(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 271 952**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/775 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **96913320 .6**
(86) Fecha de presentación : **01.05.1996**
(87) Número de publicación de la solicitud: **0827509**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **11.03.1998**

(54) Título: **Modulación de la actividad de la proteína de transferencia de ésteres de colesterilo (CETP).**

(30) Prioridad: **01.05.1995 US 432483**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

(73) Titular/es: **AVANT Immunotherapeutics, Inc.**
119 Fourth Avenue
Needham, Massachusetts 02194, US

(72) Inventor/es: **Rittershaus, Charles, W. y**
Thomas, Lawrence, J.

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Modulación de la actividad de la proteína de transferencia de ésteres de colesterilo (CETP).

La presente es una solicitud de continuación en parte de la Solicitud de Patente de Estados Unidos nº 08/432.483, presentada el 1 de mayo de 1995.

Campo general de la invención

La presente invención se encuentra, por lo general, en el campo de las vacunas basadas en péptidos para controlar, tratar o reducir el riesgo de actividad aterogénica en el sistema circulatorio de humanos y otros animales. En particular, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos para proporcionar medios para inhibir la actividad de la proteína transportadora de ésteres de colesterilo (CETP) endógena, para tratar enfermedades cardiovasculares de forma profiláctica o terapéutica, o para modular los niveles relativos de lipoproteínas para producir una afección correlacionada con un riesgo reducido de enfermedad cardiovascular, tal como aterosclerosis.

Antecedentes de la invención

El colesterol circula por el cuerpo predominantemente en forma de componentes de partículas de lipoproteínas (lipoproteínas), que se componen de una parte de proteína, denominada apolipoproteínas (Apo) y diversos lípidos, entre los que se incluyen fosfolípidos, triglicéridos, colesterol y ésteres de colesterol. Existen diez clases principales de apolipoproteínas: Apo A-I, Apo A-II, Apo-IV, Apo B-48, Apo B-100, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III, Apo D, y Apo E. Las lipoproteínas se clasifican por densidad y composición. Por ejemplo, las lipoproteínas de alta densidad (HDL), una de cuyas funciones es mediar el transporte de colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado, tienen normalmente una densidad que varía entre 1,063-1,21 g/mL Las HDL contienen cantidades diversas de Apo A-I, Apo A-n, Apo C-I, Apo C-n, Apo C-III, Apo D, Apo E, así como cantidades diversas de lípidos, tales como colesterol, ésteres de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos.

A diferencia de las HDL, las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que por lo general tienen una densidad de aproximadamente 1,019-1,063 g/nA, contienen Apo B-100 en asociación con diversos lípidos. En particular, las cantidades de lípidos, colesterol y ésteres de colesterol son considerablemente superiores en LDL que en HDL, cuando se miden como porcentaje de masa seca. Las LDL son particularmente importantes para liberar colesterol a tejidos periféricos.

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) tienen una densidad de aproximadamente 0,95-1,006 g/ml y también se diferencian de otras clases de lipoproteínas en cuanto a composición, tanto en su contenido en proteínas como en lípidos. Por lo general, las VLDL tienen una cantidad muy superior de triglicéridos que las HDL o LDL y son particularmente importantes para liberar triglicéridos sintetizados endógenamente desde el hígado hasta los tejidos adiposos y otros tejidos. Se han revisado las características y funciones de diversas lipoproteínas (véase, por ejemplo, Mathews, C. K. y van Holde, K. E., *Biochemistry*, páginas 574-576, 626-630 (The Benjamin/Cummings Publishing Co., Redwood City, California, 1990); Havel, R.J. y col. *Introduction: Structure and metabolism of plasma lipoproteins*, en *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6ª Edición, páginas 1129-1138 (Scriver, C. R. y col. eds.) (McGraw-Hill, Inc., Nueva York, 1989); Zannis, V. L. y col., *Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors, and their enzymes*, en *Advances in Human Genetics*. Vol. 21, páginas 145-319 (Plenum Press, Nueva York, 1993)).

Por lo general, la propensión disminuida a enfermedades cardiovasculares, tales como aterosclerosis, se correlaciona con niveles absolutos aumentados de HDL circulante y también niveles aumentados de HDL relativos a niveles circulantes de lipoproteínas de más baja densidad, tales como VLDL y LDL (véase, por ejemplo, Gordon, D. J. y col., *N. Engl. J. Med*, 321:1311-1316 (1989); Castelli, W.P. y col., *J. Am. Med. Assoc*., 256: 2835-2838 (1986); Miller, N. E., y col. *Am. Heart J*., 113: 589-597 (1987); Tall. A. R., *J. Clin. Invest*., 89: 379-384 (1990); Tall, A. R. *J. Internal Med*., 237: 5-12 (1995)).

La proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) media el transporte de ésteres de colesterol de HDL a lipoproteínas ricas en TO, tales como VLDL y LDL, y también el intercambio recíproco de TG de VLDL a HDL (Tall, A. R., *J Internal Med*., 237:5-12 (1995); Tall, A. R., *J. Lipid Res*., 34: 1255-1274 (1993); Hesler, C. B. y col. *J. Biol. Chem*., 262: 2275-2282 (1987); Quig, D. W. y col. *Ann Rev. Nutr*., 10: 169-193 (1990)). La CETP puede desempeñar una función de modular los niveles de ésteres de colesterol y triglicéridos relacionados con diversas clases de lipoproteínas. Una actividad transportadora de ésteres de colesterol de la CETP elevada se ha correlacionado con niveles aumentados de colesterol asociado a las LDL y colesterol asociado a las VLDL, que se correlacionan por turno con un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular (Véase, por ejemplo, Tato, F. y col. *Arterioscler. Thromb. Vascular Biol*., 15: 112-120 (1995)).

En la presente memoria descriptiva, se usará LDL-C para referirse al colesterol total, incluyendo ésteres de colesterol y/o colesterol no esterificado, asociado a lipoproteínas de baja densidad. Se usará VLDL-C para referirse al colesterol total, incluyendo ésteres de colesterol y/o colesterol no esterificado, asociado a lipoproteínas de muy baja densidad. Se usará HDL-C para referirse al colesterol total, incluyendo ésteres de colesterol y/o colesterol no esterificado, asociado a lipoproteínas de alta densidad.

La CETP aislada del plasma humano es una glicoproteína hidrófoba que tiene 476 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 66.000 a 74.000 daltons en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS) (Albers, J. J., y col., *Arteriosclerosis*, 4: 49-58 (1984); Hesler, C. B. y col., *J. Biol. Chem*., 262: 2275-2282 (1987); Jarnagin, S. S., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE. UU., 84: 1854-1857 (1987)). Se ha clonado y secuenciado un ADNc que codifica CETP humana (Drayna, D., y col., *Nature*, 327: 632-634 (1987)). Recientemente, se ha reseñado un polimorfismo en CETP humana y se puede relacionar con una enfermedad en el metabolismo lípido (Fumeron y col., *J. Clin. Invest*., 96: 1664-1671 (1995); Juvonen y col., *J. Lipid Res*., 36: 804-812 (1995)). Se ha demostrado que la CETP une CE, TG, fosfolípidos (Barter, P. J. y col., *J. Lipid Res*. 21: 238-249 (1980)), y lipoproteínas (véase, por ejemplo, Swenson, T. L. y col., *J. Biol. Chem*., 264: 14318-14326 (1989)). Más recientemente, la región de CEPT definida por los 26 aminoácidos carboxilos terminales y, en particular, los aminoácidos 470 a 475, ha demostrado ser especialmente importante para unir lípidos neutros relacionados con el transporte de lípidos neutros (Hesler, C. B. y col., *J. Biol. Chem*., 236: 5020-5023 (1988)), pero no para unir fosfolípidos (véase, Wang, S. y col., *J. Biol. Chem*., 267: 17487-17490 (1992); Wang, S. y col., *J. Biol. Chem*., 270: 612-618 (1995)).

Se ha producido un anticuerpo monoclonal (Mab), TP2 (anteriormente denominado 5C7 en la bibliografía), que inhibe por completo la actividad transportadora de éster de colesterol y triglicéridos de la CETP, y en menor grado, la actividad transportadora de fosfolípidos (Hesler, C. B. y col., *J. Biol. Chem*., 263: 5020-5023 (1988)). El epitope de TP2 se localizó en los 26 aminoácidos carboxilos terminales, esto es, los aminoácidos de arginina-451 a serina-476, de la molécula de CETP humana de 74.000 daltons (véase, Hesler, C. B. y col. (1988)). Se reseñó que TP2 inhibe tanto la actividad de la CETP humana como de la de conejo *in vitro* y la CETP de conejo *in vivo* (Yen, F. T. y col. *J. Clin. Invest*., 83: 2018-2024 (1989) (reaccionando TP2 con CETP humana); Whitlock y col., *J. Clin. Invest*., 84: 129-137 (1989) (reaccionando TP2 con CETP de conejo)). Otro análisis de la región de la CETP unida por TP2 reveló que los aminoácidos entre fenilalanina-463 y leucina-475 son necesarios para unir TP2 y para la actividad transportadora de lípidos neutros (por ejemplo, éster de colesterol) (véase, Wang, S. y col., 1992).

Una serie de estudios *in vivo* que usa modelos animales o humanos han indicado que la actividad de CETP puede afectar al nivel de HDL que contiene colesterol circulante. La actividad transportadora aumentada de ésteres de colesterol de CETP puede producir una reducción en los niveles de HDL-C en relación con los niveles de LDL-C y/o VLDL-C, que se correlaciona por turno con una propensión aumentada a la aterosclerosis. La inyección de CETP humana parcialmente purificada en ratas (que normalmente carecen de actividad de la CETP) dio como resultado un desplazamiento del éster de colesterol de HDL a VLDL, consistente en el transporte de éster de colesterol fomentado por CETP, de HDL a VLDL (Ha, Y. C. y col. *Biochim. Biophys. Acta*, 833: 203-211 (1985); Ha, Y. C. y col. *Comp. Biochem. Physiol*., 83B: 463-466 (1986); Gavish, D. y col. *J. Lipid Res*., 28: 257-267 (1987)). Se reseñaron ratones transgénicos que expresan CETP humana para mostrar una disminución significante en el nivel de colesterol relacionado con HDL (véase, por ejemplo, Hayek, T., y col. *J Clin. Invest*., 90: 505-510 (1992); Breslow, J. L. y col. *Proc. Natl Acad Sci*. EE. UU., 90: 8314-8318 (1993)). Además, mientras que los ratones de tipo salvaje normalmente son muy resistentes a la aterosclerosis (Breslow, J. L. y col. *Proc. Natl Acad Sci*. EE. UU., 90: 8314-8318 (1993)), se reseñaron ratones transgénicos que expresan CETP de simio para obtener una distribución modificada de colesterol asociado a lipoproteínas, a saber, niveles elevados de LDL-C y VLDL-C y niveles reducidos de HDL-C (Marotti, K. R. y col. *Nature*, 364: 73-75 (1993)). Los ratones transgénicos que expresan una CETP de simio también eran más propensos a la aterosclerosis severa inducida por la dieta en comparación con ratones que no expresan control y desarrollaron lesiones ateroscleróticas en sus aortas considerablemente superiores en área que las encontradas en los animales de control y que tienen una apariencia amplia, focal, más típica que las encontradas en lesiones ateroscleróticas en humanos (Marotti y col. id). La infusión intravenosa de anticuerpos monoclonales (Mab) de anti-CETP humana en hamsters y conejos inhibió la actividad de la CETP *in vivo* y dio como resultado niveles considerablemente aumentados de niveles de HDL-C, niveles disminuidos de HDL-triglicéridos, y tamaño aumentado de HDL; implicando, una vez más, una función crítica para la CETP en la distribución de colesterol en lipoproteínas circulantes (Gaynor, B. J. y col., *Atherosclerosis*, 110: 101-109 (1994) (hamsters); Whitlock, M. E., y col. *J. Clin. Invest*., 84: 129-137 (1989) (conejos)).

También se ha estudiado la carencia de CETP en humanos. Por ejemplo, en algunos estudios familiares en Japón, los hermanos que eran homocigóticos para alelos no funcionales del gen de la CETP no tenían una actividad de la CETP detectable. Prácticamente no se manifestaron placas ateroscleróticas en estos individuos, que también mostraron una tendencia hacia la longevidad en sus familias (véase, por ejemplo, Brown, M. L. y col. *Nature*, 342: 448-451 (1989); Inazu, A. y col. *N. Engl. J. Med*, 323: 1234-1238 (1990); Bisgaier, C. L. y col. *J. Lipid Res*., 32: 21-23 (1991)). Tales individuos homocigóticos carentes de CETP también mostraron tener un perfil de lipoproteína antiaterogénica, como demostraron los niveles elevados de HDL circulante ricos en éster de colesterol, así como los niveles elevados totales de HDL, y HDL excepcionalmente grande, esto es, hasta de cuatro a seis veces el tamaño de HDL normal (Brown, M. L. y col., 1989, página 451). La frecuencia de esta mutación en Japón es relativamente elevada, y puede suponer un nivel elevado de HDL en una fracción significativa de la población japonesa.

Los estudios anteriores indican que la CETP desempeña una función importante en el transporte de éster de colesterol de HDL a VLDL y LDL, y en la modificación de ese modo del perfil relativo de lipoproteínas circulantes a uno que está relacionado con un riesgo elevado de enfermedad cardiovascular (por ejemplo, niveles reducidos de HDL-C y niveles aumentados de VLDL-C y LDL-C). Marotti y col. (arriba) interpretaron su información indicando que una modificación en la distribución de colesterol inducida por la CETP era la razón principal de que las lesiones arteriales se desarrollaran más rápidamente en ratones transgénicos, que expresan CETP, que en ratones de control no transgénicos, cuando ambos grupos se alimentaron de una dieta aterogénica. En conjunto, la prueba actual sugiere que

los niveles aumentados de actividad de CETP puede predecir el riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular. La modulación o inhibición de actividad endógena de la CETP es, de ese modo, un procedimiento terapéutico atractivo para modular los niveles relativos de lipoproteínas, para reducir o prevenir la progresión de, o inducir la regresión de, enfermedades cardiovasculares, tales como la asterosclerosis.

Por tanto, sería ventajoso descubrir compuestos y procedimientos para controlar la actividad de la CETP que ayudaría a prevenir o tratar enfermedades cardiovasculares. Para que sea un compuesto terapéutico farmacológico efectivo, cuando se administre a una mayoría significativa de receptores, idealmente, no debería provocar una respuesta inmune que neutralice la actividad o efecto beneficioso del compuesto terapéutico, no debe fomentar un estado hipersensible en el individuo que recibe el compuesto terapéutico, y no debe producir efectos secundarios adversos. También sería ventajoso si tales compuestos y procedimientos evitaran la necesidad de tratamientos continuos o repetidos con frecuencia.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona compuestos y procedimientos útiles para la modulación o inhibición de la actividad de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP). En particular, se describen péptidos de vacuna que, cuando se administran a un mamífero, provocan una respuesta de anticuerpos contra la propia CETP endógena del mamífero, fomentando de ese modo un efecto profiláctico o terapéutico contra enfermedades cardiovasculares, tales como aterosclerosis. Tales péptidos de vacuna comprenden una parte de epitope de célula T auxiliar que comprende un epitope de célula T auxiliar inmunógeno "universal" o "de gama amplia", unido, preferiblemente por covalencia, a una parte de epitope de célula B que comprende uno o más epitopes de célula B a partir de la CETP, tal como se encuentra en la parte carboxilo terminal de la proteína CETP humana que está implicada en un enlace de lípido neutro o una actividad de transporte de la CETP. También se pueden usar otros epitopes de célula B de CETP. Preferiblemente, los epitopes de célula B de la CETP usados en la parte del epitope de célula B de los péptidos de vacuna de la presente invención inducen anticuerpos a la CETP endógena (anticuerpos autorreactivos) que o bloquean la función de la CETP o producen la eliminación de la CETP circulante en la sangre. Además, los epitopes de célula B usados en los péptidos de vacuna de la presente invención preferiblemente no comprenden un epitope de célula T de CETP, de tal forma que se evita la posibilidad de dañar el hígado autoinmune mediado por la célula T.

Los péptidos de vacuna de la presente invención incluyen varias realizaciones "multivalentes". Por ejemplo, los péptidos multivalentes presentan el sistema inmunológico con más de un epitope sencillo de célula B o de célula T auxiliar universal o de gama amplia. Tales péptidos de vacuna multivalentes incluyen aquellos que tienen copias múltiples (dos o más) del mismo o distinto epitope de célula T auxiliar inmunógeno universal o de gama amplia y/o copias múltiples del mismo o distinto epitope de célula B de la proteína CETP. Esos péptidos, que tienen más de un único epitope de célula B al que se pueden unir distintos anticuerpos, pueden fomentar la formación de complejos inmunes para eliminar de forma efectiva la CETP del sistema circulatorio.

En una realización preferida, la parte de epitope de célula T auxiliar de un péptido de vacuna de la presente invención se obtiene de una secuencia de aminoácidos de un epitope de célula T auxiliar inmunógeno universalmente (de gama amplia), tal como aquellos encontrados en toxoides de tétanos y de difteria, o en péptidos antigénicos conocidos de la vacuna contra la tos ferina, Bacilo de Calmette-Guerin (BCG), vacuna contra la polio, vacuna contra el sarampión, vacuna contra la parotiditis infecciosa, vacuna contra la rubéola, derivado proteico purificado (PPD) de tuberculina, *Mycobacterium tuberculosis* hsp-70, y hemocianina de lapa de bocallave. Además, diversas partes de epitope de célula T auxiliar antigénica universal (o de gama amplia) pueden unirse a otro para formar partes de epitope de célula T auxiliar antigénica universal múltiple (esto es, multivalente) de los péptidos de vacuna de la presente invención.

En una realización más preferida de un péptido de vacuna de la presente invención, un residuo de cisteína amino terminal está unido por covalencia a una secuencia de aminoácidos de un epitope de célula T auxiliar antigénica de gama amplia o universal de toxoide de tétanos, formando la secuencia CQY IKANSKFIGITE (aminoácidos 1 a 15 de SEQ ID. NO:2) que está unida por covalencia a una parte de epitope de célula B de un péptido de vacuna que tiene una secuencia de aminoácidos de la CETP carboxilo terminal FGFPEHLLVDFLQSLS (aminoácidos 16 a 31 de SEQ ID. NO:2).

En otra realización preferida, un péptido de vacuna multivalente comprende una secuencia de aminoácidos de un epitope de célula T auxiliar antigénica de gama amplia o universal de toxoide de tétanos, que se une por turno por covalencia a una parte de epitope de célula B compuesta por dos epitopes de célula B de la CETP. En una realización preferida como tal de la presente invención, el péptido de vacuna multivalente tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8: CQYIKA NSKFIGITELFPRPDQQHSVAYTFEEDIFGFPEHLLVDFLQ S L S en la que una cisteína amino terminal se une a un epitope de célula T de toxoide de tétanos (aminoácidos 2 a 15 de SEQ ID NO:8) unido a una secuencia de aminoácidos que contiene dos epitopes de célula B de CETP humana, esto es, aminoácidos 349 a 367 y aminoácidos 461 a 476 de la secuencia de aminoácidos para CETP humana madura (SEQ ID NO:4). Todavía en otra realización preferida de la presente invención, un péptido de vacuna multivalente de la presente invención contiene epitopes de célula B de las regiones homólogas de la CETP de conejo (esto es, aminoácidos 350 a 368 y 481 a 496 de SEQ ID NO:6) y tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9: MQYIKANSKFIGITERFPRPDGREAVAYR-FEED IFGFPKHLLVDFLQSLS, en la que una metionina amino terminal se une un epitope de célula T de toxoide de tétanos (aminoácidos 2 a 15 de SEQ ID NO: 8) que se une a una secuencia de aminoácidos que contiene los dos epitopes de célula B de la CETP de conejo.

Los péptidos de la presente invención también se pueden unir a otro a través de una molécula de unión bifuncional o una molécula de unión de péptidos que tenga inmunogenicidad mínima o ninguna. Además, los péptidos se pueden unir a una molécula común para formar ensamblajes de péptidos en los que se disponen copias múltiples de los péptidos cerca unos de otros. Tales ensamblajes multicopia (multivalentes) de péptidos pueden ser más inmunógenos, esto es, pueden producir una respuesta inmune más efectiva a la CETP endógena que las vacunas que comprenden péptidos individuales no asociados.

Los compuestos de vacuna de la presente invención también se pueden usar junto con un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Los péptidos inmunógenos de vacuna de la presente invención provocan la producción de anticuerpos que son reactivos con o reconocen la CETP endógena. La administración de péptidos de vacuna a animales experimentales dio como resultado un descenso de los niveles relativos de colesterol total y HDL-C y dio como resultado una disminución en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. Los anticuerpos anti-CETP endógenos provocados fomentan de ese modo una afección sicológica correlacionada con el riesgo disminuido de enfermedades cardiovasculares, y parece que tienen un efecto directo sobre la prevención o disminución de la formación de placas de aterosclerosis.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. El diagrama de flujo del protocolo para administrar un péptido de vacuna a (vacunación de) conejos y para extraer muestras de sangre para analizar la eficacia de la vacuna.

Figura 2. Densidad óptica (D.O.) a 450 nm frente a dilución de plasma basada en ensayo ELISA para anticuerpos anti-CETP uniéndose a CETP recombinante en muestras de plasma diluido tomadas de conejos (rb#1-#4) el Día 70. El cuadrado en blanco (conejo rb#4) se refiere al plasma de un conejo al que no se le ha administrado el péptido de vacuna (control). El cuadrado, círculo y rombo rellenos se refieren a conejos rb# 1, #2 y #3, respectivamente, a los que se les administró un péptido de vacuna con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

Figura 3. Densidad óptica (D.O.) a 450 nm frente a dilución de plasma para muestras de plasma sanguíneo de conejos (rb#1-#4, véase la descripción de la figura 2, arriba), basada en ensayo ELISA competitivo para inhibición de anticuerpo monoclonal (Mab) TP2 uniéndose a CETP humana recombinante por medio de anticuerpos anti-CETP en muestras de plasma sanguíneo diluido de conejo tomadas el Día 70.

Figura 4. Concentración de colesterol total (mg/dl) en muestras de plasma de conejos (rb#1-#4, véase la descripción de la Figura 2, arriba) frente a tiempo (Días) en protocolo de vacunación.

Figura 5. Concentración de HDL-C (mg/dl) en muestras de plasma de conejos (rb#1-#4, véase la descripción de la Figura 2, arriba) frente a tiempo (Días) en protocolo de vacunación.

Figura 6. Relación No-HDL/HDL en conejos blancos de Nueva Zelanda el Día 70. Conejo de control no vacunado (N=1) rb#4 (barra rellena); media (N=3) de conejos vacunados rb#1, 2 y 3 (recién nacidos).

Figura 7. Densidad óptica (D.O.) a 450 nm frente a dilución de plasma (gráfico semilogarítmico) basada en ensayo ELISA para anticuerpos anti-CETP uniéndose a CETP recombinante en muestras de plasma diluido tomadas de ratones transgénicos de CETP humana el Día 70 en el protocolo de vacunación. La información para cada ratón al que se administró un péptido de vacuna con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 se indica con "+" y una línea continua. La información para cada ratón de control se indica con "x" y una línea discontinua. Las diluciones de plasma abarcan un intervalo de 1:10 a 1:1.000.000 (1E+1 a 1E+6).

Figuras 8A y 8B. Diagramas típicos de Hidrofilicidad, Probabilidad de Superficie, Índice Antigénico y Hélice Anfifílica (Figura 8A) y Hojas anfifílicas y Estructura Secundaria (Figura 8B) para CETP humana madura.

Figura 9. Título de anticuerpo para CETP humana recombinante de Grupos I y II de Modelo de Aterosclerosis basado en ensayo ELISA. D.O. a 405 nm frente a dilución de plasma de conejo.

Figuras 10A y 10B. Títulos de anticuerpos en plasma de conejo para CETP de conejo en Modelo de Aterosclerosis basado en ensayo ELISA. Plasma de prevacunación (Figura 10A). Plasma de posvacunación (Figura 10B). D.O. a 405 nm frente a dilución de plasma de conejo.

Figura 11. Colesterol total en animales pre y posvacunados en Modelo de Aterosclerosis. Colesterol total (mg/dl) frente a día y grupo.

Figura 12. HDL-C en animales pre y posvacunados en Modelo de Aterosclerosis. HDL-C (mg/dl) frente a día y grupo.

Figura 13. Gráfico de barras del porcentaje medio del área total de la aorta cubierta por lesiones ateroscleróticas en ratones vacunados y de control con dietas suplementadas con colesterol. Puntos de información individual (rom-

bos), porcentaje medio de área aórtica cubierta por lesiones (barra sombreada), desviación convencional de puntos de información (barra en blanco), p <0,01 indica importancia estadística entre gráfico de barras.

Descripción detallada de la invención

Como se indica anteriormente, un riesgo disminuido de aterosclerosis se ha correlacionado con niveles de circulación relativamente bajos de LDL y VLDL y niveles relativamente elevados de HDL. Los niveles de tales lipoproteínas de circulación están influidos directamente, al menos en parte, por los niveles endógenos de actividad de la CETP. En particular, la actividad elevada de la CETP fomenta el transporte de lípidos neutros, tales como ésteres de colesterol de HDL a VLDL y LDL. Por consiguiente, la CETP es una diana relativamente preciso en humanos y otros animales para modificar los niveles relativos de LDL, VLDL y HDL en el sistema circulatorio (véase, por ejemplo, Tato, F., y col. *Arteriosclero. Thromb. Vascular Biol*., 15: 112-120 (1995); Tall, A. R., *J. Internal Med*., 237: 5-12 (1995)). La presente invención está dirigida al control de la actividad de la CETP endógena proporcionando péptidos de vacuna de la CETP que sirvan para provocar una respuesta inmune en individuos contra su CETP endógena, fomentando de ese modo una afección sicológica, como por ejemplo, nivel aumentado de HDL o nivel disminuido de LDL, correlacionado con un riesgo disminuido de aterosclerosis. Además, la provocación de una respuesta inmune contra la CETP endógena usando péptidos de vacuna de la presente invención puede proporcionar, prevenir o inhibir la progresión de lesiones en tejidos propensos a aterosclerosis.

1. *Péptidos y composiciones para la modulación de la actividad de la CETP*

Como se usa en la presente memoria descriptiva, un péptido de vacuna de CETP es un péptido que comprende una parte de epitope de célula T auxiliar que comprende una secuencia de aminoácidos de un epitope de célula T auxiliar antigénica universal (esto es, de gama amplia) y una parte de epitope de célula B que comprende una secuencia de aminoácidos de un epitope de célula B de la CETP, tal como la región carboxilo terminal de la CETP implicada en la actividad de unión de un lípido neutro y/o transporte de un lípido neutro. Tales péptidos de vacuna de CETP son antigénicos, esto es, provocan la producción de anticuerpos específicos para ese péptido que une la CETP endógena. De ese modo, los péptidos de vacuna de CETP de la presente invención son restos inmunógenos que tienen la capacidad de estimular la formación de anticuerpos que unen de forma específica la CETP endógena e inhiben la actividad de la CETP endógena.

A. *Parte de Célula T auxiliar de péptidos de vacuna*

Los péptidos útiles en las composiciones y procedimientos de la presente invención comprenden una parte de epitope de célula T auxiliar y una parte de epitope de célula B. La parte de epitope de célula T auxiliar (o simplemente "parte de epitope de célula T") tiene una secuencia de aminoácidos derivada de al menos un epitope de célula T auxiliar universal (o universal inmunógena o de amplia gama) antigénica (también denominado un péptido vehículo inmunógeno) que se define como un péptido, o derivado del mismo, que puede presentarse por medio de haplotipos de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y de ese modo activan las células T auxiliares, que por turno, estimulan el crecimiento y diferenciación de células B. Como se trata más abajo, la parte del epitope de la célula B (también denominada una parte de péptido relacionada con la CETP) de los péptidos de vacuna descritos en la presente memoria descriptiva tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un epitope de célula B de la proteína CETP, tal como una parte de la región carboxilo terminal de la enzima CETP, que está implicada en la unión de lípidos neutros y/o transporte de lípidos neutros.

En la técnica se conocen ejemplos de lo que se denominan epitopes de célula T auxiliar antigénica "universales" o de "gama amplia" que se han usado en forma de péptidos vehículo inmunógeno para vacunaciones de humanos. Entre estos se incluyen, por ejemplo, epitopes de toxoide de tétanos (tt) y toxoide de difteria (td) (véase, por ejemplo, Panina-Bordignon, P., y col. *Eur. J. Immunol*., 19: 2237-2242 (1989) (caracterización de péptidos de epitope de célula T auxiliar de toxoide de tétanos universal); Etlinger, H., *Immunol. Today*, 13: 52-55 (1992); Valmori, D., y col., *J. Immunol*., 149: 717-721 (1992) (uso de epitopes tt universales en vacunas futuras contra la malaria); Talwar, G. P., y col. *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE. UU., 91: 8532-8536 (1994) (uso de epitopes universales en forma de tt y td en vacuna para la gonadotropina coriónica anti-humana); Talwar, G. P., y col. *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE. UU., 91: 8532-8536 (1994). Además de tt y td, en la presente invención, otras secuencias útiles de epitope de célula T auxiliar incluyen aquellas que se derivan de péptidos antigénicos conocidos de la vacuna contra la tos ferina, Bacilo de Calmette-Guerin (BCG), vacuna contra la polio, vacuna contra el sarampión, vacuna contra la parotiditis infecciosa, vacuna contra la rubéola y derivado proteico purificado (PPD) de tuberculina (véase, por ejemplo, Etlinger, H., *Immunol. Today*, 13: 52-55 (1992)); incorporadas en la presente memoria descriptiva mediante referencias). Además, dos o más copias de las mismas o diversos epitopes diferentes de célula T auxiliar antigénica universal se pueden unir a otro para formar partes de epitope de célula T auxiliar multivalente o múltiple de los péptidos de vacuna de la presente invención. Por ejemplo, se puede sintetizar un péptido de vacuna de la presente invención compuesto por una parte de epitope de célula T auxiliar múltiple o multivalente, que comprenda una secuencia de aminoácidos de un epitope de célula T auxiliar tt y un epitope de célula T auxiliar td.

Además, la inmunogenicidad de un péptido de vacuna de la presente invención también se puede potenciar uniendo la parte de epitope de célula T auxiliar a una secuencia de péptido de una CETP xenogénica o a una proteína homóloga relacionada con la CETP. Anteriormente se usó un enfoque como tal en una vacuna humana para gonadotropina coriónica humana (véase, Talwar, G. P., y col. *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE. UU., 91: 8532-8536 (1994)); dímero de

heteroespecies formado entre una secuencia de aminoácidos de subunidad β de gonadotropina coriónica humana y una secuencia de aminoácidos de una subunidad de hormona luteinizante ovina. Entre los ejemplos de proteínas relacionadas con la CETP que se podrían usar en este enfoque se incluyen, por ejemplo, proteína de transporte de fosfolípidos y proteína bactericida neutrófila (véase, Day, J. R., y col. *J. Biol. Chem*., 269: 9388-91 (1994); Gray, P. W., y col., *J. Biol. Chem*., 264: 9505-9509 (1989)).

Otras moléculas vehículo inmunógenas tales como hemocianina de lapa de bocallave (KLH) también se pueden usar solas o combinándolas con otros epitopes de célula T auxiliar antigénica universal. Por ejemplo, KLH contiene residuos de lisina múltiples en su secuencia de aminoácidos. Cada una de estas lisinas es un sitio potencial en el que un péptido de vacuna descrito en la presente memoria descriptiva podría unirse (por ejemplo, KLH activada con maleimida, Catálogo Nº 77106, Pierce, Rockford, IL). Una disposición como tal es un ensamblaje de péptidos de vacuna que es multivalente de forma extensiva para tanto para los epitopes de célula T auxiliar (esto es, aquellos epitopes de célula T auxiliar de la secuencia de aminoácidos de KLH junto con aquellos epitopes de célula T auxiliar de las copias múltiples de los péptidos de vacuna unidos) como para los epitopes de célula B de la CETP (esto es, aquellos epitopes de célula B de la CETP en las copias múltiples de los péptidos de vacuna unidos a la secuencia de aminoácidos de KLH).

Recientemente, otra molécula vehículo inmunógena, hsp-70 de *Mycobacterium tuberculosis*, ha demostrado ser un antígeno especialmente potente compuesto por epitopes de célula B y T múltiples (Suzue y Young, *J. Immunol*., 156: 873-879 (1996)). La proteína hsp70 se puede unir mediante agentes de entrecruzamiento convencionales a péptidos de vacuna de la presente invención para potenciar la inmunogenicidad. De forma alternativa, se prueden introducir moléculas de ácido nucleico que codifican péptidos de vacuna de la presente invención en un vector de expresión que permite la expresión de una proteína recombinante compuesta por el péptido de vacuna fusionado al extremo amino de hsp70.

Preferiblemente, la parte de epitope de célula T auxiliar de los péptidos de vacuna de la presente invención comprende un epitope de célula T auxiliar tt o td antigénica universal. En una realización más preferida, los péptidos de la presente solicitud usan epitopes de célula T auxiliar tt antigénica universal que tienen secuencias de aminoácidos QYIKANSKFIGITE (aminoácidos 2 a 15 de SEQ ID NO: 2) y FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO:3). Más preferiblemente, los péptidos de la presente invención usan el epitope de célula T auxiliar tt antigénica universal que tiene la secuencia de aminoácidos QYIKANSKFIGITE (aminoácidos 2 a 15 de SEQ ID NO: 2).

Además de los diversos ejemplos de epitopes de célula T auxiliar tratados anteriormente, se puede determinar si otro péptido o proteína sirve como un epitope de célula T auxiliar para la parte de epitope de célula T de los péptidos de vacuna de la presente invención, usando un ensayo de proliferación convencional para epitopes de célula T (auxiliar) de clase II (véase, por ejemplo, páginas 3.12.9-3.12.14, en *Current Protocols in Immunology*. Vol. I (Coligan y col. eds.) (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, Nueva York, 1994)).

B. *Parte de epitope de célula B (relacionada con CETP) de péptidos de vacuna*

La parte de epitope de célula B de los péptidos de vacuna descritos en la presente memoria descriptiva comprenden uno o más epitopes de célula B de la proteína CETP endógena al mamífero vacunado, o uno o más epitopes de célula B de una CETP distinta a la CETP endógena, pero que es de reacción cruzada (anticuerpo) de forma inmunológica con la CETP endógena.

La parte de epitope de célula B de los péptidos de vacuna de la presente invención puede comprender uno o más epitopes de célula B de la CETP endógena del individuo al que se va a vacunar para activar anticuerpos que inhiben la actividad de la CETP endógena. Sin embargo, también se encuentra en el alcance de la presente invención que la parte de epitope de célula B de los péptidos de vacuna de la presente invención comprende epitopes de célula B de moléculas de CETP que son similares, pero no idénticos a la CETP endógena del individuo al que se va a vacunar. Algunos epitopes de célula B de tales proteínas de la CETP similares, pero no idénticos, pueden contener epitopes que potencien la respuesta inmune en el individuo vacunado. Por lo general, las moléculas de la CETP que tienen secuencias de aminoácidos que son al menos aproximadamente el 80% homólogas a la CETP endógena se pueden usar como una fuente de epitopes de célula B en la parte de epitope de célula B de los péptidos de vacuna de la presente invención. Como ejemplo, las proteínas de la CETP humana y de conejo tienen una homología en la secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 80%. La CETP de conejo madura tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6 y la CETP humana madura de hígado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. Por consiguiente, en un ejemplo de una realización como tal de los péptidos de vacuna de la presente invención, la parte de epitope de célula B comprende uno o más epitopes de una CETP humana y/o de conejo, y tal péptido de vacuna puede usarse tanto en conejos como en humanos para inhibir la actividad de la CETP endógena.

Además, la parte de epitope de célula B de los péptidos de vacuna de la presente invención comprende una parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína de la CETP madura (SEQ ID NO:4) compuesta por al menos 6 secuencias de aminoácidos de longitud y que no estimula de manera significativa, o nada, la proliferación de células T *in vitro*.

En una realización preferida, los péptidos de vacuna de la presente invención tienen partes de epitope de célula B multivalente de péptidos de vacuna de la presente invención, que comprenden dos o más epitopes de célula B diferentes de la CETP. Se prefieren especialmente tales partes de epitope de célula T auxiliar multivalente porque presentan sitios

diana múltiples en los que anticuerpos provocados pueden unirse a la CETP endógena, fomentando de ese modo la formación más extensa de complejos inmunes y/o la posibilidad de inhibir la actividad de transporte de colesterol de la CETP.

Además, se prefiere que una parte de epitope de célula B de los péptidos de vacuna no comprenda un epitope de célula B que también comprenda un epitope de célula T que se puede presentar en moléculas endógenas MHC de clase I. Tales epitopes de célula T de la CETP podrían presentarse en la superficie de hepatocitos en el contexto de MHC de clase I y provocar una respuesta de célula T citotóxica y de ese modo dañar el tejido del hígado. Se puede determinar si un epitope particular de célula B de la CETP comprende un epitope de célula T de clase I usando un ensayo convencional de célula T citotóxica (véase, por ejemplo, páginas 3.11.4-3.11.7, en *Current Protocols in Immunology*. Vol I (John Wiley & Sons, Inc. Nueva York; Nueva York, (1994)).

En otra realización, la parte de epitope de célula B de los péptidos de vacuna de la presente invención comprende los 26 aminoácidos carboxilos terminales de CETP humana (véase SEQ ID NO:1) o fragmentos de los mismos que retienen una conformación o una actividad de la región de los 26 aminoácidos carboxilos terminales de la CETP, como por ejemplo, fragmentos de los extremos carboxilos de la CETP que son al menos seis aminoácidos consecutivos en longitud y que están implicados en la unión de lípidos neutros específicos y/o la actividad de transporte de lípidos neutros específicos de la CETP. Más preferiblemente, la parte de epitope de célula B (o relacionada con la CETP) de los péptidos de vacuna de la presente invención comprende cualquier fragmento de la región carboxilo terminal de la CETP que es al menos once aminoácidos consecutivos en longitud, que retiene la conformación de la región de los 26 aminoácidos carboxilos terminales de la CETP, que está implicada en la unión de lípidos neutros y/o la actividad de transporte de lípidos neutros de la CETP, y que es accesible a la unión de anticuerpos (véase, por ejemplo, Wang, S., y col. *J. Biol. Chem*., 267: 17487-17490 (1992); Wang, S., y col., *J. Biol. Chem*., 268: 1955-1959 (1993)). Además, se han generado diversos Mab en esta región, incluyendo el Mab TP2, que bloquea la función de la CETP humana y también la CETP de conejo, suponiendo que este epitope se conserve en las proteínas de la CETP humana y de conejo (Whitlock y col., *J. Clin Invest*., 84: 129-137 (1989)). Esto se confirma con el hecho de que los 22 aminoácidos carboxilos terminales de la CETP humana y de conejo se diferencian en una sola posición, esto es, se sustituye el residuo de ácido glutámico en la posición 465 en la secuencia de aminoácidos de la CETP humana en SEQ ID NO:4 con una lisina en la posición homóloga (posición 485) en la secuencia de conejo (SEQ ID NO: 6; véase también, Nagashima y col. *J. Lipid Res*., 29: 1643-1649 (1988)).

De manera alternativa, la parte de epitope de célula B comprende un derivado de la región de 26 aminoácidos carboxilo terminales de la CETP que contiene cambios de aminoácidos (deleciones, adiciones o sustituciones) que no modifican de forma significativa o destruyen la unión de lípidos neutros o la actividad de transporte de la CETP (véase, Wang y col., *id*, (1992); Wang y col., *id*., (1993)). Tales cambios en la secuencia de aminoácidos de una CETP endógena dirigida a diana incluyen, pero no se limitan a, lo que se conoce generalmente como sustituciones conservadoras de aminoácidos, tales como la sustitución de un aminoácido de la secuencia de la CETP con otra de estructura similar, carga o hidrofobicidad. También es útil en el diseño de un péptido de vacuna de la presente invención, cualquier adición o sustitución a la secuencia de la CETP que mantenga la unión de lípidos neutros y/o actividad de transporte, pero mejore la estabilidad *in vivo* o *in situ*, mejore la purificación o proporcione sitios de entrecruzamiento (por ejemplo, a través de formación de enlaces de disulfuros de cisteína-cisteína).

Ya que el transporte de lípidos neutros mediado por la CETP precisa necesariamente la unión de lípidos neutros (por ejemplo, triglicéridos, éster de colesterol), también son útiles en el diseño de péptidos de vacuna de la presente invención partes de la secuencia de aminoácidos de la CETP que están implicadas en la unión de lípidos neutros. Algunas partes de la secuencia de aminoácidos de la CETP usadas para diseñar los péptidos de vacuna de la presente invención pueden estar implicadas tanto en la unión de lípidos neutros como en el sitio real catalítico de transporte de lípidos neutros de la CETP. Pruebas recientes sugieren que la CETP contiene sitios de unión distintos para éster de colesterol y triglicéridos (Melchior, G. W., y col. *J. Biol. Chem*., 270: 21068-21074 (1995)). Por consiguiente, la incorporación de la secuencia de aminoácidos para un sitio de unión de un lípido específico en un péptido de vacuna puede proporcionar un medio para modular interacciones de la CETP con ese lípido específico, fomentando de ese modo un perfil anti-aterogénico, a pesar de que los anticuerpos provocados a la CETP no fomenten la eliminación (reducir la semivida del suero) de la CETP circulante. Por ejemplo, para modular el contenido de triglicéridos de HDL de manera específica, se podría incorporar un epitope de célula B derivado de la región de unión del triglicérido de la CETP en la parte del epitope de célula B de un péptido de vacuna de la presente invención. De forma similar, para modular el contenido de éster de colesterol de HDL de manera específica, se podría incorporar un epitope de célula B derivado de la región de unión del éster de colesterol de la CETP en en el diseño de un péptido de vacuna de la presente invención. Tales péptidos de vacuna se diseñan de ese modo para provocar anticuerpos que bloqueen los sitios de unión de lípidos neutros específicos en la CETP y de ese modo influyen al lípido específico transportado entre HDL y la CETP.

También son útiles las secuencias de aminoácidos de la CETP que son al menos seis aminoácidos consecutivos en longitud, un tamaño mínimo de un epitope en una proteína (véase, por ejemplo, Watson y col., *Molecular Biology of the Gene*, 4ª edición, página 836 (The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., Menlo Park, CA, 1987), y más preferiblemente, que son al menos once aminoácidos consecutivos en longitud de la región de 26 aminoácidos carboxilos terminales de la CETP codificada por cualquier polimorfismo que aparezca, de forma natural, del gen de la CETP.

Las moléculas de la CETP de la secuencia de aminoácidos conocida se puede analizar para la localización de epitopes de célula B potenciales usando algoritmos que puedan identificar motivos antigénicos potenciales en la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, combinando análisis de diagramas de hidrofilicidad, probabilidad de superficie, hélice anfifílica, hojas anfifílicas y estructura secundaria (Figuras 8A y 8B), se puede obtener un Índice Antigénico (véase Figura 8A) de la secuencia de aminoácidos de la proteína completa, llevando a la identificación de epitopes de célula B potencialmente útiles en los péptidos de vacuna de la presente invención.

En la técnica se conocen bien procedimientos para analizar moléculas de CETP para unir lípidos neutros o su efecto en la actividad de transporte de lípidos neutros, (véase, por ejemplo, Swenson, T. L., y col. *J. Biol. Chem*., 263: 5150-5157 (1988) (ensayo para unión de lípidos); Hesler, C. B., y col. *J. Biol. Chem*., 262: 2275-2282 (1987) (ensayo para transporte de lípidos); Bisgaier, C. L., y col. *J. Lipid Res*., 34: 1625-1634 (1993) (uso de microemulsiones fluorescentes de éster de colesterol en ensayo de actividad de transporte de colesterol mediado con la CETP); Gaynor, B. J. y col. *Atherosclerosis*, 110: 101-109 (1994) (ensayo para transporte de lípidos de CETP); Wang y col. (1992) (analizando mutaciones por deleción de la CETP para actividad de transporte); Wang y col., (1993) (analizando formas sencillas mutantes de aminoácidos de la CETP); incorporados en la presente memoria descriptiva mediante referencias). También están disponibles en el mercado ensayos para la actividad de transporte de la CETP (por ejemplo, ensayo funcional de la CETP por Diagnescent Technologies, Yonkers, Nueva York).

Preferiblemente, la parte de epitope de célula B de los péptidos de vacuna de la CETP de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos LFPRPDQQ HSVAYTFEEDI (aminoácidos 16 a 34 de SEQ ID NO:8) y/o la secuencia de aminoácidos FGFPEHLLVDFLQSLS (aminoácidos 35 a 50 de SEQ ID NO:8).

C. *Producción de péptido de vacuna*

Las partes del epitope de célula T auxiliar y del epitope de célula B (relacionado con la CETP) de los péptidos de vacuna de la CETP de la presente invención se unen en conjunto para formar restos inmunógenos. Las partes del epitope de célula T auxiliar y del epitope de célula B se pueden unir por covalencia, directamente (por ejemplo, a través de un enlace peptídico) o a través de una molécula de entrecruzamiento. Cuando se usan moléculas de entrecruzamiento, deben unir las partes del epitope de célula T auxiliar y del epitope de célula B del péptido de vacuna sin que haga tóxico al péptido o interfiera de forma significativa con o reduzca la inmunogenicidad total del péptido de vacuna. Las moléculas de entrecruzamiento apropiadas incluyen aminoácidos, por ejemplo, usando uno o más residuos de glicina para formar un "puente de glicina" entre las partes del epitope de célula T auxiliar y del epitope de célula B de los péptidos de vacuna de la presente invención. También se contempla la formación de enlaces de disulfuros entre residuos de cisteína que se han añadido a las partes del epitope de célula T auxiliar y del epitope de célula B, o el uso de moléculas de entrecruzamiento tales como glutaraldehído (Korn, A. H., y col., *J. Mol. Biol*., 65: 525-529 (1972)) y EDC (Pierce, Rockford, IL) u otras moléculas de entrecruzamiento bifuncional para unir una parte de epitope de célula T auxiliar a una parte de epitope de célula B. Las moléculas de entrecruzamiento bifuncional poseen dos sitios reactivos distintos; uno de los sitios reactivos se puede reaccionar con un grupo funcional en la parte de epitope de célula T auxiliar para formar un enlace covalente y el otro sitio reactivo se puede reaccionar con un grupo funcional en la parte de epitope de célula B para formar otro enlace covalente, uniendo las dos partes. Means y Feeney (*Bioconjugate Chem*., 1: 2-12 (1990)) revisan procedimientos generales para moléculas de entrecruzamiento.

Las moléculas de entrecruzamiento homobifuncional tienen dos sitios reactivos que son los mismos químicamente. Entre los ejemplos de moléculas de entrecruzamiento homobifuncional se incluyen glutaraldehído, N,N'-bis(3-maleimido-propionil}-2-hidroxi-1,3-propanediol (un entrecruzador homobifuncional sulmidril-specmc); algunos ésteres de N-succinimida, tales como disuccinimidil suberato y ditio-bis-succinimidil propionato) y sus sales y ácidos bisulfónicos solubles (por ejemplo, como están disponibles en Pierce Chemicals, Rockford, Illinois; Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri). Para la presente realización, deberían ajustarse las concentraciones relativas de las partes de epitope de célula T auxiliar y de epitope de célula B para maximizar el número de partes de epitope de célula T auxiliar y de epitope de célula B que están unidas y para minimizar la unión de partes idénticas de epitope con otras (esto es, evitar, por ejemplo, la formación homodímera de epitope de célula T auxiliar- epitope de célula T auxiliar o epitope de célula B- epitope de célula B).

Preferiblemente, la molécula de entrecruzamiento bifuncional es una molécula de unión heterobifuncional, que significa que la molécula de unión tiene al menos dos sitios reactivos que se pueden unir separadamente por covalencia a un epitope de célula T y a un epitope de célula B. El uso de tales moléculas de unión heterobifuncional permite separar químicamente y añadir de forma escalonada (conjugación vectorial) cada uno de los sitios reactivos de la molécula de unión a las partes del epitope de célula T auxiliar y del epitope de célula B del péptido de vacuna. Las moléculas de entrecruzamiento heterobifuncional que se pueden usar para unir partes del epitope de célula T auxiliar y del epitope de célula B con otras incluyen éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (véase, Green, N., y col., *Cell*, 28: 477-487 (1982); Palker y col., *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE. UU., 84: 2479-2483 (1987); éster de m-maleimido-benzoilsulfosuccinimida; éster de N-hidroxisuccinimida de ácido γ-maleimidobutírico; y N-succinimidil 3-(2-piridil-ditio)propionato (véase, Carlsson, J., y col., *Biochem J*., 173: 723-737 (1978); Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri).

Además, las partes del epitope de célula T auxiliar y del epitope de célula B pueden unirse a una molécula vehículo común, tal como albúmina de suero o una resina o perla polimérica. La unión de partes del epitope de célula T auxiliar y del epitope de célula B a un vehículo común se puede conseguir usando una molécula de entrecruzamiento tal como

gutaraldehído u otra molécula de entrecruzamiento bifuncional (véase arriba). Para la presente realización, deberían ajustarse las concentraciones relativas de parte de epitope de célula T auxiliar, parte de epitope de célula B y la molécula vehículo común para maximizar el número de partes de epitope de célula T auxiliar y de epitope de célula B que están unidas al vehículo común y para minimizar tanto la unión de moléculas idénticas con otras (esto es, formación homodímera) como la unión de partes del epitope de célula T auxiliar y del epitope de célula B con otras (esto es, formación heterodímera). La unión de las partes del epitope de célula T auxiliar y del epitope de célula B con otra molécula o superficie (por ejemplo, la superficie de una resina o perla de polímero) no debería alterar de forma significativa o reducir las características inmunógenas de las secuencias de la parte del epitope de célula T auxiliar antigénica universal o de la parte del epitope de célula B (relacionada con la CETP). El efecto global de usar tales moléculas de entrecruzamiento bifuncional es que se unen copias múltiples de partes del epitope de célula T auxiliar y del epitope de célula B de un péptido de vacuna con un vehículo común que puede potenciar una respuesta inmune y la producción de anticuerpos que se unan a la CETP endógena.

Las disposiciones de péptidos antigénicos múltiples (MAP) también han demostrado ser antígenos e inmunogenes altamente eficaces (véase, por ejemplo, Tam, *J. P., Proc. Natl. Acad. Sci*. EE. UU., 85: 5409-5413 (1988); Wang, C. Y., y col., *Science*, 254: 285-288 (1991); Marguerite, M, y col., *Mol. Immunol*., 29: 793-800 (1992)). Dicha tecnología MAP, en la que las partes del epitope de célula T auxiliar y del epitope de célula B de los péptidos de vacuna descritos en la presente memoria descriptiva están unidos a una molécula núcleo común, proporciona otra forma de realizar ensamblajes de péptidos multivalentes a provocar anticuerpos contra la CETP endógena.

Preferiblemente, las partes del epitope de célula T auxiliar y del epitope de célula B de los péptidos de vacuna de la presente invención se unen por covalencia de extremo a extremo para formar un péptido continuo. Más preferiblemente, una parte de epitope de célula T auxiliar antigénica universal seleccionada forma la parte amino terminal del péptido de vacuna con su residuo de aminoácidos carboxilos terminales, unido por covalencia en un enlace peptídico al aminoácido amino terminal de una secuencia de aminoácidos seleccionada relacionada con la CETP (parte del epitope de célula B) del péptido de vacuna. Sin embargo, también se puede usar el orden inverso, esto es, la secuencia de aminoácidos relacionada con la CETP (parte del epitope de célula B) de los péptidos de vacuna de la presente invención puede posicionarse para formar la región amino terminal de un péptido de vacuna y un epitope de célula T auxiliar antigénica universal o una secuencia vehículo inmunógena de aminoácidos puede comprender la parte carboxilo terminal del péptido de vacuna.

Los péptidos de vacuna de la presente invención pueden hacerse más inmunógenos uniéndolos por covalencia a copias múltiples de la proteína del complemento C3d (Dempsey y col. *Science*, 271: 348-350 (1996)). De forma alternativa, se pueden derivatizar los péptidos de vacuna con estructuras de hidratos de carbono que activan el complemento y se unen por covalencia con C3d (Fearon y col. *Science*, 272: 50-54 (1996)). Por ejemplo, las proteínas expresadas en algunas células hospedadoras de ovario de hámster chino mutante se pueden glicosilar con estructuras de hidratos de carbono específicas (Stanley, *Mol. Cell. Biol*., 9: 377-383 (1989)). Pruebas recientes demuestran que C3d fomenta el reconocimiento de antígenos por parte del sistema inmunológico adquirido provocando una respuesta inmune enérgica (Dempsey y col., 1996).

Los péptidos de la presente invención se pueden producir por medio de cualquiera de los procedimientos disponibles conocidos en la técnica para producir péptidos de secuencia de aminoácidos definida. Por ejemplo, la síntesis automatizada de péptidos está disponible para aquellos expertos en la técnica usando sintetizadores automatizados de péptidos (por ejemplo, Sintetizador de péptidos Synergy™ de Applied Biosystems; AMS 422 de Abimed, Langenfeld, Alemania). El encargo de síntesis de tales péptidos se realiza como un servicio comercial por parte de muchas compañías de servicios comerciales de sintetización de péptidos, como por ejemplo, Quality Controlled Biochemicals, Inc. Hopkinton, Massachusetts); Chiron Mimotopes Peptide Systems (San Diego, California); Bachem Bioscience, Inc. (Filadelfia, Pensilvania); Severn Biotech Ltd. (Kiddeminster, Inglaterra).

De forma alternativa, los péptidos de la presente invención se pueden producir usando tecnología de ácido nucleico sintético y recombinante. Por ejemplo, uno de los expertos en la técnica habituales puede diseñar a partir del código genético conocido una secuencia de de 5' a 3' ácidos nucleicos que codifica un péptido de la presente invención. Se conoce la secuencia de aminoácidos para una CETP madura de hígado humano (SEQ ID NO:4), como lo es su secuencia de ADN correspondiente (SEQ ID NO:5) (véase, Drayna y col. *Nature*, 327: 632-634 (1987)). Además, se conocen las secuencias de aminoácidos para una diversidad de epitopes de célula T de gama amplia o "universal" (véase, por ejemplo, Panina-Bordignon y col., *Eur. J. Immunol*., 19: 2232-2242 (1989), Etlinger y col. (1990), Pillai y col., *Infect. Immun*., 63: 1535-1540 (1995)).

Se puede sintentizar fácilmente una molécula de ADN que contiene las secuencias codificadoras de un epitope de célula T auxiliar y una o más partes de epitope de célula B seleccionada (y cualquier péptido de unión, tal como poliglicina, u otro(s) residuo(s) adicional(es), tal(es) como un aminoácido y/o cisteína carboxilo terminal, si así se desea) usando un sintetizador de ADN automatizado (por ejemplo, Sintetizador de ADN Oligo 1000, Beckman Corp.) o contratando un servicio comercial de sintetización de ADN (por ejemplo, Genset Corp.; La Jolla, California). La molécula de ADN sintetizada se puede introducir en cualquiera de una diversidad de sistemas de expresión de genes disponible (por ejemplo, plásmidos bacterianos, vectores de expresión bacteriófagos, vectores de expresión retrovirales, vectores de expresión del baculovirus), usando procedimientos convencionales disponibles en la técnica (por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol. 1-3 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989)), y/o como dirige el fabricante de un sistema de expresión de genes particular dispo-

nible en el mercado (por ejemplo, 1 sistema de expresión de células bacterianas pPROEX™; sistema de expresión de células eucariotas SFV; Sistema de expresión del baculovirus BAC-TO-BAC™; Life Technologies, Inc. Gaithersburg, Maryland). Luego, se aísla el péptido expresado del sistema de expresión usando procedimientos convencionales para purificar péptidos. Se puede acelerar la purificación de los péptidos de la presente invención empleando cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación basada en el uso de anticuerpos para la secuencia particular de aminoácidos del epitope de célula T auxiliar o del epitope de célula B(parte relacionada con la CETP), de un péptido de vacuna de la presente invención. Por ejemplo, el Mab TP2 se une a los 26 aminoácidos carboxilos terminales de la CETP humana, y podría ser útil en una o más etapas de inmunoafinidad en un esquema de purificación (Hesler, C. B., y col. *J. Biol. Chem*., 263: 5020-5023 (1988)).

Por supuesto, si las moléculas de ADN están disponibles codificando cada uno de los epitopes de célula T y célula B para un péptido de vacuna particular, se pueden emplear procedimientos convencionales de ácido nucleico recombinante, incluyendo reacción en cadena con polimerasa (RCP), para producir moléculas de ácido nucleico recombinante que codifiquen los péptidos de vacuna. Tales moléculas de ácido nucleico recombinante se pueden introducir en cualquiera de una diversidad de vectores de expresión que pueden transportarse o transformarse en células hospedadoras adecuadas para expresar el péptido de vacuna en cultivo (véase, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Vol. 1-3 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989)). Por ejemplo, la secuencia de ADN que codifica la CETP humana madura del hígado tiene la secuencia nucleótida de SEQ ID NO:5 y la secuencia de ADN que codifica la CETP madura de conejo tiene la secuencia nucleótida de SEQ ID NO:7. Se pueden recombinar secuencias particulares que codifican diversos epitopes de célula B de cada una de estas proteínas de CETP con secuencias nucleótidas que codifican epitope(s) seleccionado(s) de célula T, e introducir en un vector de expresión para expresión en una célula hospedadora adecuada.

Un ejemplo de un plásmido recombinante que se puede usar para producir un péptido de vacuna es el plásmido pCMV-CETP/TT, en el que el promotor del CMV dirige la trascripción de una secuencia que codifica un péptido de vacuna que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9: MQYIKANSKFIGITERFPRPDGREAVAYRFEE DIFGFPKH LLVDFLQSLS, en la que una metionina amnio terminal se une a un epitope de célula T de toxoide de tétanos (aminoácidos 2 a 15 de SEQ ID NO:2) y dos epitopes de célula B de CETP de conejo (aminoácidos 350 a 368 y 481 a 496 de SEQ ID NO: 6). El plásmido pCMV-CETP/TT se ha depositado en la Colección Americana de cultivos Tipo (ATCC, Rockville, MD) y se le ha designado el registro nº 98038.

En una realización preferida, un péptido de la presente invención también contiene un residuo de cisteína amino terminal, u otro residuo, unido por covalencia al aminoácido amino terminal de la parte del epitope de célula T auxiliar del péptido de vacuna de la presente invención para usar en el atado o acoplamiento del péptido a sí mismo, para formar dímeros de péptidos de vacuna o a otras moléculas, tales como moléculas de entrecruzamiento o vehículo. Más preferiblemente, el péptido de vacuna de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos CQYIKANSKFI GITEFGFPE HLLVDFLQSLS (SEQ ID NO: 2). Aún más preferido es un péptido de vacuna de la presente invención que tiene al menos dos epitopes de célula B de la CETP. Un ejemplo de tal péptido de vacuna tiene la secuencia CQYIKANSKFIGITELFPRPDQQHSVAYT FEEDIFGFPEHLLVDFLQSLS (SEQ ID NO: 8).

D. *Producción de vacuna*

Los péptidos de la presente invención se usan para preparar vacunas que provoquen la producción de anticuerpos endógenos que se unan de forma específica a la CETP y modulen la actividad de la CETP endógena (esto es, disminuir o inhibir). Las vacunas anti-CETP de la presente invención pueden contener uno o varios péptidos diferentes de la presente invención. Por ejemplo, los péptidos que tienen partes de epitope de célula T auxiliar diferentes (por ejemplo, epitopes de célula T auxililar universal diferente) y/o partes de epitope de célula B (por ejemplo, partes diferentes relacionadas con la CETP de los 26 aminoácidos carboxilos terminales de la CETP) pueden combinarse y administrarse como una composición de vacuna sencilla.

Se pueden mezclar adyuvantes farmacéuticamente aceptables, tales como alumbre, con péptidos de vacuna descritos en la presente memoria descriptiva para producir vacunas de la presente invención. El alumbre es el adyuvante sencillo aprobado en la actualidad para usar en la administración de vacunas para humanos (véase, Eldrige, J. H., y col. en *Immunobiology of Proteins and Peptides V: Vaccines; Mechanisms, Design, and Applications*, Atassi, M. Z., ed. (Plenum Press, Nueva York, 1989), página 192). Recientemente, se usó el alumbre junto con un derivado ftalil de sodio de lipopolisacárido para administrar a una vacuna que mostraba ser efectiva contra la gonadotropina coriónica humana en humanos (véase, Talwar, G. P., y col., *Proc. Natl. Acad Sci*., EE. UU., 91: 8532-8536 (1994)).

Se pueden usar otros adyuvantes convencionales ya que están aprobados para un uso particular. Por ejemplo, microesferas biodegradables compuestas por poli (DL-lactida-co-glicolida) se han estudiado como adyuvantes para administración de vacunas por vía oral o parenteral (Eldridge, J. H., y col. en *Immunobiology of Proteins and Peptides V: Vaccines; Mechanisms, Design, and Applications*, Atassi, M. Z., ed. (Plenum Press, Nueva York, 1989), páginas 191-202).

Se han usado otros adyuvantes para administrar vacunas a mamíferos no humanos. Por ejemplo, el Adyuvante Completo de Freund (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), Adyuvante Incompleto de Freund (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), y el Sistema Adyuvante de RIBI™ (RAS; RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Montana) son adyuvantes bien conocidos usados de forma rutinaria para administrar antígenos a animales distintos

de humanos. Además, las estructuras de adyuvante también se pueden mezclar con o, preferiblemente, incorporarse por covalencia en péptidos de la presente invención, por ejemplo en el residuo amino o de aminoácidos carboxilos terminales de los péptidos. Tales adyuvantes incorporados incluyen N-palmitoil-S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-propil]-cisteína lipofílica ("Pam_3-Cys-OH") en el extremo amino de los péptidos de la presente invención; lipopéptidos solubles en agua, anfifílicos, tales como Pam_3-Cys-Ser-Lys_4 y Pam_3-Cys-Ser-Glu_4; glicopéptidos tales como N-acetil-glucosaminil-N-acetilmuramil-alanil-D-isoglutamina ("GMDP"), dipéptidos de muramilo, y alanil-N-adamantil-D-glutamina; y adyuvantes basados en gel de poliamida que se pueden unir fácilmente a los péptidos durante su síntesis química *in vitro* (véase, *Synthetic Vaccines*, Nicholson, B. H., ed. (Blackwell Scientific Publications, Cambridge, Massachusetts, 1994), páginas 236-238).

Además, los péptidos de vacuna de la presente invención se pueden unir a otras moléculas que puedan potenciar la inmunogenicidad de los péptidos. Por ejemplo, uniendo péptidos de la presente invención a una superficie de una molécula más grande, tal como albúmina de suero, puede potenciar la inmunogenicidad, ya que los epitopes de los péptidos de vacuna se presentan en el sistema inmunológico de un individuo en forma de copias múltiples repetidas adyacentes (véase, por ejemplo, Tam, J. P., *Proc. Natl. Acad. Sci*., EE. UU. 85: 5409-5413 (1988); Wang, C. Y., y col., *Science*, 254: 285-288 (1991); Marguerite, M. y col., *Mol. Immunol*., 29: 793-800 (1992)). Tales disposiciones "múltiples" o "multivalentes" de los péptidos de vacuna de la presente invención se pueden crear usando moléculas de entrecruzamiento (véase arriba). Por ejemplo, como se indica anteriormente, las moléculas de entrecruzamiento bifuncional poseen dos sitios reactivos, uno de los sitios puede unir el enlace a un péptido de vacuna de la presente invención y el otro sitio está disponible para reaccionar con una molécula diferente, como por ejemplo, una proteína más grande como albúmina de suero, o una resina o perla polimérica. De ese modo, las moléculas de entrecruzamiento covalentes se pueden usar para unir péptidos de vacuna con otras proteínas o sustratos para formar disposiciones de copias múltiples de péptidos (ensamblajes de copias múltiples de péptidos).

La unión de péptidos de vacuna de la presente invención a otra molécula o superficie debería realizarse de una forma que no altere significativamente o reduzca las características inmunógenas de las partes unidas del epitope de célula T auxiliar y del epitope de célula B (relacionada con la CETP) de los péptidos de vacuna. Preferiblemente, el uso de tales moléculas de unión potencia la inmunogenicidad de los péptidos de vacuna de la presente invención, como se ha demostrado, por ejemplo, mediante un aumento más rápido en el título de anticuerpos anti-CETP y/o producción de anticuerpos anti-CETP con afinidad superior a cuando se administra péptidos de vacuna que no están unidos a los individuos. Tales moléculas de entrecruzamiento también se pueden usar para unir un péptido de la presente invención a una molécula "potenciadora inmunógena" tal como el factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), que demostró servir como un potenciador inmunógeno efectivo en la obtención de la producción de anticuerpos anti-tumor específicos (por ejemplo, Tao, M. H., y col., *Nature*, 362: 755-758 (1993)). Otro potenciador inmunógeno como tal es la hemocianina de lapa de bocallave (KLH) (véase, Ada, G. L. en *Fundamental Immunology*, tercera edición, W. E. Paul, ed. (Raven Pres Ltd., Nueva York, 1993), páginas 1309-1352). Como se indica anteriormente, un ejemplo de disposición multivalente usando KLH es la unión de péptidos de vacuna con cualquiera de los varios residuos de cisteína de molécula de KLH a través de la formación de enlaces de disulfuros.

2. *Uso de péptidos de vacuna*

Aquellos expertos en la técnica conocen bien los procedimientos generales de administración y pruebas de vacunas (véase, por ejemplo, Talwar, G. P., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE. UU., 91: 8532-8536 (1994)). Los péptidos de la presente invención se diseñan de forma específica para administrarse, tanto solos como junto con uno o más vehículos o adyuvantes farmacéuticamente aceptables, en forma de una vacuna que provocará una respuesta de anticuerpos contra la CETP endógena del receptor de vacuna. En algunas realizaciones de la presente invención, los péptidos de vacuna también pueden combinarse y administrarse con vacunas para otras enfermedades o desórdenes.

La respuesta inmune a la CETP endógena debería inhibir significativamente la actividad de la CETP, modificar la semivida del suero de la CETP, causar la eliminación de la CETP a través de la formación de complejos inmunes, modificar el tráfico de HDL-colesterol, cambiar el equilibrio del contenido de colesterol de las lipoproteínas, modificar el catabolismo de colesterol, y/o reducir el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. El control de niveles LDL, VLDL y/o HDL es un indicador o punto final aceptado en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, ya que estos niveles se correlacionan con un riesgo disminuido de enfermedad cardiovascular u otra progresión de tal enfermedad (Mader, S. S., en *Human Biology*, 4ª edición, páginas 83, 102 (Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa, 1995)). Por consiguiente, se demuestra el efecto profiláctico o terapéutico deseado de acuerdo con la presente invención provocando anticuerpos en un individuo que se unen a la CETP y/o inhiben la actividad de la CETP, o mediante una disminución relativa de los niveles de LDL y/o VLDL, en comparación con los niveles de HDL ya que aumenta el título de anticuerpos dirigidos contra la CETP endógena, o mediante la elevación de los niveles absolutos de HDL circulante con la producción de anticuerpos anti-CETP, o mediante la inhibición o disminución del desarrollo de lesiones ateroscleróticas en tejido cardiovascular.

Como se demuestra en la presente memoria descriptiva, la administración de péptidos de vacuna en un modelo de conejo de aterosclesrosis llevó a una disminución importante en el desarrollo de placas ateroscleróticas en animales alimentados con una dieta suplementada con colesterol. Esta prueba indica que la vacunación para provocar anticuerpos a la CETP endógena puede ser un procedimiento útil para tratar o prevenir la aterosclerosis. Esta es la primera prueba de que la provocación de una respuesta inmune a la CETP puede inhibir el desarrollo de aterosclerosis.

Tales anticuerpos producidos de forma endógena contra la propia CETP de un individuo es ventajoso frente a otros enfoques terapéuticos posibles. Por ejemplo, es probable que tanto el uso de inhibidores de polipéptidos de la CETP, tales como uno aislado recientemente de babuinos (véase, por ejemplo, el documento WO93/11782; Kushwaha, R. S., y col., *J. Lipid Res*., 34: 1285-1297 (1993); *Genetic Engineering News*, 14: 44 (1994); *Science*, 262: 1974-1975 (1993)), como la infusión de anticuerpos anti-CETP producidos de forma exógena (foránea) que inhiben la actividad CETP, provoquen una reacción inmune dirigida contra tales moléculas foráneas inhibitorias de la CETP. Una respuesta inmune como tal podría inactivar rápidamente y/o eliminar el inhibidor de la CETP proporcionado de forma exógena del cuerpo. En teoría, la respuesta inmune como tal contra el inhibidor de la CETP proporcionado de forma exógena podría vencerse administrando dosis crecientes del inhibidor. Sin embargo, las administraciones múltiples de dosis de un inhibidor de CETP foráneo, en particular las dosis múltiples de cantidades cada vez más crecientes de dichas moléculas foráneas, presentan la posibilidad de una reacción de hipersensibilidad, poniendo en peligro la salud del individuo que se está tratando. Tales problemas relacionados con el uso de inhibidores de la CETP producidos de forma exógena se evitan usando vacunas basadas en péptidos de la presente invención, que reclutan los propios anticuerpos del sistema inmunológico de un individuo para inhibir de forma específica la CETP endógena. La dosificación repetida, dosificación graduada, y efectos secundarios no deseados (tales como una respuesta de anticuerpo anti-ratón humano (HAMA)) se evitan empleando el enfoque de vacuna anti-CETP descrito en la presente memoria descriptiva.

Las composiciones de péptidos de vacuna de la CETP de la presente invención se pueden administrar por cualquier vía usada para vacunación, entre las que se incluye: por vía parenteral, tal como intraperitoneal, interperitoneal, intradérmica (subcutánea), intramuscular, intravenosa o por vía oral. Preferiblemente, las vacunas de la presente invención se administran por vía parenteral, por ejemplo, intraperitoneal, interperitoneal, intradérmica, intramuscular o intravenosa. Si se desea la administración de un péptido de vacuna por vía oral, se puede mezclar cualquier excipiente oral farmacéuticamente aceptable con los péptidos de vacuna de la presente invención, como por ejemplo, tales como soluciones aprobadas para usar en la vacuna oral contra la polio Sabin. Al igual que con algunas otras vacunas, tales como para el tétanos, puede ser necesaria la administración de refuerzo ocasional de composiciones de péptidos de vacuna de la CETP para mantener un nivel deseado de modulación o inhibición de la CETP endógena. Como se indica anteriormente, las microesferas biodegradables, tales como aquellas compuestas por poli (DL-actida-co-glicolida), han demostrado ser útiles para la administración de vacunas efectivas e inmunización por vía oral o parenteral. (Eldridge, J. H., y col. en *Immunobiology of Proteins and Peptides V: Vaccines; Mechanisms, Design, and Applications*, Atassi, M. Z., ed. (Plenum Press. Nueva York, 1989), páginas 191-202).

Las dosis adecuadas de vacunas de péptidos de la presente invención se establecen a través de metodologías de vacunas generales usadas en la técnica, basadas en parámetros medibles para los que se piensa que la vacuna va a afectar, incluyendo el control de contraindicaciones potenciales, tales como reacción por hipersensibilidad, eritema, induración, sensibilidad (véase, por ejemplo, *Physician's Desk Reference*. Edición 49, (Medical Economics Data Production Co., Mont Vale, Nueva Jersey, 1995), páginas 1628, 2371 (referente a la vacuna contra la hepatitis B), páginas 1501, 1573, 1575 (referente a vacunas contra el sarampión, paroditis infecciosa y/o rubéola), páginas 904, 919, 1247, 1257, 1289, 1293, 2363 (referente a vacunas contra la difteria, tétanos y/o tos ferina)); Talwar, G. P. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci*. EE. UU., 91: 8532-8536 (1994)). Un enfoque común y tradicional para la vacunación de humanos es administrar una dosis inicial de una vacuna particular para sensibilizar el sistema inmunológico y después seguir con una o más dosis "de refuerzo" de la vacuna para provocar una respuesta anamnésica en el sistema inmunológico que fue sensibilizado con la administración inicial de la vacuna (vacunación). Dicho procedimiento de administración primaria y "de refuerzo" se ha conocido bien y usado de forma común en la técnica, como por ejemplo, en el desarrollo y uso de vacunas contra el sarampión, polio, tétanos, difteria y hepatitis B.

De forma inicial, puede ser que la cantidad de un péptidos de vacuna administrado a un individuo precisara provocar una respuesta de anticuerpos efectiva para neutralizar el nivel aproximado de actividad de la CETP endógena presente en el individuo antes de la vacunación, como se puede determinar midiendo la actividad de la CETP en muestras de suero o pasma del individuo, por ejemplo, como se determina usando un ensayo de la CETP disponible en el mercado (por ejemplo, Diagnescent Technologies, Inc., Yonkers, Nueva York). También se pueden controlar las muestras de plasma o suero de un individuo vacunado para determinar si se observa un incremento medible de los niveles de HDL o HDL-C total, después de la administración del péptido de vacuna usando ensayos disponibles en el mercado (por ejemplo, disponibles de Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, Virginia). Se puede medir un aumento en la concentración (título) de anticuerpos anti-CETP circulante en muestras de plasma o suero, por ejemplo usando un ensayo ELISA (véase, por ejemplo, Ejemplo 3). De ese modo, es posible y se recomienda que se establezca inicialmente si un aumento en el anticuerpo anti-CETP se puede correlacionar con un incremento del nivel de HDL o HDL-C, o con una disminución en la actividad de la CETP. A partir de entonces, sólo es necesario controlar un aumento en el título de los anticuerpos anti-CETP para determinar si se ha administrado una dosis suficiente de péptido de vacuna o si se indica una dosis "de refuerzo" para provocar un nivel elevado de anticuerpos anti-CETP. Este es el procedimiento común con diversas vacunaciones establecidas, tales como vacunación contra el virus de la hepatitis B.

Actualmente están disponibles procedimientos de formación de imágenes arteriales en tres dimensiones, que se pueden usar para identificar lesiones arteriales y controlar su desarrollo o regresión en un individuo (véase, por ejemplo, *McPherson, Scientific American Science & Medicine*, páginas 22-31), (marzo/abril, 1996)). De ese modo, se pueden usar tales procedimientos de formación de imágenes para controlar la efectividad de vacunación con un péptido de la presente invención.

Se puede obtener una apreciación más completa de la presente invención y de las ventajas de la misma a partir de los siguientes ejemplos que no limitan.

Ejemplos

Ejemplo 1

Diseño y Síntesis de un péptido de vacuna anti-CETP

Para investigar la posibilidad de provocar una respuesta de anticuerpos contra la CETP endógena, se preparó un péptido con una parte del epitope de célula T auxiliar que comprende una parte de epitope de célula T auxiliar de toxoide de tétanos universal y del epitope de célula B que comprende una región carboxilo terminal de CETP humana. Se designó un péptido de 31 aminoácidos con una secuencia de aminoácidos CQYIKANSKFIGITEFGFPEHLLVDFLQSLS (SEQ ID NO:2), en la que QYIKANSKFIGITE (aminoácidos 2 a 15 de SEQ ID NO:2) es la misma secuencia de aminoácidos que los aminoácidos 830 a 843 de la proteína de toxoide de tétanos, FGFPEHLLVDFLQSLS (aminoácidos 16 a 31 de SEQ ID NO:2) es la misma secuencia de aminoácidos que los aminoácidos 461 a 476 de SEQ ID NO:4 que contiene el dominio de transporte de lípidos neutros de la CETP humana y se sabe que se reconoce con Mab TP2 de la CETP anti-humana (Wang, S., y col., *J. Biol. Chem*, 267: 17487-17490 (1992); Wang, S., y col., *J. Biol. Chem*, 268: 1955-1959 (1993)), y el residuo de cisteína (C) amino terminal está presente para usar en la unión del péptido consigo mismo o con otras moléculas, si así se desea. La parte relacionada con la CETP de este péptido sintético se diferencia de la parte correspondiente de la secuencia de aminoácidos de la CETP de conejo solamente en el residuo de ácido glutámico (E) (véase, Nagashima M., y col., *J. Lipid Res*., 29: 1643-6149 (1988) (clonando gen de la CETP de conejo)). Sin embargo, un estudio anterior ha indicado que Mabs de la CETP anti-humana pueden reconocer esta región de la CETP de conejo correspondiente (véase, Hesler, C. B., y col., *J. Biol. Chem*, 263: 5020-5023 (1988)). Se sintentizó el péptido para usar en orden procedimientos de síntesis de péptidos convencionales de Quality Controlled Biochemicals, Inc. (Hopkinton, Massachusetts).

Ejemplo 2

Inmunización de conejos contra la CETP endógena

Se inyectó el péptido de vacuna sintético (SEQ ID NO:2) del Ejemplo 1 anterior en conejos blancos de Nueva Zelanda para analizar la capacidad del péptido de vacuna de provocar una respuesta inmune contra la CETP de conejo endógena. El Grupo I contenía tres conejos (rb#1-#3), cada uno de los cuales se sometió a un protocolo para administración del péptido de vacuna. El Grupo II contenía un conejo (rb#4) en forma de control que no se trató.

En la Figura 1 se muestra el protocolo general para analizar el péptido de vacuna en los conejos. El Día 1, se suspendió el péptido (100 μg) en el sistema adyuvante RIBI™ (RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Montana) de acuerdo con las instrucciones del fabricante hasta un volumen final de 1.000 μl, y cada conejo del Grupo I fue inyectado en dos sitios intramusculares (250 μl por sitio), por vía subcutánea en dos sitios (100 μl por sitio), y seis sitios intradérmicos (50 μl por sitio). El Día 28, se administró un refuerzo (100 μg de péptido en sistema adyuvante RIBI™) como en el Día 1. El Día 56, se administró otro refuerzo (100 μl de péptido en sistema adyuvante RIBI™), como el Día 1.

Se extrajeron muestras de sangre (aproximadamente 1-5 ml) del oído de cada conejo antes de cada inyección inicial ("presangrado") y en los Días 42, 70 y 108, salvo que no hubo presangrado para el conejo de control rb#4. Se prepararon muestras de plasma sanguíneo por medio de procedimientos de centrifugación convencionales para separar componentes celulares del plasma. Se almacenaron las muestras de plasma a -70ºC. Se analizaron muestras de plasma de ambos Grupos I y II para la presencia de y aumento en el título de anticuerpos anti-CETP y para niveles totales de colesterol en plasma y HDL-C en plasma.

Ejemplo 3

Producción de anticuerpos anti-CETP en conejos vacunados

Ensayo ELISA directo para titular anticuerpos anti-CETP

Se usó un ensayo (ELISA) inmunosorbente unido a encimas en sándwich para titular muestras de plasma que contienen anticuerpos anti CETP. En este establecimiento, se absorbió CETP humana recombinante (CETPr humana, obtenida de la línea celular CHO recombinante CHO(AT) aprobada por The Trustees of Columbia University, Nueva York, Nueva York) a pocillos de una placa de microtítulos, y se añadieron diversas diluciones de plasma de conejo de los conejos de los Grupos I y II a cada pocillo. Se revistió cada pocillo de una placa de 96 pocillos NUNC Maxisorb por exposición de toda la noche a 4ºC a 100 μl de 1 solución de 1 μg/ml de CETPr humana en PBS. Se bloqueó la unión no específica añadiendo una solución del 1% de BSA en PBS y el 0,05% de Tween a cada pocillo e incubando durante dos horas a temperatura ambiente (20º-22ºC) en un baño de agitación a 150 rpm. Después se lavaron los pocillos cuatro veces con tampón de lavado ELISA (PBS + 0,05% Tween). Después se diluyeron muestras de plasma 1:10 en tampón de dilución (1% HSA en PBS), seguido de 6 diluciones en serie dos veces en el mismo tampón. Se añadieron muestras diluidas (100 μl) a los pocillos, se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en un baño de agitación a 150 rpm,

y después se lavaron 4 veces con tampón de lavado ELISA (PBS + 0,05% Tween). Para detectar anticuerpos anti-CETP unidos, se añadió 100 μl de una dilución de 1: 10.000 de inmunoglobina de cabra anti-conejo etiquetada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Southern Biotechnologiy Associates, Inc.; Birmingham, Alabama) en tampón de dilución, y se incubaron las placas durante 2 horas a temperatura ambiente en un baño de agitación a 150 rpm. Después se lavaron los pocillos 4 veces con tampón de lavado ELISA (véase arriba), se añadió sustrato de peroxidasa TMB (sustrato de peroxidasa TMB, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. Gaithersburg, Maryland), y se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se controló el cambio en densidad óptica por medio de espectrofotometría a 450 nm usando un lector ELISA (por ejemplo, E-max, Molecular Device Corp., Menlo Park, California). En este ensayo, la D.O. era directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-CETP presentes en las muestras de plasma. Los resultados indicaron que todos los conejos (rb#1-rb#4) del Grupo I produjeron anticuerpos anti-CETP que eran específicos para la CETP humana recombinante. No se produjo ningún anticuerpo anti-CETP en el conejo de control no tratado (rb#4) del Grupo 1 en el Ejemplo 2. Véase Figura 2.

ELISA competitivo para detectar anticuerpos anti-CETP

Se diseñó este ensayo para determinar si los conejos vacunados habían generado anticuerpos que se unieran con el mismo epitope que el Mab TP2 anti-CETP (aprobado por The Trustees of Columbia University, Nueva York, Nueva York). Se adaptó un ELISA competitivo convencional para detectar la presencia de anticuerpos anti-CETP en plasma de conejo. En este ensayo, se conjugó peroxidasa de rábano picante (HRP) con el Mab TP2 anti-CETP que se une específicamente al fragmento de los 26 aminoácidos carboxilos terminales de la CETP humana (Wang y col., *J. Biol. Chem*., 267: 17487-17490 (1992); Wang y col., *J. Biol. Chem*., 268: 1955-1959 (1993)).

El siguiente procedimiento se usó para conjugar HRP con el anticuerpo. Se dializó el anticuerpo contra Na_2CO_3 (50 mM, pH 9,5). El anticuerpo dializado estaba en una concentración de 2 a 5 mg/ml. Se disolvió HRP (Boehringer-Manaheim) en tampón de acetato sódico (1,0 mM, pH 4,4) a una concentración de 6 mg/ml. Después se activó la HRP añadiendo 0,2 ml de periodato sódico (21,4 mg/ml de tampón de acetato, preparado inmediatamente antes de usar) a cada 1 ml de solución de HRP, y la mezcla de activación se incubó a temperatura ambiente en un agitador por balanceo durante 20 minutos. Después la HRP activada se pasó por un una columna G25 equilibrada con tampón de acetato para desalar la HRP activada. Una densidad óptica (D.O.) a 403 nm corresponde a aproximadamente 1 mg de HRP/ml. Después se añadió HRP activada, desalada, al anticuerpo dializado en una cantidad igual a la mitad de la cantidad de anticuerpo (por peso, por ejemplo, por cada 1 mg de lgG, añadir 0,5 mg de HRP activada), y se incubó la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador por balanceo para permitir que la HRP conjugue con las moléculas del anticuerpo. Se detuvo la reacción de conjugación añadiendo 20 μl de borohidruro sódico (10 mg/ml) por cada 1 ml de la mezcla de conjugación HRP-anticuerpo, y después se incubó la mezcla en hielo durante 30 minutos. La mezcla de anticuerpo conjugado con HRP se dializó toda la noche contra solución salina tampón fosfato (PBS) y después se centrifugó (Airfuge) durante 15 minutos a 30 psi (206,90 kPa). Se añadió timerosal al sobrenadante (anticuerpo conjugado con HRP) al 0,5%, y se añadió albúmina de suero bovino al 1%. Se almacenó la preparación de anticuerpo conjugado con BRP a 4ºC y se protegió de la luz.

Los pocillos de la placa de microtítulos de 96 pocillos se revistieron con CETP incubando en cada pocillo 100 μl de una solución de 300 ng/ml de CETP humana recombinante (obtenida de la línea celular CHO recombinante CHO(AT), aprobada por The Trustees of Columbia University, Nueva York, Nueva York) en salina tampón fosfato (PBS). Se drenaron los pocillos y se llenaron los pocillos con una solución del 1% (p/p) de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS y el 0,05% (vol./vol.) de Tween (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en un baño agitador (aproximadamente a 150 rpm) para bloquear la unión no específica. Los pocillos se lavaron cuatro veces con tampón de lavado ELISA (PBS + 0,05% Tween), y se añadió 100 μl de muestras de plasma diluidas en tampón de dilución (1% BSA en PBS). Después se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente en un baño agitador como anteriormente, y después se lavaron cuatro veces con tampón de lavado ELISA. A cada pocillo se añadió más tarde 100 μl de una dilución 1:100.000 de Mab TP2 conjugada (etiquetada) con peroxidasa de rábano picante en tampón de dilución. Las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en un baño de agitación como anteriormente, después se lavaron cuatro veces con tampón de lavado ELISA. Se añadió el sustrato de peroxidasa de rábano picante (por ejemplo, sustrato de peroxidasa TMB, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. Gaithersburg, Maryland) a cada pocillo y se controló un cambio en densidad óptica (D.O.) a 450 nm por medio de espectrofotometría, usando un lector ELISA (por ejemplo, E-max, Molecular Devices Corp., Menlo Park, California). En este ensayo, si se producía un anticuerpo contra la parte relacionada con la CETP del péptido de vacuna, tales moléculas de anticuerpos anti-CETP no etiquetadas presentes en las muestras de plasma compiten con el Mab TP2 etiquetado para unirse con la CETP absorbida en las paredes de los pocillos y se observa una inhibición en el desarrollo de color a medida que aumenta la concentración de la muestra de plasma (esto es, D.O. es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpo anti-CETP presente en cada muestra de plasma).

Como se muestra en la Figura 3, se observó dicha inhibición de TP2 uniéndose con la CETP en una muestra de plasma de dos de los tres conejos a los que se administró el péptido de vacuna, indicando de ese modo la producción de anticuerpos específicos de la CETP (compárese gráficos de sueros de conejo rb#2 y rb#3 con plasma de conejo de control no tratado de conejo rb#4 en la Figura 3). La inhibición más fuerte de TP2 uniéndose con la CETP se manifestó en el plasma de conejo rb#3 (véase Figura 3).

Ejemplo 4

Niveles de colesterol y HDL en muestras de plasma de conejos vacunados

También se analizaron las muestras de plasma tomadas de conejos de los Grupos I y II, del Ejemplo 2, en diversos tiempos (días), en el protocolo de vacunación para la concentración de colesterol total (Figura 4) y HDL-C (Figura 5). Se determinaron los niveles totales de colesterol y HDL-C en plasma usando ensayos convencionales comerciales (Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, Virginia). Las muestras de plasma de dos conejos (rb#2 y rb#3) que tenían los títulos de anticuerpo anti-CETP más elevados mostraron un aumento de 2 a 5 veces en las concentraciones de HDL-C en el Día 70, en comparación con muestras de plasma presangrado. Los conejos rb#2 y rb#3 también mostraron un aumento en las concentraciones de HDL en plasma en el transcurso del tiempo, en comparación con el conejo de control (rb#4) y el conejo (rb#1) con título de anticuerpo más bajo, manifestando ambos concentraciones de HDL decrecientes en el transcurso del tiempo (Figura 5).

La Figura 6 muestra la relación de colesterol No-HDL (No-HDL) a HDL-colesterol (HDL) en el Día 70 de la pos-vacunación. La información muestra una tendencia hacia un perfil anti-aterogénico en el grupo de conejos vacunados (recién nacidos), en comparación con el conejo no vacunado (barra rellena). A pesar de que no se observó ninguna diferencia importante en el colesterol total de las muestras de plasma, la relación de No-HDL/HDL disminuyó en general con un aumento de los niveles de anticuerpos anti-CETP en los conejos vacunados del Grupo I.

Ejemplo 5

Administración a ratones transgénicos que expresan CETP humana

Recientemente una cepa de ratones transgénicos que expresan la CETP humana se ha puesto a disposición en el mercado (ratones de CETP Biodigm™; Pharmakon USA, Waverly, Pensilvania). Dichos ratones expresan CETP humana en el hígado y se reseña que tienen aproximadamente niveles inferiores al 50% de colesterol relacionado con HDL que compañeros de camada no transgénicos cuando se les alimentó con dieta de pienso normal. Dichos animales transgénicos sirven de modelo experimental adicional para analizar otros péptidos de vacuna de la presente invención.

Se usaron dos grupos compuestos por seis ratones transgénicos que expresan la CETP para analizar el mismo péptido de vacuna usado en los Ejemplos 1 a 4 anteriores. Cada ratón del Grupo I recibió inyecciones primarias del péptido de vacuna disuelto en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y emulsionado con adyuvante de Freund completo (1:1) para producir una concentración final de 100 μg/100 μl. Se administró a cada ratón la mezcla de péptido de vacuna en una dosis de 50 μl (50 μg) en cada uno de los dos sitios subcutáneos. El Día 28 y de nuevo el Día 56, se administró a los animales de forma similar refuerzos del péptido de vacuna (100 μg) en PBS, salvo que el péptido de vacuna se emulsionó con adyuvante de Freund incompleto. Se extrajeron muestras de sangre en el Día 42 y en el Día 63. Los ratones de control del Grupo II recibieron inyecciones primarias y de refuerzo de PBS emulsionada con adyuvante, pero sin péptido de vacuna, de la misma forma que los ratones del Grupo I. Se prepararon muestras de plasma, como se describe anteriormente, para las muestras de plasma de conejos.

Todos los ratones del Grupo I tenían títulos significativos de anticuerpos anti-CETP como se mide en una amplia gama de diluciones de plasma (1:10 a 1:1.000.000) por medio de un ensayo ELISA directo, como se describe anteriormente (véase Figura 7). Además, tres de los seis ratones del Grupo I mostraron tener anticuerpos anti-CETP que competían con Mab TP2 para unirse con la CETP recombinante humana (como se descubrió en los conejos rb#2 y rb#3 en el Ejemplo 3, arriba).

Ejemplo 6

Inmunización de conejos contra CETP endógena en un modelo de alimentación con colesterol de aterosclerosis

Se inyectó el péptido de vacuna sintético (SEQ ID NO:2) del Ejemplo 1 de arriba en conejos blancos de Nueva Zelanda para analizar la capacidad del péptido de vacuna de provocar una respuesta inmune contra la CETP de conejo endógena y de proteger o reducir el desarrollo de aterosclerosis. El Grupo I estaba compuesto por seis conejos (rb#1 #6), cada uno de los cuales se sometió a un protocolo para administración del péptido de vacuna. El Grupo II de control estaba compuesto por seis conejos (rb#7-12) a los que se vacunó pero no se les administró una dieta alta en colesterol. El Grupo de control III estaba compuesto por seis conejos (rb#13-18) a los que no se vacunó ni se les administró una dieta alta en colesterol. El Grupo de control IV estaba compuesto por seis conejos (rb#19-24) a los que no se vacunó, pero si se les administró una dieta alta en colesterol. La dieta alta en colesterol se administró empezando cuatro semanas después de un refuerzo final con la vacuna y continuó durante un total de 17 semanas.

En la Tabla 1, a continuación, se muestra el protocolo general para analizar el péptido de vacuna en los conejos. En el Día 0, se suspendió el péptido (100 μg) en el sistema adyuvante RIBI™ (RIBI ImmunoChem Research, Inc. Hamilton, Montana), de acuerdo con las instrucciones del fabricante hasta un volumen final de 1.000 μl, y cada conejo del Grupo I y II fue inyectado en dos sitios intramusculares (250 μl por sitio), por vía subcutánea en dos sitios (100 μl por sitio), y seis sitios intradérmicos (50 μl por sitio). El Día 28, se administró un refuerzo (100 μg de péptido en sistema adyuvante RIBI™) como en el Día 0. El Día 49, se administró otro refuerzo (100 μg de péptido en sistema adyuvante RIBI™) como en el Día 0, El Día 77, se alimentó a los Grupos I y IV con el 0,25% (p/p) de dietas enri-

quecidas con colesterol (pienso para conejos suplementado con colesterol (Farmer's Exchange, Framingham, MA)). Se alimentó a los Grupos II y III con el mismo pienso de conejos, pero sin suplementar con colesterol (Farmer's Exchange, Framingham, MA).

Se extrajeron muestras (aproximadamente 1-5 ml) del oído de cada conejo antes de cada inyección inicial ("pre-sangrado") y de forma rutinaria en aproximadamente cada dos semanas a partir de entonces. Las muestras de plasma sanguíneo se prepararon a través de procedimientos de centrifugación convencionales para separar componentes celulares del plasma. Las muestras de plasma se almacenaron a -70ºC. Se analizaron muestras de plasma de todos los Grupos para la presencia de y aumento en el título de anticuerpos anti-CETP y para niveles totales de colesterol en plasma y HDL-C en plasma.

Tabla 1

PROGRAMA CONEJO

	Procedimiento, por grupo				PIENSO	PIENSO		
SEMANA	1	2	3	4	Grupo 2 y 3	Grupo 1 y 4	SEMANA /DIETA	DIA REAL
-2	B	B	B	B	Normal	Normal		-14
-1	B	B	B	B	Normal	Normal		-6
0	B,V	B,V	B	B	Normal	Normal		0
1					Normal	Normal		7
2	B	B	B	B	Normal	Normal		14
3					Normal	Normal		21
4	B,V	B,V	B	B	Normal	Normal		28
5					Normal	Normal		35
6					Normal	Normal		42
7	B,V	B,V	B	B	Normal	Normal		49
8					Normal	Normal		56
9					Normal	Normal		63
10	B	B	B	B	Normal	Normal		70
11					Transición	Transición	0	77
12					Control	0,25% col.	1	84
13	B	B	B	B	Control	0,25% col.	2	91
14					Control	0,25% col.	3	98
15	B	B	B	B	Control	0,25% col.	4	105
16					Control	0,25% col.	5	112
17	B	B	B	B	Control	0,25% col.	6	119
18					Control	0,25% col.	7	126
19	B	B	B	B	Control	0,25% col.	8	133
20					Control	0,25% col.	9	140
21	B	B	B	B	Control	0,25% col.	10	147
22					Control	0,25% col.	11	154
23	B	B	B	B	Control	0,25% col.	12	161
24					Control	0,25% col.	13	168
25	B	B	B	B	Control	0,25% col.	14	175
26					Control	0,25% col.	15	182
27					Control	0,25% col.	16	189
28	B,E			B,E	Control	0,25% col.	17	196

CLAVE:	
1 = vacunar, dieta alta en colesterol	B = muestra de sangre
2 = vacunar, dieta normal/control	V = vacunar
3 = control, dieta normal/control	E = eutanasia
4 = control, dieta alta en colesterol	

Ejemplo 7

Producción de anticuerpos anti-CETP en conejos vacunados en modelo aterosclerótico (hipercolesterolemia)

ELISA directo para titular anticuerpos anti-CETP humana recombinante

Se usó un ensayo (ELISA) inmunosorbente unido a encimas en sándwich para titular muestras de plasma que contienen anticuerpos anti CETP. En este establecimiento, se absorbió CETP humana recombinante (CETPr humana, obtenida de la línea celular CHO recombinante CHO(AT) aprobada por The Trustees of Columbia University, Nueva York, Nueva York) a pocillos de una placa de microtítulos, y se añadieron diversas diluciones de plasma de conejo de los conejos de los Grupos I y IV a cada pocillo. Se revistió cada pocillo de una placa de 96 pocillos NUNC Maxisorb por exposición de toda la noche a 4ºC a 100 μl de 1 solución de 1 μg/ml de CETPr humana en PBS. Se bloqueó la unión no específica añadiendo una solución del 1% de BSA en PBS y el 0,05% de Tween a cada pocillo e incubando durante dos horas a temperatura ambiente (20º-22ºC) en un baño de agitación a 150 rpm. Después se lavaron los pocillos cuatro veces con tampón de lavado ELISA (PBS + 0,05% Tween). Después se diluyeron muestras de plasma 1:10 en tampón de dilución (1% BSA en PBS), seguido de 6 diluciones seriadas dobles en el mismo tampón. Se añadieron muestras diluidas (100 μl) a los pocillos, se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en un baño de agitación a 150 rpm, y después se lavaron 4 veces con tampón de lavado ELISA (PBS + 0,05% Tween). Para detectar anticuerpos anti-CETP unidos, se añadió 100 μl de una dilución de 1: 10.000 de inmunoglobina de cabra anti-conejo etiquetada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Southern Biotechnologiy Associates, Inc.; Birmingham, Alabama) en tampón de dilución, y se incubaron las placas durante 2 horas a temperatura ambiente en un baño de agitación a 150 rpm. Después se lavaron los pocillos 4 veces con tampón de lavado ELISA (véase arriba), se añadió sustrato de peroxidasa TMB (sustrato de peroxidasa TMB, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. Gaithersburg, Maryland), y se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se controló el cambio en densidad óptica a 450 nm por medio de espectrofotometría usando un lector ELISA (por ejemplo, E-max, Molecular Device Corp., Menlo Park, California). En este ensayo, la D.O. era directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-CETP presentes en las muestras de plasma. Los resultados indicaron que cinco de los doce conejos vacunados (Grupos I y II) produjeron anticuerpos anti-CETP que eran específicos para la CETP humana recombinante (véase Figura 9). No se produjo ningún anticuerpo anti-CETP humana recombinante en los Grupos de control III y IV no tratados.

ELISA directo para titular anticuerpos de la CETP anti-conejo autorreactiva (endógena) recombinante

Se sintetizó un péptido (péptido de conejo) compuesto por una secuencia de aminoácidos de la CETP de conejo endógena para usar en orden procedimientos de síntesis de péptidos convencionales de Quality Controlled Biochemicals, Inc. (Hopkinton, Massachusetts) con la secuencia de SEQ ID NO:7: LQMDFGFPKHLLVDFLQSLS, que corresponde a los aminoácidos 457 a 476 de la región carboxilo terminal de la secuencia de la CETP humana mostrada en SEQ ID NO:4. Esta parte de la secuencia de aminoácidos de la CETP de conejo se diferencia de la secuencia de la CETP humana en que el residuo de ácido glutámico en la posición 465 de la secuencia humana (SEQ ID NO:4) se sustituye con un residuo de lisina (véase aminoácido 9 en SEQ ID NO:7). A efectos de este ensayo, se compró el péptido de conejo en forma de un derivado biotinilado (biotina unida por covalencia al residuo de leucina amino terminal).

Se prepararon placas prebloqueadas de microtítulos revestidas con estreptavidina de la siguiente forma. Se preparó 100 μl de 5 μg/ml de estreptavidina (catálogo #43-4302, Zymed Laboratories, Inc., S. San Francisco, CA) en PBS en cada pocillo de las microplacas de 96 pocillos con bandas desechables (catálogo #950-2950-00P, LabSystems, Needham, MA), sellados e incubados a temperatura ambiente toda una noche. Después de la aspiración del contenido de cada pocillo, se lavaron las placas y luego se bloquearon con 300 μl de PBS compuesto por el 1% de BSA, el 5% de sacarosa, el 0,05% de Tween 20 y el 0,1% de sulfato de gentamicina, toda una noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se vaciaron los pocillos y se dejaron secar toda una noche antes de almacenarlos, sellarlos con desecador, a 4ºC, hasta su uso. Después se añadió péptido de conejo a cada pocillo (100 μl de una solución de 1 μg/ml) en PBS (GIBCO BRL) suplementada con el 10% (p/v) de albúmina de suero bovino (BSA)) y se incubó durante 1 hora con agitación a 150 rpm a temperatura ambiente (22ºC). Se lavaron las placas tres veces con tampón de lavado (PBS suplementado con el 0,05% de Tween-20) para eliminar el péptido no unido. Se diluyeron muestras de plasma de conejo (inicialmente 1:40, después la mitad en serie sucesivamente) en PBS suplementado con el 5% de BSA y el 1% de gelatina y se incubaron 100 μl de cada dilución durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación a 150 rpm. Después se lavaron las placas tres veces con tampón de lavado. Se diluyó lgG de cabra anti-conejo etiquetada con peroxidasa de rábano picante (Southern Biotechnologiy Associates, Inc.; Birmingham, Alabama, AL) 1:50.000 en tampón de lavado y se añadieron 100 μl a cada pocillo, que se incubaron después durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación a 150 rpm. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado y después se incubaron

con sustrato de peroxidasa TMB (sustrato de peroxidasa TMB, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. Gaithersburg, Maryland), y se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se controló el cambio en densidad óptica a 450 nm por medio de espectrofotometría, usando un lector ELISA (por ejemplo, E-max, Molecular Device Corp., Menlo Park, California). En este ensayo, la D.O. era directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos de la CETP anti-conejo presentes en las muestras de plasma.

Los resultados indicaron que tres semanas después del refuerzo final (y antes de administrar la dieta suplementada con colesterol a los Grupos I y IV) seis de los doce animales vacunados (tres de cada uno de los Grupos I y II) produjeron anticuerpos que reaccionaron con el péptido derivado de la secuencia de la CETP de conejo endógena (véase Figuras 10A y 10B).

La información mostró que el péptido de vacuna era capaz de provocar anticuerpos autorreactivos a la CETP endógena de conejo. Esto indica que la combinación de epitope de célula T de toxoide de tétanos y el epitope de célula B de la región carboxilo terminal de la CETP es capaz de romper la tolerancia a una proteína propia específica, esto es, en este caso, CETP endógena de conejo.

Ejemplo 9

Niveles de colesterol y HDL en muestras de plasma de conejos vacunados en modelo aterosclerótico

También se analizaron muestras de plasma tomadas de conejos de los Grupos del Ejemplo 6 en diversos tiempos (días) en el protocolo de vacunación para la concentración total de colesterol (Figura 11) y HDL-C (Figura 12). Se determinaron los niveles totales de colesterol y HDL-C en plasma usando ensayos convencionales comerciales (Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, Virginia).

Las muestras de plasma de los Grupos I (vacunado) y IV (no vacunado) mostraron un aumento en colesterol total (hipercolesterolemia) debido a la administración de la dieta suplementada con colesterol (Figura 11). Los Grupos II (vacunado) y III (no vacunado) no manifestaron hipercolesterolemia inducida por la dieta (Figura 11).

De forma similar, Los Grupos I y IV alimentados con la dieta suplementada con colesterol mostraron un aumento en HDL-C (Figura 12). Los análisis preliminares de la información para el Grupo II indicaron que los tres animales con los títulos de anticuerpos anti-CETP más elevados también mostraron un aumento en sus niveles de HDL-C en comparación con niveles de prevacunación. Los análisis preliminares también indicaron que en los tres de los cinco animales del Grupo III, no se observó ningún cambio en los niveles de HDL-C en comparación con los niveles de prevacunación.

Ejemplo 10

Medida de lesiones ateroscleróticas de la aorta en conejos en un modelo de aterosclerosis de alimentación con colesterol

Se extrajeron las aortas de todos los conejos supervivientes (cuatro de los Grupos I y IV, cinco del Grupo II, seis del Grupo III) después de 17 semanas (Día 196 desde la vacunación primaria) de dieta suplementada con colesterol en los Grupos I y IV) y dieta de control (no suplementada con colesterol) en los Grupos II y III. Se mostró que la muerte de conejos no supervivientes por necropsia se debió a bolas de pelo y no, por tanto, a al diseño experimental. Se abrió cada aorta para una visión frontal con el fin de examinar lesiones ateroscleróticas. Se tiñó la toda la longitud de la aorta, esto es, desde el arco de la aorta en el corazón hasta la bifurcación en el abdomen inferior, con Aceite Rojo O para detectar lesiones. Se midieron las lesiones y se cuantificó la información usando un programa informático (The Morphometer, Woods Hole Educational Associated, Woods Hole, MA).

Los resultados en la Figura 13 de este análisis demostraron una reducción estadísticamente importante en el tamaño de las lesiones en los animales del Grupo I (vacunado, dieta suplementada con colesterol) en comparación con el tamaño de las lesiones en animales del Grupo IV (no vacunados, dieta suplementada con colesterol). Los resultados mostraron que la vacuna del péptido era capaz de reducir la zona de lesiones ateroscleróticas en animales alimentados con dietas suplementadas con colesterol (hipercolesterolemia) en más del 50%. Los animales no vacunados (Grupo IV) tuvieron lesiones que abarcaban una media del 45% de la zona total de la aorta, mientras que los animales vacunados (Grupo I) tuvieron lesiones que abarcaban una media del 19% de la zona total de la aorta.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido antigénico aislado que comprende una parte de epitope de célula T auxiliar unida a una parte de epitope de célula B, en el que dicha parte de epitope de célula T auxiliar comprende un epitope de célula T auxiliar de gama amplia y dicha parte de epitope de célula B comprende un epitope de célula B de proteína transportadora de ésteres de colesterilo (CETP) y en el que dicho péptido antigénico provoca, en un sujeto mamífero, la producción de autoanticuerpos que se unen a la CETP endógena del sujeto al que se administra dicho péptido, y en el que dichos anticuerpos modulan la actividad de transporte de la CETP endógena del sujeto al que se administra dicho péptido.

2. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la CETP es CETP humana.

3. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha parte de epitope de célula B comprende una parte de CETP humana, compuesta por al menos 6 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO:4 y que se reconocen por células B o anticuerpos.

4. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho epitope de célula B de CETP se selecciona a partir del grupo compuesto por la secuencia de aminoácidos definida por los aminoácidos 349 a 367 de SEQ ID NO:4, aminoácidos 461 a 476 de SEQ ID NO:4; secuencias de aminoácidos identificadas por algoritmos que identifican epitopes antigénicos, una región implicada en la unión de lípidos neutros, o una región implicada en la actividad de transporte de lípidos neutros.

5. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha parte de epitope de célula B es un péptido compuesto por entre seis y 26 aminoácidos consecutivos de los 26 aminoácidos carboxilos terminales de CETP humana (SEQ ID NO:1).

6. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 ó reivindicación 2, en el que dicha parte de epitope de célula B es un derivado de la región de los 26 aminoácidos carboxilos terminales de CETP que tiene deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos que no modifican o destruyen de forma significativa la unión de lípidos neutros o actividad de transporte de lípidos neutros de dicha CETP.

7. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha parte de epitope de célula T auxiliar comprende un epitope de célula T auxiliar derivado de un péptido antigénico seleccionado del grupo compuesto por toxoide de tétanos, toxoide de difteria, vacuna contra la tos ferina, Bacilo de Calmette-Guerin (BCG), vacuna contra la polio, vacuna contra el sarampión, vacuna contra la parotiditis infecciosa, vacuna contra la rubéola, derivado proteico purificado de tuberculina, hemocianina de lapa de bocallave, hsp70, y combinaciones de los mismos.

8. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha parte de epitope de célula T auxiliar comprende la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 830 a 843 de proteína de toxina de tétanos (aminoácidos 2 a 15 de SEQ ID NO:2), la secuencia de los aminoácidos 947 a 967 de proteína de toxina de tétanos (SEQ ID NO:3), y combinaciones de las mismas.

9. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que tiene un residuo de cisteína amino terminal.

10. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha parte de epitope de célula B se une a dicha parte de epitope de célula T auxiliar.

11. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha parte de epitope de célula B se une por covalencia a dicha parte de epitope de célula T auxiliar.

12. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicha parte de epitope de célula B se une por covalencia a dicha parte de epitope de célula T auxiliar a través de un enlace péptidico o un enlace de disulfuro.

13. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha parte de epitope de célula B se une a dicha parte de epitope de célula T auxiliar a través de una molécula de entrecruzamiento.

14. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha parte de epitope de célula B se une a dicha parte de epitope de célula T auxiliar a través de un puente de aminoácidos.

15. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

16. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha parte de epitope de célula B y dicha parte de epitope de célula T auxiliar están unidas a una molécula vehículo común.

17. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, unido por covalencia a copias múltiples de la proteína C3d del complemento.

18. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, derivatizado con estructuras de hidratos de carbono que se vuelve unido por covalencia *in vivo* con la proteína C3d del complemento.

19. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende más de una parte de epitope de célula T auxiliar y/o más de una parte de epitope de célula B.

20. Una vacuna que comprende un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable y uno o más péptidos seleccionados de los péptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.

21. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para usar en forma de medicamento.

22. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 20, para usar en la provocación de anticuerpos anti-CETP en un humano o animal.

23. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 20, para usar en la elevación de la relación de HDL circulante a LDL circulante, VLDL, o colesterol total en un humano u otro animal.

24. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 20, para usar en la disminución del nivel de actividad de CETP endógena en un humano u otro animal.

25. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 20, para usar en la modificación del catabolismo de HDL-colesterol para disminuir el desarrollo de lesiones ateroscleróticas en un humano u otro animal.

26. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 20, para usar en el tratamiento o prevención de aterosclerosis en un humano u otro animal.

27. Un procedimiento para preparar una vacuna anti-CETP para modular la actividad de la CETP endógena o para tratar o prevenir la aterosclerosis, comprendiendo:

Selección de una parte de epitope de célula B de CETP, en la que dicho epitope de célula B no incluye un epitope de célula T de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad;

Selección de una parte de epitope de célula T auxiliar derivado de un péptido antigénico que no se deriva de la CETP; y uniéndose dicha parte de epitope de célula B de la CETP y dicha parte de epitope de célula T auxiliar para formar un resto antigénico, en el que dicho resto antigénico provoca, en un sujeto mamífero, la producción de autoanticuerpos que unen la CETP endógena del sujeto al que se administra dicha vacuna, y en el que dichos autoanticuerpos modulan la actividad de la CETP endógena del sujeto al que se administra dicho péptido.

28. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 27, en el que dicha parte de epitope de célula B de la CETP es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 y dicha parte de epitope de célula T auxiliar es como se define en la reivindicación 7 ó reivindicación 8.

29. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 27 ó reivindicación 28, en el que dicha parte de epitope de célula B se une como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16 a dicha parte de epitope de célula T auxiliar.

30. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 27 ó 28, en el que dicha parte de epitope de célula B se une a dicha parte de epitope de célula T auxiliar para formar un péptido de vacuna y comprendiendo además la etapa de unión de dicho péptido de vacuna a una molécula vehículo común.

31. Uso de un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 20, para la elaboración de un medicamento para usar en la provocación de anticuerpos anti-CETP endógena en un humano o animal.

32. Uso de un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 20, para la elaboración de un medicamento para usar en el tratamiento o prevención de aterosclerosis.

33. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 20, para usar en forma de medicamento.

34. Un péptido o vacuna de acuerdo con la reivindicación 33 para usar en el tratamiento o prevención de aterosclerosis.

35. Uso de un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 20, para la elaboración de un medicamento para elevar la relación de HDL circulante a LDL circulante, VLDL, o colesterol total en un humano u otro animal.

36. Uso de un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 20, para la elaboración de un medicamento para disminuir el nivel de actividad de CETP endógena en un humano u otro animal.

37. Uso de un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 20, para la elaboración de un medicamento para aumentar el nivel de HDL circulante en un humano o animal.

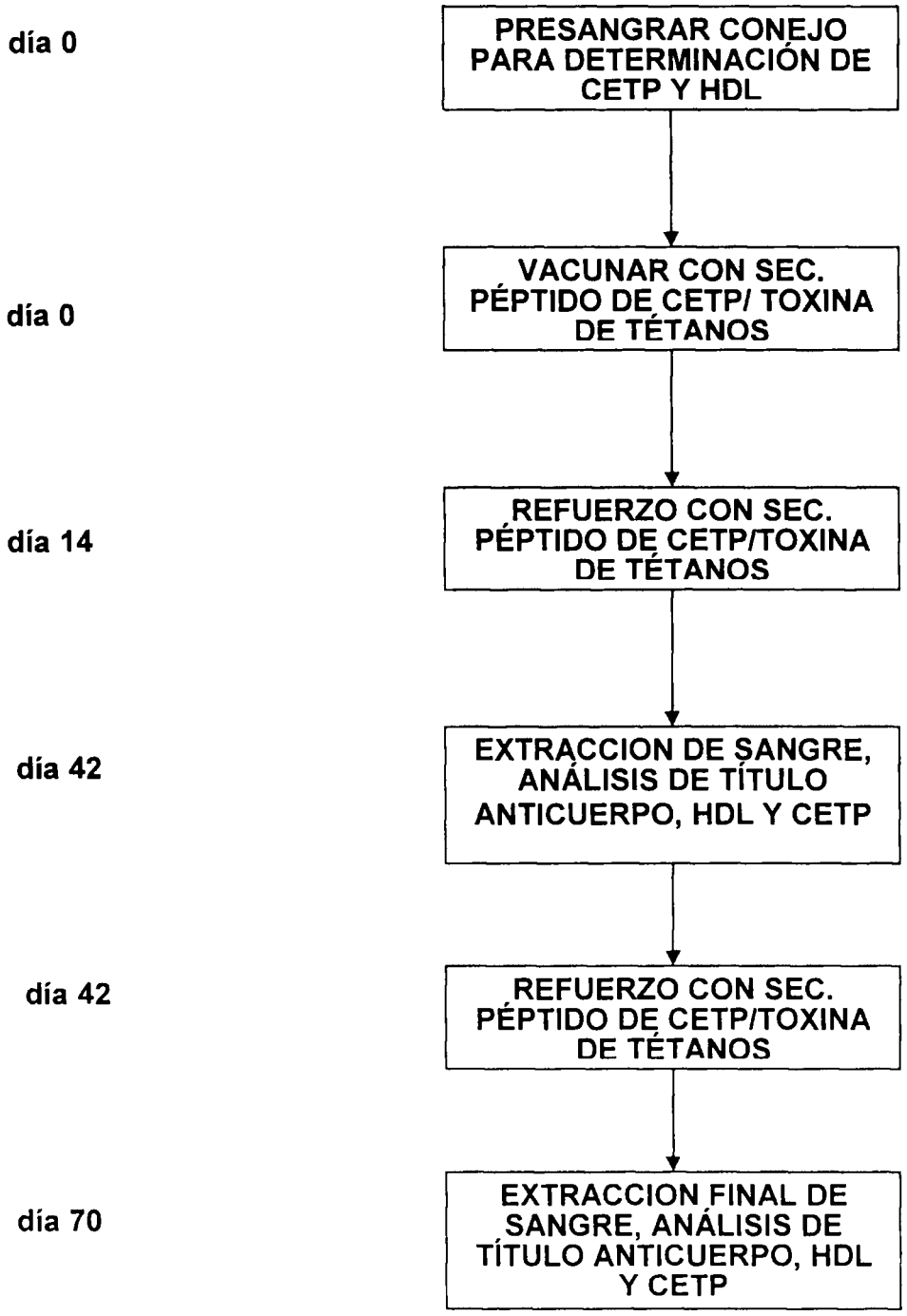

día 0
PRESANGRAR CONEJO PARA DETERMINACIÓN DE CETP Y HDL
día 0
VACUNAR CON SEC. PÉPTIDO DE CETP/ TOXINA DE TÉTANOS
día 14
REFUERZO CON SEC. PÉPTIDO DE CETP/TOXINA DE TÉTANOS
día 42
EXTRACCION DE SANGRE, ANÁLISIS DE TÍTULO ANTICUERPO, HDL Y CETP
día 42
REFUERZO CON SEC. PÉPTIDO DE CETP/TOXINA DE TÉTANOS
día 70
EXTRACCION FINAL DE SANGRE, ANÁLISIS DE TÍTULO ANTICUERPO, HDL Y CETP

Fig. 1

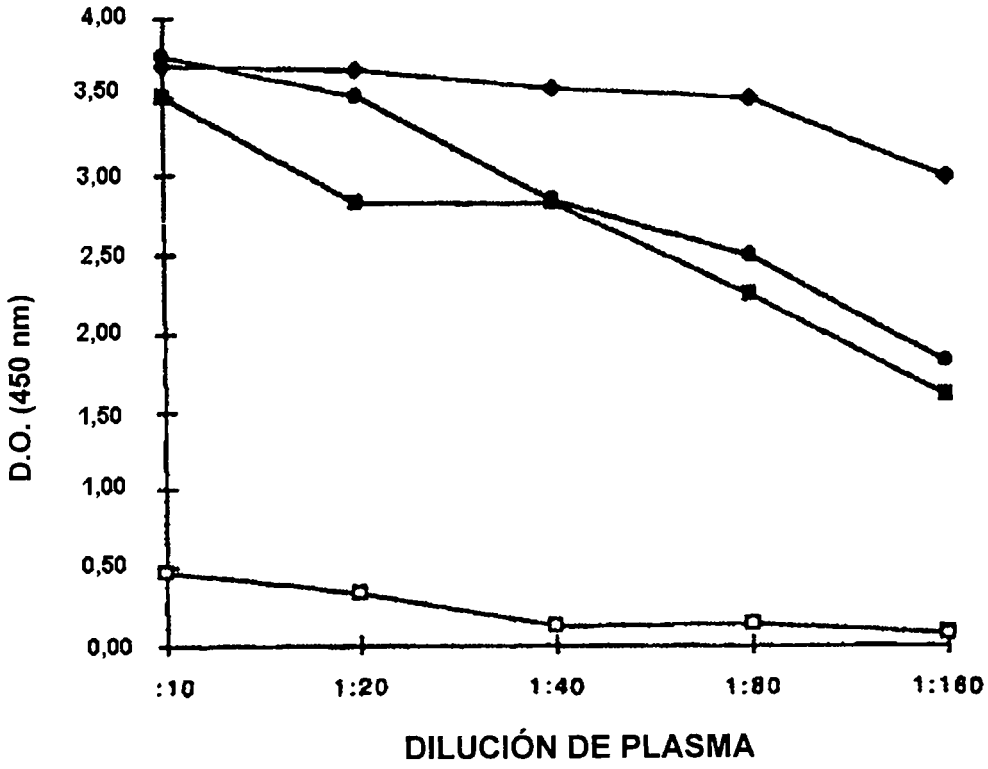

4,00
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
D.O. (450 nm)
:10
1:20
1:40
1:80
1:160
DILUCIÓN DE PLASMA

Fig. 2

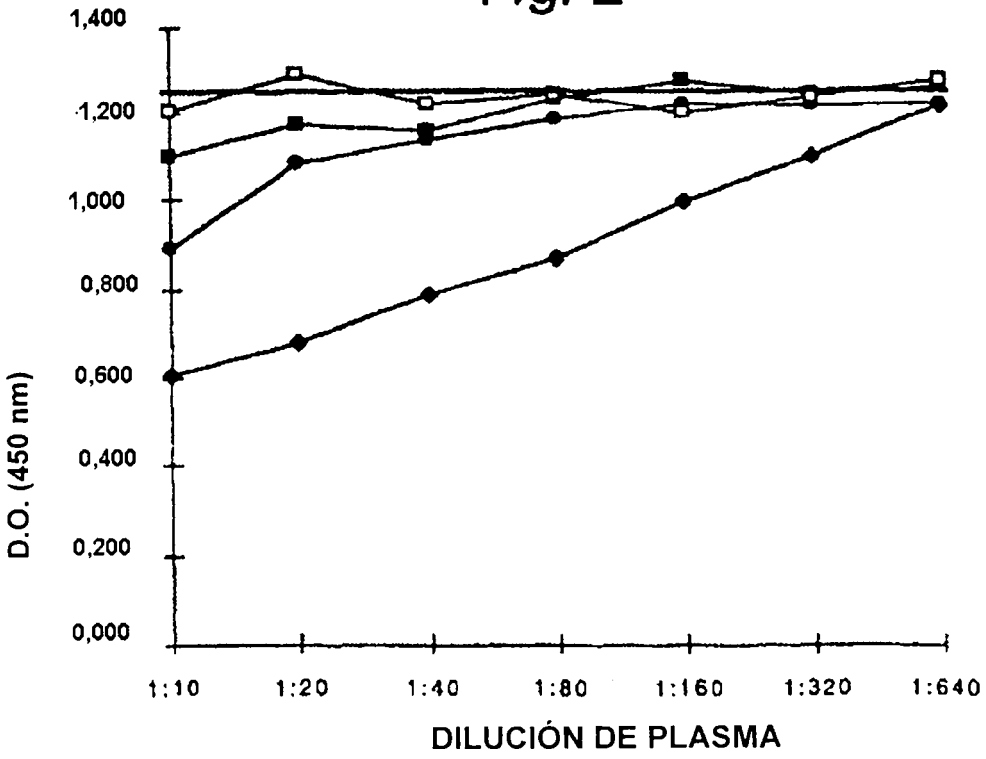

1,400
1,200
1,000
0,800
0,600
0,400
0,200
0,000
D.O. (450 nm)
1:10
1:20
1:40
1:80
1:160
1:320
1:640
DILUCIÓN DE PLASMA

Fig. 3

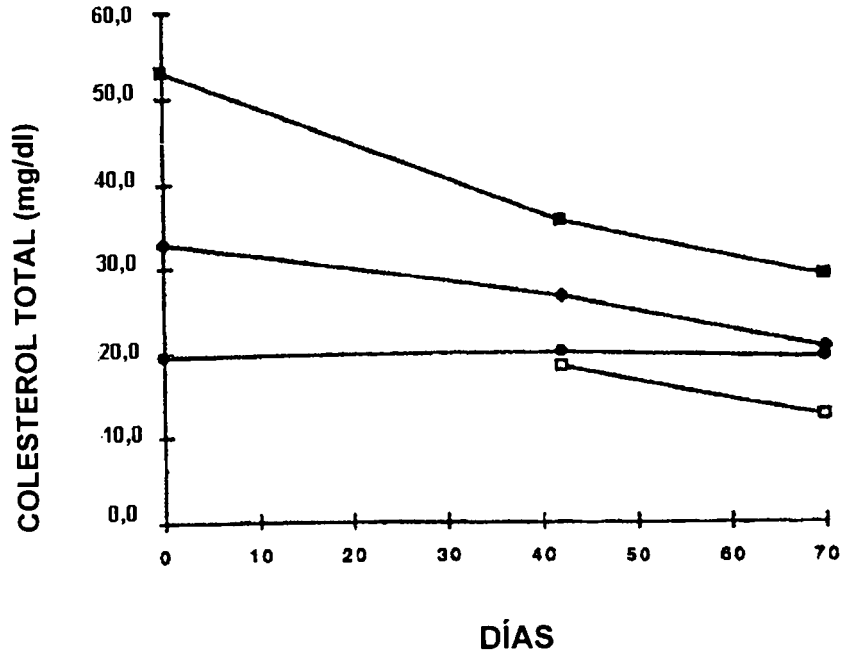

COLESTEROL TOTAL (mg/dl)
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
0
10
20
30
40
50
60
70
DÍAS

Fig. 4

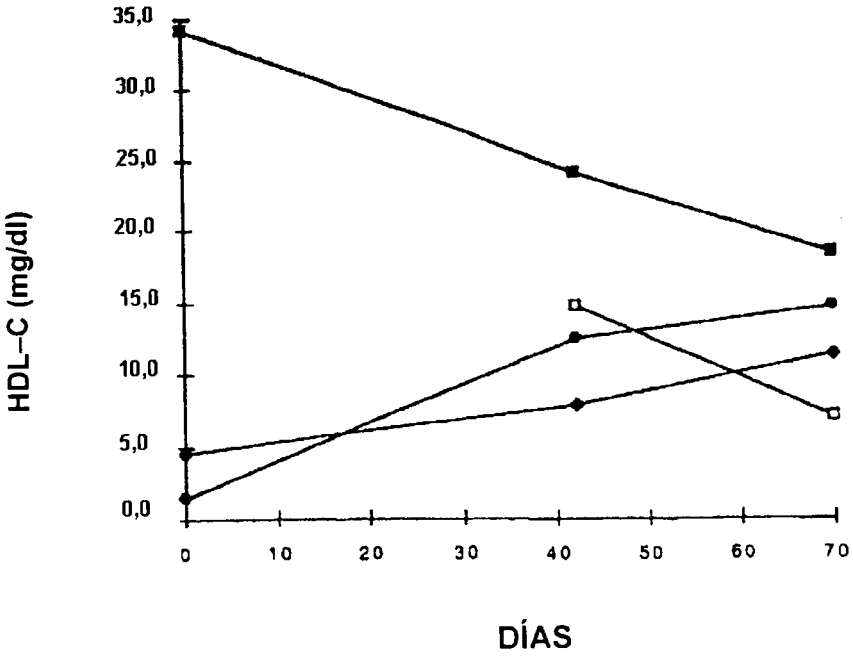

HDL–C (mg/dl)
35,0
30,0
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
0
10
20
30
40
50
60
70
DÍAS

Fig. 5

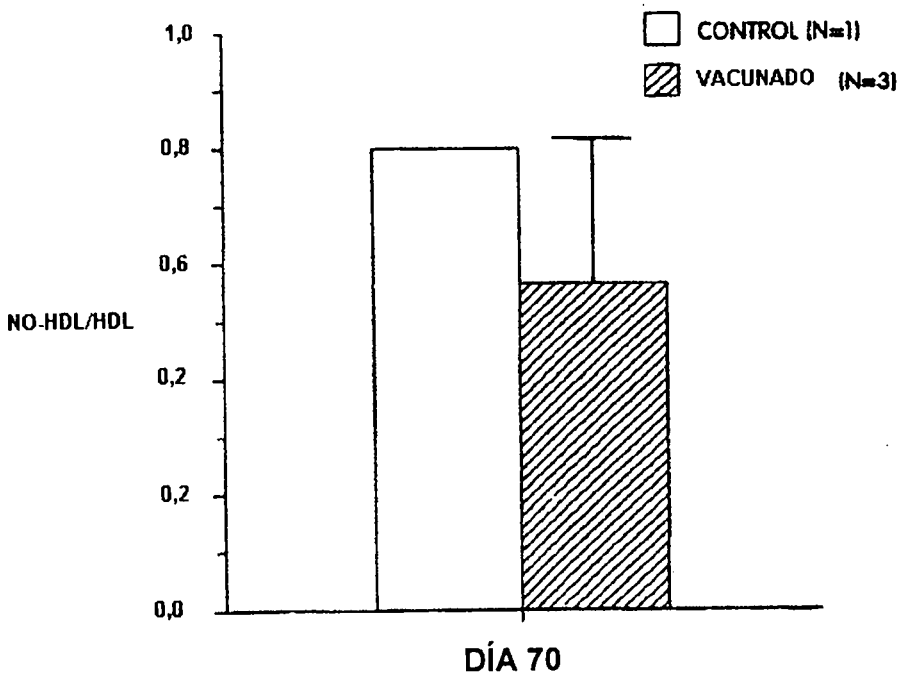


Fig. 6

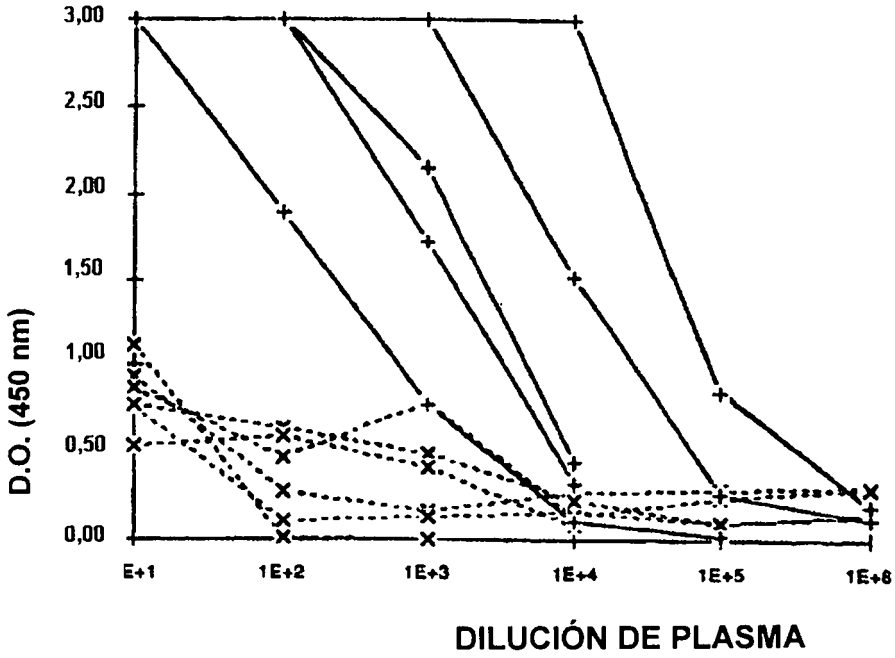

3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
D.O. (450 nm)
E+1
1E+2
1E+3
1E+4
1E+5
1E+6
DILUCIÓN DE PLASMA

Fig. 7

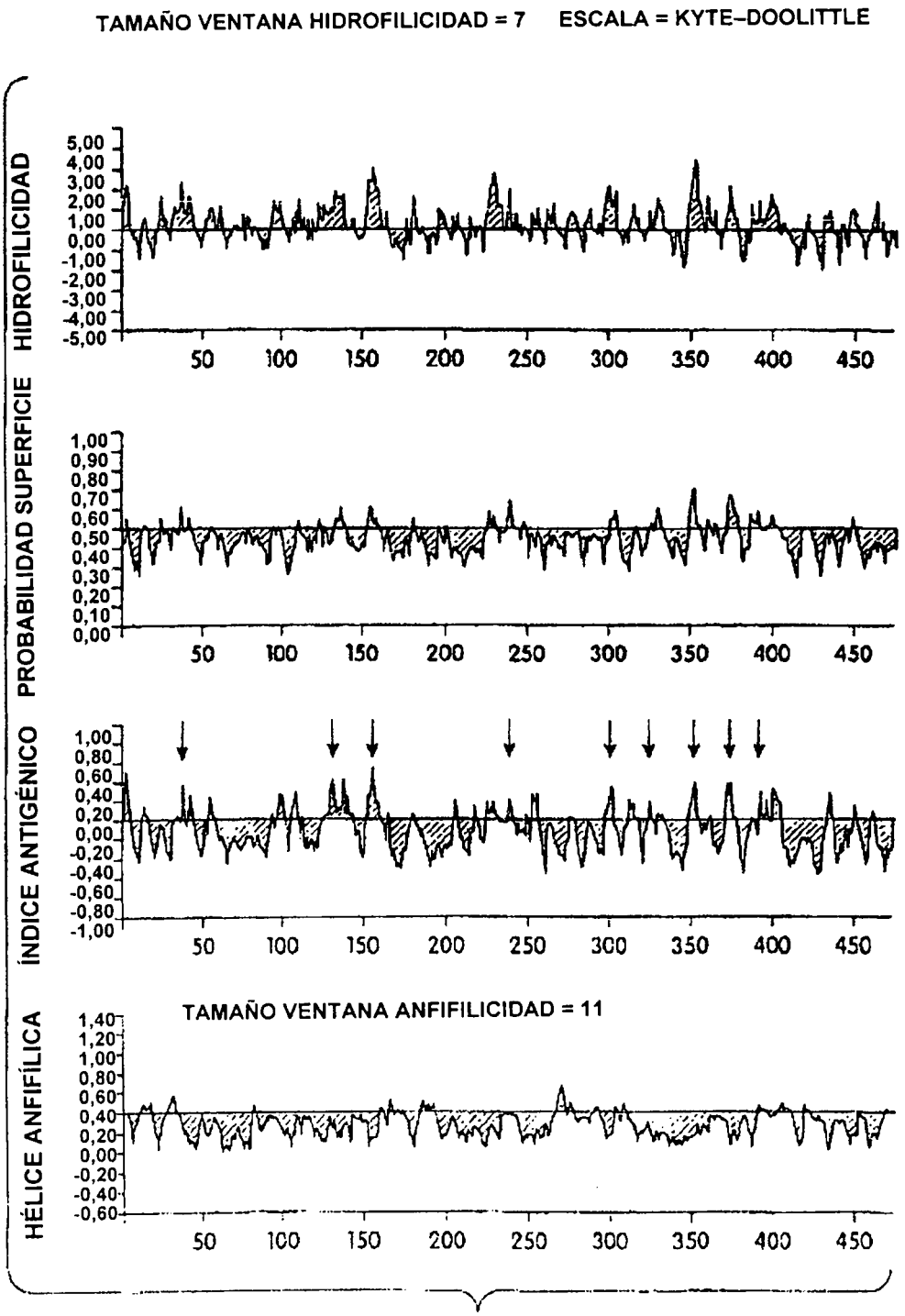

TAMAÑO VENTANA HIDROFILICIDAD = 7
ESCALA = KYTE–DOOLITTLE
HIDROFILICIDAD
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
-1,00
-2,00
-3,00
-4,00
-5,00
50
100
150
200
250
300
350
400
450
PROBABILIDAD SUPERFICIE
1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
ÍNDICE ANTIGÉNICO
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
-0,20
-0,40
-0,60
-0,80
-1,00
TAMAÑO VENTANA ANFIFILICIDAD = 11
HÉLICE ANFIFÍLICA
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
-0,20
-0,40
-0,60

Fig. 8A

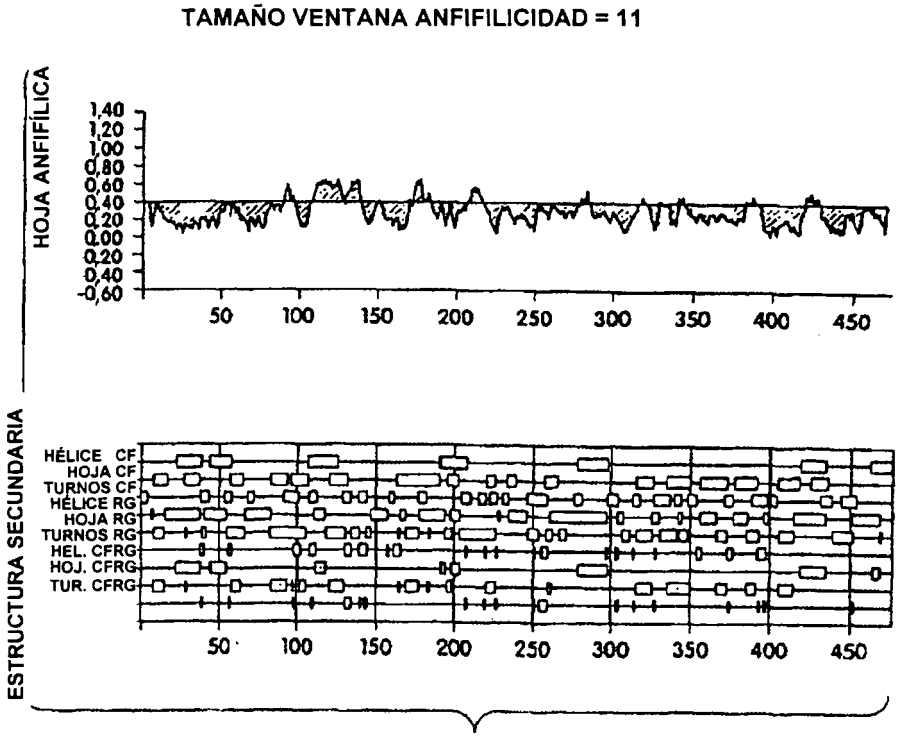
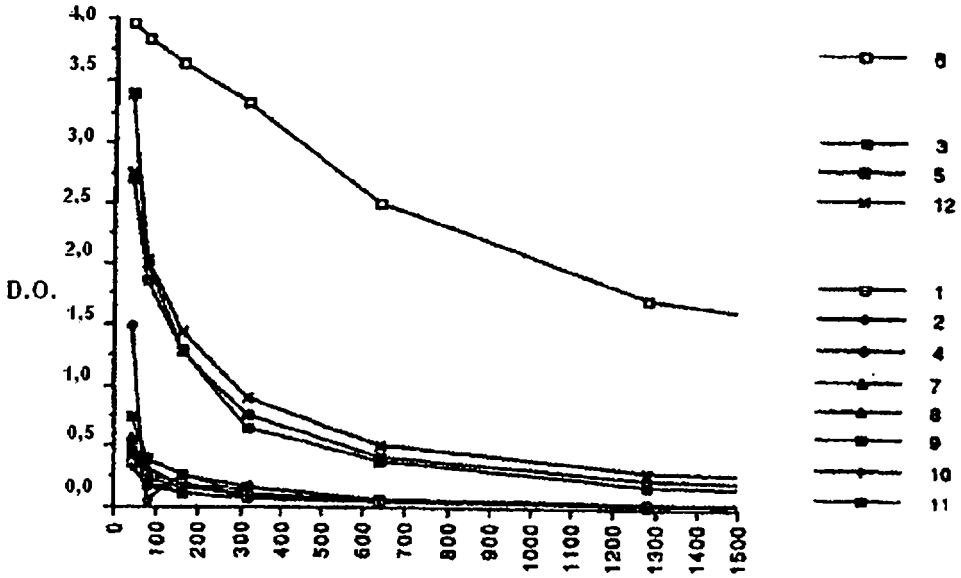

TAMAÑO VENTANA ANFIFILICIDAD = 11
HOJA ANFIFÍLICA
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
0,20
0,40
-0,60
50
100
150
200
250
300
350
400
450
ESTRUCTURA SECUNDARIA
HÉLICE CF
HOJA CF
TURNOS CF
HÉLICE RG
HOJA RG
TURNOS RG
HEL. CFRG
HOJ. CFRG
TUR. CFRG
50
100
150
200
250
300
350
400
450

Fig. 8B



DILUCIÓN DE PLASMA

Fig. 9

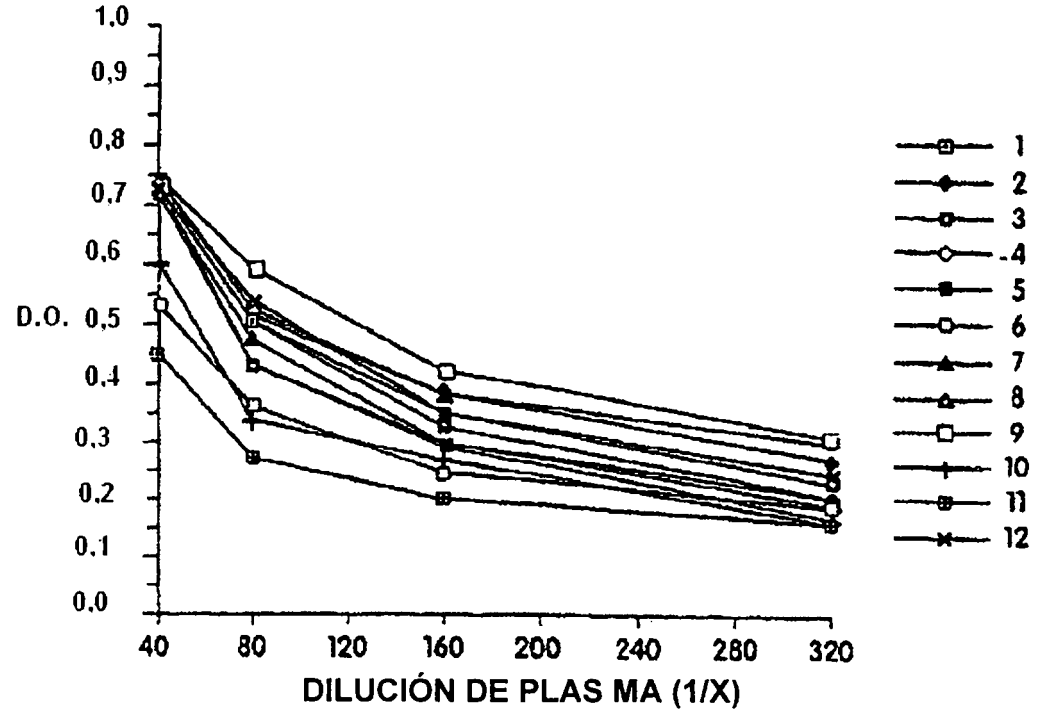


Fig. 10A

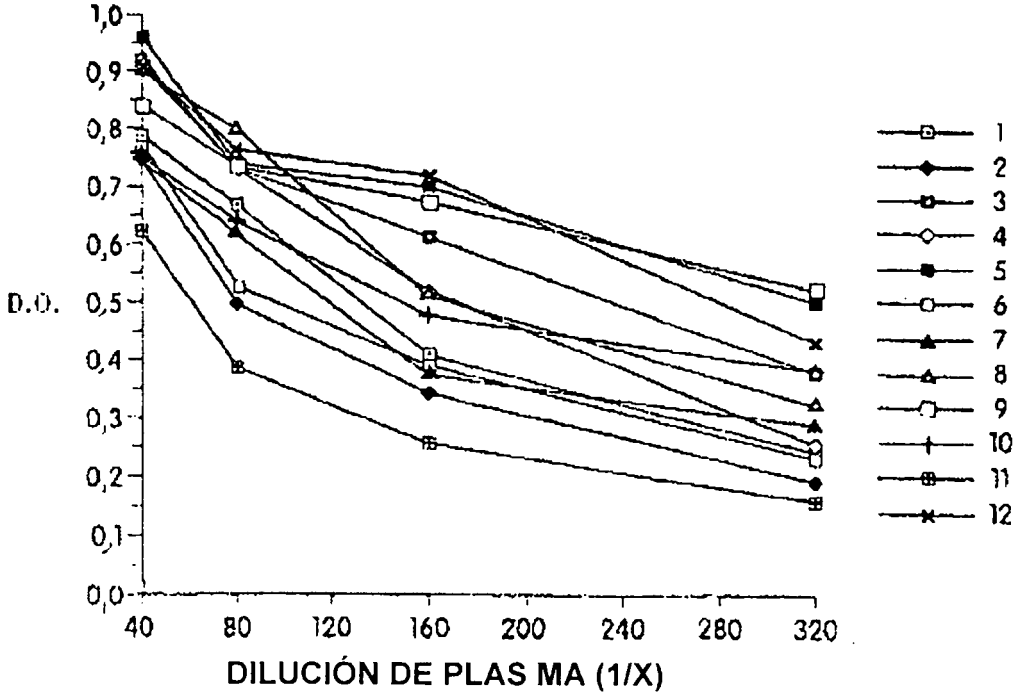


Fig. 10B

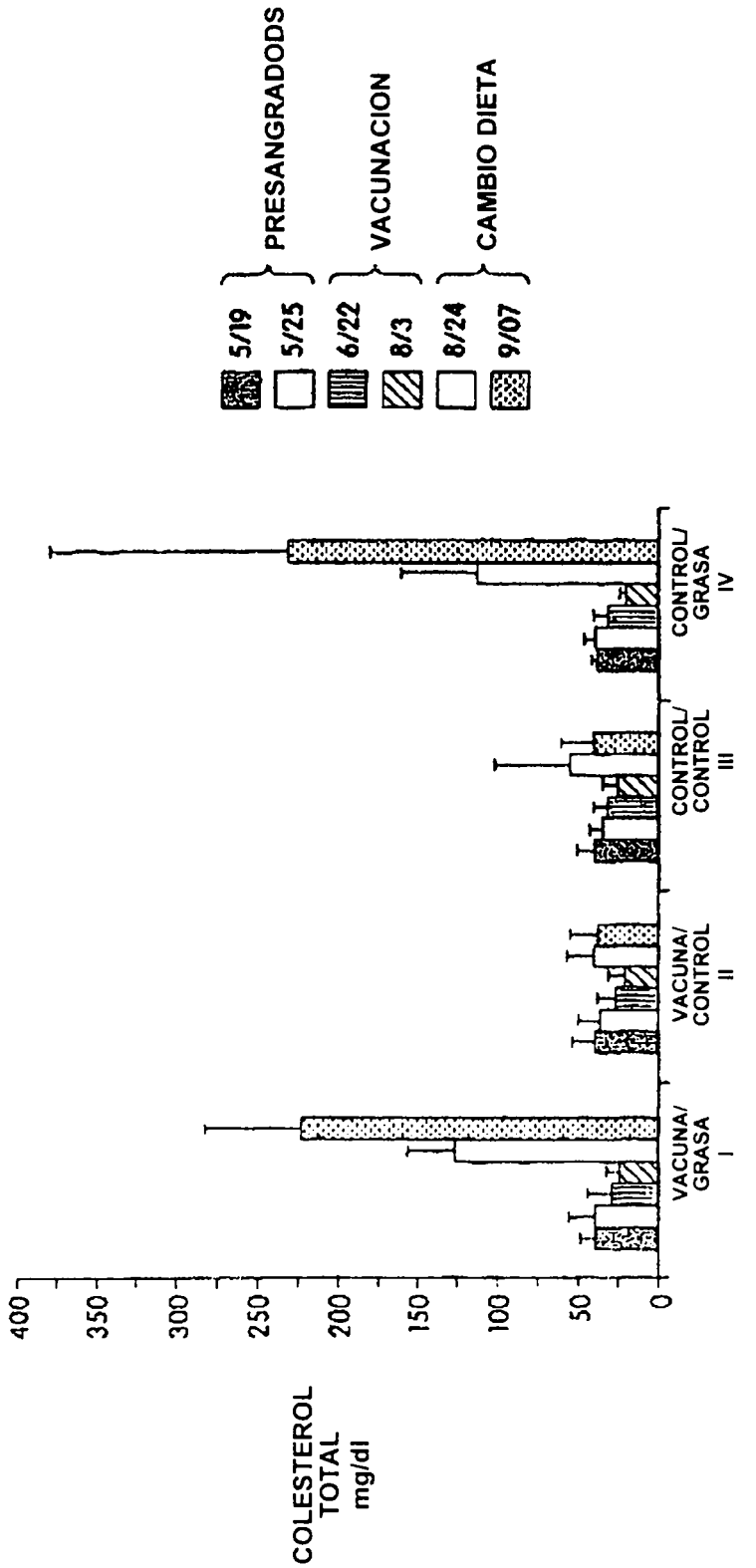

PRESANGRADODS
5/19
5/25
VACUNACION
6/22
8/3
CAMBIO DIETA
8/24
9/07
COLESTEROL TOTAL mg/dl
400
350
300
250
200
150
100
50
0
VACUNA/ GRASA I
VACUNA/ CONTROL II
CONTROL/ CONTROL III
CONTROL/ GRASA IV
GRUPO

Fig. 11

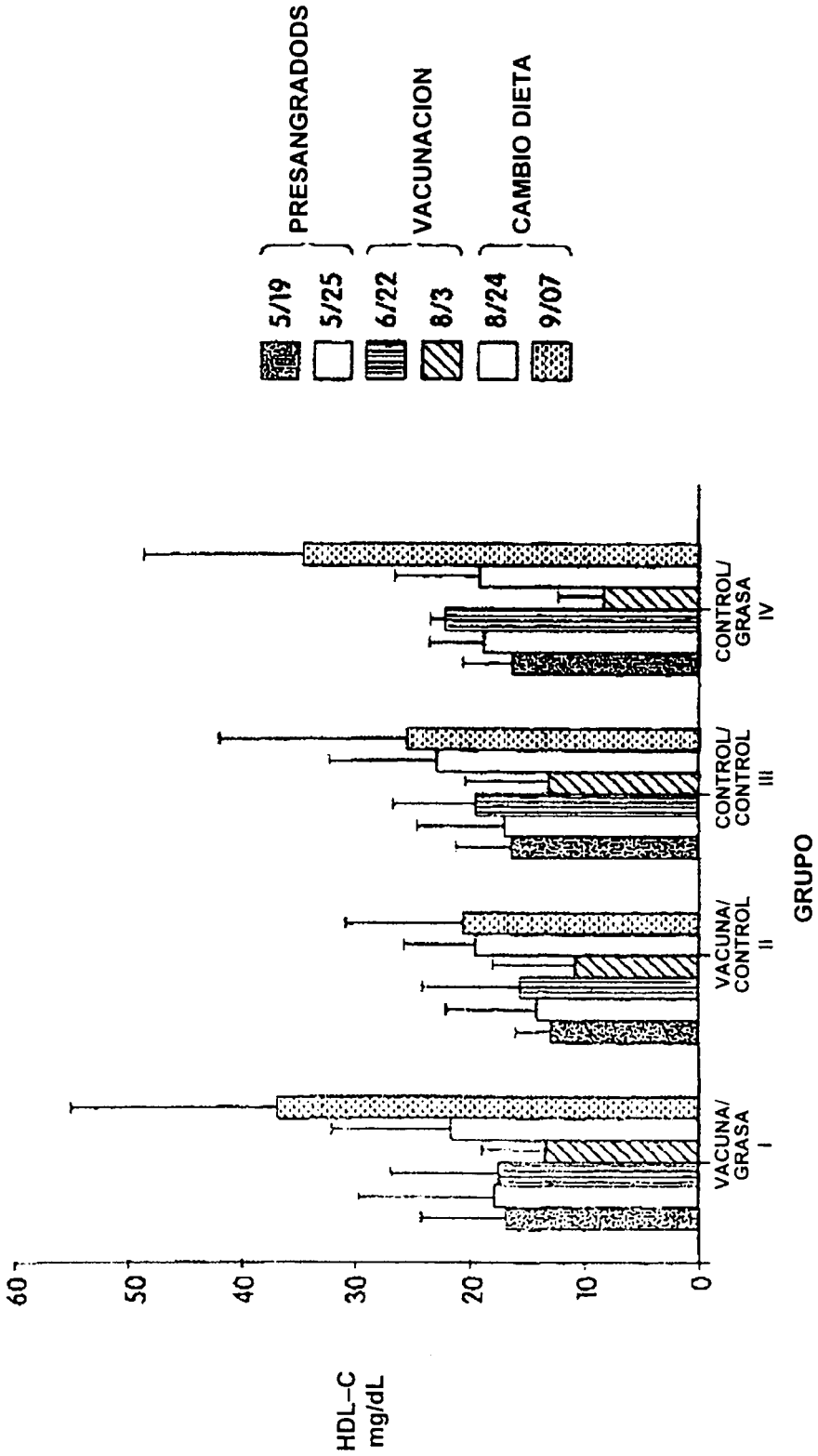

PRESANGRADODS
5/19
5/25
VACUNACION
6/22
8/3
CAMBIO DIETA
8/24
9/07
HDL-C mg/dL
60
50
40
30
20
10
0
VACUNA/ GRASA I
VACUNA/ CONTROL II
CONTROL/ CONTROL III
CONTROL/ GRASA IV
GRUPO

Fig. 12

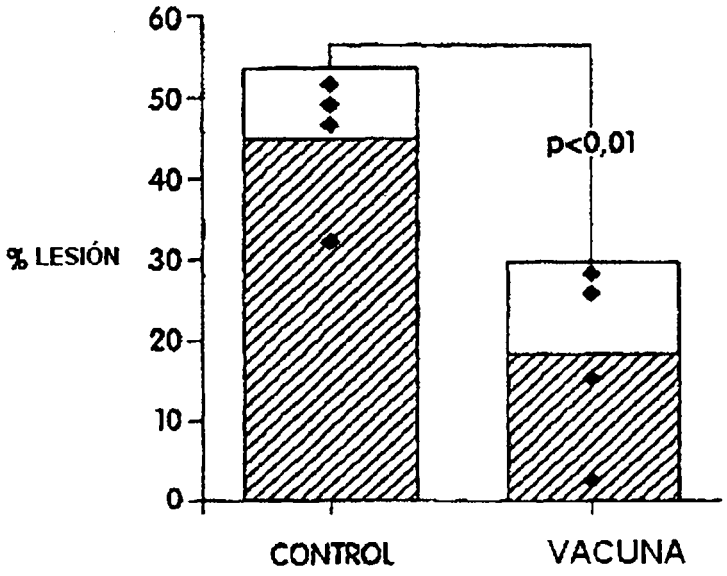


Fig. 13

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: Rittershaus, Charles, W. Thomas, Lawrence J.

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE ÉSTERES DE COLESTERILO (CETP).

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 9

(iv) DIRECCIÓN CORRESPONDENCIA:

A. DESTINATARIO: Banner & Allegretti, Ltd.
B. CALLE: 75 State Street
C. CIUDAD: Boston
D. ESTADO: Massachusetts
E. PAÍS: EE. UU.
F. C.P.: 02109

(v) FORMA DE LECTURA POR ORDENADOR:

A. TIPO DE MEDIO: Disco flexible
B. ORDENADOR: PC compatible con IBM
C. SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
D. SOFTWARE: WordPerfect 6.1

(vi) INFORMACIÓN SOLICITUD ACTUAL:

A. NÚMERO SOLICITUD: (no asignado todavía)
B. FECHA DE PRESENTACIÓN: 1 de mayo de 1996
C. CLASIFICACIÓN:

(vii) INFORMACIÓN SOLICITUD ANTERIOR:

A. SOLICITUD: 08/432.483
B. FECHA DE PRESENTACIÓN: 1 de mayo de 1995

(viii) INFORMACIÓN ABOGADO / AGENTE:

A. NOMBRE: Leon R. Yankwich
B. NÚMERO DE REGISTRO: 30.237
C. NÚMERO DE REFERENCIA / EXPEDIENTE: 95.179-B (TCS-204-PCT)

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 1

(i) CARACTERÍSTICAS SECUENCIA:

A. LONGITUD: 26 aminoácidos
B. TIPO: aminoácido
C. TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTISENTIDO:

(ix) RASGO:

A. NOMBRE: 26 aminoácidos carboxilos terminales de la CETP humana
B. LOCALIZACIÓN:

(x) INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:

(A) AUTORES: Drayna, Dennis, y col.

(B) TÍTULO: Clonación y secuenciación de ADNc de transporte de ésteres de colesterol humano

(C) REVISTA: *Nature*

(D) VOLUMEN: 327

(E) EMISIÓN:

(F) PÁGINAS: 632-634

(G) FECHA: 18-JUN-1987

(K) RESIDUOS RELEVANTES EN SEQ ID NO:1: DE 1 A 26

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

Arg Asp Gly Phe Leu Leu Leu Gln Met Asp Phe
1 5 10
Gly Phe Pro Glu His Leu Leu Val Asp Phe Leu
15 20
Gln Ser Leu Ser
25

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2

(i) CARACTERÍSTICAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTISENTIDO:

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE:

(B) LOCALIZACIÓN:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

Cys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile
1 5 10
Gly Ile Thr Glu Phe Gly Phe Pro Glu His Leu
15 20
Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
25 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 3

(i) CARACTERÍSTICAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTISENTIDO:

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE: epitope de célula T auxiliar universal de toxoide de tétanos de 21 aminoácidos

(B) LOCALIZACIÓN:

(x) INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:

(A) AUTORES: Panina-Bordignon, P., y col.

(B) TÍTULO: Epitopes de célula T inmunógenos universalmente: unión promiscua a MHC humana de clase II y reconocimiento promiscuo por células T

(C) REVISTA: *European Journal of Immunology*

(D) VOLUMEN: 19

(E) EMISIÓN:

(F) PÁGINAS: 2237-2242

(G) FECHA: 1989

(K) RESIDUOS RELEVANTES EN SEQ ID NO:3: DE 1 A 21

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

Phe	Asn	Asn	Phe	Thr	Val	Ser	Phe	Trp	Leu	Arg
1				5					10	
Val	Pro	Lys	Val	Ser	Ala	Ser	His	Leu	Glu	
			15					20		

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 4

(i) CARACTERÍSTICAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 476 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTISENTIDO:

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE: secuencia de aminoácidos de la CETP humana madura

(B) LOCALIZACIÓN:

(x) INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:

(A) AUTORES: Drayna, Dennis, y col.

(B) TÍTULO: Clonación y secuenciación de ADNc de transporte de ésteres de colesterol humano

(C) REVISTA: *Nature*

(D) VOLUMEN: 327

(E) EMISIÓN:

(F) PÁGINAS: 632-634

(G) FECHA: 18-JUN-1987

(K) RESIDUOS RELEVANTES EN SEQ ID NO:1: DE 1 A 476

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

```
Cys Ser Lys Gly Thr Ser His Glu Ala Gly Ile Val Cys
1               5                  10

Arg Ile Thr Lys Pro Ala Leu Leu Val Leu Asn His Glu
    15                  20                  25

Thr Ala Lys Val Ile Gln Thr Ala Phe Gln Arg Ala Ser
            30                  35

Tyr Pro Asp Ile Thr Gly Glu Lys Ala Met Met Leu Leu
40                  45              50

Gly Gln Val Lys Tyr Gly Leu His Asn Ile Gln Ile Ser
        55                  60                  65

His Leu Ser Ile Ala Ser Ser Gln Val Glu Leu Val Glu
                70                  75

Ala Lys Ser Ile Asp Val Ser Ile Gln Asn Val Ser Val
    80                  85                  90

Val Phe Lys Gly Thr Leu Lys Tyr Gly Tyr Thr Thr Ala
            95                  100

Trp Trp Leu Gly Ile Asp Gln Ser Ile Asp Phe Glu Ile
105                 110                 115

Asp Ser Ala Ile Asp Leu Gln Ile Asn Thr Gln Leu Thr
        120                 125                 130
```

Cys Asp Ser Gly Arg Val Arg Thr Asp Ala Pro Asp Cys
135 140

Tyr Leu Ser Phe His Lys Leu Leu Leu His Leu Gln Gly
145 150 155

Glu Arg Glu Pro Gly Trp Ile Lys Gln Leu Phe Thr Asn
160 165

Phe Ile Ser Phe Thr Leu Lys Leu Val Leu Lys Gly Gln
170 175 180

Ile Cys Lys Glu Ile Asn Val Ile Ser Asn Ile Met Ala
185 190 195

Asp Phe Val Gln Thr Arg Ala Ala Ser Ile Leu Ser Asp
200 205

Gly Asp Ile Gly Val Asp Ile Ser Leu Thr Gly Asp Pro
210 215 220

Val Ile Thr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser His His Lys Gly
225 230

His Phe Ile Tyr Lys Asn Val Ser Glu Asp Leu Pro Leu
235 240 245

Pro Thr Phe Ser Pro Thr Leu Leu Gly Asp Ser Arg Met
250 255 260

Leu Tyr Phe Trp Phe Ser Glu Arg Val Phe His Ser Leu
265 270

Ala Lys Val Ala Phe Gln Asp Gly Arg Leu Met Leu Ser
275 280 285

Leu Met Gly Asp Glu Phe Lys Ala Val Leu Glu Thr Trp
290 295

Gly Phe Asn Thr Asn Gln Glu Ile Phe Gln Glu Val Val
300 305 310

Gly Gly Phe Pro Ser Gln Ala Gln Val Thr Val His Cys
315 320 325

Leu Lys Met Pro Lys Ile Ser Cys Gln Asn Lys Gly Val
330 335

Val Val Asn Ser Ser Val Met Val Lys Phe Leu Phe Pro
340 345 350

Arg Pro Asp Gln Gln His Ser Val Ala Tyr Thr Phe Glu
355 360

Glu Asp Ile Val Thr Thr Val Gln Ala Ser Tyr Ser Lys
365 370 375

Lys Lys Leu Phe Leu Ser Leu Leu Asp Phe Gln Ile Thr
380 385 390

Pro Lys Thr Val Ser Asn Leu Thr Glu Ser Ser Ser Glu
395 400

Ser Ile Gln Ser Phe Leu Gln Ser Met Ile Thr Ala Val
405 410 415

Gly Ile Pro Glu Val Met Ser Arg Leu Glu Val Val Phe
420 425

Thr Ala Leu Met Asn Ser Lys Gly Val Ser Leu Phe Asp
430 435 440

Ile Ile Asn Pro Glu Ile Ile Thr Arg Asp Gly Phe Leu
445 450 455

Leu Leu Gln Met Asp Phe Gly Phe Pro Glu His Leu Leu
460 465

Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
470 475

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 5

(i) CARACTERÍSTICAS SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1.428 parejas básicas
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTISENTIDO:

(ix) RASGO:
- (A) NOMBRE: secuencia codificadora de la CETP humana madura
- (B) LOCALIZACIÓN:

(x) INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:
- (A) AUTORES: Drayna, Dennis, y col.
- (B) TÍTULO: Clonación y secuenciación de ADNc de transporte de ésteres de colesterol humano
- (C) REVISTA: *Nature*
- (D) VOLUMEN: 327
- (E) EMISIÓN:
- (F) PÁGINAS: 632-634
- (G) FECHA: 18-JUN-1987
- (K) RESIDUOS RELEVANTES EN SEQ ID NO:5: DE 1 A 1.428

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

```
TGCTCCAAAG GCACCTCGCA CGAGGCAGGC ATCGTGTGCC   40

GCATCACCAA GCCTGCCCTC CTGGTGTTGA ACCACGAGAC   80

TGCCAAGGTG ATCCAGACCG CCTTCCAGCG AGCCAGCTAC  120

CCAGATATCA CGGGCGAGAA GGCCATGATG CTCCTTGGCC  160

AAGTCAAGTA TGGGTTGCAC AACATCCAGA TCAGCCACTT  200

GTCCATCGCC AGCAGCCAGG TGGAGCTGGT GGAAGCCAAG  240

TCCATTGATG TCTCCATTCA GAACGTGTCT GTGGTCTTCA  280

AGGGGACCCT GAAGTATGGC TACACCACTG CCTGGTGGCT  320

GGGTATTGAT CAGTCCATTG ACTTCGAGAT CGACTCTGCC  360

ATTGACCTCC AGATCAACAC ACAGCTGACC TGTGACTCTG  400

GTAGAGTGCG GACCGATGCC CCTGACTGCT ACCTGTCTTT  440
```

CCATAAGCTG CTCCTGCATC TCCAAGGGGA GCGAGAGCCT 480

GGGTGGATCA AGCAGCTGTT CACAAATTTC ATCTCCTTCA 520

CCCTGAAGCT GGTCCTGAAG GGACAGATCT GCAAAGAGAT 560

CAACGTCATC TCTAACATCA TGGCCGATTT TGTCCAGACA 600

AGGGCTGCCA GCATCCTTTC AGATGGAGAC ATTGGGGTGG 640

ACATTTCCCT GACAGGTGAT CCCGTCATCA CAGCCTCCTA 680

CCTGGAGTCC CATCACAAGG GTCATTTCAT CTACAAGAAT 720

GTCTCAGAGG ACCTCCCCCT CCCCACCTTC TCGCCCACAC 760

TGCTGGGGGA CTCCCGCATG CTGTACTTCT GGTTCTCTGA 800

GCGAGTCTTC CACTCGCTGG CCAAGGTAGC TTTCCAGGAT 840

GGCCGCCTCA TGCTCAGCCT GATGGGAGAC GAGTTCAAGG 880

CAGTGCTGGA GACCTGGGGC TTCAACACCA ACCAGGAAAT 920

CTTCCAAGAG GTTGTCGGCG GCTTCCCCAG CCAGGCCCAA 960

GTCACCGTCC ACTGCCTCAA GATGCCCAAG ATCTCCTGCC 1000

AAAACAAGGG AGTCGTGGTC AATTCTTCAG TGATGGTGAA 1040

ATTCCTCTTT CCACGCCCAG ACCAGCAACA TTCTGTAGCT 1080

TACACATTTG AAGAGGATAT CGTGACTACC GTCCAGGCCT 1120

CCTATTCTAA GAAAAAGCTC TTCTTAAGCC TCTTGGATTT 1160

CCAGATTACA CCAAAGACTG TTTCCAACTT GACTGAGAGC 1200

AGCTCCGAGT CCATCCAGAG CTTCCTGCAG TCAATGATCA 1240

CCGCTGTGGG CATCCCTGAG GTCATGTCTC GGCTCGAGGT 1280

AGTGTTTACA GCCCTCATGA ACAGCAAAGG CGTGAGCCTC 1320

TTCGACATCA TCAACCCTGA GATTATCACT CGAGATGGCT 1360

TCCTGCTGCT GCAGATGGAC TTTGGCTTCC CTGAGCACCT 1400

GCTGGTGGAT TTCCTCCAGA GCTTGAGC 1428

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 6

(i) CARACTERÍSTICAS SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 496 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTISENTIDO:

(ix) RASGO:
- (A) NOMBRE: secuencia aminoácido para proteína de la CETP madura de conejo
- (B) LOCALIZACIÓN:

(x) INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:
- (A) AUTORES: Nagashima, Mariko, y col.
- (B) TÍTULO: Clonación y distribución de tejido ARNm de proteína de transporte de ésteres de colesterol de conejo
- (C) REVISTA: *J. Lipid Res.*

(D) VOLUMEN: 29
(E) EMISIÓN:
(F) PÁGINAS: 1643-1649
(G) FECHA: 1988
(K) RESIDUOS RELEVANTES EN SEQ ID NO:6: DE 1 A 496

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

```
Cys Pro Lys Gly Ala Ser Tyr Glu Ala Gly Ile Val Cys
1               5                  10

Arg Ile Thr Lys Pro Ala Leu Leu Val Leu Asn Gln Glu
        15                  20                  25

Thr Ala Lys Val Val Gln Thr Ala Phe Gln Arg Ala Gly
            30                  35

Tyr Pro Asp Val Ser Gly Glu Arg Ala Val Met Leu Leu
40                  45                  50

Gly Arg Val Lys Tyr Gly Leu His Asn Leu Gln Ile Ser
        55                  60                  65

His Leu Ser Ile Ala Ser Ser Gln Val Glu Leu Val Asp
                70                  75
```

Ala Lys Thr Ile Asp Val Ala Ile Gln Asn Val Ser Val
80 85 90

Val Phe Lys Gly Thr Leu Asn Tyr Ser Tyr Thr Ser Ala
95 100

Trp Gly Leu Gly Ile Asn Gln Ser Val Asp Phe Glu Ile
105 110 115

Asp Ser Ala Ile Asp Leu Gln Ile Asn Thr Glu Leu Thr
120 125 130

Cys Asp Ala Gly Ser Val Arg Thr Asn Ala Pro Asp Cys
135 140

Tyr Leu Ala Phe His Lys Leu Leu Leu His Leu Gln Gly
145 150 155

Glu Arg Glu Pro Gly Trp Leu Lys Gln Leu Phe Thr Asn
160 165

Phe Ile Ser Phe Thr Leu Lys Leu Ile Leu Lys Arg Gln
170 175 180

Val Cys Asn Glu Ile Asn Thr Ile Ser Asn Ile Met Ala
185 190 195

Asp Phe Val Gln Thr Arg Ala Ala Ser Ile Leu Ser Asp
200 205

Gly Asp Ile Gly Val Asp Ile Ser Val Thr Gly Ala Pro
210 215 220

Val Ile Thr Ala Thr Tyr Leu Glu Ser His His Lys Gly
225 230

His Phe Thr His Lys Asn Val Ser Glu Ala Phe Pro Leu
235 240 245

Arg Ala Phe Pro Pro Gly Leu Leu Gly Asp Ser Arg Met
250 255 260

Leu Tyr Phe Trp Phe Ser Asp Gln Val Leu Asn Ser Leu
265 270

Ala Arg Ala Ala Phe Gln Glu Gly Arg Leu Val Leu Ser
275 280 285

Leu Thr Gly Asp Glu Phe Lys Lys Val Leu Glu Thr Gln
290 295

Gly Phe Asp Thr Asn Gln Glu Ile Phe Gln Glu Leu Ser
300 305 310

Arg Gly Leu Pro Thr Gly Gln Ala Gln Val Ala Val His
315 320 325

Cys Leu Lys Val Pro Lys Ile Ser Cys Gln Asn Arg Gly
330 335

Val Val Val Ser Ser Ser Val Ala Val Thr Phe Arg Phe
340 345 350

Pro Arg Pro Asp Gly Arg Glu Ala Val Ala Tyr Arg Phe
355 360

Glu Glu Asp Ile Ile Thr Thr Val Gln Ala Ser Tyr Ser
365 370 375

Gln Lys Lys Leu Phe Leu His Leu Leu Asp Phe Gln Cys
380 385 390

Val Pro Ala Ser Gly Arg Ala Gly Ser Ser Ala Asn Leu
395 400

Ser Val Ala Leu Arg Thr Glu Ala Lys Ala Val Ser Asn
405 410 415

Leu Thr Glu Ser Arg Ser Glu Ser Leu Gln Ser Ser Leu
420 425

Arg Ser Leu Ile Ala Thr Val Gly Ile Pro Glu Val Met
430 435 440

Ser Arg Leu Glu Val Ala Phe Thr Ala Leu Met Asn Ser
445 450 455

Lys Gly Leu Asp Leu Phe Glu Ile Ile Asn Pro Glu Ile
460 465

Ile Thr Leu Asp Gly Cys Leu Leu Leu Gln Met Asp Phe
470 475 480

Gly Phe Pro Lys His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser
485 490

Leu Ser
495

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 7

(i) CARACTERÍSTICAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1.488 parejas básicas

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTISENTIDO:

(ix) RASGO: Secuencia codificadora para la CETP madura de conejo

(A) NOMBRE:

(B) LOCALIZACIÓN:

(x) INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:

(A) AUTORES: Nagashima, Mariko, y col.

(B) TÍTULO: Clonación y distribución de tejido ARNm de proteína de transporte de ésteres de colesterol de conejo

(C) REVISTA: *J. Lipid Res.*

(D) VOLUMEN: 29

(E) EMISIÓN:

(F) PÁGINAS: 1643-1649

(G) FECHA: 1988

(K) RESIDUOS RELEVANTES EN SEQ ID NO:7: DE 1 A 1.488

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

```
TGTCCCAAAG GCGCCTCCTA CGAGGCTGGC ATCGTGTGTC     40

GCATCACCAA GCCCGCCCTC TTGGTGTTGA ACCAAGAGAC     80

GGCCAAGGTG GTCCAGACGG CCTTCCAGCG CGCCGGCTAT    120
```

CCGGACGTCA GCGGCGAGAG GGCCGTGATG CTCCTCGGCC 160

GGGTCAAGTA CGGGCTGCAC AACCTCCAGA TCAGCCACCT 200

GTCCATCGCC AGCAGCCAGG TGGAGCTGGT GGACGCCAAG 240

ACCATCGACG TCGCCATCCA GAACGTGTCC GTGGTCTTCA 280

AGGGGACCCT GAACTACAGC TACACGAGTG CCTGGGGGTT 320

GGGCATCAAT CAGTCTGTCG ACTTCGAGAT CGACTCTGCC 360

ATTGACCTCC AGATCAACAC AGAGCTGACC TGCGACGCTG 400

GCAGTGTGCG CACCAATGCC CCCGACTGCT ACCTGGCTTT 440

CCATAAACTG CTCCTGCACC TCCAGGGGGA GCGCGAGCCG 480

GGGTGGCTCA AGCAGCTCTT CACAAACTTC ATCTCCTTCA 520

CCCTGAAGCT GATTCTGAAG CGACAGGTCT GCAATGAGAT 560

CAACACCATC TCCAACATCA TGGCTGACTT TGTCCAGACG 600

AGGGCCGCCA GCATCCTCTC AGATGGAGAC ATCGGGGTGG 640

ACATTTCCGT GACGGGGGCC CCTGTCATCA CAGCCACCTA 680

CCTGGAGTCC CATCACAAGG GTCACTTCAC GCACAAGAAC 720

GTCTCCGAGG CCTTCCCCCT CCGCGCCTTC CCGCCCGGTC 760

TTCTGGGGGA CTCCCGCATG CTCTACTTCT GGTTCTCCGA 800

TCAAGTGCTC AACTCCCTGG CCAGGGCCGC CTTCCAGGAG 840

GGCCGTCTCG TGCTCAGCCT GACAGGGGAT GAGTTCAAGA 880

AAGTGCTGGA GACCCAGGGT TTCGACACCA ACCAGGAAAT 920

CTTCCAGGAG CTTTCCAGAG GCCTTCCCAC CGGCCAGGCC 960

CAGGTAGCCG TCCACTGCCT TAAGGTGCCC AAGATCTCCT 1000

GCCAGAACCG GGGTGTCGTG GTGTCTTCTT CCGTCGCCGT 1040

GACGTTCCGC TTCCCCCGCC CAGATGGCCG AGAAGCTGTG 1080

GCCTACAGGT TTGAGGAGGA TATCATCACC ACCGTCCAGG 1120

CCTCCTACTC CCAGAAAAAG CTCTTCCTAC ACCTCTTGGA 1160

TTTCCAGTGC GTGCCGGCCA GCGGAAGGGC AGGCAGCTCA 1200

GCAAATCTCT CCGTGGCCCT CAGGACTGAG GCTAAGGCTG 1240

TTTCCAACCT GACTGAGAGC CGCTCCGAGT CCCTGCAGAG 1280

CTCTCTCCGC TCCCTGATCG CCACGGTGGG CATCCCGGAG 1320

GTCATGTCTC GGCTCGAGGT GGCGTTCACA GCCCTCATGA 1360

ACAGCAAAGG CCTGGACCTC TTCGAAATCA TCAACCCCGA 1400

GATTATCACT CTCGATGGCT GCCTGCTGCT GCAGATGGAC 1440

TTCGGTTTTC CCAAGCACCT GCTGGTGGAT TTCCTGCAGA 1480

GCCTGAGC 1488

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:8

(i) CARACTERÍSTICAS SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 50 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTISENTIDO:

(ix) RASGO:
- (A) NOMBRE:
- (B) LOCALIZACIÓN:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

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

Thr Glu Leu Phe Pro Arg Pro Asp Gln Gln His Ser Val
15 20 25

Ala Tyr Thr Phe Glu Glu Asp Ile Phe Gly Phe Pro Glu
30 35

His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
40 45 50

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:9

(i) CARACTERÍSTICAS SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 50 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA:

(iv) ANTISENTIDO:

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE:

(B) LOCALIZACIÓN:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

Met	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Phe	Ile	Gly	Ile
1				5				10				

Thr	Glu	Arg	Phe	Pro	Arg	Pro	Asp	Gly	Arg	Glu	Ala	Val
	15					20					25	

Ala	Tyr	Arg	Phe	Glu	Glu	Asp	Ile	Phe	Gly	Phe	Pro	Lys
		30						35				

His	Leu	Leu	Val	Asp	Phe	Leu	Gln	Ser	Leu	Ser
40					45				50	