(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 332 701**

(51) Int. Cl.:
C12P 21/02 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/165 (2006.01)
A61K 39/175 (2006.01)
A61K 38/09 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **00906047 .6**
(96) Fecha de presentación : **07.02.2000**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1147212**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **24.10.2001**

(54) Título: **Epítopes de las células T adyuvantes.**

(30) Prioridad: **05.02.1999 AU PP8533**
04.08.1999 AU PQ2013

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.02.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.02.2010

(73) Titular/es: **The University of Melbourne**
Royal Parade
Parkville, VIC 3052, AU
CSL Limited,
COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION,
THE COUNCIL OF THE QUEENSLAND INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH y
THE WALTER AND ELIZA HALL INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH

(72) Inventor/es: **Jackson, David, Charles;**
Ghosh, Souravi y
Walker, John

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Epítopes de las células T adyuvantes.

La presente invención se refiere a epítopes de las células T adyuvantes derivados del Virus del Moquillo de los caninos (CDV). La presente invención se refiere a composiciones que incluyen al menos un epítope de las células T adyuvantes y opcionalmente epítopes de las células B y/o epítopes CTL.

Antecedentes de la invención

Para que cualquier péptido sea capaz de inducir una respuesta eficaz de anticuerpos, el mismo tiene que contener secuencias particulares de aminoácidos conocidas como epítopes que son reconocidas por el sistema inmunitario. En particular, para las respuestas de anticuerpos, los epítopes precisan ser reconocidos por receptores específicos de inmunoglobulinas (Ig) presentes en la superficie de los linfocitos B. Son estas células las que se diferencian finalmente en células plasmáticas capaces de producir anticuerpos específicos para dicho epítope. Además de estos epítopes de las células B, el inmunógeno debe contener también epítopes que son presentados por las células presentadoras de antígeno (APC) a receptores específicos presentes en los linfocitos T adyuvantes, las células que son necesarias para proporcionar las señales requeridas para que las células B se diferencien en células productoras de anticuerpos.

En el caso de las infecciones virales y en muchos casos de cáncer, el anticuerpo produce un beneficio limitado en la recuperación y el sistema inmunitario responde con células T citotóxicas (CTL) que son capaces de destruir la célula infectada por el virus o célula cancerosa. Al igual que las células T adyuvantes, las CTL son activadas en primer lugar por interacción con APC que llevan su epítope peptídico específico presentado en la superficie, esta vez en asociación con el MHC clase I en lugar de moléculas de la clase II. Una vez activadas, las CTL pueden capturar una célula diana que lleva el mismo complejo péptido/clase I y causar su lisis. Está evidenciándose también que las células T adyuvantes juegan un papel en este proceso; antes que la APC sea capaz de activar la CTL, la misma tiene que recibir primeramente señales de la célula adyuvante T para regular en sentido creciente la expresión de las moléculas coestimuladoras necesarias.

Los epítopes de las células T adyuvantes son fijados por moléculas presentes en la superficie de las APCs que están codificadas por genes de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). El complejo de la molécula de clase II y el epítope peptídico es reconocido luego por receptores específicos de las células T (TCR) en la superficie de los linfocitos T adyuvantes. De este modo la célula T, presentada con un epítope antigénico en el contexto de una molécula MHC, puede activarse y proporcionar las señales necesarias para que el linfocito B se diferencie. Tradicionalmente, la fuente de epítopes de las células T adyuvantes para un inmunógeno peptídico es una proteína portadora a la cual se acoplan péptidos de modo covalente, pero este procedimiento de acoplamiento puede introducir otros problemas tales como modificación del determinante antigénico durante el proceso de acoplamiento y la inducción de anticuerpos contra el vehículo a expensas de anticuerpos que se dirigen hacia el péptido (Schutze, M. P., Leclerc, C. Jolivet, M. Audibert, F. Chedid, L. Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. Immunol. 1985, 135, 2319-2322; DiJohn, D., Torrese, J. R. Murillo, J. Herrington, D.A. *et al.* Effect of priming with carrier on response to conjugate vaccine. The Lancet. 1989, 2, 1415-1416). Adicionalmente, el uso de proteínas irrelevantes en la preparación introduce problemas de control de calidad. La elección de proteínas portadoras apropiadas es muy importante en el diseño de vacunas peptídicas y su selección está limitada por factores tales como toxicidad y factibilidad de su producción en gran escala. Existen otras limitaciones a este enfoque, que incluyen el tamaño de la carga peptídica que puede acoplarse y la dosis de vehículo que puede ser administrada en condiciones de seguridad (Audibert, F. a. C., L. 1984. Modern approaches to vaccines. Molecular and chemical basis of virus virulence and immunogenicity., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York.). Aunque las moléculas portadoras permiten la inducción de una respuesta inmunitaria fuerte, las mismas están asociadas también con efectos indeseables tales como la supresión de la respuesta de anticuerpos anti-peptídicos (Herzenberg, L. A. y Tokuhisa, T. 1980. Carrier-priming leads to hapten-specific suppression. Nature 285:664; Schutze, M. P., Leclerc, C., Jolivet, M., Audibert, F., y Chedid, L. 1985. Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. J Immunol 135:2319; Etlinger, H. M., Felix, A. M., Gillessen, D., Heimer, E. P., Just, M., Pink, J. R., Sinigaglia, F., Sturchler, D., Takacs, B., Trzeciak, A., and *et al*. 1988. Assessment in humans of a synthetic peptide-based vaccine against the sporozoite stage of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. J Immunol 140:626).

En general, por tanto, un inmunógeno ha de contener epítopes capaces de ser reconocidos por las células T adyuvantes además de los epítopes que serán reconocidos por la Ig de la superficie o por los receptores presentes en las células T citotóxicas. Debe tenerse en cuenta que estos tipos de epítopes pueden ser muy diferentes. Para los epítopes de las células B, la conformación es importante, dado que el receptor de las células B se fija directamente al inmunógeno nativo. En contraste, los epítopes recogidos por las células T no son dependientes de la integridad estructural del epítope, y están constituidos por secuencias cortas de aproximadamente 9 aminoácidos para CTL y secuencias ligeramente más largas, con menor restricción de longitud, para las células T adyuvantes. Los únicos requisitos para estos epítopes son que los mismos puedan alojarse en la hendidura de fijación de la molécula de la clase I o clase II respectivamente, y que el complejo sea capaz luego de acoplarse al receptor de las células T. El sitio de fijación de la molécula de clase II está abierto en ambos extremos, permitiendo una variación mucho mayor en la longitud de los péptidos enlazados (Brown, J. H., T. S. Jardetzky, J. C. Gorga, L. J. Stern, R. G. Urban, J. L. Strominger y D. C. Wiley, 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. Nature 364:33) with epitopes as short as 8 amino acid residues being reported (Fahrer, A.M., Geysen, H.M., White, D.O., Jackson.

D.C. y Brown, L.E. Analysis of the requirements for class II-restricted T-cell recognition of a single determinant reveals considerable diversity in the T-cell response and degeneracy of peptide binding to I-Ed J. Immunol. 1995. 155: 2849-2857).

El virus del moquillo de los caninos (CDV) pertenece al subgrupo de la familia de morbilivirus o paramixovirus de los virus de RNA de cadena negativa. Otros virus que son miembros de este grupo son el virus del sarampión y el virus rinderpest ("morriña") de la peste del ganado. El desarrollo de vacunas basadas en péptidos ha despertado un interés considerable en la identificación de epítopes de las células B y T a partir de secuencias de proteínas. La base racional para la utilización de epítopes de las células T a partir de proteínas tales como la proteína F del CDV es que se inoculan perros jóvenes contra CDV en la primera fase de su vida y llegarán a poseer por tanto células T adyuvantes específicas para los epítopes de las células T adyuvantes presentes en esta proteína. La exposición subsiguiente a una vacuna que contiene uno o más de los epítopes dará por consiguiente como resultado el reclutamiento de células T adyuvantes existentes y por consiguiente una respuesta inmunitaria incrementada. Tales epítopes de células T adyuvantes podrían, sin embargo, administrarse a animales no sensibilizados e inducir todavía una respuesta inmunitaria. Los autores de la presente invención se propusieron identificar epítopes de las células T de los caninos a partir de la secuencia de la proteína de fusión CDV a fin de que estos epítopes puedan utilizarse luego en el diseño de vacunas basadas en péptidos, en particular, para los caninos y especies afines.

La LHRH (hormona liberadora de la hormona luteinizante) es una hormona peptídica de 10 aminoácidos de longitud cuya secuencia está conservada entre los mamíferos. La misma es secretada por el hipotálamo y controla la fisiología reproductora tanto de los machos como de las hembras. El principio del desarrollo de vacunas inmunoanticonceptivas basadas en LHRH se basa en observaciones de que los anticuerpos para LHRH bloquean la acción de la hormona en la secreción hipofisaria de hormona luteinizante y hormona estimulante del folículo, conduciendo a atrofia gonadal y esterilidad en los mamíferos.

La mayoría de las vacunas de LHRH que han sido desarrolladas están constituidas por LHRH conjugada químicamente a vehículos proteínicos para proporcionar adyuvantes de las células T para la producción de anticuerpos anti-LHRH. Se ha demostrado que, después de inoculación repetida de conjugados LHRH-vehículo proteínico, el título anti-LHRH disminuye debido al fenómeno conocido como "supresión de epítopes inducida por el vehículo". Una idea de los autores de la presente invención consiste en reemplazar los vehículos proteínicos en las vacunas con epítopes de adyuvantes T (epítopes TH) definidos a fin de eliminar la "supresión de epítopes inducida por el vehículo".

Sumario de la invención

Los presentes inventores han identificado un número de péptidos de 17 residuos cada uno de los cuales incluye un epítope de las células T adyuvantes. Como será apreciado fácilmente, la mayoría de estos péptidos no son epítopes mínimos de células T adyuvantes. Típicamente, se ha demostrado que las moléculas de la clase II están asociadas con péptidos tan cortos como 8 aminoácidos [Fahrer *et al.*, 1995, *ibid.*] pero usualmente de 12-19 aminoácidos (Chicz, R. M., Urban, R. G., Gorga, J. C., Vignali, D. A. A., Lane, W. S. y Strominger, J. L. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. J Exp Med 1993, 178, 27-47; Chicz, R. M., Urban, R. G., Lane, W. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Vignali, D. A. A. and Strominger, J. L. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. Nature 1992, 358, 764-8), aunque se ha consignado la existencia de péptidos de hasta 25 aminoácidos de longitud que se fijan a la clase II (revisado en Rammensee, H.-G. Chemistry of peptide associated with class I and class II molecules. Curr Opin Immunol 1995, 7, 85-95).

Así pues, epítopes peptídicos que están comprendidos en longitud entre 8 y 25 residuos de aminoácidos pueden fijarse a las moléculas de clase II. Los péptidos más cortos son epítopes de "núcleo", que pueden tener menos actividad que las secuencias más largas, pero es un ejercicio trivial la truncación de secuencias más largas en el término N o el término C para producir secuencias más cortas que tengan la misma o mejor actividad que la secuencia parental.

De acuerdo con ello, en un primer aspecto, la presente invención consiste en un epítope de las células T adyuvantes capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un animal canino, estando contenido el epítope dentro de una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SSKTQTHTQQDRPPQPS; QPSTELEETRTSRARHS; RHSTTSAQRSTHYDPRT; PRTSDRPVSYTMNRTRS; TRSRKQTSHRLKNIPVH; SHQYLVIKLIPNASLIE; IGTDNVHYIKIMTRPSHQ; YKIMTRPSHQYLVIKLI; KLIPNASLIENCTKAEL; AELGEYEKLLNSVLEPI; EPINQALTLMTKNVKPL; FAGVVLAGVALGVATAA; TAAQITAGLALHQSNLN; GIALHQSNLNAQAIQSL; NLNAQAIQSLRTSLEQS; QSLRTSLEQSNKAIEEI; EQSNKAIEEIREATQET; TELLSIFGPSLRDPISA; PRYIATNGYLISNFDES; CIRGDTSSCARTLVSGT; DESSCVFVSESAICSQN; TSTIINQSPDKLLTFIA, SPDKLLTFIASDTCPLV.

En un segundo aspecto, la presente invención consiste en una composición para uso en la producción de una respuesta inmunitaria en un animal, comprendiendo la composición al menos un epítope de las células T adyuvantes capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un animal canino, estando contenido el al menos un epítope de las células T adyuvantes dentro de una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SSKTQTHTQQDRPPQPS; QPSTELEETRTSRARHS; RHSTTSAQRSTHYDPRT; PRTSDRPVSYTMNRTRS; TRSRKQTSHRLKNIPVH; SHQYLVIKLIPNASLIE; IGTDNVHYKIMTRPSHQ; YKIMTRPSHQYLVIKLI; KLIPNASLIENCTKAEL; AELGEYEKLLNSVLEPI; EPINQALTLMTKNVKPL; FAGVVLAGVALGVATAA;

TAAQITAGIALHQSNLN; GIALHQSNLNAQAIQSL; NLNAQAIQSLRTSLEQS; QSLRTSLEQSNKAIEEI; EQSNKAIEEIREATQET; TELLSIFGPSLRDPISA; PRYIATNGYLISNFDES; CIRGDTSSCARTLVSGT; DESSCVFVSESAICSQN; TSTIINQSPDKLLTFIA, SPDKLLTFASDTCPLV.

En una realización preferida de la presente invención, la composición comprende al menos un péptido seleccionado del grupo constituido por SSKTQTHTQQDRPPQPS; QPSTELEETRTSRARHS; RHSTTSAQRSTHYDPRT; PRTSDRPVSYTMNRTRS; TRSRKQTSHRLKNIPVH; SHQYLVIKLIPNASLIE; IGTDNVHYKIMTRPSHQ; YKIMTRPSHQYLVIKLI; KLIPNASLIENCTKAEL; AELGEYEKLLNSVLEPI; EPINQALTLMTKNVKPL; FAGWLAGVALGVATAA; TAAQITAGIALHQSNLN; GIALHQSNLNAQAIQSL; NLNAQAIQSLRTSLEQS; QSLRTSLEQSNKAIEEI; EQSNKAIEEIREATQET; TELLSIFGPSLRDPISA; PRYIATNGYLISNFDES; CIRGDTSSCARTLVSGT; DESSCVFVSESAICSQN; TSTIINQSPDKLLTFIA, SPDKLLTFIASDTCPLV.

Adicionalmente, se prefiere que la composición comprenda además al menos un epítope de las células B y/o al menos un epítope CTL.

En otra realización preferida adicional, el al menos un epítope de las células B y/o el al menos un epítope CTL están enlazados contiguamente a al menos uno de los epítopes de las células T adyuvantes. Se prefiere también que la composición comprenda una pluralidad de constructos de epítopes en los cuales cada uno comprende al menos un epítope de las células T adyuvantes y al menos un epítope de las células B. Alternativamente, la composición puede comprender una pluralidad de constructos de epítopes en los cuales cada uno comprende al menos un epítope de las células T adyuvantes y al menos un epítope CTL.

Se comprenderá que el epítope de las células B o epítope CTL puede ser cualquier epítope. Un epítope de las células B preferido actualmente es un epítope de células B LHRH.

La composición de la presente invención puede comprender una pluralidad de epítopes de células T adyuvantes. Estos epítopes pueden ser singulares o pueden estar unidos entre sí contiguamente para formar un solo polipéptido. Se comprenderá que donde los epítopes están enlazados unos a otros en un solo polipéptido, los epítopes pueden ser contiguos (es decir, sin estar distanciados por aminoácidos adicionales o pueden estar distanciados por aminoácidos adicionales que no forman parte en sí mismos de los epítopes de las células T adyuvantes.

Como se ha expuesto anteriormente en una realización, los epítopes de las células T adyuvantes y al menos un epítope de las células B y/o al menos un epítope CTL en el cual están enlazados contiguamente los epítopes. Esto puede hacerse por enlace covalente simple de los péptidos. En otra realización, los epítopes están polimerizados, muy preferiblemente del modo que se describe en PCT/AU98/00076, cuya descripción se incorpora en esta memoria por referencia.

En otra realización preferida adicional, la composición comprende adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un adyuvante.

En un aspecto adicional, la presente invención puede utilizarse en un método de inducción de una respuesta inmunitaria en un animal, comprendiendo el método administrar al animal la composición del segundo aspecto de la presente invención.

Vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen los utilizados en composiciones adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (con inclusión de bucal y sublingual), vaginal, parenteral (con inclusión de subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural). Los mismos son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas.

Ejemplos representativos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin carácter limitante, agua, soluciones isotónicas que están preferiblemente tamponadas a un pH fisiológico (tal como solución salina tamponada con fosfato o solución salina tamponada con Tris) y pueden contener también uno o más de manitol, lactosa, trehalosa, dextrosa, glicerol, etanol o polipéptidos (tales como sero-albúmina humana). Las composiciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosis unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia.

Como se ha mencionado, se prefiere que la composición incluya un adyuvante. Como se comprenderá, un "adyuvante" significa una composición constituida por una o más sustancias que mejora la inmunogenicidad y eficacia de una composición de vacuna. Ejemplos no limitantes de adyuvantes adecuados incluyen escualano y escualeno (u otros aceites de origen animal); copolímeros de bloques; detergentes tales como Tween® -80; Quil® A, aceites minerales tales como Drakeol o Marcol, aceites vegetales tales como aceite de cacahuete; adyuvantes derivados de *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium parvum*; adyuvantes derivados de *Propionibacterium* tales como *Propionibacterium acne*; *Mycobacterium bovis* (bacilo de Calmette y Guerin o BCG; interleuquinas tales como interleuquina 2 e interleuquina 12; monoquinas tales como interleuquina 1: factor de necrosis tumoral, interferones tales como gamma-interferón; combinaciones tales como saponina-hidróxido de aluminio o Quil-A-hidróxido de aluminio; liposomas; adyuvante ISCOM; extracto de paredes celulares micobacterianas; glicopéptidos sintéticos tales como muramil-dipéptidos u otros derivados; Avridina; derivados de lípido A; sulfato de dextrano; DEAE-dextrano o con fosfato de aluminio; carboxipolimetileno tal como Carbopol' EMA; emulsiones de copolímeros acrílicos tales como Neocryl

A640 (v.g. Patente U.S. No. 5.047.238); proteínas de poxvirus Vaccinia o poxvirus de animales; adyuvantes de proteínas sub-virales tales como la toxina del cólera, o mezclas de los mismos.

Como será reconocido por los expertos en la técnica, pueden hacerse modificaciones en los péptidos de la presente invención sin anular por completo su actividad biológica. Estas modificaciones incluyen adiciones, deleciones y sustituciones, en particular sustituciones conservadoras. Debe entenderse que los péptidos que incluyen tales modificaciones que no den como resultado la pérdida completa de actividad como epítopes de las células T adyuvantes están dentro del alcance de la presente invención.

Si bien el concepto de sustitución es bien conocido en el campo, se exponen a continuación los tipos de sustituciones contempladas.

Residuo Original	Sustituciones Ilustrativas	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val: leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln: his; lys; arg	Gln
Asp (D)	glu	Glu
Cys (C)	ser	Ser
Gln (Q)	asn	Asn
Glu (E)	asp	Asp
Gly (G)	pro	Pro
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	Leu
Leu (L)	norleucina, ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile;	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala	leu
Pro (P)	gly	gly
Ser (S)	thr	thr
Thr (T	ser	ser
Trp (W)	tyr	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe ala; norleucina	leu

Otro tipo de modificación de los péptidos contemplados incluye, pero sin carácter limitante, modificaciones de las cadenas laterales, incorporación de aminoácidos no naturales y/o sus derivados durante la síntesis de los péptidos y el uso de reticulantes y otros métodos que imponen limitaciones estructurales en los péptidos.

Ejemplos de modificaciones de las cadenas laterales contempladas por la presente invención incluyen, pero sin carácter limitante, modificaciones de grupos amino por ejemplo por alquilación reductora por reacción con un aldehído

seguida por reducción con $NaBH_4$; amidación con acetimidato de metilo; acilación con anhídrido acético; carbamoilación de grupos amino con cianato; trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobenceno-sulfónico (TNBS); acilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidroftálico; y piridoxilación de lisina con piridoxal-5'-fosfato seguida por reducción con $NaBH_4$.

El grupo guanidino de los residuos arginina puede modificarse por la formulación de productos de condensación heterocíclicos con reactivos tales como 2,3-butanodiona, fenilglioxal y glioxal.

El grupo carboxilo puede modificarse mediante activación con carbodiimida por formación de O-acilisourea seguida por derivatización subsiguiente, por ejemplo, para dar una amida correspondiente.

Los residuos triptófano pueden modificarse, por ejemplo, por oxidación con N-bromosuccinimida o alquilación del anillo indol con bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobencilo o haluros de sulfenilo. Los residuos tirosina, por otra parte, pueden alterarse por nitración con tetranitrometano para formar derivados de 3-nitrotirosina.

La modificación del anillo de imidazol de un residuo histidina puede realizarse por alquilación con derivados de ácido yodoacético o N-carbetoxilación con pirocarbonato de dietilo.

Ejemplos de la incorporación de aminoácidos no naturales y derivados durante la síntesis de los péptidos incluyen, pero sin carácter limitante, el uso de norleucina, ácido 4-amino-butírico, ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico, ácido 6-aminohexanoico, t-butilglicina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metil-heptanoico, 2-tienil-alanina y/o isómeros D de aminoácidos.

Los péptidos de la presente invención pueden derivarse de CDV. Alternativamente, el péptido o la combinación de epítopes peptídicos pueden producirse por tecnología de DNA recombinante. Sin embargo, se prefiere que los péptidos se produzcan por síntesis utilizando métodos bien conocidos en el campo. Por ejemplo, los péptidos pueden sintetizarse utilizando síntesis en solución o síntesis en fase sólida como se describe, por ejemplo, en el Capítulo 9 titulado "Peptide Synthesis" por Atherton y Sheppard que se incluye en una publicación titulada "Synthetic Vaccines" editada por Nicholson y publicada por Blackwell Scientific Publications. Preferiblemente, se utiliza un soporte en fase sólida que puede estar constituido por perlas de gel de poliestireno en las cuales el poliestireno puede estar reticulado con una pequeña proporción de divinilbenceno (v.g. 1%) que se hincha ulteriormente por disolventes lipófilos tales como diclorometano o disolventes más polares tales como dimetilformamida (DMF). El poliestireno puede funcionalizarse con grupos clorometilo o aminometilo. Alternativamente, se utiliza gel de polidimetil-acrilamida reticulado y funcionalizado que puede estar fuertemente solvatado e hinchado por DMF y otros disolventes apróticos dipolares. Pueden utilizarse otros soportes basados en polietilen-glicol que está injertado usualmente o fijado de algún otro modo a la superficie de perlas de poliestireno inertes. En una forma preferida, puede hacerse uso de soportes sólidos comerciales o resinas que se seleccionan de PAL-PEG-PS, PAC-PEG-PS, KA, KR o TGR.

En la síntesis en estado sólido, se hace uso de grupos bloqueantes reversibles que tienen la función dual de enmascarar la reactividad indeseable en los grupos funcionales α-amino, carboxi o de cadenas laterales y de destruir el carácter dipolar de los aminoácidos y péptidos que los hacen inactivos. Tales grupos funcionales pueden seleccionarse de terc-butil-ésteres de la estructura RCO-$OCMe_3$-CO. Puede hacerse uso también de los bencil-ésteres correspondientes que tienen la estructura RCO-OCH_2-C_6H_5 y uretanos que tienen la estructura $C_6H_5CH_2OCO$-NHR, que se conocen como los derivados de benciloxicarbonilo o derivados Z y cualquier Me_3-COCO-NHR, que se conocen como derivados de t-butoxi-carbonilo, o derivados Boc. Puede hacerse también uso de derivados de fluorenil-metanol y especialmente el grupo fluorenil-metoxi-carbonilo o Fmoc. Cada uno de estos tipos de grupo protector es susceptible de escisión independiente en presencia de cualquier otro, de tal modo que se hace uso frecuentemente, por ejemplo, de estrategias de protección con BOC-bencilo y Fmoc-terc-butilo.

Debe hacerse también referencia a un agente de condensación para enlazar los grupos amino y carboxilo de aminoácidos o péptidos protegidos. Esto puede hacerse por activación del grupo carboxi de tal modo que el mismo reaccione espontáneamente con una amina primaria o secundaria libre. Ésteres activados tales como los derivados de p-nitrofenol y pentafluorofenol pueden utilizarse para este propósito. Su reactividad puede incrementarse por adición de catalizadores tales como 1-hidroxibenzo-triazol. Pueden utilizarse también ésteres de triazina DHBT (como se expone en las páginas 215-216 de la referencia de Nicholson arriba mencionada). Otras especies acilantes se forman *in situ* por tratamiento del ácido carboxílico (es decir, el aminoácido o péptido protegido en N-alfa) con un reactivo de condensación y se hacen reaccionar inmediatamente con el componente amino (el aminoácido o péptido protegido en carboxi o C). Diciclohexilcarbodiimida, el reactivo BOP (al que se hace referencia en la página 216 de la referencia de Nicholson), hexafluorofosfato de O'-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU) y su tetrafluoborato análogo son agentes de condensación utilizados frecuentemente.

La fijación del primer aminoácido al soporte de fase sólida puede realizarse utilizando BOC-aminoácidos de cualquier manera adecuada. En un método, se fijan amino-ácidos BOC a resina de clorometilo por calentamiento de las sales de trietil-amonio con la resina. Los Fmoc-aminoácidos pueden acoplarse a la resina de alcohol p-alcoxibencílico de manera similar. Alternativamente, puede hacerse uso de diversos agentes de enlace o "asas" para unir el primer aminoácido a la resina. A este respecto, el ácido p-hidroximetil-fenilacético enlazado a aminometil-poliestireno puede utilizarse para este propósito.

A lo largo de esta memoria descriptiva, se entenderá que el término "comprenden" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende(n)", implica(n) la inclusión de un elemento, entidad o paso, o grupo de elementos, entidades o pasos indicado(s), pero no la exclusión de ningún otro elemento, entidad o paso, o grupo de elementos, entidades o pasos.

Descripción detallada de la invención

Con objeto de que la naturaleza de la presente invención pueda comprenderse más fácilmente, se describirán a continuación formas preferidas de la misma con referencia a los ejemplos no limitantes siguientes.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de CDV.

Figura 2. Índices de estimulación para el epítope Th P25 y sus versiones truncadas de perros inmunizados con P25-LHRH. (Eje X, concentración de péptidos en nmoles/pocillo).

Figura 3. Índices de estimulación para el epítope Th P27 y su 15-mero truncado de perros inmunizados con P27-LHRH. (Eje X, concentración de péptidos, nmoles/pocillo).

Figura 4. Índices de estimulación para el epítope Th P35 y sus versiones truncadas de perros inmunizadas con P35-LHRH. (Eje X, concentración de péptidos, nmoles/pocillo).

Ejemplo 1

Identificación de los epítopes de las células T adyuvantes

Métodos y Resultados

Para la identificación de los epítopes de las células T de los caninos, se diseñaron 94 péptidos solapantes de 17 residuos que abarcaban la secuencia entera de la proteína de fusión del virus del moquillo de los caninos (CDV). Los péptidos 17-meros se numeraron secuencialmente para identificación a partir del término N. La secuencia de la proteína de fusión de CDV como fue determinada por Barrett *et al.* 1987 (Virus Res. 8, 373-386) se muestra en la Figura 1. Los péptidos se utilizaron en escenarios de proliferación de las células T que utilizaban linfocitos de sangre periférica (PBMC) de perros inmunizados con la vacuna Canvac™ 3 en 1 (CSL Limited) que contiene CDV vivos.

Inicialmente, se utilizaron cuatro perros y se reforzaron luego con la vacuna Canvac™ 3 en 1 dos veces con 4 a 6 semanas entre cada vacunación. Los perros se sangraron después de cada vacunación de refuerzo y se testaron los PBMCs contra los péptidos. No se observó proliferación significativa alguna de los péptidos.

Dado que se ha considerado que CDV es linfotrópico y que la vacuna está constituida por CDV vivos, existía la posibilidad de que la misma pueda ser secuestrada en los órganos linfoides impidiendo que números significativos de células T precursoras entren en el sistema periférico. Para aumentar la frecuencia de las células T anti-CDV de la sangre periférica se reforzaron los perros con CDV destruido por calor (obtenido como un pelet a partir de medio de cultivo de virus, CSL Limited). Dos semanas después, se sangraron los perros y se testaron los PBMCs en cuanto a proliferación contra los péptidos. Una vez más, no se apreció proliferación alguna de los antígenos peptídicos.

Se utilizó una estrategia alternativa para aumentar la frecuencia de precursores de las células T específicas que reconocían los péptidos CDV. PBMCs recientes obtenidos de estos perros hiperinmunizados se sometieron a estimulación *in vitro* con agrupaciones de los 94 péptidos durante 30 minutos a 37ºC. Las células se lavaron luego para eliminar cualesquiera péptidos en exceso y se cultivaron durante 7 días. Esta población de células T se testó luego con APCs autólogas con cada péptido individual como el antígeno. La Tabla 1 muestra los péptidos para los cuales se observaron niveles de proliferación significativos (índice de estimulación >2).

Para confirmar esta observación, se sangraron de nuevo los mismos cuatro perros, cinco semanas después de la recepción de la dosis de virus muertos. Se estimularon los PBMCs *in vitro* con agrupaciones de la totalidad de los 94 péptidos o los péptidos 21-40 (debido a que la mayor parte de la actividad se encontraba en esta región) y después de 7 días de cultivo se testaron las células T estimuladas contra péptidos individuales. Se obtuvieron índices de estimulación significativos con todos los péptidos, confirmando los resultados anteriores. Se testaron cuatro perros más que recibieron únicamente una dosis de la vacuna 3 en 1, utilizando el método de estimulación *in vitro*, y la totalidad de los cuatro perros respondían a la mayor parte de los péptidos que se muestran en la Tabla 2.

Los péptidos anteriores se testaron también en células de perros adicionales, con los resultados que se muestran en la Tabla 3. Se demostró también que los péptidos P64, P74 y P75 reaccionaban fuertemente con las células mononucleares de sangre periférica de perros de diversas razas inmunizados con CDV (Tabla 4), y se identifican por tanto como epítopes T adyuvantes fuertes.

TABLA 1

Identificación de los epítopes de las células T de los caninos a partir de la secuencia de la proteína de fusión de CDV

Péptidos	Beagle zorrero (perro #18)	Beagle Zorrero (perro #19)	Beagle zorrero (perro #20)	Beagle zorrero (perro #21)
p2	2*	<2	8	3,9
p4	4,9	<2	3,3	4,6
p6	2,5	<2	4	5,1
p10	2,3	<2	3,2	9,1
p24	5,8	9,9	2,8	29
p25	3,2	11,9	4,5	17
p27	3,3	34	6,7	14,8
p29	3,5	42	4,4	<2
p35	3,1	57	3,3	22
p36	6,7	3,7	3,3	16
p37	6,9	10,9	8,2	26
p38	2,8	6,7	3,6	4,2
p47	3,3	85,7	2,9	1,9
p62	<2	51	5,6	4,2
p68	6,6	<2	<2	11,7

* Índice de estimulación

TABLA 2

Identificación de epítopes de células T de los caninos a partir de la secuencia de la proteína de fusión de CDV

Péptidos	Beagle zorrero (perro #70)	Beagle Zorrero (perro #71)	Beagle zorrero (perro #72)	Beagle zorrero (perro #73)
p8	2,2			
p22			2,6	
p24		3,2	2,2	
p25	1,5	2,9	2	12
p27		2,7	3,5	4,8
p28		2		
p29		2		6
p33			1,6	
p35			1,7	6,8
p37			1,7	
p62		3		

TABLA 3

Identificación de epítopes de las células T de los caninos a partir de la secuencia de la proteína de fusión de CDV

Péptidos	Ovejero zorrero (perro #125)	Ovejero zorrero (perro #126)
p23	3,2	
p27	4,5	8,5
p28	1,9	
p29	3,6	
p33	6	
p34	2,1	
p35	3,8	10
p36	3	
p37	2,5	
p38	2,2	
p39	2,9	
p47	2,7	
p62	2,4	
p68	2,9	

TABLA 4

Identificación de epítopes de las células T de caninos a partir de la secuencia de la proteína de fusión de CDV

Péptidos	Perro de aguas Shitzu	Beagle zorrero #18	Beagle zorrero #19	Beagle zorrero #20	Beagle zorrero #21
P64	50,0		2,5	2,5	
P74	4,0			1,7	6,0
P75	10	2,5			7,2

Una vez más, se testaron los mismos péptidos y un péptido P32 adicional en células de perros adicionales. Se demostró también que estos péptidos reaccionan fuertemente con las células mononucleares de sangre periférica de perros de diversas razas inmunizados con CDV (Tabla 5), y son identificados por tanto como epítopes T adyuvantes fuertes.

En conclusión, se identificaron 26 péptidos como epítopes de células T adyuvantes de los caninos y la proteína de fusión de CDV. Las secuencias de cada uno de estos péptidos se expone en la Tabla 6.

Estos epítopes de las células adyuvantes P que tienen utilidad como componentes de vacunas animales, en particular, vacunas de los caninos, sea simplemente como vacunas basadas en péptidos sintéticos y como adiciones a vacunas que contienen antígenos más complejos.

TABLA 5

Identificación de epítopes de las células T de los caninos a partir de la secuencia de la proteína de fusión de CDV

Péptidos	Perro de Aguas Shitzu	Galgo	Fox terrier	Terrier cruzado	Ovejero de muestra	Collie fronterizo
P2	140	<2	<2	<2	2,6	2
P4	44	2	<2	2	3,5	2
P6	38	<2	<2	<2	<2	2
P8	100	2	<2	<2	2,8	2
P10	50	2	2,2	2,1	2,4	3
P25	<2	<2	2,6	<2	2,6	<2
P29	2	<2	<2	2	<2	<2
P32	<2	2	<2	<2	<2	<2
P33	<2	<2	<2	<2	2	2
P35	<2	<2	2,2	<2	2	2
P37	<2	<2	<2	2	2	<2
P62	24	<2	<2	<2	<2	<2
P64	50	<2	<2	<2	<2	<2
P68	5	<2	<2	<2	<2	<2
P74	4	<2	<2	<2	<2	<2
P75	10	<2	<2	<2	<2	<2

TABLA 6

Secuencias de los péptidos

P2	SSKTQTHTQQDRPPQPS
P4	QPSTELEETRTSRARHS
P6	RHSTTSAQRSTHYDPRT
P8	PRTSDRPVSYTMNRTRS
P10	TRSRKQTSHRLKNIPVH
P24	SHQYLVIKLIPNASLIE
P22	IGTDNVHYKIMTRPSHQ
P23	YKIMTRPSHQYLVIKLI
P25	KLIPNASLIENCTKAEL
P27	AELGEYEKLLNSVLEPI
P28	KLLNSVLEPINQALTLM
P29	EPINQALTLMTKNVKPL
P32	SGRRQRRFAGVVLAGVA
P33	FAGVVLAGVALGVATAA
P34	GVALGVATAAQITAGIA
P35	TAAQITAGIALHQSNLN
P36	GIALHQSNLNAQAIQSL
P37	NLNAQAIQSLRTSLEQS
P38	QSLRTSLEQSNKAIEEI
P39	EQSNKAIEEIREATQET
P47	TELLSIFGPSLRDPISA
P62	PRYIATNGYLISNFDES
P68	CIRGDTSSCARTLVSGT
P64	DESSCVFVSESAICSQN
P74	TSTIINQSPDKLLTFIA
P75	SPDKLLTFIASDTCPLV

Se testaron secuencias seleccionadas de los epítopes de células T identificados en cuanto a su capacidad para inducir una respuesta de anticuerpos para un epítope de células B enlazado. Las pruebas se realizaron en perros para evaluación de las respuestas de anticuerpos. Los epítopes de células T se enlazaron al epítope LHRH de células B (hormona liberadora de la hormona luteinizante), con el epítope de las células T en el término N y LHRH posicionada en el término carboxi.

Se sintetizaron los péptidos utilizando química estándar con protección de Fmoc. Todos los péptidos se purificaron al menos hasta una pureza de 80% y el producto se comprobó por espectroscopia de masas.

Los péptidos se produjeron como determinantes contiguos célula T-célula B. La secuencia LHRH de Pyro Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly, o variaciones de la misma se enlazó al término carboxilo de cada epítope adyuvante T de CDV respectivo.

La evaluación *in vivo* de algunos de los epítopes T adyuvantes se condujo en dos pruebas, por vacunación de perros con secuencias T adyuvantes-LHRH.

Ejemplo 2

Prueba K9-5

Se utilizaron en esta prueba un total de 14 perros de sexo mixto. Todos ellos habían sido vacunados previamente con una vacuna CDV viva y se habían vacunado también contra LHRH.

Formulación de la vacuna

Los péptidos de test P25, P27, P35 de CDV se sintetizaron con LHRH en el término C de cada epítope adyuvante T. La secuencia LHRH utilizada estaba constituida por los 10 aminoácidos completos de la LHRH nativa. Cada uno de los constructos de la vacuna, junto con un péptido de control que comprendía un epítope de células T de la gripe de los ratones enlazado a un epítope de células B de la malaria repetido (secuencia representada en la tabla siguiente) se purificaron hasta pureza 80-90%. Todos los péptidos se disolvieron en urea 4M antes de dilución con solución salina estéril a un volumen apropiado para dar 40 nmoles por dosis de 1 ml. Se añadió Iscomatrix™ a una concentración final de 130 μg/1 ml de dosis como adyuvante junto con tiomersal como conservante (0,01%).

ISCOM™ o Immunostimulating Complex (Barr, Sjolander y Cox, 1998, Advanced Drug Delivery Systems 32:247-271) son una clase bien caracterizada de adyuvante constituida por un complejo de fosfolípidos, colesterol y saponina, usualmente con una proteína incorporada en el complejo. En los casos en que el complejo se forma en ausencia de antígeno proteínico, entonces este complejo se designa como Iscomatrix™. La saponina utilizada en la preparación de este adyuvante era Quil A.

Vacunación, muestras de sangre y ensayos

Todos los perros se vacunaron con una dosis de 1 ml, administrada en el cogote. Las vacunaciones se realizaron a las 0 y 4 semanas y se obtuvieron muestras de sangre venosa a intervalos durante la prueba.

Se determinó la ayuda eficaz de las células T por medida de la respuesta de anticuerpos para LHRH por ELISA. La eficacia biológica de la vacuna basada en el péptido se determinó por medida de los niveles de progesterona en perros hembras y testosterona en perros macho.

TABLA 7

Grupos de Prueba

Péptido	**Perros Núm.**
Control -ALNNRFQIKGVELKS - (NANP) 3	104, 998
P25 -LHRH 1-10	70, 73, 127, 993
P27 -LHRH 1-10	20, 94, 101, 105
P35 -LHRH 1-10	19, 96, 100, 102

Resultados

Estaban presentes niveles bajos preexistentes de anticuerpos para LHRH en todos los perros debido a una inmunización previa con una vacuna diferente. El grupo de control de los perros exhibía una disminución lenta en los niveles de anticuerpos.

Los perros inmunizados con P25-LHRH, P27-LHRH y P35-LHRH exhibían todos ellos respuestas fuertes de anticuerpos para el epítope de las células B (LHRH). Esta respuesta persistía hasta 6 semanas después de la vacunación de refuerzo (véase la Tabla 8).

La potencia biológica de la vacuna se demostró por una reducción importante en los niveles de progesterona o testosterona (véase las Tablas 9 y 10).

TABLA 8

Títulos anti LHRH

		Títulos anti-LHRH		
Péptido	**Perro No.**	**Sangrías previas**	**Dos semanas después del refuerzo**	**Seis semanas después del refuerzo**
Control	104	1258	1975	1936
	998	2559	1982	1947
Valor medio		1794	1978	1941
Intervalo		1258-2559	1975-1982	1936-1947
P25-LHRH (1-10)	70	856	24245	16697
	73		42665	16922
	127	1361	21485	19662
	993	577	24879	15119
Valor medio		886	23120	17242
Intervalo		0-1361	21485-42665	15119-19662
p27-LHRH (1-10)	20	747	29653	8423
	94		41247	22759
	101	4256	52724	17353
	105	944	12600	8366
Valor medio		2004	25774	12049
Intervalo		747-4256	12600-52724	8366-22759
p35-LHRH (11-10)	19	665	18033	6228
	96	1621	26583	5744
	100	580	17255	4829
	102	180	11740	2963
Valor medio		323	14233	3783
Intervalo		180-1621	11740-26583	2963-6228

TABLA 9

Resultados de progesterona (nmol/l)

Péptido	Perro No.	Cuatro semanas después de la primaria	Dos semanas después del refuerzo	Seis semanas después del refuerzo
Control	998	5,17	4,28	<0
p25-LHRH (1-10)	127	3,04	4,83	<0
	993	1,7	0,87	<0
p27-LHRH (1-10)	101	0,42	0,14	<0
p35-LHRH (1-10)	96	31,76	2,15	<0
	100	<0	<0	<0

TABLA 10

Resultados de testosterona (nmol/l)

Péptido	Perro No.	Cuatro semanas después de la primaria	Dos semanas después del refuerzo	Seis semanas después del refuerzo
Control	104	9,69	2,51	3,31
p25-LHRH (1-10)	70	< 0	< 0	<0
	73	5,38	<0	<0
p27-LHRH (1-10)	20	1,04	< 0	<0
	94	3,33	<0	<0
	105	>47,7	<0	<0
p35-LHRH (1-10)	19	4,3	2,77	4,55
	102	6,72	<0	<0

La eficacia de los epítopes de células T seleccionados de la proteína F de CDV para proporcionar ayuda de las células T a fin de producir respuestas de anticuerpos en los perros demuestra que las secuencias identificadas son funcionales. Estos resultados validan también el método científico y la utilidad del método de escrutinio *in vitro* para identificar secuencias de epítopes T adyuvantes con actividad *in vivo*.

Ejemplo 3

Prueba K9-8

Se utilizaron en esta prueba un total de 35 perros de sexo mixto. Todos ellos habían sido vacunados previamente con una vacuna CDV viva, pero no habían sido vacunados contra LHRH.

Formulación de la vacuna

Los epítopes T adyuvantes se enlazaron a una forma truncada de LHRH, que contenía los aminoácidos 2 a 10 de la secuencia nativa de 10 aminoácidos, como se muestra a continuación:

2-10 LHRH: His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly.

Todas las vacunas se formularon como para el Ejemplo 2, es decir cada una de 1 ml de dosis de vacuna que contenía 40 nmoles de péptido, 150 μg de Iscomatrix™, y tiomersal como conservante.

En los casos en que los perros se vacunaron con una agrupación de péptidos, la concentración de cada péptido se ajustó para dar concentraciones iguales y una cantidad total de 40 nmoles de epítope LHRH por ml de dosis.

Vacunación, muestras de sangre y ensayos

Todos los perros se vacunaron con una dosis de 1 ml, administrada en el cogote. Las vacunaciones se realizaron a las 0 y 4 semanas y se obtuvieron muestras de sangre venosa a intervalos durante la prueba.

Se determinó el adyuvante de células T efectivo por medida de la respuesta de anticuerpos para LHRH por ELISA. La efectividad biológica de la vacuna basada en péptidos se determinó por medida de los niveles de progesterona en perros hembra y testosterona en perros macho.

TABLA 11

Grupos de prueba

Grupo de péptido	**Perros Núms.**
P25-LHRH 2-10	211, 195, 197, 181
P27-LHRH 2-10	203, 191, 186, 201
P35-LHRH 2-10	217, 198, 187, 196
Agrupación: P25-LHRH 2-10, P27-LHRH 2-10, P35-LHRH 2-10	212, 193, 178, 216, Y3
P2-LHRH 2-10	194, 199, 179, 220
P8-LHRH 2-10	Y4, Y6, 160, 200
P62-LHRH 2-10	219, 185, 221, 177
P75-LHRH 2-10	189, 222, 202, 176
Controles no vacunados	190, 159

Resultados

Se demostraron fuertes respuestas de anticuerpos a LHRH en los perros inmunizados con los constructos células T-LHRH con los epítopes de las células T P25, P27, P35, P62, P75, y la agrupación de péptidos células T-LHRH que comprendía una combinación de epítopes de células T P25, P27, y P35 (véase Tabla 12).

Se observaron respuestas de anticuerpos bajas a indetectables en los perros inmunizados con los péptidos P2 y P8-LHRH (véase tabla 12). Se concluyó que esto indicaba que estos péptidos de células T no eran bien reconocidos por los perros Beagle-Zorrero, lo cual es consistente con su identificación utilizando PBMCs' de otras razas de perros. El cribado inicial en los perros Beagle-zorrero indicaba que esta raza de perros no responde a estos 2 epítopes de las células T.

Como es bien conocido por los expertos en la técnica de las vacunas de péptidos, la respuesta a péptidos individuales está determinada genéticamente. El Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC II) es polimórfico. Las moléculas de la clase II en la superficie de las células funcionan para fijar péptidos para presentación a las células T, lo que se requiere como parte del proceso de activación para las células T, con inclusión de las células T adyuvantes. Las formas alélicas del MHC clase II fijan series discretas de antígenos peptídicos, y por tanto la respuesta a estos antígenos está determinada genéticamente. Así pues, los resultados se interpretan para indicar que la raza de perro Beagle-zorrero no posee los alelos MHC-II apropiados para responder a P2 y P8, pero que otras razas de perro sí lo hacen, v.g. la raza Poodle (perro de aguas)-Shitzu, que se utilizaban para identificar estos péptidos.

Los perros de control no exhibían cambio alguno en los niveles de anticuerpos para LHRH durante el periodo de prueba y los niveles de hormonas estaban dentro de los intervalos normales para la edad y el sexo de los perros (véase Tabla 12).

TABLA 12

Títulos anti-LHRH

			Títulos anti-LHRH		
Péptido	**Grupo**	**Perro No.**	**Cuatro semanas después de la primaria**	**Dos semanas después del refuerzo**	**Cuatro semanas después del refuerzo**
Control	1	159	0	0	0
	1	190	0	0	0
	GMT				
Agrupación	2	Y3	1860	55659	95038
	2	178	17900	416036	486793
	2	193	8770	211369	189143
	2	212	3766	121411	135293
	2	216	8378	294769	642293
	GMT		6207	177292	237798

TABLA 12 (continuación)

			Títulos anti-LHRH		
Péptido	**Grupo**	**Perro No.**	**Cuatro semanas después de la primaria**	**Dos semanas después del refuerzo**	**Cuatro semanas después del refuerzo**
P25-LHRH	3	181	1893	152264	131643
	3	195	31197	205906	455193
	3	197	14423	337698	240543
	3	211	20607	142798	131643
	GMT		11510	193037	214229
P27-LHRH	4	186	0	11206	17263
	4	191	0	59154	125493
	4	201	0	17041	34103
	4	203	0	1000	857
	GMT		0	18523	26698
P35-LHRH	5	187	2009	141775	55797
	5	196	4868	237208	158040
	5	198	1539	154375	68307
	5	217	0	121050	40822
	GMT		2469	103085	58002
P2-LHRH	6	179	0	0	0
	6	194	0	0	0
	6	199	0	0	0
	6	220	0	0	0
	GMT				
P8-LHRH	7	Y4	0	0	0
	7	Y6	0	0	0
	7	160	0	1200	ND
	7	200	0	8000	2227
	GMT				
P62-LHRH	8	177	1242	3821	2985
	8	185	0	146581	67461
	8	219	0	29353	28282
	8	221	2697	231473	156549
	GMT		1830	44167	30728
P75-LHRH	9	176	0	12177	5559
	9	189	0	15795	17155
	9	202	0	2121	2216
	9	222	0	9787	7879
	GMT			11201	8746

Ejemplo 4

Ensayos de proliferación de células T in vitro para demostrar el reconocimiento del epítope Th incorporado en las vacunas peptídicas

Para demostrar el reconocimiento del epítope Th en los PBMCs inmunógenos peptídicos obtenidos de perros inmunizados con vacunas peptídicas (perros del Ejemplo 2) se testaron contra los epítopes Th respectivos. El ensayo se llevó a cabo sin el enriquecimiento de PBMCs. PBMCs obtenidos por purificación en gradiente Ficoll se testaron directamente contra el epítope Th respectivo y sus versiones truncadas. El estudio demostró que todos los perros inyectados con vacunas peptídicas respondían al epítope Th incorporado, confirmando que la actividad de las células T reside en las secuencias respectivas (Figuras 2-4). Se testaron también versiones truncadas de los epítopes Th respectivos para definir más estrechamente la actividad de las células T en las secuencias. Se observó que para P25 la secuencia completa de 17 residuos era mejor que los péptidos más cortos de 15 y 12 residuos, truncado cada uno a partir del término N de la secuencia (Figura 2). Esto implica que la actividad de las células T se encuentra hacia el término N o el término medio del péptido de 17 residuos.

Se realizó una observación similar con P27, siendo el péptido de 17 residuos de longitud un simulador mejor que el 15-mero truncado a partir del término N (Figura 3). Esta observación sugería de nuevo que la actividad de las células T puede residir hacia el punto medio o el término N del péptido de longitud total.

En el caso de P35 y sus versiones más cortas, excepto para un perro (#102), los otros tres perros respondían tan bien al péptido de 12 residuos como al péptido completo de 17 residuos de longitud total (Figura 4). En el perro #102, el péptido de 15 residuos era más estimulante que el péptido de longitud total. De esto puede deducirse que los dos primeros residuos en la secuencia de P35 pueden no ser esenciales y que la actividad se encuentra hacia el punto medio o el término C del péptido.

Ejemplo 5

Prueba en ratones BALB/c

Las vacunas de caninos con epítopes Th y LHRH derivados de CDV-F utilizadas en el Ejemplo 3 se utilizaron también para inmunizar ratones BALB/c a fin de investigar si los epítopes Th podrían ser funcionales en una especie animal diferente.

Formulación de la vacuna

Todas las vacunas se formularon como para el Ejemplo 3 excepto que se diluyeron ulteriormente de tal modo que las dosis de 100 μl contenían 2,7 nmoles de péptido y 10 μg de Iscomatrix™ y tiomersol como conservante.

Vacunación, muestras de sangre y ensayos

Se vacunaron los ratones con 100 μl de la vacuna en la base del rabo. Las vacunaciones se administraron a las 0 y 4 semanas y los animales se sangraron a intervalos después de cada vacunación desde el plexo retro-orbital. Se determinó la ayuda efectiva de las células T por medida de la respuesta de anticuerpos a LHRH por ELISA.

Resultados

Los ratones inmunizados con P25-LHRH y una agrupación de péptidos constituida por P25-LHRH, P27-LHRH y P35-LHRH producían títulos altos de anticuerpos para LHRH. Los péptidos P35 y P75 producían títulos bajos de anticuerpos, mientras que los ratones inmunizados con P2, P8 y P62 tenían niveles indetectables de anticuerpos anti-LHRH (Tabla 13).

Tabla 13. Títulos de anticuerpos anti-LHRH en ratones inmunizados con vacunas de epítope de células T-LHRH derivado de CDV-F

Grupos	Cuatro semanas después de la primera vacunación					Dos semanas después de la segunda vacunación				
	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4	Ratón 5	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4	Ratón 5
Grupo 1 (control)	< 100	< 100				< 100	< 100			
Grupo 2 (agrupación)	100	126	200	126	200	16.000	16.000	16.000	16.000	16.000
Grupo 3 (p25-LHRH)	126	400	282	100	282	16.000	16.000	16.000	16.000	16.000
Grupo 5 (p35-LHRH)	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	1.412	800	< 100	< 100	< 100
Grupo 6 (p2-LHRH)	< 100	< 100				< 100	< 100			
Grupo 7 (p8-LHRH)	< 100	< 100	< 100	< 100		< 100	< 100	< 100	< 100	
Grupo 8 (p62-LHRH)	< 100	< 100	< 100			126	126	< 100		
Grupo 9 (p75-LHRH)	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	316	3.162	< 100

REIVINDICACIONES

1. Un epítope de las células T adyuvantes capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un animal canino, estando contenido el epítope dentro de una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SSKTQTHTQQ DRPPQPS (SEQ ID NO: 1); QPSTELEETRTSRARHS (SEQ ID NO: 2); RHSTTSAQRSTHYDPRT (SEQ ID NO: 3); PRTSDRPVSYTMNRTRS (SEQ ID NO: 4); TRSRKQTSHRLKNIPVH (SEQ ID NO: 5); SHQYLVIKLIPNAS LIE (SEQ ID NO: 6); IGTDNVHYKIMTRPSHQ (SEQ ID NO: 7); YKIMTRPSHQYLVIKLI (SEQ ID NO: 8); KLIPNASLIENCTKAEL (SEQ ID NO: 9); AELGEYEKLLNSVLEPI (SEQ ID NO: 10); EPINQALTLMTKNVK PL (SEQ ID NO: 12); FAGVVLAGVALGVATAA (SEQ ID NO: 13); TAAQITAGIALHQSNLN (SEQ ID NO: 15); GIALHQSNLNAQAIQSL (SEQ ID NO: 16); NLNAQAIQSLRTSLEQS (SEQ ID NO: 17); QSLRTSLEQSNKAIEEI (SEQ ID NO: 18); EQSNKAIEEIREATQET (SEQ ID NO: 19); TELLSIFGPSLRDPISA (SEQ ID NO: 20); PR YIATNGYLISNFDES (SEQ ID NO: 21); CIRGDTSSCARTLVSGT (SEQ ID NO: 22); DESSCVFVSESAICSQN (SEQ ID NO: 23); TSTIINQSPDKLLTFIA (SEQ ID NO: 24) y SPDKLLTFIASDTCPLV (SEQ ID NO: 25).

2. El epítope adyuvante T de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el epítope está contenido dentro de una secuencia peptídica seleccionada del grupo constituido por SSKTQTHTQQDRPPQPS (SEQ. ID NO: 1); QPSELEETR TSRARHS (SEQ. ID NO: 2); RHSTTSAQRSTHYDPRT (SEQ. ID. NO: 3); TRSRKQTSHRLKNIPVH (SEQ. ID. NO: 5); SHQYLVIKLIPNASLIE (SEQ. ID. NO: 6); KLIPNASLIENCTKAEL (SEQ. ID. NO: 9); AELGEYEK LLNSVLEPI (SEQ. ID. NO: 10); EPINQALTLMTKNVKPL (SEQ. ID. NO: 12); TAAQITAGIALHQSNLN (SEQ. ID. NO: 15); GIALHQSNLNAQAIQSL (SEQ. ID. NO: 16); NLNAQAIQSLRTSLEQS (SEQ. ID. NO: 17); QSLRTS LEQSNKAIEEI (SEQ. ID. NO: 18); TELLSIFGPSLRDPISA (SEQ. ID. NO: 20); PRYIATNGYLISNFDES (SEQ. ID. NO: 21); CIRGDTSSCARTLVSGT (SEQ. ID. NO: 22); DESSCVFVSESAICSQN (SEQ. ID. NO: 23); TSTIIN QSPDKLLTFIA (SEQ. ID. NO: 24) y SPDKLLTFIASDTCPLV (SEQ. ID. NO: 25).

3. El epítope de células T adyuvantes de la reivindicación 1 ó 2, en donde el epítope es de una proteína de fusión del virus del moquillo de los caninos (CDV-F).

4. El epítope de las células T adyuvantes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en la producción de una respuesta inmunitaria en un animal.

5. Una composición para uso en la producción de una respuesta inmunitaria en un animal, comprendiendo la composición un epítope de células T adyuvantes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

6. Una composición para uso en la producción de una respuesta inmunitaria en un animal, comprendiendo la composición una pluralidad de epítopes de las células T adyuvantes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde dicha pluralidad de epítopes de las células T adyuvantes están combinados o enlazados entre sí contiguamente para formar un solo polipéptido sin estar distanciados por aminoácidos adicionales.

7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la pluralidad de los epítopes de las células T adyuvantes están combinados.

8. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la pluralidad de los epítopes de las células T adyuvantes están enlazados entre sí contiguamente para formar un solo polipéptido sin estar distanciados por aminoácidos adicionales.

9. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la composición comprende adicionalmente al menos un péptido epitópico de células B y/o al menos un péptido epitópico CTL combinado con el epítope de las células T adyuvantes o enlazado contiguamente al epítope de las células T adyuvantes para formar un solo polipéptido sin estar distanciados por aminoácidos adicionales.

10. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la composición comprende adicionalmente al menos un péptido epitópico de las células B y/o al menos un péptido epitópico CTL y en donde al menos un péptido epitópico de las células B y/o al menos un péptido epitópico CTL está combinado con una pluralidad de los epítopes de las células T adyuvantes o enlazado contiguamente a una pluralidad de los epítopes de las células T adyuvantes para formar un solo polipéptido sin estar distanciados por aminoácidos adicionales.

11. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la composición comprende adicionalmente al menos un péptido epitópico de las células B y/o al menos un péptido epitópico CTL y en donde al menos un péptido epitópico de las células B y/o al menos un péptido epitópico CTL está combinado con el polipéptido único formado por una pluralidad de los epítopes de las células adyuvantes T o enlazado contiguamente al polipéptido único formado por una pluralidad de los epítopes de las células T adyuvantes sin estar distanciados por aminoácidos adicionales.

12. La composición de acuerdo con la reivindicación 9 ó 11, en donde el al menos un péptido epitópico de las células B y/o el al menos un péptido epitópico CTL está/están enlazado(s) continuamente a un epítope de las células T adyuvantes para formar un solo polipéptido sin estar distanciados por aminoácidos adicionales.

13. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde el epítope de las células B es un epítope de las células B de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH).

14. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, en donde la composición comprende un adyuvante.

15. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el adyuvante comprende ISCOMs o Iscomatrix.

16. Uso del epítope de las células T adyuvantes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la preparación de una composición para inducir una respuesta inmunitaria en un animal.

Figura 1

```
1      MHRGIPKSSK TQTHTQQDRP PQPSTELEET RTSRARHSTT SAQRSTHYDP
51     RTSDRPVSYT MNRTRSRKQT SHRLKNIPVH GNHEATIQHI PESVSKGARS
101    QIERRQPNAI NSGSHCTWLV LWCLGMASLF LCSKAQIHWD NLSTIGIIGT
151    DNVHYKIMTR PSHQYLVIKL IPNASLIENC TKAELGEYEK LLNSVLEPIN
201    QALTLMTKNV KPLQSLGSGR RQRRFAGVVL AGVALGVATA AQITAGIALH
251    QSNLNAQAIQ SLRTSLEQSN KAIEEIREAT QETVIAVQGV QDYVNNELVP
301    AMQHMSCELV GQRLGLRLLR YYTELLSIFG PSLRDPISAE ISIQALIYAL
351    GGEIHKILEK LGYSGSDMIA ILESRGIKTK ITHVDLPGKF IILSISYPTL
401    SEVKGVIVHR LEAVSYNIGS QEWYTTVPRY IATNGYLISN FDESSCVFVS
451    ESAICSQNSL YPMSPLLQQC IRGDTSSCAR TLVSGTMGNK FILSKGNIVA
501    NCASILCKCY STSTIINQSP DKLLTFIASD TCPLVEIDGA TIQVGGRQYP
551    DMVYEGKVAL GPAISLDRLD VGTNLGNALK KLDDAKVLID SSNQILETVR
601    RSSFNFGSLL SVPILSCTAL ALLLLIYCCK RRYQQTLKQH TKVDPAFKPD
651    LTGTSKSYVR SL
```

Fig. 2

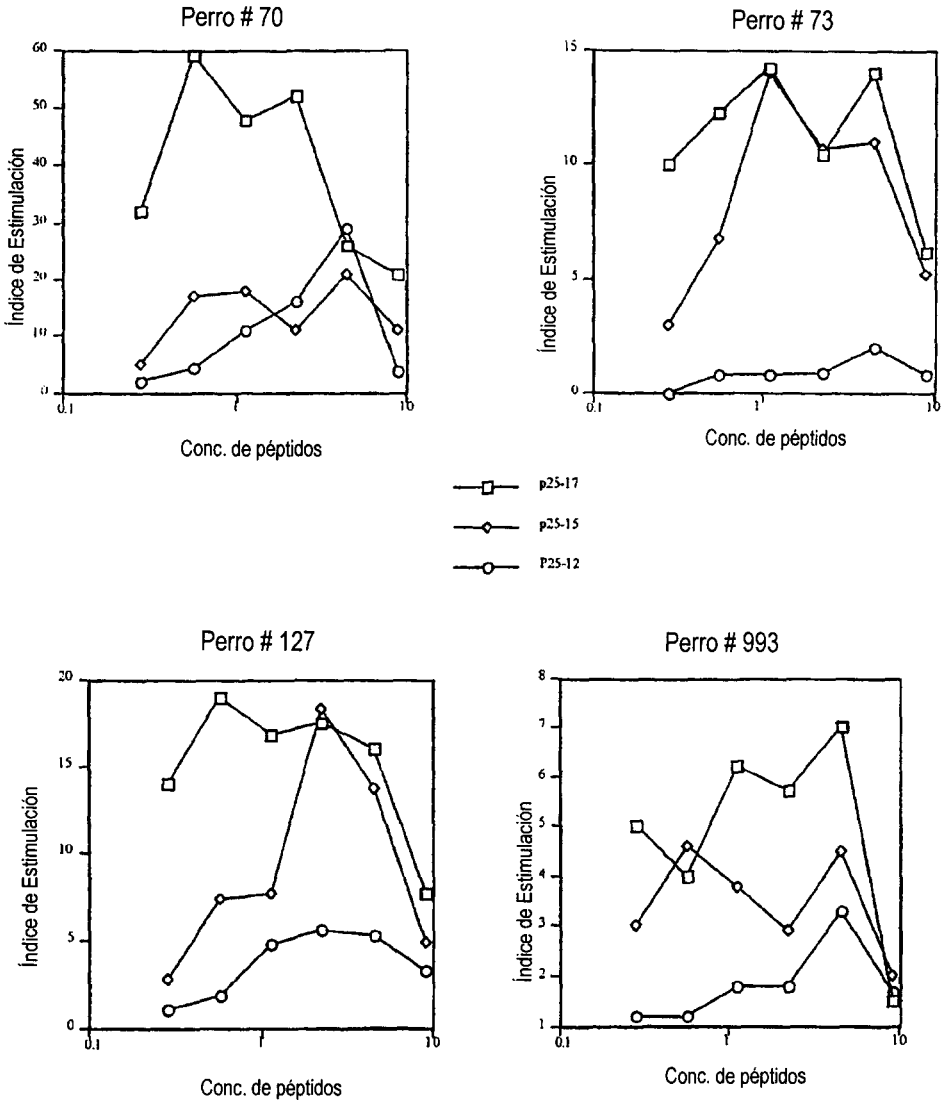

Perro # 70
Índice de Estimulación
Conc. de péptidos
Perro # 73
Índice de Estimulación
Conc. de péptidos
p25-17
p25-15
P25-12
Perro # 127
Índice de Estimulación
Conc. de péptidos
Perro # 993
Índice de Estimulación
Conc. de péptidos

Fig. 3

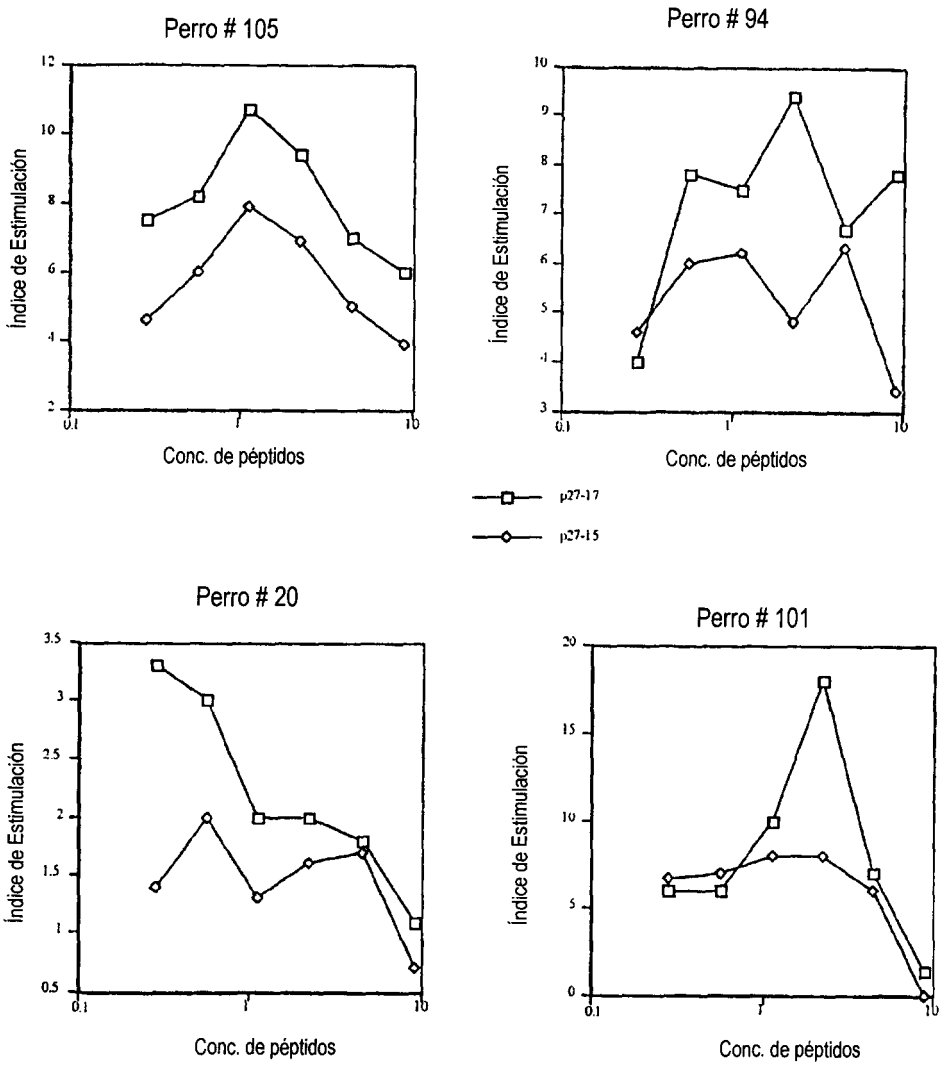
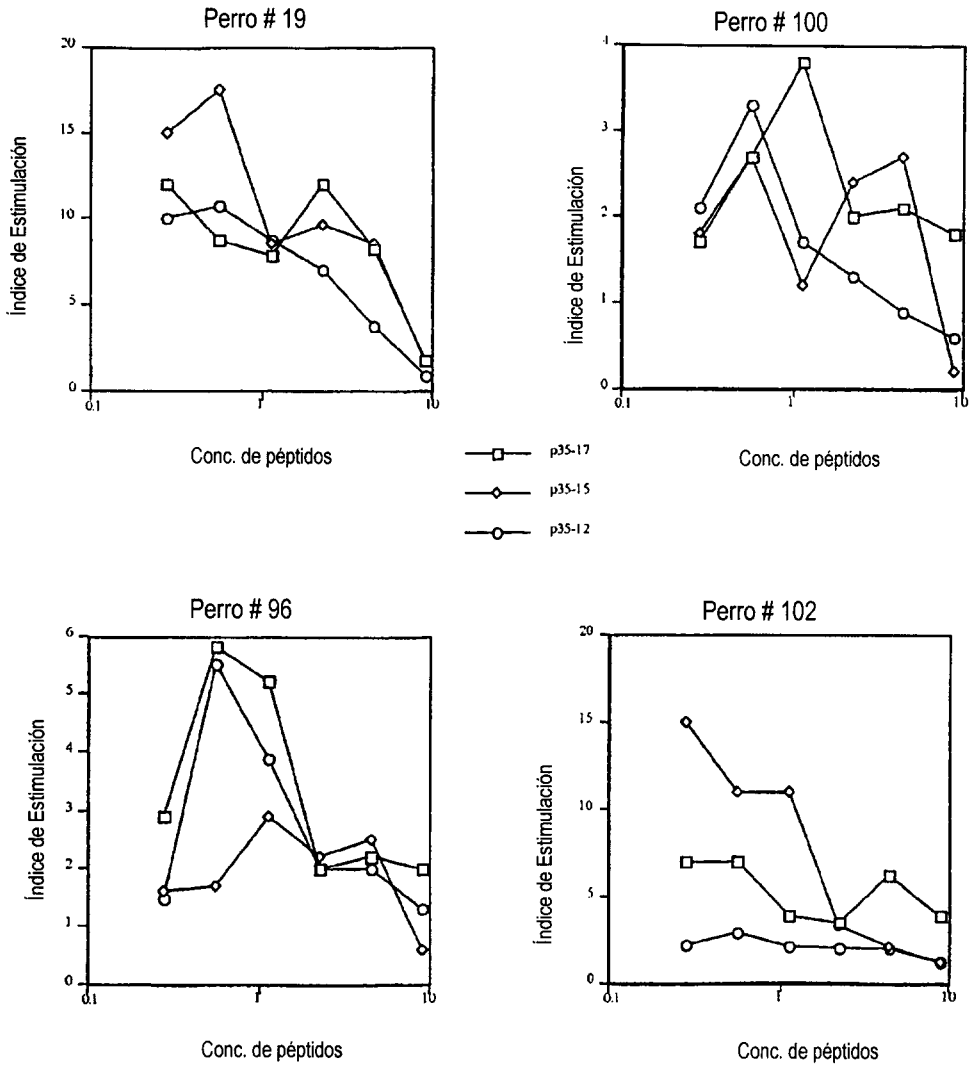

Perro # 105
Índice de Estimulación
Conc. de péptidos
Perro # 94
Índice de Estimulación
Conc. de péptidos
p27-17
p27-15
Perro # 20
Índice de Estimulación
Conc. de péptidos
Perro # 101
Índice de Estimulación
Conc. de péptidos

Fig. 4


Perro # 19
Índice de Estimulación
Conc. de péptidos
Perro # 100
Índice de Estimulación
Conc. de péptidos
p35-17
p35-15
p35-12
Perro # 96
Índice de Estimulación
Conc. de péptidos
Perro # 102
Índice de Estimulación
Conc. de péptidos

LISTA DE SECUENCIAS

<110> The University of Melbourne CSL Limited
Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation
The Council of the Queensland Institute of Medical Research
Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research

<120> Epítopes de células T adyuvantes

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 1

Ser Ser Lys Thr Gln Thr His Thr Gln Gln Asp Arg Pro Pro Gln Pro
1 5 10 15

Ser

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400>2

Gln Pro Ser Thr Glu Leu Glu Glu Thr Arg Thr Ser Arg Ala Arg His
1 5 10 15

Ser

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 3

Arg His Ser Thr Thr Ser Ala Gln Arg Ser Thr His Tyr Asp Pro Arg
1 5 10 15

Thr

<210> 4
<211> 17

<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 4

Pro Arg Thr Ser Asp Arg Pro Val Ser Tyr Thr Met Asn Arg Thr Arg
1 5 10 15

Ser

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 5

Thr Arg Ser Arg Lys Gln Thr Ser His Arg Leu Lys Asn Ile Pro Val
1 5 10 15

His

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 6

Ser His Gln Tyr Leu Val Ile Lys Leu Ile Pro Asn Ala Ser Leu Ile
1 5 10 15

Glu

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 7

Ile Gly Thr Asp Asn Val His Tyr Lys Ile Met Thr Arg Pro Ser His
1 5 10 15

Gln

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 8

Tyr Lys Ile Met Thr Arg Pro Ser His Gln Tyr Leu Val Ile Lys Leu
1 5 10 15

Ile

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 9

Lys Leu Ile Pro Asn Ala Ser Leu Ile Glu Asn Cys Thr Lys Ala Glu
1 5 10 15

Leu

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 10

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

Ile

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 11

Lys Leu Leu Asn Ser Val Leu Glu Pro Ile Asn Gln Ala Leu Thr Leu
1 5 10 15

Met

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 12

Glu Pro Ile Asn Gln Ala Leu Thr Leu Met Thr Lys Asn Val Lys Pro
1 5 10 15

Leu

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 13

Phe Ala Gly Val Val Leu Ala Gly Val Ala Leu Gly Val Ala Thr Ala
1 5 10 15

Ala

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 14

Gly Val Ala Leu Gly Val Ala Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile
1 5 10 15

Ala

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 15

Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Asn Leu
1 5 10 15

Asn

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 16

Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Asn Leu Asn Ala Gln Ala Ile Gln Ser
1 5 10 15

Leu

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 17

Asn Leu Asn Ala Gln Ala Ile Gln Ser Leu Arg Thr Ser Leu Glu Gln
1 5 10 15

Ser

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 18

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

Ile

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 19

Glu Gln Ser Asn Lys Ala Ile Glu Glu Ile Arg Glu Ala Thr Gln Glu
1 5 10 15

Thr

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 20

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

Ala

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 21

Pro Arg Tyr Ile Ala Thr Asn Gly Tyr Leu Ile Ser Asn Phe Asp Glu
1 5 10 15

Ser

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 22

Cys Ile Arg Gly Asp Thr Ser Ser Cys Ala Arg Thr Leu Val Ser Gly
1 5 10 15

Thr

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 23

Asp Glu Ser Ser Cys Val Phe Val Ser Glu Ser Ala Ile Cys Ser Gln
1 5 10 15

Asn

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 24

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

Ala

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 25

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

Val

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 26

Ser Gly Arg Arg Gln Arg Arg Phe Ala Gly Val Val Leu Ala Gly Val
1 5 10 15

Ala

<210> 27
<211> 662
<212> PRT
<213> Virus del moquillo de los caninos

<400> 27

Met His Arg Gly Ile Pro Lys Ser Ser Lys Thr Gln Thr His Thr Gln
1 5 10 15

Gln Asp Arg Pro Pro Gln Pro Ser Thr Glu Leu Glu Glu Thr Arg Thr
20 25 30

Ser Arg Ala Arg His Ser Thr Thr Ser Ala Gln Arg Ser Thr His Tyr
35 40 45

Asp Pro Arg Thr Ser Asp Arg Pro Val Ser Tyr Thr Met Asn Arg Thr
50 55 60

Arg Ser Arg Lys Gln Thr Ser His Arg Leu Lys Asn Ile Pro Val His
65 70 75 80

Gly Asn His Glu Ala Thr Ile Gln His Ile Pro Glu Ser Val Ser Lys
85 90 95

Gly Ala Arg Ser Gln Ile Glu Arg Arg Gln Pro Asn Ala Ile Asn Ser
100 105 110

Gly Ser His Cys Thr Trp Leu Val Leu Trp Cys Leu Gly Met Ala Ser
115 120 125

Leu Phe Leu Cys Ser Lys Ala Gln Ile His Trp Asp Asn Leu Ser Thr
130 135 140

Ile Gly Ile Ile Gly Thr Asp Asn Val His Tyr Lys Ile Met Thr Arg
145 150 155 160

Pro Ser His Gln Tyr Leu Val Ile Lys Leu Ile Pro Asn Ala Ser Leu
165 170 175

Ile Glu Asn Cys Thr Lys Ala Glu Leu Gly Glu Tyr Glu Lys Leu Leu
180 185 190

Asn Ser Val Leu Glu Pro Ile Asn Gln Ala Leu Thr Leu Met Thr Lys
195 200 205

Asn Val Lys Pro Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly Arg Arg Gln Arg Arg
210 215 220

Phe Ala Gly Val Val Leu Ala Gly Val Ala Leu Gly Val Ala Thr Ala
225 230 235 240

Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Asn Leu Asn Ala
245 250 255

Gln Ala Ile Gln Ser Leu Arg Thr Ser Leu Glu Gln Ser Asn Lys Ala
260 265 270

Ile Glu Glu Ile Arg Glu Ala Thr Gln Glu Thr Val Ile Ala Val Gln
275 280 285

Gly Val Gln Asp Tyr Val Asn Asn Glu Leu Val Pro Ala Met Gln His
290 295 300

Met Ser Cys Glu Leu Val Gly Gln Arg Leu Gly Leu Arg Leu Leu Arg
305 310 315 320

Tyr Tyr Thr Glu Leu Leu Ser Ile Phe Gly Pro Ser Leu Arg Asp Pro
325 330 335

Ile Ser Ala Glu Ile Ser Ile Gln Ala Leu Ile Tyr Ala Leu Gly Gly
340 345 350

Glu Ile His Lys Ile Leu Glu Lys Leu Gly Tyr Ser Gly Ser Asp Met
355 360 365

Ile Ala Ile Leu Glu Ser Arg Gly Ile Lys Thr Lys Ile Thr His Val
370 375 380

Asp Leu Pro Gly Lys Phe Ile Ile Leu Ser Ile Ser Tyr Pro Thr Leu
385 390 395 400

Ser Glu Val Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Ala Val Ser Tyr
405 410 415

Asn Ile Gly Ser Gln Glu Trp Tyr Thr Thr Val Pro Arg Tyr Ile Ala
420 425 430

Thr Asn Gly Tyr Leu Ile Ser Asn Phe Asp Glu Ser Ser Cys Val Phe
435 440 445

Val Ser Glu Ser Ala Ile Cys Ser Gln Asn Ser Leu Tyr Pro Met Ser
450 455 460

Pro Leu Leu Gln Gln Cys Ile Arg Gly Asp Thr Ser Ser Cys Ala Arg
465 470 475 480

Thr Leu Val Ser Gly Thr Met Gly Asn Lys Phe Ile Leu Ser Lys Gly
485 490 495

Asn Ile Val Ala Asn Cys Ala Ser Ile Leu Cys Lys Cys Tyr Ser Thr
500 505 510

Ser Thr Ile Ile Asn Gln Ser Pro Asp Lys Leu Leu Thr Phe Ile Ala
515 520 525

Ser Asp Thr Cys Pro Leu Val Glu Ile Asp Gly Ala Thr Ile Gln Val
530 535 540

Gly Gly Arg Gln Tyr Pro Asp Met Val Tyr Glu Gly Lys Val Ala Leu
545 550 555 560

Gly Pro Ala Ile Ser Leu Asp Arg Leu Asp Val Gly Thr Asn Leu Gly
565 570 575

Asn Ala Leu Lys Lys Leu Asp Asp Ala Lys Val Leu Ile Asp Ser Ser
580 585 590

Asn Gln Ile Leu Glu Thr Val Arg Arg Ser Ser Phe Asn Phe Gly Ser
595 600 605

Leu Leu Ser Val Pro Ile Leu Ser Cys Thr Ala Leu Ala Leu Leu Leu
610 615 620

Leu Ile Tyr Cys Cys Lys Arg Arg Tyr Gln Gln Thr Leu Lys Gln His
625 630 635 640

Thr Lys Val Asp Pro Ala Phe Lys Pro Asp Leu Thr Gly Thr Ser Lys
645 650 655

Ser Tyr Val Arg Ser Leu
660

<210> 28
<211> 10

<212> PRT
<213> *Canis sp.*

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> ácido piroglutámico

<400> 28

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

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> *Canis sp.*

<400> 29

His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
1 5

<210> 30
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido de control

<400> 30

Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Asn
1 5 10 15

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro
20 25