procedimientos bien conocidos y documentados en la técnica, y pueden expresarse en una variedad de sistemas de expresión diferentes, asimismo bien conocidos y documentados en la técnica. Los vectores virales adecuados incluyen, baculovirus y también adenovirus y virus vacunales. Muchos otros vectores virales y no virales están descritos y son conocidos en la técnica.

15 Se conoce, así mismo, una variedad de técnicas que pueden utilizarse para introducir tales vectores en células procarióticas o eucarióticas para la expresión, o en una línea germinal o en células somáticas, para formar animales transgénicos. Técnicas adecuadas de transformación o transfección están bien descritas en la bibliografía.

20 Las células hospedadoras eucarióticas o procarióticas transformadas o transfectadas, que contienen una molécula de ácido nucleico conforme a la invención, como se definió anteriormente, también forman parte de este aspecto de la invención.

25 La expresión de las secuencias (igual u homóloga) codificadoras de la subunidad catalítica de la proteína serina/treonina fosfatasa de *Angiostrongylus costaricensis*, o sus fragmentos inmunogénicos, conforme a la invención, utilizando una serie de técnicas y sistemas de expresión conocidos, incluyendo la expresión en células procarióticas tales como *E. coli* y en células eucarióticas tales como levaduras o el sistema de baculovirus-célula de insecto o células de mamíferos transformadas y en animales transgénicos y plantas. De un modo particularmente ventajoso, las secuencias de nucleótidos pueden expresarse utilizando el sistema de nematodo transgénico, tal como el sistema correspondiente al nematodo *Caenorhabditis*.

30 En una realización particular de este aspecto de la invención, el vector empleado para clonar el gen de la proteína recombinante fue el pGex2TK, y el hospedador donde se expresó, fue la bacteria *Escherichia coli* cepa BL 21.

35 Los péptidos se formulan en composiciones para usar como inmunógeno. Estos inmunógenos pueden también ser usados como vacunas en animales, y más particularmente en mamíferos, incluyendo humanos, o producir una respuesta en la producción de anticuerpos en animales. Para la formulación de tales composiciones, una cantidad efectiva inmunológicamente de al menos uno de los péptidos es mezclado con un transportador adecuado aceptable fisiológicamente para la administración a mamíferos incluyendo humanos. Los péptidos pueden estar covalentemente ligados entre ellos, a otros péptidos, a una proteína transportadora o con otros transportadores, incorporados en liposomas u otras vesículas similares, y/o mezclados con un adyuvante o absorbente como es conocido en el campo de las vacunas. Por ejemplo, el péptido o péptidos pueden ser mezclados con complejos inmunoestimuladores. Alternativamente, los péptidos no están acoplados y meramente mezclados con un transportador aceptable fisiológicamente tal como un compuesto tampón o salino normal adecuado para la administración a mamíferos incluyendo humanos.

45 Por tanto, y como se ha descrito anteriormente, los péptidos sintéticos producidos conforme a la invención presentan secuencias antigénicas protectoras. Estos antígenos protectores son capaces de generar una respuesta inmune (inmunogénica) protectora del hospedador, es decir, una respuesta del hospedador que conduce a la generación de moléculas efectoras inmunes, anticuerpos o células que esterilizan o reducen la fecundidad del parásito o lo dañan, inhiben o matan, "protegiendo" así al hospedador de una enfermedad clínica o sub-clínica y de una pérdida de productividad. Tal respuesta inmune protectora puede manifestarse comúnmente por la generación de anticuerpos que son capaces de inhibir la función metabólica del parásito, conduciendo a un impedimento de su crecimiento normal, falta de producción de huevos y/o muerte.

55 Como con todas las composiciones inmunogénicas para producir una respuesta en anticuerpos, las cantidades efectivas inmunogénicamente de los péptidos de la invención deben ser determinados empíricamente. Los factores que se consideran incluyen la inmunogenicidad del péptido natural, esté o no el péptido complejo con un enlace covalente a un adyuvante o una proteína transportadora o otro transportador y vía de administración para la composición, por ejemplo, y sin limitarse a estas, intravenosa, intramuscular, subcutánea, y como en una realización particular de la invención, intranasal, así como el número de la dosis de inmunización que se administraría. Tales factores son conocidos en el campo de las vacunas y está en conformidad con la habilidad del inmunólogo que ha realizado tales determinaciones sin una experimentación indebida.

60 En otro aspecto de la invención, se proporcionan los anticuerpos aislados producidos tras la inmunización de un animal, con los péptidos que consisten esencialmente en las secuencias aminoácídicas SEQ ID NO:1, o sus fragmentos, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 ó SEQ ID NO:5, o cualquiera de sus combinaciones.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen mezclas de anticuerpos generados por inmunización de uno o varios animales con uno o varios péptidos de la presente invención. Dichos anticuerpos pueden estar purificados, o

## ES 2 325 243 B1

no. La generación y purificación de anticuerpos puede realizarse en el laboratorio según los procedimientos generales conocidos en el estado de la técnica.

5 En una realización particular de este aspecto de la invención, el animal que se emplea para la inmunización es un mamífero, incluyendo al hombre.

En una realización preferida, el animal que se emplea para la inmunización es un mamífero, sin incluir al hombre.

10 En otra realización particular de este aspecto de la invención, los anticuerpos producidos tras la inmunización del animal son usados como medicamento.

15 Los anticuerpos de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas. Así, los anticuerpos pueden estar en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, los anticuerpos pueden prepararse para su administración en forma sólida. Los anticuerpos pueden combinarse con 20 varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido alginico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

25 Los anticuerpos o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas. Tales medios incluyen, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

30 La dosificación de anticuerpos para obtener una cantidad farmacéuticamente eficaz depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia,... del animal.

En otro aspecto de la invención se proporciona una composición que comprende un péptido de la invención, o un anticuerpo de la invención, o cualquiera de sus mezclas.

35 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición comprende, además, excipientes farmacológicamente aceptables.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición se usa como medicamento.

40 En otro aspecto de la invención, la composición se usa en la fabricación de una vacuna.

45 En el contexto de la presente invención el término “vacuna” se refiere a una preparación antigénica empleada para establecer la respuesta del sistema inmune a una enfermedad. Son preparados de antígenos que una vez dentro del organismo provocan la respuesta del sistema inmunitario, mediante la producción de anticuerpos, y generan memoria inmunológica produciendo inmunidad permanente o transitoria.

50 En otro aspecto de la invención, se proporciona una vacuna que contiene un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, o sus fragmentos, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 ó SEQ ID NO:5, o cualquiera de sus combinaciones, o un una molécula de ácidos nucleicos capaz de transcribirse a cualquiera de ellos.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la vacuna comprende, además un adyuvante.

55 En esta memoria, el término “adyuvante” se refiere a un agente, mientras no posea un efecto antigénico por si mismo, que puede estimular el sistema inmune incrementando su respuesta a la vacuna. Aunque sin limitarse a ellas, las sales de aluminio “fosfato de aluminio” e “hidróxido de aluminio” son los dos adyuvantes más comúnmente empleados en las vacunas. Otras sustancias, como por ejemplo el escualeno, también se pueden emplear como adyuvantes.

60 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la vacuna además comprende la subunidad b de la toxina colérica

La subunidad b de la toxina del cólera ha demostrado inducir una respuesta inmune contra el antígeno de interés.

65 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, cualquiera de los péptidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 ó SEQ ID NO:5 se encuentra polimerizado con la subunidad b de la toxina colérica. En una realización más preferida de este aspecto de la invención, el péptido que se polimeriza con la subunidad b de la toxina colérica contiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

## ES 2 325 243 B1

En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, la vacuna comprende también una matriz ISCOM.

Las matrices tipo ISCOM son conocidas en el campo de la técnica de las vacunas, y son ejemplos, pero sin limitarse a estas, las descritas, y sus modos de realización, en las patentes ES2029758, ES2195169, ES2214608, ES2210495, ES2199346, ES2284265.

En otra realización preferida de la invención, la composición se usa para la elaboración de un medicamento o vacuna, para prevenir la parasitación por nemátodos de un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre.

En otro aspecto de la invención se proporciona una composición que comprende uno o varios péptidos de la invención, una molécula de ácidos nucleicos de la invención, un anticuerpo de la invención, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de la parasitación por nemátodos de un animal.

Un método alternativo de la producción de vacunas es el uso de técnicas de biología molecular para producir una proteína de fusión que contiene uno o más de los péptidos de la presente invención y una proteína altamente inmunológica. Por ejemplo, proteínas de fusión conteniendo el Antígeno de interés y la subunidad b de la toxina del cólera han demostrado inducir una respuesta inmune contra el Antígeno de interés.

Otro aspecto de la invención lo constituye una composición que comprenda una construcción genética de DNA, la cual dirigiría la transcripción *in vitro* o intracelular de las moléculas de ácido nucleico de la invención, y que comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias:

- a) secuencia de nucleótidos de DNA, preferentemente de doble cadena, que comprende, al menos, la secuencia codificante de cualquiera de las secuencias aminoacídicas de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 ó SEQ ID NO:5, para su transcripción *in vitro* o intracelular, o,
- b) secuencia de nucleótidos de DNA, preferentemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia codificante de las secuencias según a) operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc... Múltiples de estos sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia y forman parte de la presente invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición que contiene la construcción genética que permite la transcripción y traducción de los péptidos *in vitro* o intracelular, es capaz de generar anticuerpos y puede ser utilizada en la elaboración de vacunas terapéuticas para generar una respuesta humoral.

### Definiciones

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere, también, a una composición capaz de generar una respuesta inmune frente a un parásito dado, y en concreto un parásito nematodo, que está causando dicha enfermedad en el hombre o los animales. Incluye, por tanto, lo que se conoce como vacuna, tal y como se ha definido previamente en esta memoria.

El término "péptido", tal como se usa en la presente invención, incluye tanto la proteína de longitud completa, como las secuencias de péptidos más cortas.

El término "antígeno" en esta memoria se refiere a una molécula (generalmente una proteína o un polisacárido) de superficie celular, que puede inducir la formación de anticuerpos. Hay muchos tipos de moléculas diferentes que pueden actuar de antígenos, como las proteínas o péptidos, los polisacáridos y, más raramente, otras moléculas como los ácidos nucleicos. En concreto, en esta memoria, el término antígeno haría referencia a la subunidad catalítica de la proteína serin/treonin fosfatasa de *Angiostrongylus costaricensis*, o a fragmentos antigénicos de la misma, como pueden ser, pero sin limitarse a éstos, las secuencias aminoacídicas de las SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 ó SEQ ID NO:5.

La familia serina/treonina fosfatasa pertenece al grupo de las fosfatasas, las cuales desfosforilan diferentes residuos proteicos. Muchas funciones celulares en eucariotas, incluyendo transducción de señales, adhesión celular, transcripción, "RNA splicing", apoptosis y proliferación celular son controladas por la desfosforilación de proteínas. La fosforilación reversible es regulada por la relación dinámica entre quinasa y fosfatasas. Existen tres tipos de fosfatasas en eucariotas:

- serina/treonina fosfatasa (PSTP's),

## ES 2 325 243 B1

- proteína Tirosina fosfatasa (PTP's) y
- fosfatasas doble especificas (DSP's).

5

Las PSTP's son las fosfatasas mayoritarias en eucariotas y se han aislado y caracterizado de un gran número de tejidos. Se clasifican en subfamilias de acuerdo con la especificidad de sustrato, dependencia a iones metálicos y sensibilidad a inhibidores.

10

La mayoría de PSTP's son proteínas multimericas formadas por una subunidad catalítica y una o mas proteínas accesorias. Las proteínas accesorias confieren especificidad de sustrato, regulan la actividad enzimática y controlan la localización subcelular de la holoenzima (Faux, M. C. & Scott, J. D. 1996. More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location. *Trends Biochem. Sci.* 21, 312-315).

15

Las proteínas de la subfamilia PP2A puede ser dimericas o trimericas, por lo general están compuestas de una subunidad catalítica (C), una subunidad estructural (A) y una subunidad reguladora (B). La subunidad A o subunidad estructural es la unión entre la subunidad C y B, siendo la subunidad B la que le otorga a la holoenzima la especificidad de sustrato.

20

La serina/treonina fosfatasa PP2A es la más prevalente en eucariotas y es principalmente citosólica aunque se puede encontrar en el núcleo, interviene en numerosos procesos vitales tales como: mitosis, apoptosis, replicación y reparación de daños del DNA, transducción de señales, respuesta a estrés por calor.

25

En especies como *Drosophila melanogaster*, la subunidad catalítica de la proteína PP2A interviene en la regulación del ciclo celular y señalización intracelular, expresándose en todos lo estadios aunque esta es notablemente superior en embriones tempranos. Se ha podido confirmar el papel de la PP2A en la morfogénesis y mitosis.

30

En nematodos han sido identificadas miembros de la familia de las serina/threonina fosfatasa hasta el momento en *Trichinella spiralis*, *Caenorhabditis elegans*, *Oesophagostomum dentatum*, *Trichostrongylus vitrinus*. En *Trichostrongylus vitrinus* y *Oesophagostomum dentatum* las serina/treonina fosfatasas han sido relacionadas con procesos reproductivos y existen antecedentes que las involucra en la espermatogenesis y/o movilidad del esperma.

35

Ambas isoformas son altamente expresadas en cerebro y corazón, aunque la PP2A $\alpha$  es diez veces más abundante que la PP2A $\beta$ . También han sido aisladas de varias especies en diversos tipos de tejidos, en mamíferos han sido aisladas a partir de hígado, pulmón y cerebro, entre otros.

40

La identificación de la PP2AC en organismos como: *Xenopus*, *Drosophila*, las plantas *Brassica napus* y *Arabidopsis thaliana*, y las levaduras *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae*, han revelado que la de las PP2Ac pueden ser la mas conservada de todas las enzimas conocidas.

45

La "subunidad estructural" A es una proteína de 65 kDa, que se asocia a la PP2Ac formando un dimero al que se les une la subunidad B. Al igual que la PP2Ac, en mamíferos la subunidad estructural esta codificada en dos genes alfa y beta, los cuales tienen un 87% de identidad. En general PR65 alfa  $\beta$  es mas abundante que PR65 beta, excepto en oocitos de *Xenopus*, siendo PR65 beta $\beta$  altamente expresada en el ovario durante la oogenesis, meiosis, maduración y fertilización. PR658 ha sido identificada como un inhibidor de tumores en humanos. Este enzima muestra un 15% de alteraciones somáticas en el gen que codifica PR65 beta en líneas celulares cancerígenas de pulmón y colon. Estas alteraciones, incluyen deleciones del gen, deleciones internas y en C-terminal de la proteína. Recientemente se han detectado mutaciones en el que codifica la isoforma PR65 alfa en melanomas humanos y carcinomas de pecho y pulmón, aunque dichas mutaciones ocurren en baja proporción si se compara con los estudios realizados con PR65 beta.

50

La estructura del PR65 esta compuesta por 15 repeticiones en tandem de 39 aminoácidos, llamada HEAT, esta repetición en tandem se encuentran en varias proteínas incluyendo factores de elongación y TOR quinasa. La cristalización de la PR65 reveló que la arquitectura de cada repetición es virtualmente la misma, dos alfa hélices.

55

La tercera subunidad asociada a esta holoenzima es la subunidad B. Existen tres clases de subunidad B descritas: PR55, PR61, PR72 y PR93/PR110. La "subunidad reguladora" PR55 es una proteína de 55 kDa que en mamíferos esta codificada en cuatro genes (PR55 alfa, PR55 beta, PR55 gamma y PR55 delta), los cuales se expresan en tejidos específicos. PR55 alfa y PR55 delta tienen una amplia distribución en los tejidos, mientras que PR55beta y PR55 gamma están en alta concentración en el cerebro.

60

La presencia uniforme de las subunidades A y C, indican que las subunidades B confieren una localización subcelular, otorgando regulación y especificidad a la holoenzima PP2A. La unión específica de cada subunidad B otorga la especificidad de sustrato y ubicación.

65

A pesar que solo existen dos isoformas de subunidad C de la holoenzima PP2A, el número potencial de asociaciones de las dos subunidades A y de las cuatro subunidades B es muy grande, esto da un total aproximado de 75

diferentes trimeros de la holoenzima PP2A. Esta composición específica provee muchas posibilidades para su regulación y siendo tejida específica.

Adicionalmente, en la identificación de una secuencia aminoacídica perteneciente a la subunidad catalítica de la serina/treonina quinasa son aplicables los parámetros siguientes, sea aisladamente o en combinación con los anteriores. Dado que las secuencias de ADN son afines en cuanto a su evolución, puede esperarse que la identidad global de los genomas al nivel de los aminoácidos, y más concretamente a nivel de la secuencia aminoacídica que se recoge en la SEQ ID NO:1, sea de un 80% o mayor, y más preferiblemente de un 90% o mayor y más preferiblemente de un 95% o mayor.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de péptidos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, o construcciones genéticas que permitan su expresión calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos péptidos, anticuerpos, secuencias y construcciones y el efecto terapéutico a conseguir. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia. Las composiciones proporcionadas por esta invención puede ser facilitada por cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Muestran la homología de la secuencia con el dominio catalítico de la familia serina/threonina fosfatasa 2A. Por lo cual determinamos que la secuencia identificada correspondía a la subunidad catalítica de familia serina/treonina fosfatasa 2A.

Figura 2. Consenso entre el dominio catalítico de cd00144, PP2Ac, homólogas de Proteína fosfatasa 2A, dominio catalítico y la secuencia de aminoácidos de la proteína “serine/threonine phosphatase pph-1”, Expect 3e-15.

### Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los péptidos sintéticos y la proteína recombinante para la generación de una respuesta inmune frente a nemátodos.

#### Ejemplo

Con el fin de identificar proteínas dianas con características antigénicas se realizó una genoteca de cDNA a partir del adulto del nematodo *Angiostrongylus costaricensis*, la cual fue rastreada con un pool de sueros de pacientes con la enfermedad que produce la angiostrongilosis abdominal. A partir de estos rastreos se pudo identificar un clon con una secuencia de 345 pb que corresponde a una secuencia de 76 aminoácidos, la cual fue depositada en EMBL como “serine/threonine phosphatase pph-1” (AM041130) y en esta memoria corresponde a la SEQ ID NO:1.

La figura 2, muestra la homología de la secuencia con el dominio catalítico de la familia serina/treonina fosfatasa 2A. Por lo cual se determina que la secuencia identificada corresponde a la subunidad catalítica de familia serina/threonina fosfatasa 2A.

#### Elaboración de péptido sintético

Con el fin comprobar las características antigénicas de la proteína, la secuencia aminoacídica fue analizada con el programa antigénico del paquete EMBOSS (Kolaskar, AS & Tongaonkar, PC 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Letters* 276: 172-174), y como resultado de dicho análisis se obtuvieron 4 péptidos. El péptido seleccionado para la realización del ejemplo fue el ANFIIFRPVV.

#### Obtención de los antígenos

Para los ensayos de inmunoprotección se emplearon como antígeno el péptido sintético polimerizado y la proteína recombinante (serine/threonine phosphatase pph-1).

#### Proteína recombinante

El gen que corresponde a la dicha proteína recombinante fue subclonado en el vector pGex2TK y obtenida a partir del cultivo de la bacteria *Escherichia coli* cepa BL 21.

## ES 2 325 243 B1

### *Obtención de la subunidad b de la toxina colérica*

La subunidad b de la toxina colérica se obtuvo a partir de una toxina colérica comercial.

#### 5 *Polimerización del péptido sintético*

Para la polimerización del péptido sintético se siguió la técnica por Endoh *et al.* 1981 (Antibody coating of liposomes with 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimide and the effect on target specificity. *J Immunol Methods.*; 44(1):79-85). Se utilizaron 2 mg de péptido sintético y se mezclaron con 3 mg de subunidad b de la toxina colérica, se disolvieron en 20 ml de PBS. Una vez disueltos se le añadieron 40  $\mu$ l de glutaraldehído y se incubó a temperatura ambiente durante 6 h. La reacción fue detenida con la adición de 1 ml de glicina 1 M, e incubada nuevamente a temperatura ambiente durante 30 min y finalmente dializada durante 12 h a 4°C. Este mismo procedimiento se realizó con el péptido sintético sin la subunidad b de la toxina colérica.

#### 15 *Elaboración de ISCOM*

Las nano cápsulas se prepararon por técnica descrita por Iosef C *et al.*, 2002 (Systemic and intestinal antibody secreting cell responses and protection in gnotobiotic pigs immunized orally with attenuated Wa human rotavirus and Wa 2/6-rotavirus-like-particles associated with immunostimulating complexes. *Vaccine*; 15; 20(13-14):1741-1753) modificada posteriormente por PH.- Demana *et al.*, 2004 (Pseudo-ternary phase diagrams of aqueous mixtures of Quil A, cholesterol and phospholipid prepared by the lipid-film hydration method. *Int J Pharm.* 2004 Feb 11;270(1-2):229-39). Una vez preparadas se mezcló en proporción 1:1 con el péptido sintético polimerizado con y sin la subunidad b de la toxina colérica. Posteriormente se dializo realizando 4 cambios de 12 h, las muestras se liofilizaron y se comprobó su correcta formación por microscopía electrónica.

#### 25 *Ensayo de inmunoprotección*

Se emplearon 6 grupos de 5 ratones C57Bl/6, los cuales fueron inmunizados por vía intranasal con 5  $\mu$ g de los antígenos encapsulados en ISCOM (péptido polimerizado y péptido polimerizado con subunidad b de la toxina colérica) y 50  $\mu$ g de proteínas totales (proteínas bacterianas y proteína recombinante). Se realizaron dos inoculaciones vía intranasal, con un periodo de intermedio de 15 días. Un mes después de la segunda inoculación se realizó la infección vía oral con 3 larvas de tercer estadio del nematodo y el sacrificio y comprobación de resultados se realizó un mes después de la infección.

35 Cada uno de los ratones sacrificados fue examinado en busca de alteraciones y presencia de nematodos adultos, encontrado una reducción de la carga parasitaria del 80% en el grupo inoculado con el péptido sintético en combinación con la toxina colérica y 100% en el grupo inoculado con la proteína recombinante.

40

45

50

55

60

65

## ES 2 325 243 B1

### REIVINDICACIONES

1. Péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
- 5 2. Péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.
3. Péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
- 10 4. Péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.
5. Péptido que consiste en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 ó SEQ ID NO: 5, o cualquiera de sus combinaciones.
- 15 6. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
7. Péptido cuya secuencia aminoacídica presenta una identidad con un péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, seleccionada de cualquiera de las siguientes:
  - 20 a) al menos un 80%.
  - b) al menos un 90%.
  - c) al menos un 95%.
  - 25 d) al menos un 98%.
8. Moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden una o más secuencias de nucleótidos, que codifican a toda o una fracción del péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o cualquiera de sus combinaciones.
- 30 9. Moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden una o más secuencias de nucleótidos, que codifican, o que son capaces de transcribirse, a toda o una fracción del péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso como medicamento.
- 35 10. Anticuerpos producidos tras la inmunización de un animal, con los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o cualquiera de sus combinaciones.
11. Anticuerpos según la reivindicación anterior, donde el animal empleado para la inmunización es un mamífero.
- 40 12. Anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, para su uso como medicamento.
13. Composición que comprende:
  - 45 a) un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o
  - b) un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, o
  - c) cualquiera de sus mezclas.
- 50 14. Composición según la reivindicación anterior que además comprende excipientes farmacológicamente aceptables.
15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, para su uso como medicamento.
- 55 16. Composición según la reivindicación 15, donde el medicamento es una vacuna.
17. Vacuna que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una molécula de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9.
- 60 18. Vacuna según la reivindicación 17, que además comprende un adyuvante.
19. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18 que además comprende la subunidad b de la toxina colérica.
- 65 20. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 donde cualquiera de los péptidos de las reivindicaciones 1 a 6, se encuentra polimerizado con la subunidad b de la toxina colérica.

## ES 2 325 243 B1

21. Vacuna según la reivindicación anterior donde el péptido que se encuentra polimerizado consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

22. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21 que comprende también una matriz ISCOM.

23. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-16, o de la vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 17-21, para la prevención o tratamiento de la parasitación por nemátodos de un animal.

24. Uso de una composición que comprende:

- a) uno o varios péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1-6,
- b) una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, o
- c) un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12,
- d) cualquiera de las combinaciones de a, b ó c,

en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de la parasitación por nemátodos de un animal.

25. Composición que comprende una construcción genética de DNA, la cual dirigirá la transcripción *in vitro* o intracelular de las moléculas de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, y que comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias:

- a) secuencia de nucleótidos de DNA, preferentemente de doble cadena, que comprende, al menos, la secuencia codificante de cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, para su transcripción *in vitro*, o intracelular, ó
- b) secuencia de nucleótidos de DNA, preferentemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia codificante de las secuencias según a) operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc...

26. Composición según la reivindicación anterior, en la que el péptido y/o los péptidos se encuentran, o se traducen, en una cantidad terapéuticamente efectiva, capaz de generar anticuerpos para su uso en la elaboración de vacunas.

27. Uso de una composición que comprende:

- a) Un péptido que se selecciona de la lista que consiste en:
  - i. péptido que consiste esencialmente en la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1.
  - ii. fragmento de la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 ó SEQ ID NO: 5
  - iii. péptido cuya secuencia aminoacídica presenta una homología de, al menos, un 80% con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 ó SEQ ID NO: 5
- b) Una moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden una o más secuencias de nucleótidos, que codifican a toda o una fracción de dichos péptidos, o cualquiera de sus combinaciones.
- c) Un anticuerpo producido tras la inmunización de un animal, preferentemente un mamífero, con los péptidos anteriores, o cualquiera de sus combinaciones.
- d) cualquiera de las combinaciones de a, b ó c,

en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de la parasitación por nemátodos de un animal.

FIGURAS



FIG. 1

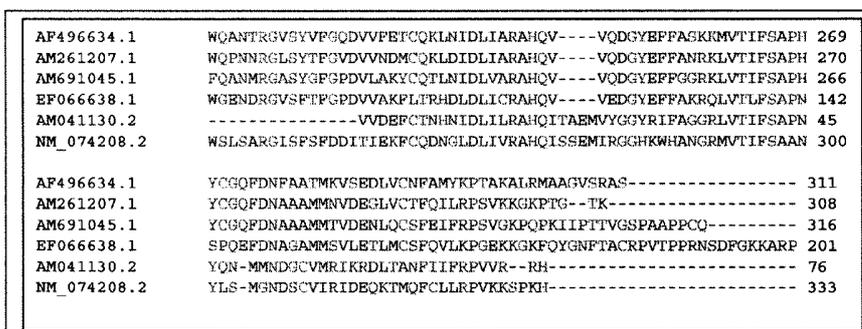


FIG. 2

# ES 2 325 243 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE GRANADA

5 <120> Antígeno Recombinante

<130> ES 1634.7

10 <160> 5

<170> PatentIn version 3.4

15 <210> 1

<211> 76

<212> PRT

20 <213> *Angiostrongylus costaricensis*

<400> 1

25 Val Val Asp Glu Phe Cys Thr Asn His Asn Ile Asp Leu Ile Leu Arg  
1 5 10 15

30 Ala His Gln Ile Thr Ala Glu Met Val Tyr Gly Gly Tyr Arg Ile Phe  
20 25 30

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

40 Met Met Asn Asp Gly Cys Val Met Arg Ile Lys Arg Asp Leu Thr Ala  
50 55 60

45 Asn Phe Ile Ile Phe Arg Pro Val Val Arg Arg His  
65 70 75

<210> 2

45 <211> 10

<212> PRT

<213> péptido sintético

50 <400> 2

Ala Asn Phe Ile Ile Phe Arg Pro Val Val  
1 5 10

55 <210> 3

<211> 11

<212> PRT

60 <213> péptido sintético

<400> 3

65 Gly Gly Arg Leu Val Thr Ile Phe Ser Ala Pro  
1 5 10

<210> 4

# ES 2 325 243 B1

<211> 10

<212> PRT

<213> péptido sintético

5

<400> 4

Ile Asp Leu Ile Leu Arg Ala His Gln Ile  
1 5 10

10

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

15

<213> péptido sintético

<400> 5

20

Ala Glu Met Val Tyr Gly Gly Tyr Arg Ile Phe  
1 5 10

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 325 243

② Nº de solicitud: 200800565

② Fecha de presentación de la solicitud: 27.02.2008

③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C07K 14/435 (2006.01)  
A61K 38/17 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BASE DE DATOS EMBL, Hinxton, UK, Junio 2005 (en línea) (recuperado el 24.04.2009). SOLANO J., MORERA P., OSUNA A., BURGOS M. Isolation of antigenic proteins from <i>Angiostrongylus costaricensis</i> . Nº de acceso Q4A1P3.	1-27,30-31
A	NAOTOSHI TSUJI et al. Recombinant <i>Ascaris</i> 16-Kilodalton Protein-induced Protection against <i>Ascaris suum</i> Larval Migration after Intranasal Vaccination in Pigs. <i>The Journal of Infections Diseases</i> . 30.09.2004. Vol 190(10), páginas 1812-1820.	1-31
A	K. ROBINSON, T. BELLABY, W.C. CHANT & D. WAKELIN. High levels of protection induced by a 40-mer synthetic peptide vaccine against the intestinal nematode parasite <i>Trichinella spiralis</i> . <i>Immunology</i> 1995, Vol. 86, páginas 495-498.	1-31

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**

12.05.2009

**Examinador**

S. González Peñalba

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.05.2009

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 28-29	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-27, 30-31	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 28-29	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-27, 30-31	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EMBL GenBank databases	Junio 2005
D02	Recombinant Ascaris	30-09-2004

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La invención se refiere a un péptido obtenido a partir de la recombinación de la proteína de la subunidad catalítica serina/treonina fosfatasa de *Angiostrongylus costaricensis*, capaz de actuar como inmunogénico para la prevención o tratamiento de la parasitación por nemátodos de un animal. El péptido se selecciona de uno cuya secuencia aminoácida consiste en SEQ ID NO1, fragmento de la SEQ ID NO1 que consiste en SEQ ID NO2, SEQ ID NO3, SEQ ID NO4 ó SEQ ID NO5.

El documento D01 hace referencia a la secuencia de la proteína de la subunidad catalítica serina/treonina fosfatasa de *Angiostrongylus costaricensis* con actividad antigénica.

Existe una identidad de la secuencia del documento D01 con las reivindicadas en la invención solicitada del 100%, conteniendo el mismo número de aminoácidos, esto es 76.

Por lo tanto, en vista a lo divulgado en el estado de la técnica, las reivindicaciones 1 a 12 no tienen novedad ni implican actividad inventiva, debido a que dicho documento revela el objeto de las citadas reivindicaciones, es decir las secuencias de dicho péptido.

En cuanto a las reivindicaciones 13 y 14 referentes a las moléculas de ácido nucléico que comprenden una o más secuencias de nucleótidos que codifican a toda o una fracción del péptido, tampoco tienen actividad inventiva porque un experto en la materia podría llevar a cabo la obtención de ácidos nucléicos a partir de dicho péptido.

Las reivindicaciones 15-17 sobre anticuerpos producidos tras la inmunización de un animal con el péptido reivindicado también carecen de actividad inventiva porque igualmente un experto en la materia podría obtener a partir del péptido recombinante de la proteína de la subunidad catalítica serina/treonina fosfatasa anticuerpos mediante cualquiera de las técnicas conocidas.

Las reivindicaciones 22 a 27 que hacen referencia a las vacunas, son reivindicaciones carentes de actividad inventiva debido a que contienen o bien la secuencia del péptido conocido o la molécula de los ácidos nucléicos fácilmente obtenible a partir de dicho péptido, siendo conocida también la utilización de la toxina colérica como componente en vacunas.

Y por último las reivindicaciones 19-21 y 30-31 relativas a una composición que comprende dicho péptido como tal, como ácido nucléico o como construcción genética de DNA tampoco tendrían actividad inventiva por ser dicho péptido ya conocido.

En consecuencia a la vista de lo divulgado en el estado de la técnica (D01) las reivindicaciones 1-12 carecen de novedad y actividad inventiva y las 13-27 y 30-31 carecen de actividad inventiva. LP Arts 6 y 8. Las reivindicaciones 1-31 si cumplen el requisito de actividad industrial LP Art.9.