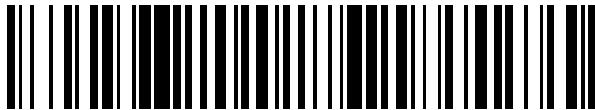


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 525 106**

(21) Número de solicitud: 201330905

(51) Int. Cl.:

<b>C12N 9/64</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/48</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/18</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/40</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)
<b>A61P 33/10</b>	(2006.01)

(12)

## PATENTE DE INVENCIÓN

B1

(22) Fecha de presentación:  
**17.06.2013**

(43) Fecha de publicación de la solicitud:  
**17.12.2014**

Fecha de la concesión:  
**22.09.2015**

(45) Fecha de publicación de la concesión:  
**29.09.2015**

(73) Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (100.0%)**  
Patio de Escuelas, 1  
37008 Salamanca (Salamanca) ES

(72) Inventor/es:

**MURO ÁLVAREZ, Antonio;**  
**ROJAS CARABALLO, José Vicente;**  
**LÓPEZ ABÁN, Julio;**  
**PÉREZ DEL VILLAR MORO, Luis;**  
**VICENTE SANTIAGO, Belén y**  
**FERNÁNDEZ SOTO, Pedro**

(74) Agente/Representante:  
**PONS ARIÑO, Ángel**

(54) Título: **Péptido sintético derivado de Fasciola hepatica y su uso como vacuna**

(57) Resumen:

Péptido sintético derivado de Fasciola hepática y su uso como vacuna.

La presente invención se refiere a polipéptidos o secuencias nucleotídicas que los codifican y composiciones que los contienen los cuales resultan útiles para la prevención y/o el tratamiento de infecciones producidas por organismos del género *Fasciola* y más concretamente por *Fasciola hepática*. Estos elementos también resultan útiles para la producción de anticuerpos frente a dichos péptidos. Los polipéptidos, secuencias nucleotídicas, composiciones, sueros y anticuerpos también resultan útiles para la elaboración de vacunas.

Péptido sintético derivado de *Fasciola hepatica* y su uso como vacuna

**DESCRIPCIÓN**

- 5 La presente invención se refiere a un polipéptido o una combinación de polipéptidos sintéticos derivados de secuencias de proteínas de *Fasciola hepatica*, los cuales resultan útiles como vacuna frente a la infección producida por este organismo. La invención también se refiere a las secuencias nucleotídicas que codifican para los polipéptidos, y a composiciones que comprendan los polipéptidos. Además la presente  
10 invención también incluye los anticuerpos que reconocen los polipéptidos de la invención. Por tanto, la presente invención se podría encuadrar en el campo de la biotecnología y más concretamente dentro del campo de la biomedicina.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

- 15 El organismo *Fasciola hepatica* es un trematodo digénido que produce la enfermedad denominada fasciolosis o fascioliasis, la cual es transmitida principalmente por la ingestión de metacercarias adheridas a plantas acuáticas. Su distribución geográfica es cosmopolita y se han reportado casos de fasciolosis en los cinco continentes (Mas-  
20 Coma *et al.*, 2009. *Adv Parasitol.* 69: 41-146; Hotez *et al.*, 2012. *PLoS Negl Trop Dis.* 6: e1475).

- Este organismo en su ciclo de vida necesita dos hospedadores, uno intermediario el cual es un caracol de agua dulce. En Europa el hospedador intermediario es el caracol  
25 *Galba truncatula* (sinónimo *Lymnaea truncatula*). El segundo hospedador o hospedador definitivo son principalmente mamíferos herbívoros como ovejas y vacas, pero también el ser humano (López-Abán *et al.*, 2012. *Manual de enfermedades importadas* p.10).
- 30 A nivel veterinario, la fasciolosis causa grandes pérdidas económicas debidas principalmente a la muerte de los animales, disminución en la producción de carne y leche, así como el decomiso de los mismos por las autoridades sanitarias en los mataderos para evitar que puedan llegar al consumo alimentario humano (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012. *Vet Parasitol.* 1: 15-38).

Por otro lado, en humanos esta enfermedad está considerada como un problema de salud pública. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha descrito casos de fasciolosis humana en 51 países, con más de 17 millones de personas afectadas, 5 existiendo mayores problemas de salud en áreas endémicas de países andinos, el área del Caribe, Norte de África, Europa del Este y cuenca del mar Caspio. En la actualidad se considera que existe un aumento en los casos registrados de fasciolosis humana ya que los avances surgidos en el diagnóstico de la enfermedad permiten detectar un mayor número de casos, considerándola una enfermedad emergente a 10 nivel mundial (World Health Organization 2008. *Facts sheet on fasciolasis. In action Against worms: 1-8*).

Tras la ingestión de las metacercarias, los vermes juveniles liberados atraviesan la pared intestinal para migrar a través del parénquima hepático y llegar a su localización 15 definitiva en los conductos biliares. El daño durante su proceso migratorio se debe a factores mecánicos como la abrasión que causan sus espículas o la succión originada por sus ventosas. Durante este proceso el parénquima hepático sufre una extensa destrucción con intensas lesiones y hemorragias causadas tanto por los vermes inmaduros como por la reacción inflamatoria e inmunológica desencadenada. Además 20 se pueden producir infecciones bacterianas secundarias que pueden originar peritonitis. Los vermes adultos se localizan principalmente en los conductos biliares, pero pueden encontrarse en el conducto cístico, la vesícula biliar, la ampolla de Vater o el colédoco. Los conductos biliares interlobulares se observan dilatados y esclerosados, presentan hiperplasia y obstrucción del flujo biliar.

25

Las infecciones por este organismo se tratan fundamentalmente con triclabenzadol, un antihelmíntico seguro el cual actúa frente a las fasciolas tanto inmaduras como adultas y elimina hasta el 99% de las mismas. Sin embargo, no resulta útil en todos los casos y por tanto aun resulta necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos. Además, 30 debido al amplio uso de este fármaco en animales se han ido seleccionando organismos resistentes al mismo, por lo que su eficacia se ha ido viendo reducida paulatinamente (World Health Organization, 2006. *Report of the WHO Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control*; Fairweather, 2009. *J. Helminthol.* 83: 139-150).

El control de la fasciolosis se basa principalmente en evitar la ingestión de plantas acuáticas (berros, marujas, lechugas, etc.) recogidas en zonas endémicas de fasciolosis y en efectuar tratamientos eficaces en ganado infectado con el parásito. Por 5 último, se siguen realizando grandes esfuerzos para lograr una vacuna efectiva contra esta enfermedad. De esta manera se han descrito diferentes moléculas candidatas a vacunas (catepsinas, GST (Glutatión S-transferasa o "Glutathione S-transferase"), FABP (proteínas de unión a ácidos grasos o "fatty-acid-binding proteins"), etc.). (Hillyer, 2005. *J. Helminthol.* 79: 241-247; McManus *et al.*, 2006. *Parasitology*. 133 10 Suppl: S43-61). Sin embargo en la actualidad no se dispone de una vacuna comercial eficaz.

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

15 La presente invención se refiere a polipéptidos formados por al menos 3 repeticiones de una secuencia de aminoácidos. La presente invención también se refiere a combinaciones de los polipéptidos, así como a composiciones que comprenden dichos polipéptidos, solos o en combinación con otros elementos. También se refiere a anticuerpos producidos por la inmunización de un animal con cualquiera de estos 20 elementos. La presente invención también se refiere al uso de estos polipéptidos, composiciones y/o anticuerpos para la elaboración de medicamentos, preferiblemente vacunas para la prevención de enfermedades producidas por organismos del género *Fasciola* y más concretamente por *Fasciola hepatica*.

25 En la presente invención, los inventores demuestran como el uso de uno de los polipéptidos denominados T14 (SEQ ID NO: 1), T15 (SEQ ID NO: 2) y T16 (SEQ ID NO: 3) o combinaciones de estos polipéptidos derivados de proteínas de *Fasciola hepatica*, provocan la generación de una respuesta inmune en el individuo. Además demuestran como mediante esta inmunización se disminuye la mortalidad de los 30 individuos infectados con *Fasciola hepatica*, y se consigue una reducción en el daño hepático y del número de vermes presentes en el individuo. Estos polipéptidos son moléculas que presentan 3 copias de una secuencia de 15 aminoácidos. T14 se refiere a un péptido que presenta 3 copias del péptido de secuencia SEQ ID NO: 17 y que tiene la secuencia SEQ ID NO: 1. T15 se refiere a un péptido que presenta 3

copias del péptido de secuencia SEQ ID NO: 18 y que tiene la secuencia SEQ ID NO: 2. T16 se refiere a un péptido que presenta 3 copias del péptido de secuencia SEQ ID NO: 19 y que tiene la secuencia SEQ ID NO: 3. Por todo ello, un primer aspecto de la invención se refiere a un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 5 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19, donde dicha secuencia SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces. En una realización preferida el polipéptido comprende SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 se repite 3 veces. En una realización más preferida el polipéptido que comprende SEQ ID NO: 17 donde dicha 10 secuencia SEQ ID NO: 17 se repite 3 veces es SEQ ID NO: 1. En otra realización más preferida el polipéptido que comprende SEQ ID NO: 18 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 18 se repite 3 veces es SEQ ID NO: 2. En otra realización más preferida el polipéptido que comprende SEQ ID NO: 19 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 19 se repite 3 veces es SEQ ID NO: 3. En una realización aun más preferida el polipéptido 15 es el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida el polipéptido consiste en 3 copias del péptido de secuencia SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19.

Estos polipéptidos que comprenden SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19, 20 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces, presentan una mayor utilidad que las secuencias SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 en sí ya que inducen una respuesta inmunológica mayor y provocan una mayor protección.

25 En la presente invención los polipéptidos que presentan al menos 3 copias de un péptido pueden consistir únicamente en las secuencias de los péptidos repetidas en tandem de forma que no incluyen ningún aminoácido adicional, o bien pueden incluir aminoácidos adicionales entre las repeticiones separándolas y/o en los extremos, debido por ejemplo al método de obtención del péptido para permitir la fusión de 30 monómeros mediante oxidación. Estos aminoácidos adicionales que separan las repeticiones como son por ejemplo la presencia de glicina y cisteína en ambos extremos de cada monómero no modifican la capacidad inmunogénica de los polipéptidos con respecto a los polipéptidos que no presentan estos aminoácidos entre los monómeros. Además todos los polipéptidos descritos en la presente invención, se

pueden encontrar fusionados o conjugados con otros elementos de forma que se aumente su inmunogenicidad. Estos elementos pueden ser por ejemplo, aunque sin limitarse, hemocianina de lapa (KLH o *keyhole limpet hemocyanin*), haptenos, GST, GPI (glicosil fosfatidil inositol o *glycosyl phosphatidylinositol*). Por tanto en otra 5 realización preferida de este primer aspecto de la invención los polipéptidos se encuentran fusionados o conjugados con elementos que aumentan su inmunogenicidad.

Los péptidos o polipéptidos de la presente invención pueden ser sintetizados, por 10 ejemplo, aunque sin limitarnos, siguiendo la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida y fusión de varias copias mediante reacciones de oxidación tal y como se indica en los ejemplos, o mediante aproximaciones de ADN recombinante que den lugar a la misma secuencia. Los polipéptidos de la invención pueden producirse recombinantemente, no sólo directamente sino como un polipéptido de fusión junto 15 con un polipéptido heterólogo, el cual puede contener, por ejemplo aunque sin limitarnos, otro péptido o polipéptido que facilite su aislamiento y purificación. Este péptido o polipéptido fusionado al polipéptido de la invención puede comprender además un sitio de corte para una proteasa, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en el extremo N-terminal del polipéptido o proteína madura. La producción recombinante 20 puede comprender por ejemplo, aunque sin limitarse, la amplificación de una secuencia nucleotídica que codifique para el polipéptido de interés, la clonación de la secuencia nucleotídica amplificada en un vector de expresión, la transformación o transfección de una célula competente con dicho vector, el cultivo de dicha célula en condiciones que promuevan la expresión del polipéptido de la invención y el 25 aislamiento y purificación del polipéptido de la invención producido por la célula.

Debido a la degeneración del código genético, en el cual diversos tripletes de nucleótidos dan lugar a un mismo aminoácido, existen diferentes secuencias de nucleótidos que dan lugar a una misma secuencia de aminoácidos y por tanto 30 múltiples secuencias de nucleótidos que pueden dar lugar a los polipéptidos de la invención. La obtención de estas secuencias de nucleótidos que dan lugar a los polipéptidos de la invención, son fáciles de obtener mediante herramientas informáticas. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada, de ahora en adelante “secuencia nucleotídica de la invención”,

que codifica para cualquiera de los polipéptidos de la invención. Los términos “secuencia nucleotídica”, “secuencia de nucleótidos”, “ácido nucleico”, “oligonucleótido” y “polinucleótido” se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud que pueden estar 5 o no, química o bioquímicamente modificados. Se refieren, por tanto, a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, tanto de cadena sencilla como de doble hebra.

La secuencia nucleotídica de la invención puede obtenerse de manera artificial 10 mediante métodos de clonación y selección convencional, o mediante secuenciación. La secuencia nucleotídica, adicionalmente a la secuencia codificante, puede llevar otros elementos, como por ejemplo aunque sin limitarse, intrones, secuencias no codificantes en los extremos 5' o 3', sitios de unión a ribosomas, o secuencias estabilizadoras. Las secuencias nucleotídicas adicionalmente también pueden incluir 15 secuencias codificantes para aminoácidos adicionales que puedan ser útiles, por ejemplo, aunque sin limitarse, para aumentar la estabilidad del péptido generado a partir de ellos o permitir una mejor purificación del mismo.

Otro aspecto de la invención se refiere a una construcción genética, de ahora en 20 adelante “construcción genética de la invención”, que comprende la secuencia nucleotídica de la invención. El término “construcción genética” se refiere a una molécula de ADN o ARN en la que se puede integrar otro fragmento de ADN, sin que pierda la capacidad de autorreplicación. En una realización preferida, la construcción genética de la invención es un vector de expresión. El término “vector de expresión”, 25 tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una molécula de ADN linear o circular que comprende la secuencia nucleotídica de la invención operativamente unido a nucleótidos adicionales necesarios para su expresión, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, secuencias control tales como reguladores, terminadores y/o promotores. Ejemplos de vectores de expresión son, sin ningún tipo de limitación, 30 plásmidos, fagos, cósmidos, fagémidos, cromosomas artificiales de levaduras (YAC), cromosomas artificiales de bacterias (BAC), cromosomas humanos artificiales (HAC), vectores virales, tales como adenovirus, retrovirus o cualquier otro tipo de molécula de ADN con capacidad para replicarse en el interior de una célula, procariota o eucariota.

La expresión “unidos operativamente” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a una secuencia nucleotídica, está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se 5 consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

El término “promotor” hace referencia a una región del ADN, generalmente “aguas arriba” o *upstream* del punto de inicio de la transcripción, que es capaz de iniciar la transcripción en una célula. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarse, 10 promotores constitutivos, promotores específicos de tipo celular o de tejido o promotores inducibles o reprimibles. Las secuencias de control dependen del origen de la célula en la que se quiere expresar el ácido nucleico. Ejemplos de promotores procariotas incluyen, por ejemplo, pero sin limitarnos, los promotores de los genes trp, recA, lacZ, lacI, tet, gal, trc, o tac de *Escherichia coli*, o el promotor del gen  $\alpha$ -amilasa 15 de *Bacillus subtilis*. Para la expresión de un ácido nucleico en una célula procariota también es necesaria la presencia de un sitio de unión ribosomal situado *upstream* de la secuencia codificante. Secuencias de control apropiadas para la expresión de una secuencia nucleotídica en células eucariotas son conocidas en el estado de la técnica. Dicha construcción genética de la invención puede ser introducida en una célula 20 hospedadora de manera que se mantenga como una construcción genética integrada en el cromosoma o como un vector extracromosómico autoreplicante. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a una célula, de ahora en adelante “célula de la invención”, que comprende la construcción genética de la invención.

25 La célula de la invención puede ser cualquier tipo celular susceptible de transformación o transfección con la construcción genética de la invención para la expresión del péptido de la invención. Así, dicha célula puede ser eucariota o procariota, preferiblemente procariota y más preferiblemente *E. coli*.

30 Todos los polipéptidos o secuencias nucleotídicas descritas pueden usarse bien de forma independiente o bien incluidos en una composición que comprenda otros elementos útiles para el mismo o diferente fin que los polipéptidos o secuencias nucleotídicas de la invención. Por tanto otro aspecto de la invención se refiere a una composición “de ahora en adelante composición de la invención” que comprende un

polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19, donde dicha secuencia SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces. En una realización preferida el número de repeticiones de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 en el polipéptido es de 3. En una  
5 realización más preferida el polipéptido consiste en 3 repeticiones de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19. En una realización aun más preferida el polipéptido consiste en 3 repeticiones de SEQ ID NO: 18. En otra realización más preferida el polipéptido comprende solo 3 copias del péptido de secuencia SEQ ID NO: 18. En una realización aun más preferida el polipéptido es el polipéptido de secuencia SEQ ID  
10 NO: 2.

Los polipéptidos también se pueden usar en composiciones que comprenden uno o varios de estos polipéptidos tal y como se demuestra en la presente invención. De esta forma la composición de la invención puede incluir combinaciones de polipéptidos  
15 aislados o sintéticos que comprenden SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19, donde dicha secuencia SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces. De esta forma la composición induce una mayor respuesta inmunitaria en un individuo en caso de ser administrada que si comprende uno solo de los péptidos. Por ello en una realización preferida de este aspecto de la invención, la  
20 composición comprende:

- a) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 17 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 17 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces,  
y
- b) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 18 donde dicha  
25 secuencia SEQ ID NO: 18 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces.

En otra realización preferida la composición comprende:

- a) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 17 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 17 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces,  
30 y
- b) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 19 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces.

En otra realización preferida la composición comprende:

- a) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 18 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 18 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces, y
  - b) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 19 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces.
- 5

En una realización más preferida la composición comprende:

- a) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 17 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 17 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces,
- 10 b) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 18 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 18 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces, y
- c) un polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 19 donde dicha secuencia SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces, y preferiblemente solo 3 veces.

15

Cabe destacar que tal y como se muestra en los ejemplos de la presente invención la combinación de los péptidos T14 (SEQ ID NO: 1), T15 (SEQ ID NO: 2) y T16 (SEQ ID NO: 3) es la que mejor efecto tienen en cuanto a la supervivencia y protección frente a *Fasciola hepatica*. Por ello en una realización aun más preferida la composición comprende los polipéptidos de secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3.

20 En otra realización preferida la composición comprende el péptido que consiste 3 repeticiones de SEQ ID NO: 17, el péptido que consiste 3 repeticiones de SEQ ID NO: 18 y/o el péptido que consiste 3 repeticiones de SEQ ID NO: 19.

25 Estas composiciones además de uno o varios de los péptidos o polipéptidos de la invención previamente descritos pueden incluir además otros elementos como son por ejemplo, aunque sin limitarse, otros péptidos derivados de organismos del género *Fasciola* y más preferiblemente de *Fasciola hepatica*, adyuvantes, sistemas de liberación, y/o inmunomoduladores de forma que se potencie aun en mayor medida el efecto inmunológico de los polipéptidos.

Se entiende por “péptidos derivados de organismos del género *Fasciola*” en la

presente invención cualquier péptido obtenible de un organismo del género *Fasciola* y que produzca una respuesta inmunitaria en el individuo o potencie la respuesta producida por los péptidos de la invención. Estos péptidos pueden potenciar tanto la respuesta por células T como por células B.

5

En la presente invención se entiende por “individuo” un sujeto que es un mamífero, y que puede ser tanto humano como no humano.

Se entiende por “adyuvante” en la presente invención aquella sustancia que  
10 administrada con un antígeno provoca un aumento en la respuesta inmune y por tanto una mejora en la inmunogenicidad del antígeno así como su eficacia. Además los adyuvantes pueden provocar que la respuesta inmunológica se extienda durante más tiempo. Resultan de interés como adyuvantes por ejemplo, aunque sin limitarse, sales minerales, y más concretamente sales de aluminio, adyuvantes tensoactivos,  
15 adyuvantes derivados de bacterias, emulsiones, liposomas, microesferas poliméricas, citocinas, carbohidratos, o mezclas de los mismos. En la presente invención resultan de especial relevancia como adyuvantes las saponinas y más concretamente las saponinas de *Quillaja saponaria* (Qs). Estas saponinas se pueden encontrar individualizadas o incluidas dentro de extractos obtenidos de dicho organismo y que  
20 incluyan varias de estas saponinas. En la presente invención resulta de especial importancia el adyuvante QS21, el cual es un adyuvante que comprende diversas saponinas de *Quillaja saponaria*. Por todo lo descrito, en una realización preferida la composición de la invención además comprende un adyuvante. En una realización más preferida el adyuvante comprende al menos una saponina de *Quillaja saponaria*.  
25 En una realización más preferida el adyuvante es QS21.

Se entiende por “sistemas de liberación” en la presente invención aquellos sistemas que permiten la encapsulación de los péptidos de forma que estos se vayan liberando de forma lenta y prolongada en el tiempo permitiendo de esta forma mantener el efecto  
30 durante más tiempo. Existen diferentes sistemas de liberación conocidos en el estado de la técnica como por ejemplo aquellos basados en la encapsulación mediante sistemas lipídicos (liposomas) o mediante sistemas poliméricos (microesferas o nanoesferas). Dentro de los sistemas poliméricos se encuentran por ejemplo los sistemas naturales como alginato, dextrano, goma arábica o quitosano, los

semisintéticos como derivados de celulosa (etilcelulosa, acetobutirato de celulosa o acetoftalato de celulosa) o los sintéticos como son los derivados acrílicos o los poliésteres (policaprolactona, ácido poliláctico o copolímeros del ácido láctico y del ácido glicólico). Dentro de los sistemas lipídicos en la presente invención se pueden

5 encontrar por ejemplo, aunque sin limitarse, aceites tanto minerales como no minerales. Entre estos grupos resulta más interesante el uso de los aceites no minerales ya que permiten la formación de micelas dentro de las cuales se encapsulan los polipéptidos y permiten su liberación lenta y por tanto mantienen su efecto durante mayor tiempo. Ejemplos de aceites no minerales que presentan utilidad son por  
10 ejemplo, aunque sin limitarse, Montanide ISA 720 ó Montanide ISA 763A. Por todo ello, en una realización preferida la composición de la invención comprende además un sistema de liberación. En una realización más preferida el sistema de liberación es un aceite no mineral. En una realización aun más preferida el aceite no mineral es Montanide ISA 763A.

15

Se entiende por “inmunomodulador” en la presente invención aquellos compuestos o elementos que permiten modular la respuesta inmune en función de los requerimientos de cada caso. De esta forma existen compuestos que pueden activar esta respuesta inmune mientras que otros la reducen o la suprimen. Estos inmunomoduladores  
20 pueden actuar a diferentes niveles dentro del sistema inmune de forma que se pueden inhibir o intensificar poblaciones o subpoblaciones de células, modular la respuesta inmune o dirigirla a un tipo celular concreto, o provocar la modulación de la producción de mediadores solubles. Los inmunomoduladores pueden ser de acción inespecífica los cuales estimulan o suprimen la respuesta inmune, sin que la actividad de las  
25 células estimuladas vaya dirigida hacia un antígeno determinado, o específicos los cuales ejercen su acción sobre células del sistema inmune en presencia de un antígeno o inmunógeno lo que provoca una especificidad selectiva en la acción de las células para producir una respuesta inmune. La inmunomodulación es selectiva cuando hay estimulación y su resultado significa una inmunorreacción hacia un  
30 antígeno o varios. Los inmunomoduladores pueden ser por ejemplo, aunque sin limitarse, bacilo de Calmette-Guering, levamisol, dipéptido murámico, glucanos (hongos), polisacáridos de algas, hormonas tímicas, proteínas del complemento (globulinas), citocinas como por ejemplo Interleucina 1(IL-1), Interferón gamma (IFN-γ), Interleucina 2 (IL-2), Interleucina 5 (IL-5), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α),

Interleucina 18 (IL-18), Factor de transferencia y factor de crecimiento y diferenciación granulocito-macrófago (GM-CSF), Interleucina 12 (IL-12), lectinas, concanavalina A, fitohemaglutininas (PHA), lipopolisacáridos bacterianos (LPS), ciclosporina, metotrexato, ciclofosfamida, azatriopina, o corticosteroides. En la presente invención 5 resultan de especial relevancia los inmunomoduladores tanto de síntesis química derivados de diaminas o aminoalcoholes como son por ejemplo aunque sin limitarse los inmunomoduladores, OA0004, AA0029 y AA2829, como el inmunomodulador natural PAL el cual es un extracto acuoso del helecho *Polypodium leucotomos* (PAL). Por todo ello, en otra realización preferida la composición de la invención comprende 10 un inmunomodulador. En una realización más preferida el inmunomodulador es OA0004, AA0029, AA2829 o PAL. En una realización aun más preferida el inmunomodulador es AA0029.

La composición de la invención puede comprender además de los polipéptidos 15 descritos previamente, otros péptidos o polipéptidos derivados de organismos del género *Fasciola* y preferiblemente de la especie *Fasciola hepatica*. Tal y como se demuestra en los ejemplos de la invención las composiciones pueden comprender otros polipéptidos que comprendan al menos 3 copias, y preferiblemente solo 3 copias de péptidos derivados de proteínas de *Fasciola hepatica*. Por tanto en otra realización 20 preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención puede comprender además al menos otro péptido derivado de proteínas de *Fasciola hepatica*. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención puede comprender además al menos otro polipéptido que comprende al menos 3 copias de un péptido derivado de proteínas de *Fasciola hepatica*. Dentro 25 de los péptidos derivados de proteínas de *Fasciola hepatica*, resultan de especial interés los incluidos y utilizados en los ejemplos de la presente invención. Por ello, en una realización más preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención comprende además al menos otro polipéptido que comprende al menos 3 copias y preferiblemente solo 3 copias del péptido derivado de proteínas de *Fasciola 30 hepatica* el cual se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27. En una realización aun

más preferida la composición comprende al menos un polipéptido seleccionado de la lista que comprende SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41,

- 5 SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48.

Los polipéptidos o composiciones de la invención tal y como se demuestra en los ejemplos, al ser inoculados en un organismo dan lugar a una respuesta inmunológica  
10 en el mismo, mediante la cual se producen anticuerpos que reconocen los polipéptidos. Debido a la composición de los polipéptidos que incluyen varias copias de un único péptido, algunos de los anticuerpos producidos son capaces de reconocer no sólo el polipéptido sino también el péptido repetido en el polipéptido. Por tanto otro aspecto de la invención se refiere a los anticuerpos producidos por la inmunización de  
15 un animal con cualquiera de los polipéptidos o composiciones de la invención. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el animal inmunizado es un mamífero.

El término “anticuerpo” se refiere a moléculas de inmunoglobulinas o a porciones  
20 inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con los péptidos o polipéptidos de la invención. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')2, los cuales pueden ser generados, por ejemplo, aunque sin  
25 limitarnos, tratando el anticuerpo con una enzima tal como pepsina o mediante técnicas de ingeniería genética conocidas en el estado de la técnica.

El anticuerpo de la invención puede ser policlonal (incluye típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítopos distintos) o monoclonal (dirigido  
30 contra un único determinante en el antígeno). La expresión “anticuerpo monoclonal” alude a una población de moléculas de anticuerpos que contienen solamente una especie de un sitio de fijación de antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítopo particular del antígeno. El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, mediante manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el

anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento del péptido de la invención, y estando sustituidas por otras que producen en el anticuerpo propiedades ventajosas adicionales.

- 5 El anticuerpo de la invención también puede ser recombinante, químico, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un "anticuerpo recombinante" (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora transformada o transfectada con la secuencia nucleotídica de la invención, con un ácido nucleico codificante para el anticuerpo de la invención, o que produce el anticuerpo de la  
10 invención o el péptido de la invención como resultado de la recombinación homóloga. Dicha célula hospedadora incluye una célula en un cultivo celular "*in vitro*" así como una célula en un animal hospedador.

El anticuerpo de la invención también puede ser químico. Así, una región de la  
15 cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de una especie determinada o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos determinados, mientras que la(s) cadena(s) restante(s) es(son) idéntica(s), u homóloga(s), a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos,  
20 así como a fragmentos de dichos anticuerpos, de manera que exhiban la actividad biológica deseada.

La expresión "anticuerpo frente al péptido de la invención" se refiere a que el anticuerpo de la invención reconoce el polipéptido de la invención.

25 Uno de los métodos mediante el que se pueden obtener los anticuerpos de la invención consiste, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en la inmunización de animales con un polipéptido o composición de la invención y la posterior purificación de los anticuerpos específicos para los péptidos o polipéptidos presentes en su suero.

30 Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de anticuerpos específicos frente a los péptidos o polipéptidos de la invención, de ahora en adelante "primer método de la invención", que comprende:

a. Obtener el suero previamente extraído de un animal inmunizado con un polipéptido o composición de la invención, y

b. Purificar los anticuerpos frente al polipéptido usado para inmunizar en el paso (a) presentes en el suero obtenido en la etapa (a).

5

De forma preferible, el animal al que se refiere la etapa (a) del primer método de la invención puede ser, un mamífero, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, conejo, roedores como el ratón o rata, cerdo, caballo, oveja o cabra.

10 El protocolo de inmunización se puede realizar por métodos convencionales, es decir, administrando al animal a inmunizar una única dosis o varias dosis. Otro protocolo de inmunización puede ser el descrito en los ejemplos de la presente invención. Las inmunizaciones se pueden llevar a cabo con cualquiera de los polipéptidos o composiciones de la invención.

15

Las inmunizaciones se pueden llevar a cabo por vía oral o parenteral. Ejemplos de vía parenteral son, aunque sin limitarnos, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. Preferiblemente, el protocolo de inmunización es el que se describe en los ejemplos de la presente invención y puede ser llevado a cabo por 20 un técnico sin formación médica específica.

Una vez producida la inmunización, se extrae el suero del animal inmunizado con el polipéptido o composición de la invención. Se entiende por "suero", "suero sanguíneo" o "suero hemático" el componente de la sangre resultante tras permitir la coagulación

25 de ésta y eliminar el coágulo de fibrina y otros componentes, que contiene numerosos efectores biológicos, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, segregados por los elementos formes al suceder dicha coagulación. Es de un color amarillo, un poco más intenso que el plasma.

30 Posteriormente, se purifican los anticuerpos específicos frente al polipéptido de interés presentes en el suero obtenido en la etapa (a) del método de la invención. Son conocidos en el estado de la técnica diversos métodos de purificación de anticuerpos que podrían llevarse a cabo en la etapa (b) del primer método de la invención, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, métodos electroforéticos o cromatográficos.

La “electroforesis” es una técnica analítica de separación basada en el movimiento o la migración de macro-moléculas disueltas en un medio (*buffer* de electroforesis), mediante una matriz o un sólido apoyo como resultado de la acción de un campo eléctrico. El comportamiento de la molécula depende de su movilidad electroforética y esta movilidad depende de la carga, tamaño y forma. Existen numerosas variaciones de esta técnica basadas en el equipamiento usado, soportes y condiciones para llevar a cabo la separación de las moléculas. La electroforesis se selecciona de la lista que consiste en, pero sin limitarse, electroforesis capilar, electroforesis en papel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida, isoelectroenfoque o electroforesis bidimensional.

Los “métodos cromatográficos” permiten la separación de las moléculas por, aunque sin limitarse, su carga, tamaño, masa molecular, mediante su polaridad o mediante su potencial redox. La técnica de cromatografía se selecciona de entre, pero sin limitarse, cromatografía de partición, filtración, cromatografía de adsorción, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica o cromatografía de afinidad, y pueden realizarse tanto en columna, como en papel o en placa.

Otro aspecto de la invención se refiere al suero que comprende anticuerpos específicos frente a cualquiera de los péptidos o polipéptidos de la presente invención. Este suero también se denominará “suero de la invención”. Dicho suero comprende uno o más anticuerpos frente al polipéptido de la invención.

Como se demuestra en la invención los péptidos o composiciones de la invención presentan utilidad al ser inoculados en un organismo para producir una respuesta inmune específica en el organismo, de forma que se protege al organismo de las infecciones por *Fasciola* y más concretamente por *Fasciola hepatica* al reducir el daño producido por este parásito. Además se evita la muerte de los organismos infectados ya que se reduce la cantidad de vermes presentes. Esta respuesta inmune es la encargada de producir una protección frente a parásitos del género *Fasciola* y especialmente de la especie *Fasciola hepatica*. Como se observa en los ejemplos resulta de especial relevancia la combinación de los polipéptidos de secuencia SEQ ID

- NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 en combinación ya que son los que provocan en el individuo posteriormente infectado por *Fasciola hepatica* una mayor supervivencia, un bajo daño hepático y una mayor reducción de vermes. Por todo esto, tanto otro aspecto de la invención se refiere al uso de los polipéptidos, secuencias nucleotídicas,
- 5 construcciones genéticas, vectores de expresión, células, composiciones, sueros o anticuerpos de la invención para la elaboración de un medicamento o alternativamente a los polipéptidos, secuencias nucleotídicas, construcciones genéticas, vectores de expresión, células, composiciones, sueros o anticuerpos de la invención para su uso como medicamento. Una realización preferida se refiere al uso de los polipéptidos,
- 10 secuencias nucleotídicas, construcciones genéticas, vectores de expresión, células, composiciones, sueros o anticuerpos de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de infecciones producidos por organismos del género *Fasciola*, preferiblemente de la especie *Fasciola hepatica* o alternativamente a los polipéptidos, secuencias nucleotídicas, construcciones
- 15 genéticas, vectores de expresión, células, composiciones, sueros o anticuerpos de la invención para su uso como medicamento para la prevención o el tratamiento de infecciones producidos por organismos del género *Fasciola*, preferiblemente de la especie *Fasciola hepatica*.
- 20 Otra realización preferida se refiere al uso de los polipéptidos, secuencias nucleotídicas, construcciones genéticas, vectores de expresión, células, composiciones, sueros o anticuerpos de la invención para la elaboración de un medicamento donde el medicamento es una vacuna o alternativamente a los polipéptidos, secuencias nucleotídicas, construcciones genéticas, vectores de
- 25 expresión, células, composiciones, sueros o anticuerpos de la invención para su uso como medicamento donde el medicamento es una vacuna.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para tratar a pacientes infectados por el parásito del género *Fasciola*, preferiblemente de *Fasciola hepatica*, el cual

30 comprende la administración de los polipéptidos, secuencias nucleotídicas, construcciones genéticas, vectores de expresión, células, composiciones o anticuerpos de la invención.

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 figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitantes de la presente invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 **Fig. 1** representa los niveles de anticuerpos IgG totales, determinados mediante ELISA, específicos para cada uno de los péptidos utilizados.

15 **Fig. 2** representa los niveles de IFN- $\gamma$  en ratones inmunizados con cada uno de los péptidos sintéticos medido mediante citometría de flujo. A: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítopos B; B: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítopos T.

20 **Fig. 3** representa los niveles de IL-4 en ratones inmunizados con cada uno de los péptidos sintéticos medido mediante citometría de flujo. A: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítopos B; B: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítopos T.

25 **Fig. 4** representa los niveles de IL-10 en ratones inmunizados con cada uno de los péptidos sintéticos medido mediante citometría de flujo. A: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítopos B; B: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítopos T.

30 **Fig. 5** representa los niveles de IL-17 en ratones inmunizados con cada uno de los péptidos sintéticos medido mediante citometría de flujo. A: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítopos B; B: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítopos T.

**Fig. 6** representa el porcentaje de CD62L en ratones inmunizados con cada uno de los péptidos sintéticos medido mediante citometría de flujo. A: Ratones inmunizados con

los péptidos que contienen epítopos B; B: Ratones inmunizados con los péptidos que contienen epítopos T.

- Fig. 7.** Análisis macroscópico del hígado de ratones inmunizados e infectados con metacercarias de *Fasciola hepatica*. A: Hígado de un ratón del grupo control sano; B: Hígado de un ratón del grupo de control de la infección; C: Hígado de un ratón inmunizado con la mezcla de péptidos T14 (SEQ ID NO: 1) + T15 (SEQ ID NO: 2) + T16 (SEQ ID NO: 3) e infectado con metacercarias de *Fasciola hepatica*.
- 10 **Fig. 8** representa los niveles de anticuerpos IgG totales, determinados mediante ELISA, con cada una de las mezclas complejas de antígenos.

## EJEMPLOS

15 **Diseño de péptidos:**

Debido a que en la actualidad no se encuentra disponible el genoma completo de *F. hepatica*, solamente se encuentra información parcial de secuencias de genes y proteínas en las bases de datos. Todas las secuencias de proteínas disponibles de *F. hepatica* fueron recogidas de la base de datos NCBI. Para seleccionar aquellas 20 proteínas que posiblemente son secretadas, cada secuencia obtenida fue individualmente analizada para detectar la presencia de péptido señal (SP) y la ausencia de dominios de unión transmembrana (TM). El dominio de péptido señal fue identificado mediante el servidor SignalP 3.0 (Bendsten et al., 2004, *J. Mol Biol.*, 4: 783-95) y la predicción del dominio transmembranal mediante el servidor TMHMM2.0. 25 Solamente aquellas proteínas que presentaron péptido señal y ningún dominio de unión transmembranal fueron finalmente seleccionadas y agrupadas en familias comunes.

- Péptidos que contienen epítopos B: Para la predicción de epitopos B lineales 30 se utilizaron las herramientas BepiPred (Larsen et al. 2006, *Immunome Res*, 2:2), y Antheprot (Deléage et al. 2001, *Comput Biol Med*, 31:258-267). En el método empleado por BepiPred, a partir de una secuencia de aminoácidos de una proteína en formato FASTA como entrada, cada aminoácido recibe un puntaje basado en algoritmos de Modelos Ocultos de Markov (HMM) y de

Redes Neuronales (NN) e incorpora métodos basado en la hidrofilicidad y predicción de estructura secundaria.

Los valores obtenidos por este método fueron comparados con aquellos dados por el programa ANTHEPROT 3D el cual se basa en propiedades físicas y químicas de los aminoácidos, tales como antigenicidad, hidrofobicidad, flexibilidad y acceso al solvente. Las secuencias de aminoácidos con los mayores puntajes fueron agrupadas en secuencias de 20 aminoácidos y solamente aquellas regiones que mostraron los mayores puntajes de probabilidad ( $\geq 0,5$  de acuerdo al resultado HMM) fueron seleccionadas como epitopos B lineales (Kolaskar A.S. et al. 1990, *FEBS letters*, 276:172-174; Larsen et al. 2006, *Immunome Res*, 2:2).

- Péptidos que comprenden epítopos T: Las herramientas de predicción SYFPEITHI (Rammensee et al. 1999, *Immunogenetics*, 50:213-219) e IEDB (Immune Epitope Database) fueron usadas para predecir el anclaje de péptidos derivados de las proteínas seleccionadas al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. La predicción de epítopos T fue realizada empleando como referencia las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II de ratón (H2-IAd y H2-IEd). Los péptidos diseñados siguiendo esta metodología corresponden a secuencias de 15 aminoácidos de longitud. Las secuencias de aminoácidos seleccionadas corresponden a aquellas secuencias que presentan los mayores valores “scores”, diseñándose dos péptidos por cada secuencia de proteína.

25

#### Síntesis de péptidos:

Se utilizó la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida desarrollada por Merrifield (Merrifield 1969, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 32:221-296) y modificada por Houghten (Houhgten 1985, *Proc Nat Acad Sci USA*, 82:5131-5135) con algunas modificaciones. En este procedimiento se distinguen cuatro pasos fundamentales:

- i. Acople del primer aminoácido protegido (t-Boc) por el extremo carboxilo terminal a una resina sólida, inerte y estable que va a soportar los polipéptidos sintetizados mediante un enlace covalente tipo éter.

ii. Desprotección (clivaje del grupo t-Boc) del aminoácido acoplado en el paso anterior, exponiendo así el grupo funcional amino del extremo N-terminal.

iii. Activación del grupo carboxílico del aminoácido t-Boc que va a ser acoplado.

iv. Acople del aminoácido t-Boc activado en el paso anterior al aminoácido que está unido covalentemente a la resina (formación del enlace amida peptídico).

5

10 Estos pasos son repetidos simultáneamente dependiendo del número de aminoácidos que se deseen acoplar a la cadena peptídica. Al final del último acople y desprotección se sigue un procedimiento de clivaje para retirar el polipéptido de la resina, así como para eliminar grupos protectores adicionales que eventualmente pudieran tener algunos aminoácidos que contengan en su estructura grupos funcionales reactivos,

15 por ejemplo, aminoácidos con grupos -OH, - COOH y -SH libres.

Cada vez que se realiza el acople de un aminoácido y la desprotección del mismo, se debe hacer una prueba analítica cualitativa para verificar que estos pasos han sido correctamente desarrollados. La prueba cualitativa empleada se denomina el test de Kaiser (Kaiser *et al.* 1970, *Anal Biochem*, 34;595-598) que detecta la presencia de grupos amino libres en aminas primarias y secundarias. Cuando el test de Kaiser resulta positivo se produce una coloración azul de la resina y es debido a que la unión de un aminoácido a otro ha sido incompleto y se detecta la presencia de grupos amino libres, o bien la desprotección ha sido completa y los grupos amino del último aminoácido acoplado están libres para formar el enlace peptídico con el siguiente aminoácido t-Boc. En caso contrario no se produce dicha coloración azul.

Inicialmente se parte de una resina de MBHA (Hidrocloruro de Metilbenzildrilamina) con una sustitución de 0,50 meq/gramo, la cual se neutraliza con DIEA (N,N – Diisopropiletilamina) al 5% en DCM (Diclorometano), los aminoácidos t-Boc son acoplados utilizando como activadores del grupo alfa carboxílico DCC (dicitclohexilcarbodiimida) y HOBr (1-hidroxi-benzotriazol) en DMF (Dimetil-formamida). Para confirmar la unión del aminoácido se realiza el test de Kaiser. Una vez acoplado el aminoácido, el grupo protector t-Boc se remueve con TFA (Ácido trifluoroacético) al

55% en DCM por 25 minutos. Antes del siguiente acople, el péptido-resina se neutraliza con DIEA al 5% en DCM. Al finalizar la síntesis del péptido el clivaje de los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y el desanclaje del péptido de la resina se hace con las técnicas de clivaje bajo (25% HF) y clivaje alto (100% HF). Finalmente, se añadieron un residuo de glicina y uno de cisteína en los extremos amino y carboxilo-terminal de cada péptido para permitir su polimerización por oxidación (Lioy *et al.* 2001, *Angew Chem Int Ed Engl*, 40;2631-2635), dando como resultado la generación de polipéptidos formados mayoritariamente por trímeros de cada monómero.

10

Mediante la síntesis de péptidos en fase sólida se sintetizaron los monómeros indicados en la tabla 1 a los que se añadió una glicina y una cisteína en cada uno de los extremos amino y carboxilo terminal. Posteriormente mediante reacción de oxidación se fusionaron 3 monómeros de cada péptido mediante la cisteína de los extremos para dar los polipéptidos de la tabla 2.

15  
Tabla 1: péptidos sintetizados

Familia	Péptido	Secuencia de aminoácidos del monómero	Peso molecular (KDa)	Posición
Amebapor 1	B1	kgagssqdacikfqiyevdg (SEQ ID NO: 4)	2437,1	63-82
Amebapor 1	B2	kgagssqdatikfqiyevdg (SEQ ID NO: 5)	2435	63-82
Amebapor 2	B3	fasfdvpskqptididlcdi (SEQ ID NO: 6)	2545,3	14-33
Amebapor 2	B4	fasfdvpskqptididltdi (SEQ ID NO: 7)	2543,2	14-33
Catepsina B1	B5	iseirdqsstsstwavssas (SEQ ID NO: 8)	2419,9	79-98
Catepsina B2	B6	gvengvkywlilianswnegwg (SEQ ID NO: 9)	2600,3	293-312
Catepsina L1	B7	qtcsplrvnhavlavgyggtq (SEQ ID NO: 10)	2435	260-279
Catepsina L1	B8	qttsplrvnhavlavgyggtq (SEQ ID NO: 11)	2432,9	260-279
Cistatina 1	B9	yteprsvtpeersvfqpmil (SEQ ID NO: 12)	2700,2	27-46
Cistatina 2	B10	fvplyssksatsvgtptrvs	2405,1	95-114

		(SEQ ID NO: 13)		
Legumaína 2	B11	vttngppngkhndkhtyvec (SEQ ID NO: 14)	2532,2	350-369
Legumaína 2	B12	vttngppngkhndkhtyvet (SEQ ID NO: 15)	2530,1	350-369
Amebaporó	T13	tvnlvkrllqnsvve (SEQ ID NO: 16)	2032,5	37-51
Amebaporó	T14	dyiidhvqdqhnamei (SEQ ID NO: 17)	2103,6	80-94
Catepsina B	T15	drntqrqtvrysse (SEQ ID NO: 18)	2159,3	46-60
Catepsina B	T16	fymfedflvyksiy (SEQ ID NO: 19)	2243,1	260-274
Catepsina L	T17	kyltemsrasdilsh (SEQ ID NO: 20)	2071,9	83-97
Catepsina L	T18	isfseqqlvdtsgpw (SEQ ID NO: 21)	2014,3	153-167
Catepsina L	T19	enayeylkhnngle (SEQ ID NO: 22)	2130,7	178-192
Citocromo oxidasa	T20	ldpyfnlvspevyny (SEQ ID NO: 23)	2153,7	27-41
Citocromo oxidasa	T21	dlnlprlnhalsawll (SEQ ID NO: 24)	2029,9	76-90
Vitelina	T22	faghgkaylhgsfdk (SEQ ID NO: 25)	1955,9	56-70
Vitelina	T23	yekyeddyaretpyd (SEQ ID NO: 26)	2276,7	254-268
NADH	T24	lgigflvevrrgyvr (SEQ ID NO: 27)	2054,9	101-115

Tabla 2: Secuencias de los polipéptidos

Polipéptido	Secuencia
B1	cg kgagssqdacikfiqyevdg gccg kgagssqdacikfiqyevdg gccg kgagssqdacikfiqyevdg gc (SEQ ID NO: 28)
B2	cg kgagssqdatikfiqyevdg gccg kgagssqdatikfiqyevdg gccg kgagssqdatikfiqyevdg gc (SEQ ID NO: 29)
B3	cg fasfdvpskqptididlcdi gccg fasfdvpskqptididlcdi gccg fasfdvpskqptididlcdi gc (SEQ ID NO: 30)
B4	cg fasfdvpskqptididltdi gccg fasfdvpskqptididltdi gccg fasfdvpskqptididltdi gc (SEQ ID NO: 31)

ES 2 525 106 B1

B5	cg iseirdqsstsstwavssas gccg iseirdqsstsstwavssas gccg iseirdqsstsstwavssas gc (SEQ ID NO: 32)
B6	cg gvengvkywlianswnegwg gccg gvengvkywlianswnegwg gccg gvengvkywlianswnegwg gc (SEQ ID NO: 33)
B7	cg qtcsplrvnhavlavgygtq gccg qtcsplrvnhavlavgygtq gccg qtcsplrvnhavlavgygtq gc (SEQ ID NO: 34)
B8	cg qttsplrvnhavlavgygtq gccg qttsplrvnhavlavgygtq gccg qttsplrvnhavlavgygtq gc (SEQ ID NO: 35)
B9	cg yteprsvtpeersvfqpmil gccg yteprsvtpeersvfqpmil gccg yteprsvtpeersvfqpmil gc (SEQ ID NO: 36)
B10	cg fvplyssksatsvgptrvs gccg fvplyssksatsvgptrvs gccg fvplyssksatsvgptrvs gc (SEQ ID NO: 37)
B11	cg vtngppngkhndkhtyvec gccg vtngppngkhndkhtyvec gccg vtngppngkhndkhtyvec gc (SEQ ID NO: 38)
B12	cg vtngppngkhndkhtyvet gccg vtngppngkhndkhtyvet gccg vtngppngkhndkhtyvet gc (SEQ ID NO: 39)
T13	cg tvnlvkrlqlqnsvve gccg tvnlvkrlqlqnsvve gccg tvnlvkrlqlqnsvve gc (SEQ ID NO: 40)
T14	cg dyiidhvqdqhnatei gccg dyiidhvqdqhnatei gccg dyiidhvqdqhnatei gc (SEQ ID NO: 1)
T15	cg drntqrqtvrysve gccg drntqrqtvrysve gccg drntqrqtvrysve gc (SEQ ID NO: 2)
T16	cg fymfedflvyksgiy gccg fymfedflvyksgiy gccg fymfedflvyksgiy gc (SEQ ID NO: 3)
T17	cg kyltemsrasdilsh gccg kyltemsrasdilsh gccg kyltemsrasdilsh gc (SEQ ID NO: 41)
T18	cg isfseqqlvdtsgpw gccg isfseqqlvdtsgpw gccg isfseqqlvdtsgpw gc (SEQ ID NO: 42)
T19	cg enayeylkhanglete gccg enayeylkhanglete gccg enayeylkhanglete gc (SEQ ID NO: 43)
T20	cg ldpyfnlvspevyny gccg ldpyfnlvspevyny gccg ldpyfnlvspevyny gc (SEQ ID NO: 44)

T21	cg dlnlprlnalsawll gccg dlnlprlnalsawll gccg dlnlprlnalsawll gc (SEQ ID NO: 45)
T22	cg faghgkaylhgsfdk gccg faghgkaylhgsfdk gccg faghgkaylhgsfdk gc (SEQ ID NO: 46)
T23	cg yekyeddyaretpyd gccg yekyeddyaretpyd gccg yekyeddyaretpyd gc (SEQ ID NO: 47)
T24	cg lgigflvevrrgyvr gccg lgigflvevrrgyvr gccg lgigflvevrrgyvr gc (SEQ ID NO: 48)

**Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de los péptidos sintéticos en macrófagos peritoneales de ratón:**

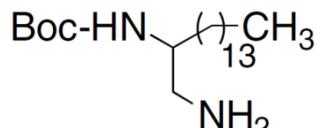
Los péptidos sintetizados se analizaron para determinar su toxicidad con la finalidad de poder descartar aquellos que pudieran generar reacciones no adecuadas en un organismo. Para ello se estableció un cultivo continuo *in vitro* de la línea celular J774.2 derivada de macrófagos peritoneales de ratón. Brevemente, el vial que contenía los macrófagos fue descongelado rápidamente en un baño a 37°C y puesto en un frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> de área superficial junto con 10 mL de medio completo de cultivo (DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2mM de L-glutamina y penicilina-estreptomicina) que se incuba en cámara de 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante 48-72 h. Pasado este tiempo, el sobrenadante de cultivo fue retirado del frasco de cultivo y los macrófagos adheridos a la superficie fueron retirados añadiendo 5 mL de Versene (Gibco) e incubados durante 10 minutos a 37°C / 5% CO<sub>2</sub>. Los macrófagos fueron recuperados por centrifugación a 1.200 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y los macrófagos fueron resuspendidos en 10 mL de medio completo de cultivo con el fin de ser cuantificados en cámara de Neubauer. Un millón de macrófagos por cada pocillo fueron puestos en placas de cultivo e incubados durante 2 h a 37°C / 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, todos los péptidos sintéticos fueron añadidos por duplicado en un rango de concentraciones entre 5 y 100 µg/mL por un periodo de 24 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo, el sobrenadante de cultivo fue recuperado y almacenado a -20° C para la posterior cuantificación de la producción de óxido nítrico. Los macrófagos adheridos a la superficie de la placa fueron tratados con el colorante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio) para evaluar la viabilidad celular (Ferrari *et al.* 1990, *J Immunol Methods*, 131; 165-172).

### Sistema ADAD de vacunación

Para la inmunización de los ratones con los péptidos sintéticos se utilizó el sistema ADAD de vacunación para potenciar el efecto de los péptidos, el cual presenta la siguiente composición:

- 5      - Extracto no-tóxico de *Quillaja saponaria* como adyuvante.
- Inmunodulador de síntesis química AA0029.
- Aceite no-mineral Montanide ISA 763A que forma una emulsión (aceite/agua) (70/30) y permite una liberación lenta del antígeno.
  
- 10     El adyuvante utilizado (*Quillaja saponaria*) está compuesto por 4 fracciones purificadas de un extracto, denominadas: Qs21, Qs18, Qs17y Qs7, las cuales no mostraban actividad hemolítica.

Como inmunomodulador sintético, se empleo la diamina alifática AA0029 de fórmula:



- 15     en una dosis de 100 µg / ratón. Este compuesto fue sintetizado siguiendo la metodología descrita por del Olmo (del Olmo *et al.* 2006, *Bioorg Med Chem Lett*, 16;6091-6095). AA0029 inhibe la proliferación de linfocitos en cultivo de esplenocitos en un rango de concentraciones entre 1 y 10 µg / mL, no presenta citotoxicidad ( $\approx 4\%$ ) y
- 20     aumenta la producción de óxido nítrico ( $\approx 25\%$ ) en macrófagos alveolares de rata pre-estimulados con LPS, por lo cual se sugiere su uso como inmunomodulador.

- El protocolo de vacunación con el sistema ADAD consta de dos inyecciones para cada administración: la primera está compuesta por el adyuvante, el inmunomodulador y el aceite no-mineral Montanide ISA 763A formando una emulsión aceite/agua (70/30), administrada por vía subcutánea como un primer paso de adaptación del sistema inmune. Cinco días después de la inyección de adaptación se realiza la primera dosis de inmunización que incluye además de los componentes anteriormente mencionados el antígeno vacunal.

30

### Inmunización de ratones BALB/c con los péptidos sintéticos

Se emplearon para este estudio 84 ratones hembras de la cepa BALB/c de seis semanas de edad procedentes de Charles River Laboratorios España (Griffa, S.A.).

Todos los animales fueron tratados de acuerdo a las disposiciones de la Unión

- 5 Europea, recogidas en el Real Decreto 1201/2005 del 10 de Octubre del Ministerio de Agricultura, Pesca y Ganadería “Protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines específicos”.

Para los estudios de valoración de la respuesta inmunológica, se inmunizaron grupos

- 10 de tres ratones cada uno con los diferentes péptidos, empleando el sistema de vacunación ADAD usando el inmunomodulador de síntesis química AA0029.

Se realizaron dos experimentos de inmunización, en los cuales se utilizaron 42 ratones

por cada experimento. La distribución de los ratones en los diferentes grupos se

- 15 muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Distribución de los ratones en grupos de inmunización con epítopos de péptidos B y T. Cada grupo consta de tres ratones hembra de la cepa BALB/c.

Experimento 1			Experimento 2		
Grupo	Antígeno	Inmunomodulador	Grupo	Antígeno	Inmunomodulador
1	Sano		1	Sano	
2	Adyuvante	AA0029	2	Adyuvante	AA0029
3	B1 (SEQ ID NO: 28)	AA0029	3	T13 (SEQ ID NO: 40)	AA0029
4	B2 (SEQ ID NO: 29)	AA0029	4	T14 (SEQ ID NO: 1)	AA0029
5	B3 (SEQ ID NO: 30)	AA0029	5	T15 (SEQ ID NO: 2)	AA0029
6	B4 (SEQ ID NO:	AA0029	6	T16 (SEQ ID NO: 3)	AA0029

	31)				
7	B5 (SEQ ID NO: 32)	AA0029	7	T17 (SEQ ID NO: 41)	AA0029
8	B6 (SEQ ID NO: 33)	AA0029	8	T18 (SEQ ID NO: 42)	AA0029
9	B7 (SEQ ID NO: 34)	AA0029	9	T19 (SEQ ID NO: 43)	AA0029
10	B8 (SEQ ID NO: 35)	AA0029	10	T20 (SEQ ID NO: 44)	AA0029
11	B9 (SEQ ID NO: 36)	AA0029	11	T21 (SEQ ID NO: 45)	AA0029
12	B10 (SEQ ID NO: 37)	AA0029	12	T22 (SEQ ID NO: 46)	AA0029
13	B11 SEQ ID NO: 38)	AA0029	13	T23 (SEQ ID NO: 47)	AA0029
14	B12 (SEQ ID NO: 39)	AA0029	14	T24 (SEQ ID NO: 48)	AA0029

Los ratones fueron inmunizados por vía subcutánea con 10 µg de cada péptido sintético formulado en el sistema ADAD de vacunación en el día 0. Dos dosis de refuerzo fueron aplicadas con la misma cantidad de antígeno en los días 14 y 28, 5 respectivamente. Se incluyó en este experimento un grupo de ratones como control sano que no fueron inmunizados durante el experimento y un grupo de ratones que solo recibieron los componentes del sistema ADAD. Dos semanas después de la última dosis de inmunización todos los ratones fueron necropsiados a fin de caracterizar la respuesta inmunológica inducida.

**Detección de anticuerpos específicos en suero de ratones inmunizados con cada péptido por la técnica de ELISA.**

Se emplearon placas de 96 pocillos y cada pocillo fue cargado con 1 µg de cada péptido sintético en un volumen final de 100 µL en tampón carbonato pH 9,6 e incubado durante 1 h a 37°C, 12 h a 37°C y finalmente 1 h más a 37°C. Las placas fueron lavadas tres veces con PBS-0,05% Tween (PBS-T) y bloqueadas con 200 µL por pocillo de una solución de leche descremada al 5% en PBS-T durante 1 h a 37°C. Las placas fueron lavadas nuevamente tres veces con PBS-T. Las muestras de suero obtenidas de cada ratón de cada uno de los dos experimentos de inmunización fueron incubadas en una dilución 1:100 en leche descremada al 5% en PBS-T durante 1 h a 37°C. Posteriormente las placas fueron lavadas como en los pasos anteriores y los anticuerpos secundarios de ratón acoplados a peroxidasa anti-IgG, IgE, IgM, así como de los subtipos IgG1 e IgG2a fueron incubados durante 1 hora a 37°C en una dilución 1:1000 en leche descremada al 5% en PBS-T. Las placas fueron lavadas y reveladas empleando el substrato de la peroxidasa OPD (*o*-fenilendiamina dihidrocloruro) en buffer citrato pH 5,0, la cual da como resultado una coloración amarillo-naranja que se mide a una longitud de onda de 492 nm en un espectrofotómetro Anthos 2010.

Los péptidos que presentaron los mayores títulos de anticuerpos ( $p<0,05$ ) corresponden a los denominados B1 (SEQ ID NO: 28), B3 (SEQ ID NO: 30), B4 (SEQ ID NO: 31), B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33), T13 (SEQ ID NO: 40), T15 (SEQ ID NO: 2), T18 (SEQ ID NO: 42), T20 (SEQ ID NO: 44) y T21 (SEQ ID NO: 45) (Figura 1).

Todos los ratones utilizados en los experimentos de inmunización fueron necropsiados dos semanas después de la tercera inmunización y los esplenocitos fueron obtenidos siguiendo la metodología descrita por López-Aban (López-Aban *et al.* 2007, *J Parasitol*, 93:428-432) con algunas modificaciones. Brevemente, los bazo de los ratones fueron extraídos y puestos en una caja de Petri que contenía 10 mL de PBS 1X estéril. Los extremos de cada bazo fueron cortados y perfundidos con 10 mL de PBS 1X estéril. Los esplenocitos fueron recuperados por centrifugación a 1.200 rpm

durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente los glóbulos rojos fueron lisados añadiendo 1 mL de solución de lisis que contenía cloruro de amonio (154 mM), bicarbonato de potasio (10 mM) y EDTA (0,082 mM) durante 5 min a 4° C. El sobrenadante que contiene los glóbulos rojos lisados fue descartado y los esplenocitos

5 fueron recuperados por centrifugación a 1.200 rpm durante 5 min y lavados con 5 mL de PBS 1X – 2% SFB para eliminar restos de la solución de lisis. Finalmente, los esplenocitos fueron resuspendidos en 1 mL de PBS 1X – 2% Suero Fetal Bovino (SFB) y cuantificados en cámara de Neubauer.

10 Un millón de esplenocitos fueron incubados en placas de cultivo de 6 pocillos en un volumen final de 1 mL de medio completo de cultivo y dejados en cámara de 37°C /5% CO<sub>2</sub> / 6 h. Pasado este tiempo los esplenocitos de cada ratón fueron reestimulados con 10 µg / mL del péptido con el que fueron inmunizados. El sobrenadante de cultivo fue recuperado a las 72 horas y las citocinas del perfil Th1 (IFN-γ, TNF-α, IL-2), Th2

15 (IL-4, IL-5, IL-6), Treg (IL-10), Th 17 (IL17), IL-1α y el factor estimulante de colonias granulocitos / macrófagos (GM-CSF) fueron cuantificadas empleando el kit *FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10plex*, por citometría de flujo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se dispone de unas esferas que están

20 cargadas con anticuerpos específicos que reaccionan con cada citocina que va a ser detectada en este sistema. Las esferas son diferenciadas en citómetro de flujo al tener dos tamaños diferentes (4 µm y 5 µm) y emitir diferentes intensidades de fluorescencia. De esta forma, se pueden distinguir 10 subpoblaciones de esferas diferentes, cada una correspondiente con la citocina que se desea cuantificar. Posteriormente, una mezcla de todas las esferas cargadas con cada anticuerpo para

25 las diferentes citocinas que se van a cuantificar son incubadas con la muestra a analizar, dando como resultado la unión de las citocinas a su anticuerpo correspondiente. Posteriormente se añade una mezcla de anticuerpos secundarios conjugados con biotina, los cuales se unen a las citocinas que previamente se habían unido a las esferas marcadas con anticuerpo primario. Finalmente, el conjugado

30 Streptavidin – Phycoerithrin es adicionado y se une al anticuerpo secundario conjugado con biotina, emitiendo señales fluorescentes que son detectadas en el citómetro de flujo y posteriormente analizadas con el software *FlowCytomix Pro* de Bender MedSystems. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACScalibur de cuatro colores del Servicio de Citometría de Flujo del Centro

de Investigación del Cáncer – CIC - de la Universidad de Salamanca. La concentración de cada citocina fue determinada a partir de curvas de calibración usando citocinas recombinantes de ratón de concentración conocida.

- 5 Las citocinas más representativas pertenecientes a los perfiles inmunológicos Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4), Treg (IL-10) y Th17 (IL-17) fueron determinadas en cada grupo de ratones inmunizados con los péptidos sintéticos y a continuación se describen aquellos péptidos que al inmunizarlos en los ratones produjeron aumentos estadísticamente significativos ( $p<0,05$ ) comparado con el grupo control.

10

Los péptidos B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33), T14 (SEQ ID NO: 1) y T15 (SEQ ID NO: 2) produjeron un aumento en los niveles de IL-4 (Figuras 2A y 2B). Como se ilustra en las figuras 3A y 3B, los péptidos B1 (SEQ ID NO: 28), B5 (SEQ ID NO: 32), T15 (SEQ ID NO: 2) y T16 (SEQ ID NO: 3) aumentaron los niveles de IFN- $\gamma$  y los péptidos B2 (SEQ ID NO: 4), T13 (SEQ ID NO: 40), T14 (SEQ ID NO: 1), T15 (SEQ ID NO: 2) y T16 (SEQ ID NO: 3) presentaron altos niveles de IL-10 (Figuras 4A y 4B). Por último, los péptidos B5 (SEQ ID NO: 32) y T16 (SEQ ID NO: 3) mostraron altos niveles de IL-17 (Figuras 5A y 5B).

- 20 **Determinación de subpoblaciones linfocitarias en esplenocitos tras la inmunización con los péptidos sintéticos por citometría de flujo.**

Se emplearon para este estudio los esplenocitos de cada ratón obtenidos en el apartado anterior. A 100  $\mu$ L de la suspensión de esplenocitos se añadió anticuerpo de bloqueo CD16/CD32 en un volumen final de 25  $\mu$ L por pocillo y en una dilución de 0.1  $\mu$ L anticuerpo / muestra en solución de lavado PBS – 2% SFB. Se homogenizó muy bien y se dejó 5 min sobre hielo.

- 30 Se hizo la preparación de un MasterMix (mezcla de anticuerpos específicos para cada una de las subpoblaciones linfocitarias a estudiar) añadiendo 0.5  $\mu$ L de anticuerpo en 25  $\mu$ L de solución de lavado (PBS 1X - 2% SFB). A cada pocillo de cada serie a determinar se añadieron 25  $\mu$ L de MasterMix y se dejó incubar durante 30 min a 4° C. Posteriormente, las placas fueron lavadas con 100  $\mu$ L de solución de lavado, homogenizados, centrifugados a 1.500 rpm y el sobrenadante descartado. Finalmente se añadieron 100  $\mu$ L por cada pocillo de solución fijadora (2% p-formaldehido en PBS

1X) y los tubos se dejaron en la oscuridad a 4° C hasta la adquisición de datos en el citómetro de flujo. El análisis de los resultados se hizo empleando el software Gatedlogic™ Flow Cytometry Analysis Software (Inivai Technologies Pty Ltd). En la tabla 4 se muestran las subpoblaciones linfocitarias estudiadas.

5

Tabla 4: Subpoblaciones linfocitarias cuantificadas en esplenocitos de ratones inmunizados.

SERIE	ANTICUERPO	FLUOROCROMO
<b>Linfoide</b>	CD45	PerCP-Cy5.5
	CD4	FITC
	CD8	PE
	CD45R/B220	APC
<b>Mieloide</b>	CD45	PerCP-Cy5.5
	CD27	APC
<b>Memoria</b>	CD45	PerCP-Cy5.5
	CD197 (CCR7)	PE
	CD62L	APC

Respecto a las subpoblaciones linfocitarias, un aumento en los niveles de CD62L se  
10 observó en el grupo de ratones inmunizados con los péptidos B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33), B7 (SEQ ID NO: 34), B8 (SEQ ID NO: 35), B9 (SEQ ID NO: 36), B10 (SEQ ID NO: 37), B11 (SEQ ID NO: 38), T16 (SEQ ID NO: 3), T17 (SEQ ID NO: 41), T18 (SEQ ID NO: 42), T19 (SEQ ID NO: 43), T22 (SEQ ID NO: 46) y T23 (SEQ ID NO: 47) (Figura 6).

15

#### **Selección de péptidos para ser utilizados en ensayos de protección frente a la infección por metacercarias de *Fasciola hepatica*.**

De los péptidos se seleccionaron varios en función de los siguientes criterios:

- 1) El perfil de respuesta Th1. Se seleccionaron péptidos que aumentaban los niveles de IFN-γ, niveles de IL-2 y/o IL-1α.
- 20 2) Péptidos que estimulen citocinas del perfil Th2 (IL-4,), Treg (IL-10) y Th17 (IL-17).
- 3) Péptidos que presenten un aumento en los marcadores de células memoria (CD62L, CD197, CD27).

25 De acuerdo al perfil inmunológico producido tras la inmunización de ratones con los péptidos sintéticos, los péptidos denominados B1 (SEQ ID NO: 28), B2 (SEQ ID NO: 28), B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33), T14 (SEQ ID NO: 1), T15 (SEQ ID NO:

2) y T16 (SEQ ID NO: 3) fueron seleccionados para realizar los posteriores ensayos de protección *in vivo* en modelo murino frente a la infección experimental con metacercarias de *Fasciola hepatica*.

5 **Estudios de protección en ratones CD1 inmunizados con los péptidos seleccionados e infectados con metacercarias de *Fasciola hepatica***

Animales

Se utilizaron en este estudio 98 ratones hembra de la cepa CD1 (Laboratorios Charles 10 River, Barcelona, España) de seis semanas de edad y con un peso comprendido entre 20 y 35 g. Los animales fueron mantenidos en jaulas plásticas con comida y agua *ad libitum*, periodos controlados de 12 h de luz / oscuridad y una temperatura de 20° C en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

15

Parásitos

Se utilizaron metacercarias de *Fasciola hepatica* provenientes de Ridgeway Research Ltd (Gloucestershire, United Kingdom) y fueron mantenidas a 4° C en una solución acuosa que contiene 0.4% de carboximetilcelulosa hasta el momento de su uso. La 20 viabilidad de las metacercarias fue confirmada bajo observación microscópica antes de la infección.

Antígenos

Se emplearon en este estudio siete péptidos derivados de proteínas de *F. hepatica* 25 que contienen epítropos B y epítropos T y que fueron seleccionados de acuerdo a la respuesta inmunológica.

Inmunización

Un total de 98 ratones hembras de la cepa CD1 fueron divididos en 14 grupos para ser 30 inmunizados con los diferentes antígenos como se indica en la tabla 5. Siete ratones fueron asignados a cada grupo.

Tabla 5. Distribución de los ratones en grupos de inmunización.

Grupo	Antígeno	*Dosis/ Antígeno	Grupo	Antígeno	*Dosis/ Antígeno
1	Sin tratamiento		8	B1 (SEQ ID NO: 28), B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33)	3,3 µg
2	Control infección		9	B6 (SEQ ID NO: 33), T14 (SEQ ID NO: 1)	5 µg
3	Control adyuvante		10	T14 (SEQ ID NO: 1)	10 µg
4	B1 (SEQ ID NO: 28)	10 µg	11	T15 (SEQ ID NO: 2)	10 µg
5	B2 (SEQ ID NO: 29)	10 µg	12	T16 (SEQ ID NO: 3)	10 µg
6	B5 (SEQ ID NO: 32)	10 µg	13	T14 (SEQ ID NO: 1), T15 (SEQ ID NO: 2), T16 (SEQ ID NO: 3)	3,3 µg
7	B6 (SEQ ID NO: 33)	10 µg	14	B1 (SEQ ID NO: 28), B2 (SEQ ID NO: 29), B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33), T14 (SEQ ID NO: 1), T15 (SEQ ID NO: 2), T16 (SEQ ID NO: 3)	1,4 µg

\* Dosis individual de cada antígeno.

Las dosis de los demás componentes del sistema ADAD de vacunación fueron las siguientes: 100 µg del inmunomodulador de síntesis química AA0029 y 20 µg de Qs 21. Los ratones fueron inmunizados en el día 0 y dos dosis adicionales fueron administradas en los días 14 y 28, respectivamente. Se tomaron muestras de sangre antes de cada inmunización, en el momento de la infección y 21 días después de la infección experimental.

10

#### Infección y evaluación de la protección

Dos semanas después de la última inmunización, todos los ratones incluidos en este estudio, (excepto el grupo de control sano), fueron infectados por vía oral con siete metacercarias de *F. hepatica*. Todos los ratones del grupo de infección murieron entre 15 los días 24 y 34 después de la infección. Los ratones supervivientes fueron necropsiados para realizar la recuperación de los vermes y la valoración de lesiones hepáticas en el día 42 después de la infección.

En el hígado de cada ratón se evaluaron cambios de color, tamaño, consistencia, cicatrices y conductos biliares. La intensidad de los cambios o de las lesiones se cuantificaron de acuerdo a los siguientes criterios: 0 puntos si no había lesiones, 1 punto si una porción de un lóbulo hepático presentaba lesiones, 2 puntos si un lóbulo 5 entero presentaba lesiones y 3 puntos si más de un lóbulo estaba afectado. Cuando la suma fue de 0 puntos, se asignó “Sin lesiones”, entre 1-5 puntos “daño leve” (+), entre 6-10 puntos “daño moderado” (++) y entre 11-14 puntos “daño grave” (+++).

La protección de los ratones frente a la infección causada por *F. hepatica* fue evaluada 10 de acuerdo al porcentaje de supervivencia de los ratones en cada grupo de inmunización, calculado como la relación entre el número de ratones supervivientes después del día 34 y el número de ratones pertenecientes a cada grupo. La puntuación total de las lesiones hepáticas y el porcentaje de reducción de vermes también se consideraron como indicadores de protección.

15

Determinación de anticuerpos.

Los niveles de IgG totales, IgG1 e IgG2a fueron detectados por la técnica de ELISA en suero de ratones inmunizados con los péptidos sintéticos y en suero de ratones infectados con metacercarias de *F. hepatica*. Brevemente, placas de 96 pocillos fueron 20 sensibilizados con 1 µg de cada péptido o la mezcla de ellos en buffer carbonato pH 9,6 e incubados durante 12h a 4°C. Las placas fueron lavadas con PBS-T y posteriormente bloqueadas con 200 µL por pozo de una solución de leche descremada al 5% p/V en PBS 1X durante 1h a 37°C. Después de lavar las placas nuevamente se adicionó el suero de los ratones incluidos en este estudio en una 25 dilución 1:100 en solución de bloqueo y se incubó durante 1h a 37°C. Posteriormente, se lavaron las placas como en el paso anterior y se añadieron 100 µL/pozo de anticuerpo secundario IgG anti-ratón generado en cabra y acoplado a peroxidasa en una dilución 1:1000 y se dejó incubar durante 1h a 37°C. Después de lavar las placas, se adicionaron 100 µL de solución de revelado (2,59 mM orto-fenilendiamina + 17,05 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en buffer de citrato pH 5,0) a cada pozo y se deja en la oscuridad por un periodo de 10 minutos. Finalmente se adicionan 50 µL de ácido sulfúrico 3N para detener la reacción colorimétrica y se lee la absorbancia de la placa a 492 nm en el lector de ELISA EAR400FT (STL Lab Instruments, Groding, Austria).

## Resultados

La inmunización de los ratones con los péptidos sintéticos produjo un aumento en la supervivencia de estos, así como una reducción tanto en el daño hepático como en el número de vermes recuperado. Estos datos se muestran en la tabla 6.

5

Tabla 6. Valoración de la protección frente a la infección experimental con metacercarias de *Fasciola hepatica* en ratones inmunizados con péptidos sintéticos.

Antígeno	Supervivencia (%)	Puntuación daño hepático	Reducción de vermes (%)
Control sano	100	0,0	
Control infección	0	12,0	
Control adyuvante	33	8,0	50,0
Péptido B1 (SEQ ID NO: 28)	50	9,3	50,0
Péptido B2 (SEQ ID NO: 29)	67	6,0	58,3
Péptido B5 (SEQ ID NO: 32)	60	7,8	60,0
Péptido B6 (SEQ ID NO: 33)	60	6,4	50,0
Péptidos B6 (SEQ ID NO: 33)+T14 (SEQ ID NO: 1)	50	10,0	58,3
Péptidos B1 (SEQ ID NO: 28)+B5 (SEQ ID NO: 32)+B6 (SEQ ID NO: 33)	50	8,7	41,7
Péptido T14 (SEQ ID NO: 1)	40	6,8	50,0
Péptido T15 (SEQ ID NO: 2)	67	8,8	58,3
Péptido T16 (SEQ ID NO: 3)	43	10,7	57,1
Péptidos T14 (SEQ	80	6,2	60,0

ID NO: 1)+T15 (SEQ ID NO: 2)+T16 (SEQ ID NO: 3)			
Péptidos B [B1 (SEQ ID NO: 28), B2 (SEQ ID NO: 29), B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33)] +T [T14 (SEQ ID NO: 1), T15 (SEQ ID NO: 2), T16 (SEQ ID NO: 3)]	57	6,3	57,1

Los resultados demuestran el enorme potencial de la mezcla de péptidos T14 (SEQ ID NO: 1)+T15 (SEQ ID NO: 2)+T16 (SEQ ID NO: 3) como candidatos a vacuna contra la infección causada por *F. hepatica*, ya que el grupo de ratones inmunizados con esta mezcla de péptidos presentaron el mayor porcentaje de supervivencia, así como los menores daños hepáticos y recuperación de vermes comparado con el grupo de infección.

Se evidencia el efecto sinérgico que posee esta mezcla de péptidos, ya que aumenta la protección de los grupos de ratones inmunizados con los péptidos individuales. El análisis macroscópico del hígado de los ratones inmunizados con esta mezcla de péptidos (T14 (SEQ ID NO: 1)+T15 (SEQ ID NO: 2)+T16 (SEQ ID NO: 3)) evidenció que las lesiones hepáticas son mínimas comparado con el grupo de infección (Figura 7). Este efecto sinérgico además no se produce cuando se utilizan otras mezclas de antígenos diferentes como se evidencia en la tabla 6 con la mezcla de los péptidos B [B1 (SEQ ID NO: 28), B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33)], o péptidos B [(B1 (SEQ ID NO: 28), B2 (SEQ ID NO: 29), B5 (SEQ ID NO: 32), B6 (SEQ ID NO: 33)] +T [T14 (SEQ ID NO: 1), T15 (SEQ ID NO: 2), T16 (SEQ ID NO: 3)]. Además este efecto se produce a pesar de que el número de anticuerpos IgG totales producidos por la inmunización con esta mezcla es inferior a la producción de anticuerpos IgG producida por otras mezclas de antígenos (Figura 8).

**REIVINDICACIONES**

1. Polipéptido aislado o sintético que comprende SEQ ID NO: 18, donde dicha secuencia se repite al menos 3 veces.

5

2. Polipéptido según la reivindicación 1 donde el número de repeticiones de SEQ ID NO: 18 es 3.

3. Polipéptido según la reivindicación 2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2.

10

4. Secuencia nucleotídica que codifica para un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Construcción genética que comprende la secuencia nucleotídica según la

15 reivindicación 4.

6. Construcción genética según la reivindicación 5 que es un vector de expresión.

7. Célula que comprende una secuencia nucleotídica según la reivindicación 4 o una

20 construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6.

8. Composición que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

25 9. Composición según la reivindicación 8 que además comprende un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 17 donde SEQ ID NO: 17 se repite al menos 3 veces o un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 19 donde SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces.

30 10. Composición según la reivindicación 9 que comprende un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 17 donde SEQ ID NO: 17 se repite al menos 3 veces y un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 19 donde SEQ ID NO: 19 se repite al menos 3 veces.

11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 donde el número de repeticiones de SEQ ID NO: 17 en el polipéptido que comprende SEQ ID NO: 17 es 3, y/o el número de repeticiones de SEQ ID NO: 19 en el polipéptido que comprende SEQ ID NO: 19 es 3.

5

12. Composición según la reivindicación 11 donde el polipéptido que comprende SEQ ID NO: 17 es el polipéptido SEQ ID NO: 2 y/o donde el polipéptido que comprende SEQ ID NO: 19 es el polipéptido SEQ ID NO: 3.

10 13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 que además comprende un inmunomodulador, un aceite no-mineral y/o un adyuvante.

14. Composición según la reivindicación 14 donde el inmunomodulador es AA0029.

15 15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14 donde el adyuvante es al menos una saponina de *Quillaja saponaria*.

16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14 donde el adyuvante es Qs21.

20

17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 donde el aceite no-mineral es Montanide ISA 763A.

25 18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 17 que además comprende otro péptido derivado de *Fasciola hepatica*.

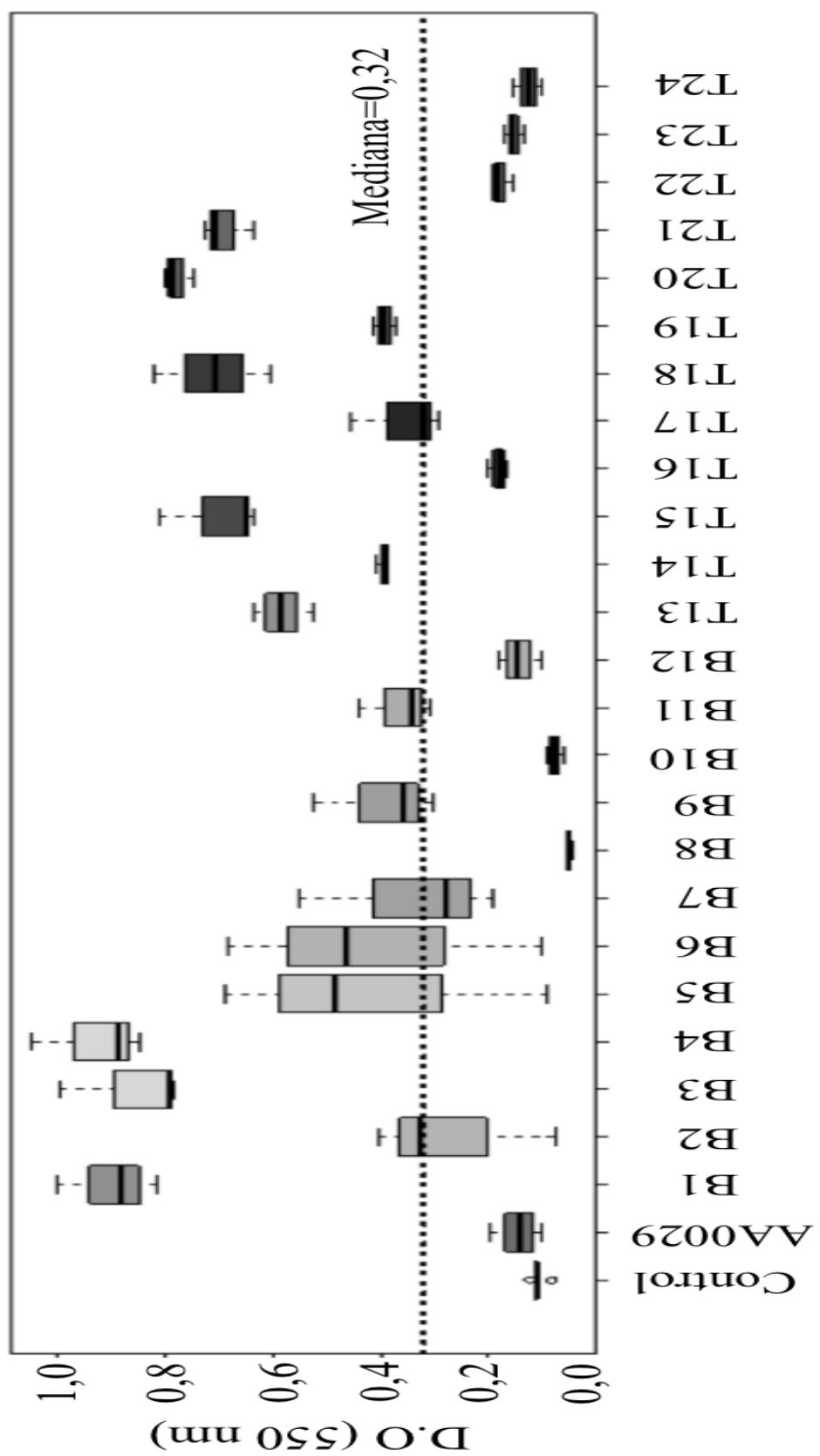
19. Composición según la reivindicación 18 donde el péptido derivado de *Fasciola hepatica* es un polipéptido que comprende al menos tres copias de uno de los péptidos de secuencia SEQ ID NO: 4-16 o SEQ ID NO: 20-27.

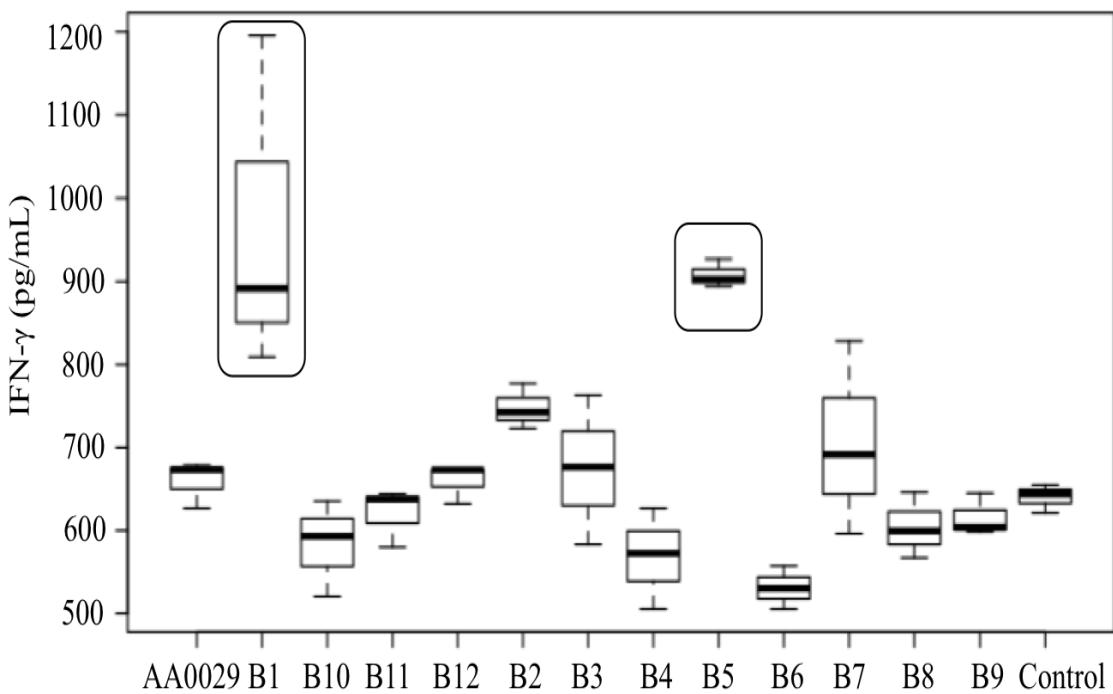
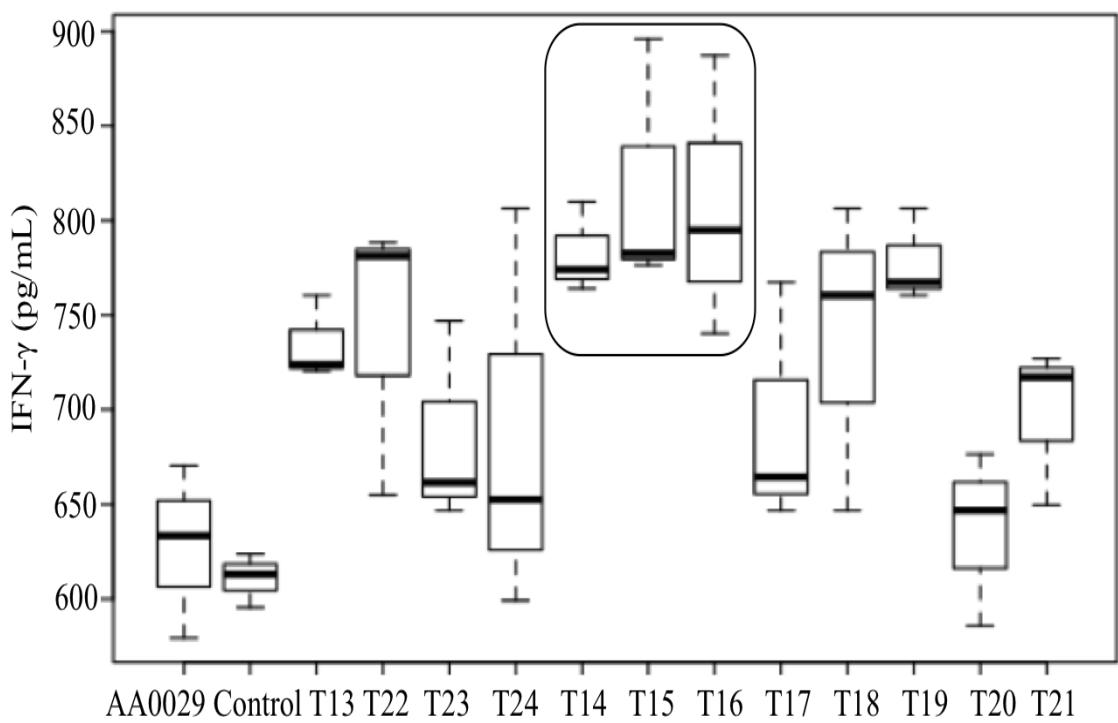
30

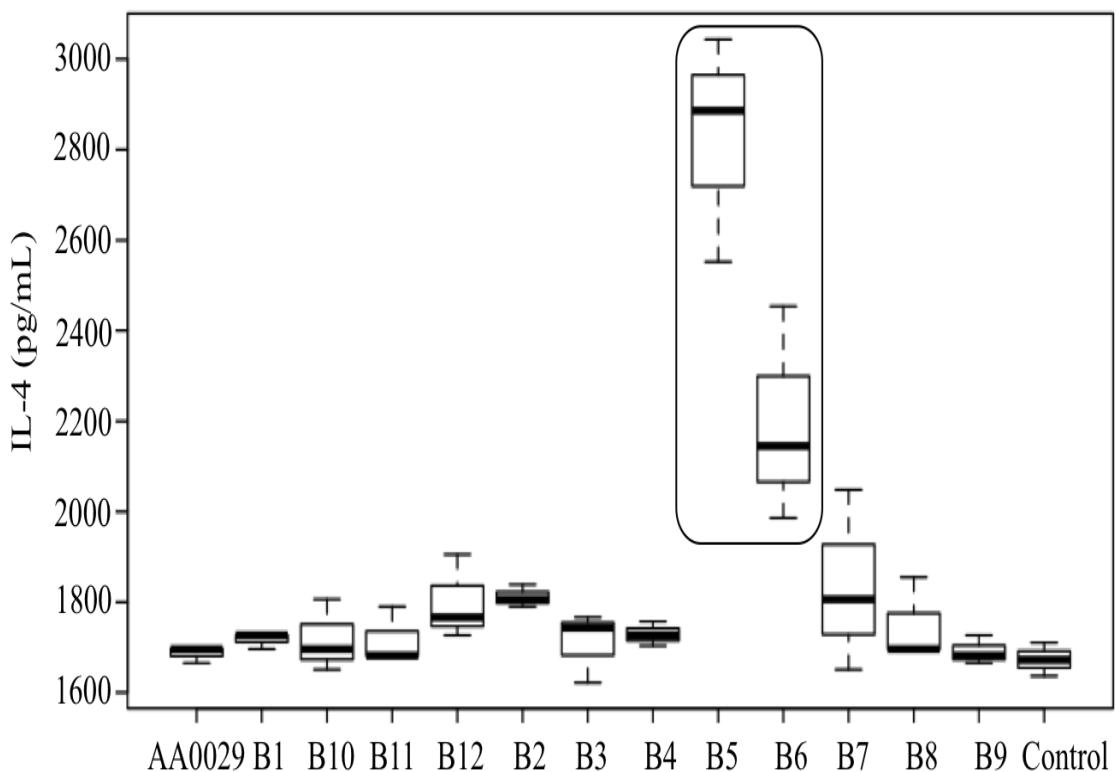
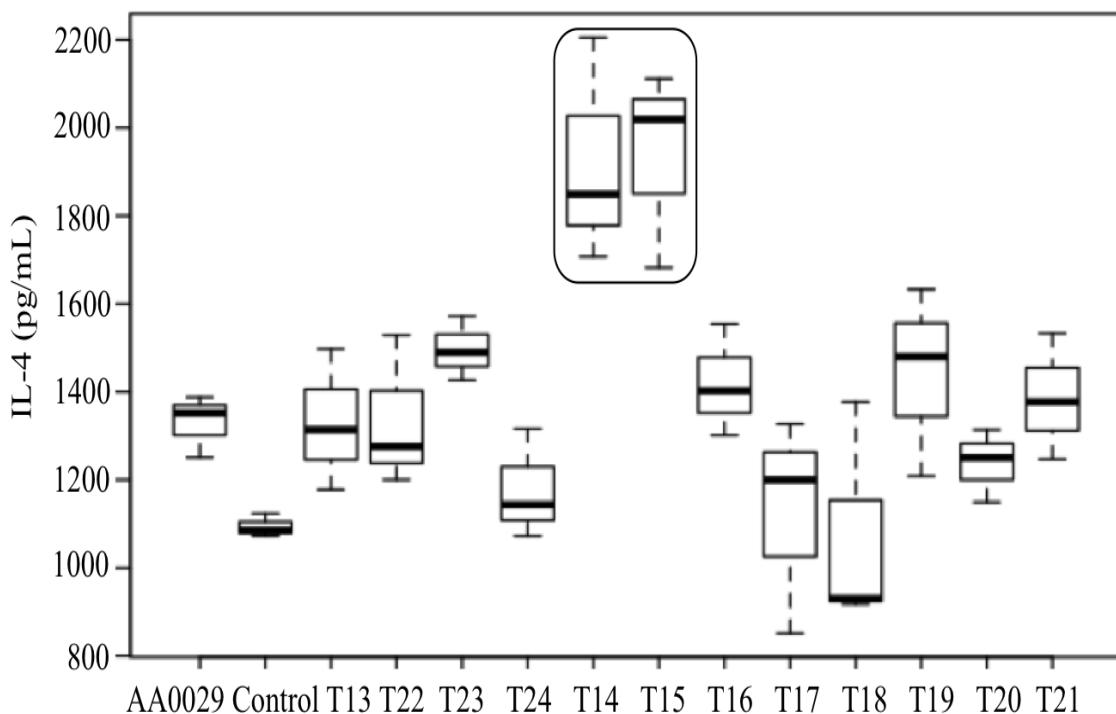
20. Composición según la reivindicación 19 donde el polipéptido es uno de los polipéptidos de secuencia SEQ ID NO: 28-48

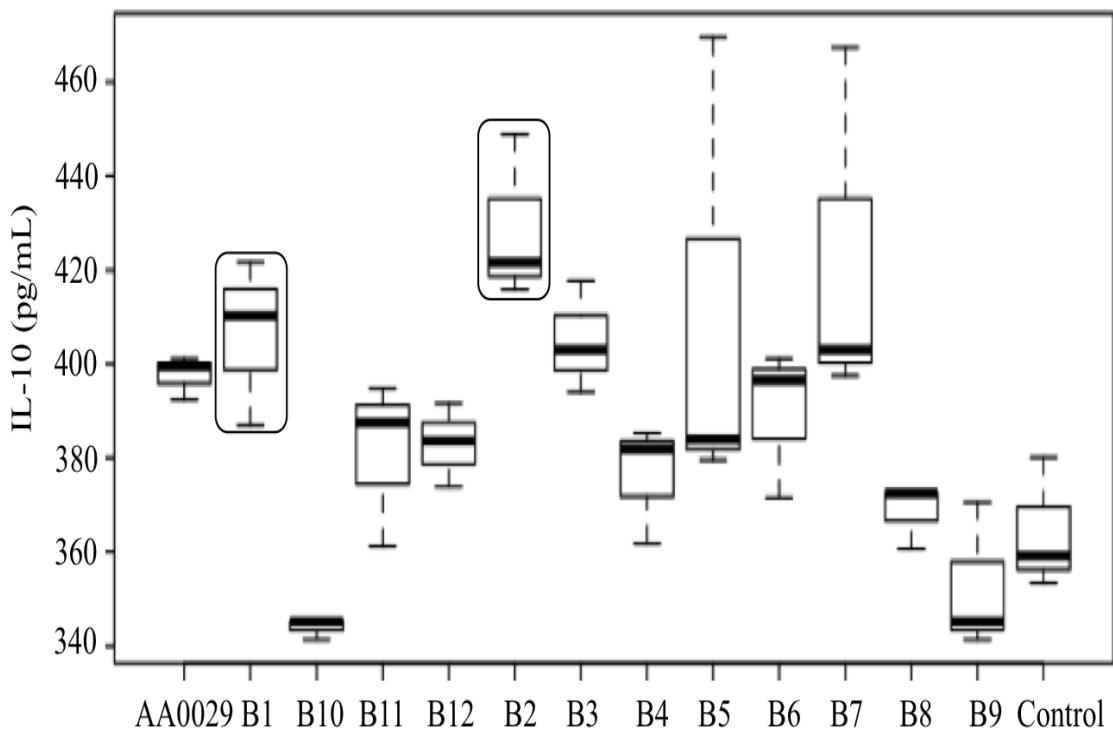
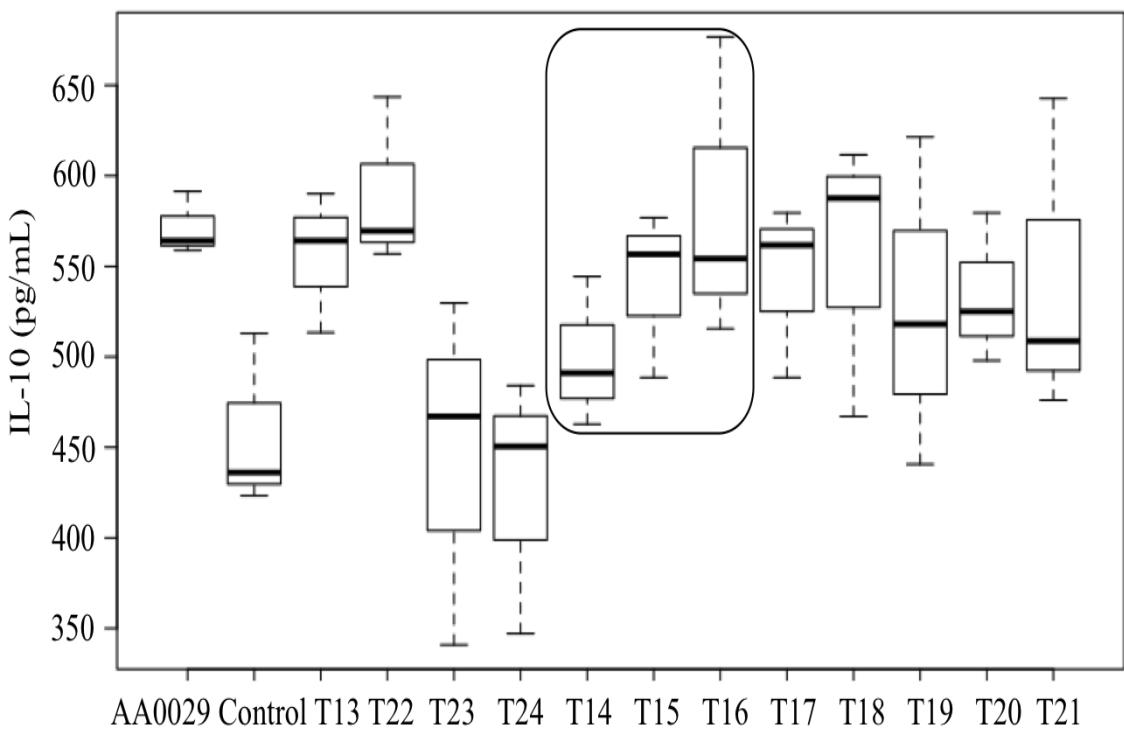
21. Anticuerpos aislados producidos tras la inmunización de un mamífero con un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 20.
- 5    22. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, una secuencia nucleotídica según la reivindicación 4, una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, una célula según la reivindicación 7, una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 20 o un anticuerpo según la reivindicación 21 para la elaboración de un medicamento.  
10
23. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, una secuencia nucleotídica según la reivindicación 4, una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, una célula según la reivindicación 7, una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 20 o un anticuerpo  
15    según la reivindicación 21 para la prevención y/o el tratamiento de infecciones producidas por organismos del género *Fasciola*.
24. Uso según la reivindicación 23 donde el organismo del género *Fasciola* es de la especie *Fasciola hepatica*.
- 20
25. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24 donde el medicamento es una vacuna.

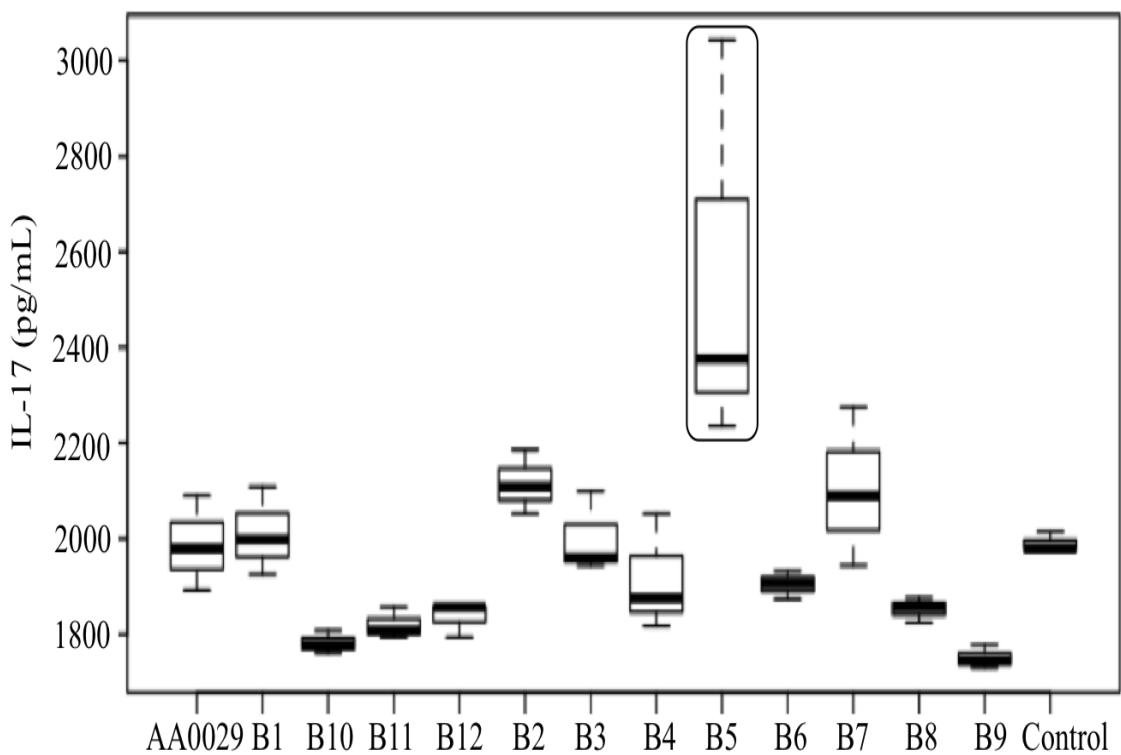
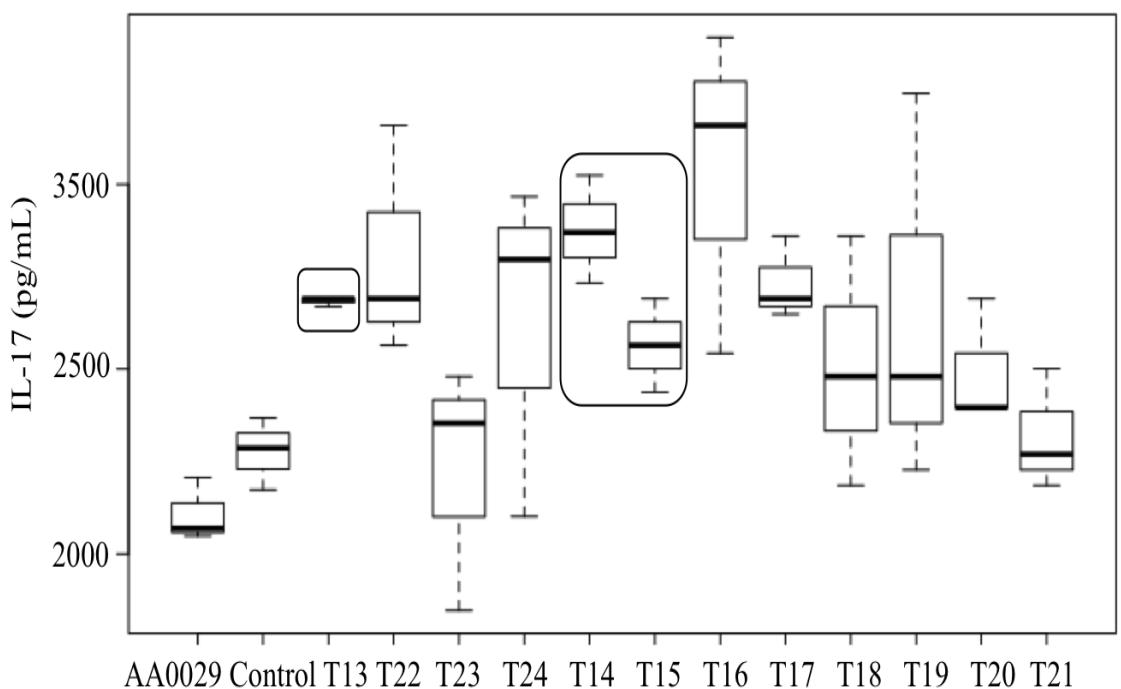
FIG.1



**FIG.2A****FIG.2B**

**FIG.3A****FIG.3B**

**FIG.4A****FIG.4B**

**FIG.5A****FIG.5B**

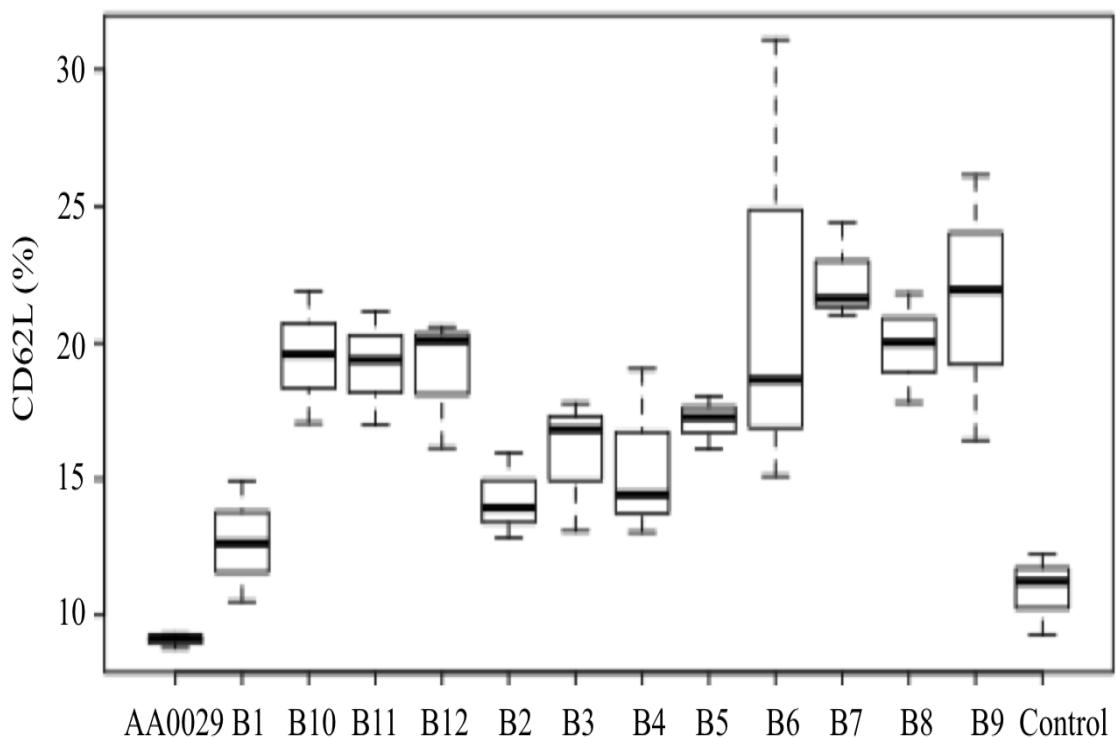
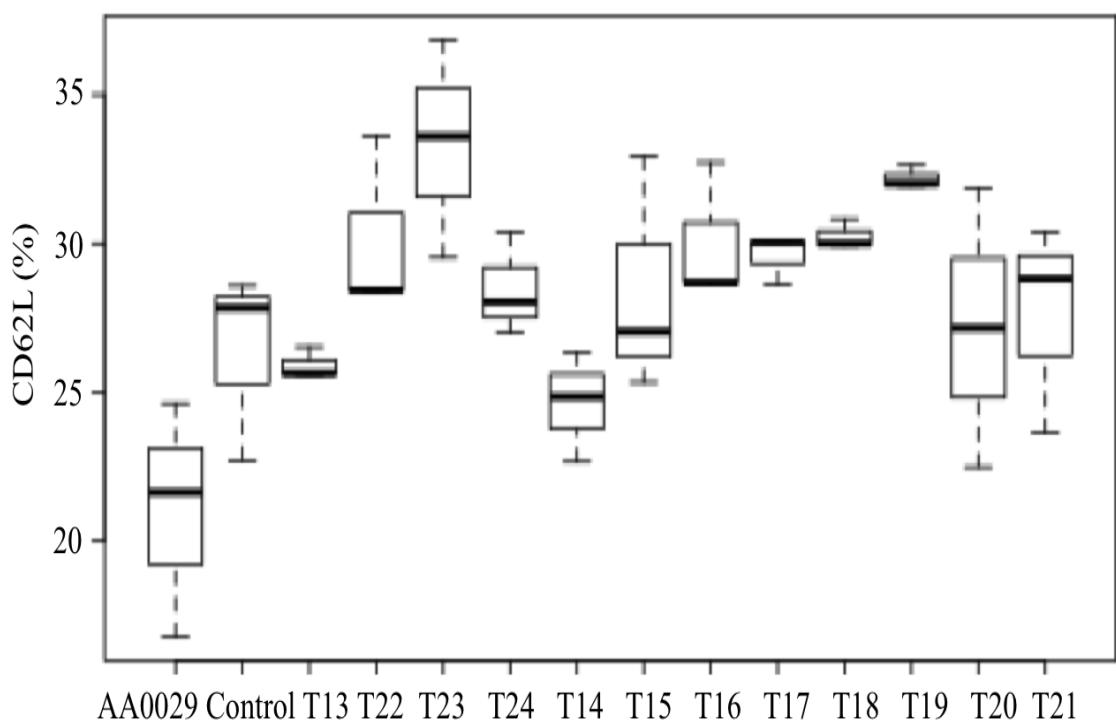
**FIG.6A****FIG.6B**

FIG.7

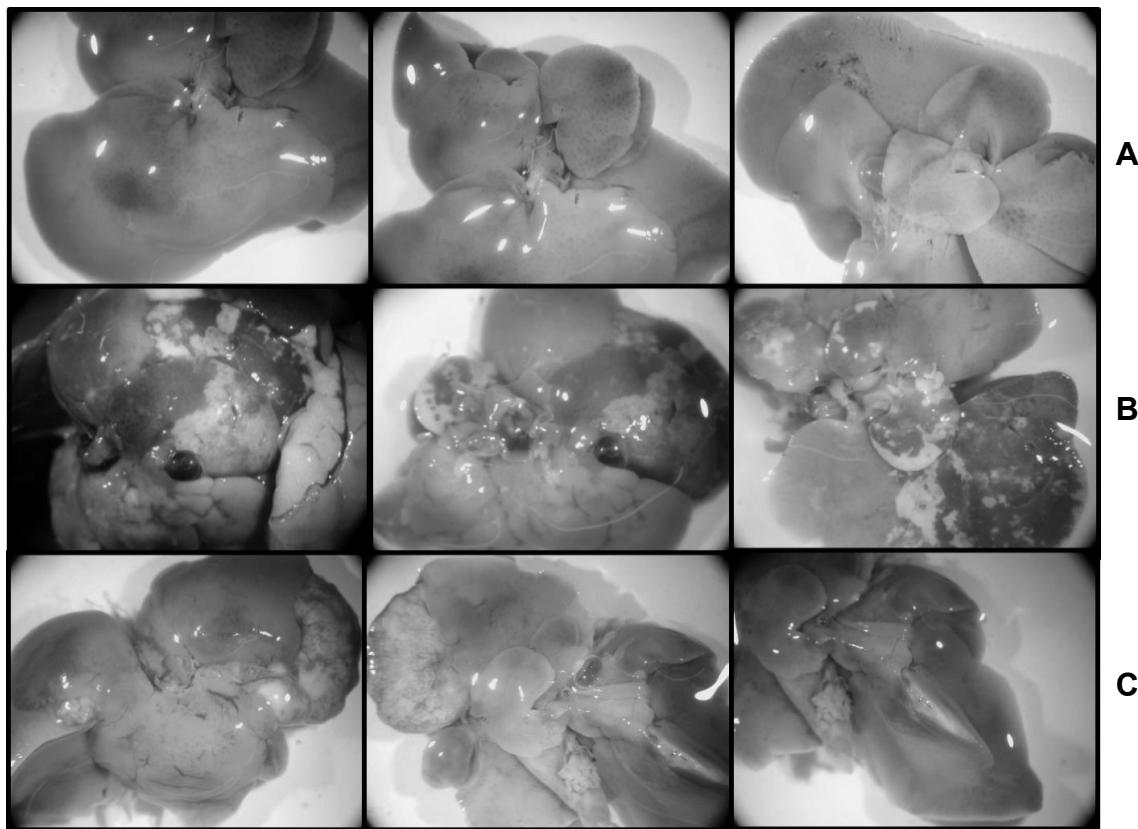
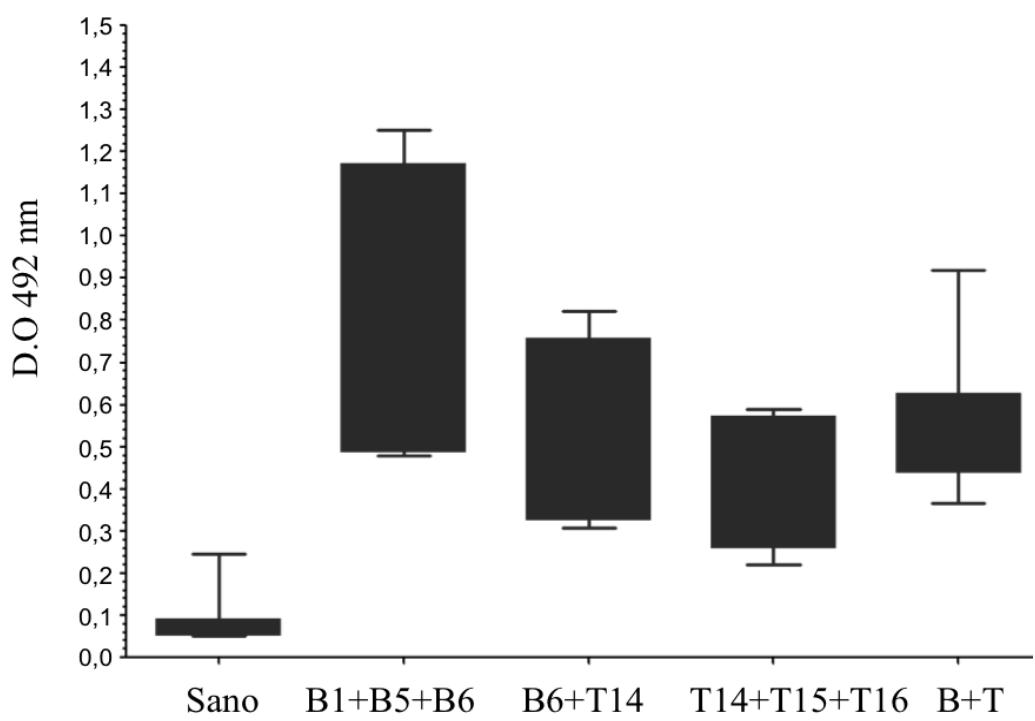


FIG.8



## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Salamanca

<120> Péptido sintético derivado de Fasciola hepatica y su uso como vacuna

<130> ES1367.58

<140> ES P201330905

<141> 2013-06-17

<160> 48

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 57

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido T14 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 17 (derivada de la región entre los aminoácidos 80-94 de la proteína amebaporo de F. hepatica) repetida tres veces.

<400> 1

Cys Gly Asp Tyr Ile Ile Asp His Val Asp Gln His Asn Ala Thr Glu  
1 5 10 15

Ile Gly Cys Cys Gly Asp Tyr Ile Ile Asp His Val Asp Gln His Asn  
20 25 30

Ala Thr Glu Ile Gly Cys Cys Gly Asp Tyr Ile Ile Asp His Val Asp  
35 40 45

Gln His Asn Ala Thr Glu Ile Gly Cys  
50 55

<210> 2

<211> 57

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido T15 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 18 (derivada de la región entre los aminoácidos 46-60 de la proteína catepsina B de F. hepatica) repetida tres veces.

<400> 2

Cys Gly Asp Arg Asn Thr Gln Arg Gln Thr Val Arg Tyr Ser Val Ser  
1 5 10 15

Glu Gly Cys Cys Gly Asp Arg Asn Thr Gln Arg Gln Thr Val Arg Tyr  
20 25 30

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

Val Arg Tyr Ser Val Ser Glu Gly Cys  
50 55

<210> 3  
<211> 57  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Polipéptido T16 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 19 (derivada de la  
región entre  
los aminoácidos 260-274 de la proteína catepsina B de F. hepatica)  
repetida tres veces.

<400> 3

Cys Gly Phe Tyr Met Phe Glu Asp Phe Leu Val Tyr Lys Ser Gly Ile  
1 5 10 15

Tyr Gly Cys Cys Gly Phe Tyr Met Phe Glu Asp Phe Leu Val Tyr Lys  
20 25 30

Ser Gly Ile Tyr Gly Cys Cys Gly Phe Tyr Met Phe Glu Asp Phe Leu  
35 40 45

Val Tyr Lys Ser Gly Ile Tyr Gly Cys  
50 55

<210> 4  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Monómero B1 derivado de la región entre los aminoácidos 63-82 de la  
proteína amebaporo 1 de F. hepatica.

<400> 4

Lys Gly Ala Gly Ser Ser Gln Asp Ala Cys Ile Lys Phe Ile Gln Tyr  
1 5 10 15

Glu Val Asp Gly  
20

<210> 5  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Monómero B2 derivado de la región entre los aminoácidos 63-82 de la  
proteína amebaporo 1 de F. hepatica.

<400> 5

Lys Gly Ala Gly Ser Ser Gln Asp Ala Thr Ile Lys Phe Ile Gln Tyr  
1 5 10 15

Glu Val Asp Gly  
20

<210> 6  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Monómero B3 derivado de la región entre los aminoácidos 14-33 de la proteína amebaporo 2 de F. hepatica.

<400> 6

Phe Ala Ser Phe Asp Val Pro Ser Lys Gln Pro Thr Ile Asp Ile Asp  
1 5 10 15

Leu Cys Asp Ile  
20

<210> 7  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Monómero B4 derivado de la región entre los aminoácidos 14-33 de la proteína amebaporo 2 de F. hepatica.

<400> 7

Phe Ala Ser Phe Asp Val Pro Ser Lys Gln Pro Thr Ile Asp Ile Asp  
1 5 10 15

Leu Thr Asp Ile  
20

<210> 8  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Monómero B5 derivado de la región entre los aminoácidos 79-98 de la proteína catepsina B1 de F. hepatica.

<400> 8

Ile Ser Glu Ile Arg Asp Gln Ser Ser Thr Ser Ser Thr Trp Ala Val  
1 5 10 15

Ser Ser Ala Ser  
20

<210> 9  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 525 106 B1

<223> Monómero B6 derivado de la región entre los aminoácidos 293-312 de la proteína catepsina B2 de F. hepatica.

<400> 9

Gly Val Glu Asn Gly Val Lys Tyr Trp Leu Ile Ala Asn Ser Trp Asn  
1 5 10 15

Glu Gly Trp Gly  
20

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Monómero B7 derivado de la región entre los aminoácidos 260-279 de la proteína catepsina L1 de F. hepatica.

<400> 10

Gln Thr Cys Ser Pro Leu Arg Val Asn His Ala Val Leu Ala Val Gly  
1 5 10 15

Tyr Gly Thr Gln  
20

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Monómero B8 derivado de la región entre los aminoácidos 260-279 de la proteína catepsina L1 de F. hepatica.

<400> 11

Gln Thr Thr Ser Pro Leu Arg Val Asn His Ala Val Leu Ala Val Gly  
1 5 10 15

Tyr Gly Thr Gln  
20

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Monómero B9 derivado de la región entre los aminoácidos 27-46 de la proteína cistatina 1 de F. hepatica.

<400> 12

Tyr Thr Glu Pro Arg Ser Val Thr Pro Glu Glu Arg Ser Val Phe Gln  
1 5 10 15

Pro Met Ile Leu  
20

<210> 13  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Monómero B10 derivado de la región entre los aminoácidos 95-114 de la proteína cistatina 2 de F. hepatica.

<400> 13

Phe Val Pro Leu Tyr Ser Ser Lys Ser Ala Thr Ser Val Gly Thr Pro  
1 5 10 15

Thr Arg Val Ser  
20

<210> 14  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Monómero B11 derivado de la región entre los aminoácidos 350-369 de la proteína legumain 2 de F. hepatica.

<400> 14

Val Thr Thr Asn Gly Pro Pro Asn Gly Lys His Asn Asp Lys His Thr  
1 5 10 15

Tyr Val Glu Cys  
20

<210> 15  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Monómero B12 derivado de la región entre los aminoácidos 350-369 de la proteína legumain 2 de F. hepatica.

<400> 15

Val Thr Thr Asn Gly Pro Pro Asn Gly Lys His Asn Asp Lys His Thr  
1 5 10 15

Tyr Val Glu Thr  
20

<210> 16  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Monómero T13 derivado de la región entre los aminoácidos 37-51 de la proteína amebaporo de F. hepatica.

ES 2 525 106 B1

<400> 16

Thr Val Asn Leu Val Lys Arg Leu Leu Gln Asn Ser Val Val Glu  
1 5 10 15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Monómero T14 derivado de la región entre los aminoácidos 80-94 de la proteína amebaporo de *F. hepatica*.

<400> 17

Asp Tyr Ile Ile Asp His Val Asp Gln His Asn Ala Thr Glu Ile  
1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Monómero T15 derivado de la región entre los aminoácidos 46-60 de la proteína catepsina B de *F. hepatica*.

<400> 18

Asp Arg Asn Thr Gln Arg Gln Thr Val Arg Tyr Ser Val Ser Glu  
1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Monómero T16 derivado de la región entre los aminoácidos 260-274 de la proteína catepsina B de *F. hepatica*.

<400> 19

Phe Tyr Met Phe Glu Asp Phe Leu Val Tyr Lys Ser Gly Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Monómero T17 derivado de la región entre los aminoácidos 83-97 de la proteína catepsina L de *F. hepatica*.

<400> 20

Lys Tyr Leu Thr Glu Met Ser Arg Ala Ser Asp Ile Leu Ser His  
1 5 10 15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Monómero T18 derivado de la región entre los aminoácidos 153-167 de la proteína catepsina L de F. hepatica.

<400> 21

Ile Ser Phe Ser Glu Gln Gln Leu Val Asp Thr Ser Gly Pro Trp  
1 5 10 15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Monómero T19 derivado de la región entre los aminoácidos 178-192 de la proteína catepsina L de F. hepatica.

<400> 22

Glu Asn Ala Tyr Glu Tyr Leu Lys His Asn Gly Leu Glu Thr Glu  
1 5 10 15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Monómero T20 derivado de la región entre los aminoácidos 27-41 de la proteína citocromo oxidasa de F. hepatica.

<400> 23

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

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Monómero T21 derivado de la región entre los aminoácidos 76-90 de la proteína citocromo oxidasa de F. hepatica.

<400> 24

Asp Leu Asn Leu Pro Arg Leu Asn Ala Leu Ser Ala Trp Leu Leu  
1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Monómero T22 derivado de la región entre los aminoácidos 56-70 de la proteína vitelina de F. hepatica.

<400> 25

Phe Ala Gly His Gly Lys Ala Tyr Leu His Gly Ser Phe Asp Lys  
 1                   5                   10                   15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Monómero T23 derivado de la región entre los aminoácidos 254-268 de la proteína vitelina de *F. hepatica*.

<400> 26

Tyr Glu Lys Tyr Glu Asp Asp Tyr Ala Arg Glu Thr Pro Tyr Asp  
 1                   5                   10                   15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Monómero T24 derivado de la región entre los aminoácidos 101-115 de la proteína NADH de *F. hepatica*.

<400> 27

Leu Gly Ile Gly Phe Leu Val Glu Val Arg Arg Gly Tyr Val Arg  
 1                   5                   10                   15

<210> 28

<211> 72

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido B1 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 (derivada de la región entre los aminoácidos 63-82 de la proteína amebaporo 1 de *F. hepatica*) repetida tres veces.

<400> 28

Cys Gly Lys Gly Ala Gly Ser Ser Gln Asp Ala Cys Ile Lys Phe Ile  
 1                   5                   10                   15

Gln Tyr Glu Val Asp Gly Gly Cys Cys Gly Lys Gly Ala Gly Ser Ser  
 20                   25                   30

Gln Asp Ala Cys Ile Lys Phe Ile Gln Tyr Glu Val Asp Gly Gly Cys  
 35                   40                   45

Cys Gly Lys Gly Ala Gly Ser Ser Gln Asp Ala Cys Ile Lys Phe Ile  
 50                   55                   60

Gln Tyr Glu Val Asp Gly Gly Cys  
 65                   70

<210> 29  
<211> 72  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Polipéptido B2 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 5 (derivada de la  
región entre  
los aminoácidos 63-82 de la proteína amebaporo 1 de F. hepatica) repetida  
tres veces.

<400> 29

Cys Gly Lys Gly Ala Gly Ser Ser Gln Asp Ala Thr Ile Lys Phe Ile  
1 5 10 15

Gln Tyr Glu Val Asp Gly Gly Cys Cys Gly Lys Gly Ala Gly Ser Ser  
20 25 30

Gln Asp Ala Thr Ile Lys Phe Ile Gln Tyr Glu Val Asp Gly Gly Cys  
35 40 45

Cys Gly Lys Gly Ala Gly Ser Ser Gln Asp Ala Thr Ile Lys Phe Ile  
50 55 60

Gln Tyr Glu Val Asp Gly Gly Cys  
65 70

<210> 30  
<211> 72  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Polipéptido B3 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 6 (derivada de la  
región entre  
los aminoácidos 14-33 de la proteína amebaporo 2 de F. hepatica) repetida  
tres veces.

<400> 30

Cys Gly Phe Ala Ser Phe Asp Val Pro Ser Lys Gln Pro Thr Ile Asp  
1 5 10 15

Ile Asp Leu Cys Asp Ile Gly Cys Cys Gly Phe Ala Ser Phe Asp Val  
20 25 30

Pro Ser Lys Gln Pro Thr Ile Asp Ile Asp Leu Cys Asp Ile Gly Cys  
35 40 45

Cys Gly Phe Ala Ser Phe Asp Val Pro Ser Lys Gln Pro Thr Ile Asp  
50 55 60

Ile Asp Leu Cys Asp Ile Gly Cys  
65 70

<210> 31  
<211> 72

<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Polipéptido B4 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 7 (derivada de la  
región entre  
los aminoácidos 14-33 de la proteína amebaporo 2 de F. hepatica) repetida  
tres veces.

<400> 31

Cys Gly Phe Ala Ser Phe Asp Val Pro Ser Lys Gln Pro Thr Ile Asp  
1 5 10 15

Ile Asp Leu Thr Asp Ile Gly Cys Cys Gly Phe Ala Ser Phe Asp Val  
20 25 30

Pro Ser Lys Gln Pro Thr Ile Asp Ile Asp Leu Thr Asp Ile Gly Cys  
35 40 45

Cys Gly Phe Ala Ser Phe Asp Val Pro Ser Lys Gln Pro Thr Ile Asp  
50 55 60

Ile Asp Leu Thr Asp Ile Gly Cys  
65 70

<210> 32  
<211> 72  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Polipéptido B5 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 8 (derivada de la  
región entre  
los aminoácidos 79-98 de la proteína catepsina B1 de F. hepatica)  
repetida tres veces.

<400> 32

Cys Gly Ile Ser Glu Ile Arg Asp Gln Ser Ser Thr Ser Ser Thr Trp  
1 5 10 15

Ala Val Ser Ser Ala Ser Gly Cys Cys Gly Ile Ser Glu Ile Arg Asp  
20 25 30

Gln Ser Ser Thr Ser Ser Thr Trp Ala Val Ser Ser Ala Ser Gly Cys  
35 40 45

Cys Gly Ile Ser Glu Ile Arg Asp Gln Ser Ser Thr Ser Ser Thr Trp  
50 55 60

Ala Val Ser Ser Ala Ser Gly Cys  
65 70

<210> 33  
<211> 72  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido B6 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 9 (derivada de la región entre los aminoácidos 293-312 de la proteína catepsina B2 de *F. hepatica*) repetida tres veces.

<400> 33

Cys Gly Gly Val Glu Asn Gly Val Lys Tyr Trp Leu Ile Ala Asn Ser  
1 5 10 15

Trp Asn Glu Gly Trp Gly Cys Cys Gly Gly Val Glu Asn Gly Val  
20 25 30

Lys Tyr Trp Leu Ile Ala Asn Ser Trp Asn Glu Gly Trp Gly Gly Cys  
35 40 45

Cys Gly Gly Val Glu Asn Gly Val Lys Tyr Trp Leu Ile Ala Asn Ser  
50 55 60

Trp Asn Glu Gly Trp Gly Cys  
65 70

<210> 34

<211> 72

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido B7 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 10 (derivado de la región entre los aminoácidos 260-279 de la proteína catepsina L1 de *F. hepatica*) repetida tres veces.

<400> 34

Cys Gly Gln Thr Cys Ser Pro Leu Arg Val Asn His Ala Val Leu Ala  
1 5 10 15

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

Arg Val Asn His Ala Val Leu Ala Val Gly Tyr Gly Thr Gln Gly Cys  
35 40 45

Cys Gly Gln Thr Cys Ser Pro Leu Arg Val Asn His Ala Val Leu Ala  
50 55 60

Val Gly Tyr Gly Thr Gln Gly Cys  
65 70

<210> 35

<211> 72

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

# ES 2 525 106 B1

<223> Polipéptido B8 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 11 (derivada de la región entre los aminoácidos 260-279 de la proteína catepsina L1 de F. hepatica) repetida tres veces.

<400> 35

Cys Gly Gln Thr Thr Ser Pro Leu Arg Val Asn His Ala Val Leu Ala  
1 5 10 15

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

Arg Val Asn His Ala Val Leu Ala Val Gly Tyr Gly Thr Gln Gly Cys  
35 40 45

Cys Gly Gln Thr Thr Ser Pro Leu Arg Val Asn His Ala Val Leu Ala  
50 55 60

Val Gly Tyr Gly Thr Gln Gly Cys  
65 70

<210> 36

<211> 72

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido B9 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12 (derivada de la región entre los aminoácidos 27-46 de la proteína cistatina 1 de F. hepatica) repetida tres veces.

<400> 36

Cys Gly Tyr Thr Glu Pro Arg Ser Val Thr Pro Glu Glu Arg Ser Val  
1 5 10 15

Phe Gln Pro Met Ile Leu Gly Cys Cys Gly Tyr Thr Glu Pro Arg Ser  
20 25 30

Val Thr Pro Glu Glu Arg Ser Val Phe Gln Pro Met Ile Leu Gly Cys  
35 40 45

Cys Gly Tyr Thr Glu Pro Arg Ser Val Thr Pro Glu Glu Arg Ser Val  
50 55 60

Phe Gln Pro Met Ile Leu Gly Cys  
65 70

<210> 37

<211> 72

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido B10 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 13 (derivada de la región entre

los aminoácidos 95-114 de la proteína cistatina 2 de *F. hepatica*) repetida tres veces.

<400> 37

Cys Gly Phe Val Pro Leu Tyr Ser Ser Lys Ser Ala Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

Thr Pro Thr Arg Val Ser Gly Cys Cys Gly Phe Val Pro Leu Tyr Ser  
20 25 30

Ser Lys Ser Ala Thr Ser Val Gly Thr Pro Thr Arg Val Ser Gly Cys  
35 40 45

Cys Gly Phe Val Pro Leu Tyr Ser Ser Lys Ser Ala Thr Ser Val Gly  
50 55 60

Thr Pro Thr Arg Val Ser Gly Cys  
65 70

<210> 38

<211> 72

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido B11 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 14 (derivada de la región entre los aminoácidos 350-369 de la proteína legumaína 2 de *F. hepatica*) repetida tres veces.

<400> 38

Cys Gly Val Thr Thr Asn Gly Pro Pro Asn Gly Lys His Asn Asp Lys  
1 5 10 15

His Thr Tyr Val Glu Cys Gly Cys Cys Gly Val Thr Thr Asn Gly Pro  
20 25 30

Pro Asn Gly Lys His Asn Asp Lys His Thr Tyr Val Glu Cys Gly Cys  
35 40 45

Cys Gly Val Thr Thr Asn Gly Pro Pro Asn Gly Lys His Asn Asp Lys  
50 55 60

His Thr Tyr Val Glu Cys Gly Cys  
65 70

<210> 39

<211> 72

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido B12 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 15 (derivada de la región entre los aminoácidos 350-369 de la proteína legumaína 2 de *F. hepatica*) repetida tres veces.

ES 2 525 106 B1

<400> 39

Cys Gly Val Thr Thr Asn Gly Pro Pro Asn Gly Lys His Asn Asp Lys  
1 5 10 15

His Thr Tyr Val Glu Thr Gly Cys Cys Gly Val Thr Thr Asn Gly Pro  
20 25 30

Pro Asn Gly Lys His Asn Asp Lys His Thr Tyr Val Glu Thr Gly Cys  
35 40 45

Cys Gly Val Thr Thr Asn Gly Pro Pro Asn Gly Lys His Asn Asp Lys  
50 55 60

His Thr Tyr Val Glu Thr Gly Cys  
65 70

<210> 40

<211> 57

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido T13 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 16 (derivada de la  
región entre  
los aminoácidos 37-51 de la proteína amebaporo de *F. hepatica*) repetida  
tres veces.

<400> 40

Cys Gly Thr Val Asn Leu Val Lys Arg Leu Leu Gln Asn Ser Val Val  
1 5 10 15

Glu Gly Cys Cys Gly Thr Val Asn Leu Val Lys Arg Leu Leu Gln Asn  
20 25 30

Ser Val Val Glu Gly Cys Cys Gly Thr Val Asn Leu Val Lys Arg Leu  
35 40 45

Leu Gln Asn Ser Val Val Glu Gly Cys  
50 55

<210> 41

<211> 57

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido T17 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 20 (derivada de la  
región entre  
los aminoácidos 83-97 de la proteína catepsina L de *F. hepatica*) repetida  
tres veces.

<400> 41

Cys Gly Lys Tyr Leu Thr Glu Met Ser Arg Ala Ser Asp Ile Leu Ser  
1 5 10 15

His Gly Cys Cys Gly Lys Tyr Leu Thr Glu Met Ser Arg Ala Ser Asp  
 20 25 30

Ile Leu Ser His Gly Cys Cys Gly Lys Tyr Leu Thr Glu Met Ser Arg  
 35 40 45

Ala Ser Asp Ile Leu Ser His Gly Cys  
 50 55

<210> 42  
 <211> 57  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Polipéptido T18 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 21 (derivada de la  
 región entre  
 los aminoácidos 153-167 de la proteína catepsina L de F. hepatica)  
 repetida tres veces.

<400> 42

Cys Gly Ile Ser Phe Ser Glu Gln Gln Leu Val Asp Thr Ser Gly Pro  
 1 5 10 15

Trp Gly Cys Cys Gly Ile Ser Phe Ser Glu Gln Gln Leu Val Asp Thr  
 20 25 30

Ser Gly Pro Trp Gly Cys Cys Gly Ile Ser Phe Ser Glu Gln Gln Leu  
 35 40 45

Val Asp Thr Ser Gly Pro Trp Gly Cys  
 50 55

<210> 43  
 <211> 57  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Polipéptido T19 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 22 (derivada de la  
 región entre  
 los aminoácidos 178-192 de la proteína catepsina L de F. hepatica)  
 repetida tres veces.

<400> 43

Cys Gly Glu Asn Ala Tyr Glu Tyr Leu Lys His Asn Gly Leu Glu Thr  
 1 5 10 15

Glu Gly Cys Cys Gly Glu Asn Ala Tyr Glu Tyr Leu Lys His Asn Gly  
 20 25 30

Leu Glu Thr Glu Gly Cys Cys Gly Glu Asn Ala Tyr Glu Tyr Leu Lys  
 35 40 45

His Asn Gly Leu Glu Thr Glu Gly Cys

50

55

<210> 44  
<211> 57  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Polipéptido T20 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 23 (derivada de la  
región entre  
los aminoácidos 27-41 de la proteína citocromo oxidasa de F. hepatica)  
repetida tres veces.

&lt;400&gt; 44

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

Tyr	Gly	Cys	Cys	Gly	Leu	Asp	Pro	Tyr	Phe	Asn	Leu	Val	Ser	Pro	Glu
		20					25					30			

Val	Tyr	Asn	Tyr	Gly	Cys	Cys	Gly	Leu	Asp	Pro	Tyr	Phe	Asn	Leu	Val
		35			40						45				

Ser	Pro	Glu	Val	Tyr	Asn	Tyr	Gly	Cys
	50				55			

<210> 45  
<211> 57  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Polipéptido T21 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 24 (derivada de la  
región entre  
los aminoácidos 76-90 de la proteína citocromo oxidasa de F. hepatica)  
repetida tres veces.

&lt;400&gt; 45

Cys	Gly	Asp	Leu	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Asn	Ala	Leu	Ser	Ala	Trp	Leu
1				5				10					15		

Leu	Gly	Cys	Cys	Gly	Asp	Leu	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Asn	Ala	Leu	Ser
		20				25						30			

Ala	Trp	Leu	Leu	Gly	Cys	Cys	Gly	Asp	Leu	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Asn
			35			40					45				

Ala	Leu	Ser	Ala	Trp	Leu	Leu	Gly	Cys
		50			55			

<210> 46  
<211> 57  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Polipéptido T22 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 25 (derivada de la

región entre los aminoácidos 56-70 de la proteína vitelina de *F. hepatica*) repetida tres veces.

<400> 46

Cys Gly Phe Ala Gly His Gly Lys Ala Tyr Leu His Gly Ser Phe Asp  
1 5 10 15

Lys Gly Cys Cys Gly Phe Ala Gly His Gly Lys Ala Tyr Leu His Gly  
20 25 30

Ser Phe Asp Lys Gly Cys Cys Gly Phe Ala Gly His Gly Lys Ala Tyr  
35 40 45

Leu His Gly Ser Phe Asp Lys Gly Cys  
50 55

<210> 47

<211> 57

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido T23 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 26 (derivada de la región entre los aminoácidos 254-268 de la proteína vitelina de *F. hepatica*) repetida tres veces.

<400> 47

Cys Gly Tyr Glu Lys Tyr Glu Asp Asp Tyr Ala Arg Glu Thr Pro Tyr  
1 5 10 15

Asp Gly Cys Cys Gly Tyr Glu Lys Tyr Glu Asp Asp Tyr Ala Arg Glu  
20 25 30

Thr Pro Tyr Asp Gly Cys Cys Gly Tyr Glu Lys Tyr Glu Asp Asp Tyr  
35 40 45

Ala Arg Glu Thr Pro Tyr Asp Gly Cys  
50 55

<210> 48

<211> 57

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido T24 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 27 (derivada de la región entre los aminoácidos 101-115 de la proteína NADH de *F. hepatica*) repetida tres veces.

<400> 48

Cys Gly Leu Gly Ile Gly Phe Leu Val Glu Val Arg Arg Gly Tyr Val  
1 5 10 15

ES 2 525 106 B1

Arg Gly Cys Cys Gly Leu Gly Ile Gly Phe Leu Val Glu Val Arg Arg  
20 25 30  
Gly Tyr Val Arg Gly Cys Cys Gly Leu Gly Ile Gly Phe Leu Val Glu  
35 40 45  
Val Arg Arg Gly Tyr Val Arg Gly Cys  
50 55



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201330905

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 17.06.2013

(32) Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ROJAS CARABALLO, J.V. et al. "Immune response in BALB/c mice of peptides derived from <i>Fasciola hepatica</i> containing T and B epitopes designed by bioinformatical tools as vaccine candidates". XII Congreso Ibérico de Parasitología. Zaragoza 5-8 de Julio de 2011, página 108, resumen, [en línea], [recuperado el 20.08.2014]. Recuperado de Internet <URL: <a href="http://www.socpea.es/congresos/xii_congreso_iberico_parasitologia.pdf">http://www.socpea.es/congresos/xii_congreso_iberico_parasitologia.pdf</a> >.	1-25
A	LÓPEZ-ABÁN, L. et al. "Progress in the development of <i>Fasciola hepatica</i> vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD". VETERINARY PARASITOLOGY. 30.04.2007. Vol. 145, Nºs 3-4, páginas 287-297, todo el documento.	1-25
A	WO 9417820 A1 (DARATECH PTY, LTD.) 18.08.1994, todo el documento.	1-25
A	WO 2008041050 A1 (CENTRO INTERNACIONAL DE VACUNAS) 10.04.2008, resumen.	1-25

#### 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 22.08.2014	Examinador M. Novoa Sanjurjo	Página 1/4
--	---------------------------------	---------------

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N9/64** (2006.01)  
**A61K38/17** (2006.01)  
**A61K38/48** (2006.01)  
**C07K16/18** (2006.01)  
**C07K16/40** (2006.01)  
**A61K39/395** (2006.01)  
**A61P33/10** (2006.01)

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

C12N, A61K, C07K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.08.2014

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-25 Reivindicaciones	SI NO
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-25 Reivindicaciones	SI NO

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 se publica.

**Consideraciones:**

La invención consiste en un péptido sintético de secuencia SEQ ID nº 2, obtenido por trimerización del fragmento 46-60 (SEQ ID nº 18) de la proteína Catepsina B del gusano trematodo *Fasciola hepatica*. El péptido de la invención se combina con otros péptidos trímeros de *Fasciola hepática*, dando lugar a composiciones que se utilizan como vacunas.

**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	ROJAS CARABALLO, J.V. et al. "Immune response in BALB/c mice of peptides derived from <i>Fasciola hepatica</i> containing T and B epitopes designed by bioinformatical tools as vaccine candidates". XII Congreso Ibérico de Parasitología. Zaragoza 5-8 de Julio de 2011, página 108, resumen, [en línea], [recuperado el 20.08.2014]. Recuperado de Internet <URL: <a href="http://www.socepa.es/congresos/xii_congreso_ibérico_parasitología.pdf">http://www.socepa.es/congresos/xii_congreso_ibérico_parasitología.pdf</a> >.	
D02	LÓPEZ-ABÁN, L. et al. "Progress in the development of <i>Fasciola hepatica</i> vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD". VETERINARY PARASITOLOGY. 30.04.2007. Vol. 145, N°s 3-4, páginas 287-297.	
D03	WO 9417820 A1 (DARATECH PTY, LTD.)	18.08.1994
D04	WO 2008041050 A1 (CENTRO INTERNACIONAL DE VACUNAS)	10.04.2008

El documento D01, describe la obtención de péptidos antigenicos de diferentes proteínas de *Fasciola hepatica*, obtenidos por síntesis química después de haber sido identificados por medios bioinformáticos. No se proporcionan las secuencias de los péptidos, pero por los datos aportados parecen ser los péptidos de SEQ ID n°s 4-27 de la lista de secuencias de la presente solicitud.

El documento D02, *describe una vacuna contra *Fasciola hepatica*, obtenida con la proteína 15 transportadora de ácidos grasos de *Fasciola* hepática Fh15 FABP* y el mismo adyuvante utilizado en las composiciones de la invención.

El documento D03, describe una vacuna frente a *Fasciola hepatica* en la que el principio activo es un péptido antigenico de una catepsina.

El documento D04, describe una vacuna contra la malaria basada en epítopos B, T de *Plasmodium vivax*. Se utiliza un péptido de nueve aminoácidos que se repite tres veces en tandem para aumentar la respuesta inmune.

**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****NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA****Reivindicaciones 1-25**

Los péptidos derivados de proteínas de *Fasciola hepatica* que se utilizan para obtener el péptido de la invención han sido descritos anteriormente en el documento D01, pero en éste no se presentan las secuencias de los mismos. Los trímeros descritos en la invención, no han sido descritos previamente, aunque la obtención de péptidos sintéticos en los que se repiten en tandem epítopos localizados en proteínas de parásitos, se han descrito en la obtención de vacunas contra la malaria (ver documento D04).

No se ha encontrado en el estado de la técnica, ningún documento en el que se describa la obtención de trímeros de péptidos derivados de *Fasciola hepatica*. Por tanto, se considera que los documentos citados solo muestran el estado general de la técnica y no suponen una particular relevancia, ya que para una persona experta en la materia, no sería obvio aplicar las características de los documentos citados y llegar a la invención tal y como se menciona en las reivindicaciones 1-25. Por lo tanto, el objeto de la presente solicitud cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes 11/1986.