



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 640**

51 Int. Cl.:

A61K 38/03 (2006.01)

A61K 39/002 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97914975 .4**

96 Fecha de presentación : **10.03.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **0914142**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.1999**

54 Título: **Péptidos con afinidad de unión aumentada para al menos tres moléculas de tipo HLA-A3.**

30 Prioridad: **11.03.1996 US 13113 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.11.2011

73 Titular/es: **EPIMMUNE Inc.**
6555 Nancy Ridge Drive, Suite 200
San Diego, California 92121, US

72 Inventor/es: **Sette, Alessandro;**
Chesnut, Robert, W. y
Sidney, John

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 640 T3

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).

DESCRIPCIÓN

Péptidos con afinidad de unión aumentada para al menos tres moléculas de tipo hla-a3

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para prevenir, tratar o diagnosticar un número de estados patológicos. En particular, proporciona péptidos novedosos capaces de unirse a moléculas de complejo de histocompatibilidad principal seleccionadas (MHC) y que inducen una respuesta inmune.

10 Las moléculas MHC se clasifican o bien como moléculas Clase I o Clase II. Las moléculas MHC de Clase II se expresan principalmente sobre las células implicadas en el inicio y mantenimiento de la las respuestas inmunes, tales como linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, y similares. Las moléculas MHC de Clase II son reconocidas por los linfocitos T auxiliares e inducen la proliferación de linfocitos T auxiliares y amplificación de la respuesta inmune al péptido inmunogénico particular que se muestra. Las moléculas MHC de Clase I se expresan en casi todas las células nucleadas y se reconocen por linfocitos T citotóxicos (CTL), que después destruyen las células que llevan antígeno. Los CTL son particularmente importantes en rechazo de tumor y en la lucha de infecciones virales, fúngicas, y parásitas.

15 La relación entre afinidad de unión para las moléculas MHC de Clase I e inmunogenicidad de epítopes de péptidos discretos se ha analizado en dos planteamientos experimentales diferentes (Sette, et al., J. Immunol., 153: 5586 - 5592 (1994)). En el primer planteamiento, la inmunogenicidad de los epítopes portenciales que varían en la afinidad de unión de MHC en un intervalos de 10,000 veecs se analizó en ratones transgénicos HLA-A*0201. En el segundo planteamiento, la antigenicidad de aproximadamente 100 epítopes potenciales diferentes derivados de virus de hepatitis B (HBV), llevando todos motivos de unión de A*0201, se ensayaron mediante el uso de PBL de pacientes de hepatitis aguda. En ambos casos, se encontró que un umbral de afinidad de aproximadamente 500 nM (preferiblemente 500 nM o menos) determina la capacidad de un epítope de péptido para inducir una respuesta CTL. Estos datos se correlacionan bien con las mediciones de la afinidad de unión de la clase I de o bien péptidos procesados de manera natural o epítopes de células T descritos previamente. Estos datos indican el papel importante de la selección determinante en la configuración de las respuestas de las células T.

20 En general, respuestas de CTL no se dirigen contra todos los epítopes posibles. En su lugar, están restringidos a unos pocos determinantes inmunodominantes (Zinkernagel, et al., Adv. Immunol. 27, 51 - 59 (1979); Bennink, et al., J. Exp. Med. 168, 1935 - 1939 (1988); Rawle, et al., J. Immunol. 146, 3977 - 3984 (1991)). Se ha reconocido durante mucho tiempo que la inmunodominancia (Benacerraf, et al., Science. 175, 273 - 279 (1972)) se podría explicar mediante o bien la capacidad de un epítope dado para unirse selectivamente a una molécula particular MHC (teoría de selección determinante) (Vitiello, et al., J. Immunol. 131:1635 (1983); Rosenthal, et al., Nature 267, 156 - 158 (1977)) o que se reconoce de manera selectiva por la especificidad de TCR existente (teoría del repertorio) (Klein, J., Immunology, the Science of Self-Nonself Discrimination, John Wiley & Sons, New York, p. 270 - 310 (1982)). Se ha demostrado que también pueden jugar un papel importante factores adicionales, la mayoría ligados a episodios profesionales en el dictado, más allá de la estricta inmunogenicidad, cuyos muchos determinantes potenciales se presentarán como inmunodominantes (Sercarz, et al., Annu. Rev. Immunol. 11, 729 - 766 (1999)).

30 La capacidad para modular la afinidad de unión de un péptido inmunogénico particular para uno o más moléculas HLA y por lo tanto modulan la respuesta inmune inducida por el péptido potenciarán en gran medida la utilidad de vacunas a base de péptido y agentes terapéuticos. La presente invención proporciona éstas y otras ventajas.

El documento WO 94/03205 describe composiciones de péptido capaces de unirse específicamente a alelos de MHC seleccionados e inducir la activación de células T en células T restringidas por el alelo MHC. Los péptidos son útiles para inducir una respuesta inmune contra el antígeno deseado.

45 En Rammensee et al, Immunogenetics (1995) 41: 178-228, titulado "MHC ligands and peptide motifs: first listing" se proporcionan un compendio de motivos de péptido MHC y ligandos de MHC.

Deckhut et al., J. of Virology, enero 1992, p. 440 - 447 describen que SV40 TAA expresado en células transformadas de H-2b SV40 induce la generación de los CTL Lyt-2+ (CD8+), que están implicados en el rechazo de tumores, en ratones. Los restos mínimos y óptimos de antígeno T reconocido por cuatro clones de CTL se determina mediante el uso de péptidos sintéticos.

50 En la "Definition of Specific Peptide Motifs for Four Major HLA-A Alleles", J. Immunology, Vol. 152, No. 8, 15 de abril de 1994, p 3913 - 24, Kubo et al., describe y caracteriza motivos específicos de alelo para las moléculas de la clase MHC humanas, HLA-A1, A3, A11 y A24.

Sumario de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no caiga dentro de las reivindicaciones se proporciona para información solamente.

En el presente documento se divulgan péptidos y ácidos nucleicos que los codifican para uso en vacunas y compuestos terapéuticos. También se describen procedimientos de inducción de una respuesta de células T citotóxicas contra un antígeno preseleccionado en un paciente, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una célula T citotóxica con un péptido inmunogénico de la invención. Los péptidos de la invención se pueden derivar de numerosos antígenos incluyendo antígenos virales, antígenos asociados a tumores, antígenos parásitos, antígenos fúngicos y similares. El procedimiento descrito en el presente documento se puede llevar a cabo *in vitro* e *in vivo*. Preferiblemente los péptidos se ponen en contacto con la célula T citotóxica mediante administración al paciente de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el péptido inmunogénico.

La presente divulgación proporciona una composición que comprende un péptido inmunogénico de entre 9 y 15 restos que se une a al menos dos moléculas de tipo HLA-A3 seleccionadas entre el grupo que comprende A*0301, A*1101, A*3101, A*3301 y A*6801 con una constante de disociación de menos de 500nM e induce una respuesta de células T citotóxicas, dicho péptido inmunogénico comprende un supermotivo A3 que consta de una secuencia de 9 restos del extremo N al extremo C como sigue:

Un primer resto de anclaje primario en la segunda posición en la segunda posición seleccionado entre el grupo que consta de A, L, I, V, M, S y T y

Un segundo resto de anclaje primario en la novena posición seleccionado entre el grupo que consta de R y K; y

Uno o más restos de anclaje secundarios seleccionados entre el grupo que consta de (i) Y F, o W, en la tercera posición, (ii) Y, F, o W en la sexta posición, (iii) Y, F, o W en la séptima posición, (iv), P en la octava posición, y cualquier combinación de (i), (ii), (iii) y (iv).

La presente invención proporciona un procedimiento de identificación de péptidos que se unen a una molécula de tipo HLA-A3 con una constante de disociación de menos de 500 nM, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:

rastrear una secuencia de aminoácidos de una proteína antigénica para la presencia del motivo de unión de la reivindicación 1; seleccionar una o más subsecuencias en la proteína antigénica que tiene el motivo de unión; preparar péptidos de ensayo de 8 y 11 restos que comprenden las subsecuencias seleccionadas; determinar la capacidad de los péptidos de ensayo que se unen a la molécula de tipo HLA-A3; e identificar péptidos con una constante de disociación de menos de 500 nM.

Definiciones

El término "péptido" se usa indistintamente con "oligopéptido" en la presente memoria descriptiva para designar una serie de restos, típicamente aminoácidos L, conectados entre sí típicamente por enlaces de péptido entre los grupos alfa-amino y carbonilo de aminoácidos adyacentes. Los oligopéptidos de la invención son menos que aproximadamente 15 restos de longitud y usualmente constan de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 11 restos, preferiblemente 9 ó 10 restos.

Un "péptido inmunogénico" es un péptido que comprende un motivo específico de alelo o supermotivo de manera que el péptido se unirá a una molécula de MHC e inducen una respuesta de CTL. Péptidos inmunogénicos de la invención son capaces de unirse a una molécula de tipo HLA-A3 apropiada e inducir una respuesta de células T citotóxicas contra el antígeno a partir del cual se deriva el péptido inmunogénico.

Un "resto de anclaje primario" es un aminoácido en una posición específica junto a una secuencia de péptidos que puede proporcionar un punto de contacto entre el péptido inmunogénico y la molécula de MHC. Uno a tres, usualmente dos, restos de anclaje primario dentro de un péptido de longitud definida en general define un motivo para un péptido inmunogénico. Estos restos están típicamente en contacto estrecho con la ranura de unión al péptido, con sus cadenas laterales enterrado en cavidades específicas de la propia ranura. Típicamente, los restos de anclaje primario se localizan en la 2 y 9 posición del péptido del resto 9.

Un "resto de anclaje secundario" es un aminoácido que se produce en una frecuencia suficientemente mayor que la que se esperaría por distribución al azar en una posición particular que los anclajes primarios en un péptido. De manera alternativa, se pueden identificar anclajes secundarios como aquellos con una mayor frecuencia entre péptidos de unión de alta afinidad o están asociados a unión de afinidad alta. Presencia o ausencia de restos particulares en estas posiciones se puede usar para modular de manera sutil la afinidad de unión de un péptido

que comprende un motivo particular.

Como se usa en el presente documento, "restos de unión negativa" son aminoácidos que si están presentes en ciertas posiciones (típicamente no posiciones de anclaje primarias) darán como resultado la disminución de la afinidad de unión para la molécula de HLA diana.

- 5 El término "motivo" se refiere al patrón de restos en un péptido de longitud definida, usualmente aproximadamente 8 a aproximadamente 15 aminoácidos, que se reconoce por una molécula de MHC particular. Los motivos de péptido son típicamente diferentes para cada alelo de MHC humano y difieren en el patrón de los restos de anclaje primarios y secundarios.

- 10 Un "supermotivo" se refiere a motivos que, cuando están presentes en un péptido inmunogénico, permite que el péptido se una a más de un antígeno HLA. El supermotivo preferiblemente se reconoce con afinidad alta o intermedia (como se define más adelante) por al menos un alelo de HLA, preferiblemente reconocido por al menos dos alelos, más preferiblemente reconocido por al menos tres alelos, y lo más preferiblemente reconocido por más de tres alelos.

- 15 Las moléculas de la clase I de HLA que comparten algo de los motivos de unión a péptido similares se agrupan en supertipos de HLA. Un "supertipo o familia de HLA", como se usa en el presente documento, describe conjuntos de moléculas agrupados en la base de especificidades de unión de péptido compartidas, en lugar de los supertipos serológicos basándose en determinantes antigénicos.

- 20 Una molécula de HLA "de tipo HLA-A3" (también denominada alelo) como se usa en el presente documento se refiere a un grupo de moléculas de HLA codificadas por los alelos de HLA-A que comparten una superposición de motivo de unión de péptido con el supermotivo HLA-A3 descrito en este documento. El supermotivo del resto compartido por estos alelos comprende los siguientes de restos de anclaje primario: A, L, I, V, M, S, o, T en la posición 2 y restos cargados positivamente, tales como R y K en la posición 9 (el extremo C en 9-meros). Los miembros ejemplares de esta familia, identificados por cualquier serología o la tipificación de ADN, incluyen: A3 (A*0301), A11 (A*1101), A31 (A*3101), A*3301, y A*6801. Otros miembros de la familia incluyen A34, A66, y A*7401. Como se explica en detalle más adelante, la unión a cada uno de los alelos individuales se puede modular de manera sutil mediante sustituciones en las posiciones de anclaje secundario.

- 25 El supermotivo "de tipo HLA-A2" se caracteriza por una preferencia para ligandos de péptido con aminoácidos pequeños o alifáticos (L, I, V, M, A, y T) en la posición 2 y el extremo C. La familia está comprendida de al menos ocho HLA-A alelos (A*0201, A*0202, A*0203, A*0204, A*0205, A*0206, A*6802, y A*6901).

- 30 El supertipo "de tipo HLA-B7" está comprendido por productos de al menos una docena de alelos HLA-B (B7, B*3501-3, B51, B*5301, B*5401, B*5501, B*5502, B*5601, BB*6701, y B*7801) (Sidney, et al., J Immunol 154: 247 (1995); Barber, et al., Curr Biol 5:179 (1995); Hill, et al, Nature 360: 434 (1992); Rammenvéase, et al., Immunogenetics 41: 178 (1995)), y se caracteriza por moléculas que reconocen péptidos que llevan prolina en la posición 2 y aminoácidos hidrófobos o alifáticos (L, I, V, M, A, F, W, y Y) en su extremo C.

- 35 Los términos "aislado" o "biológicamente puro" se refiere a material que está sustancialmente o esencialmente libre de estos componentes que normalmente lo acompañan como se encuentra en su estado nativo. De este modo, los péptidos no contienen materiales normalmente asociados a su ambiente in situ, por ejemplo, moléculas de MHC I sobre células que presentan antígeno. Incluso cuando se ha aislado una proteína a una banda homogénea o dominante, existen contaminantes en pequeñas cantidades en el intervalo de 5 - 10% de proteína nativa que se purifican conjuntamente con la proteína deseada. Los péptidos aislados de esta descripción no contienen tal proteína endógena purificada conjuntamente.

- 40 El término "resto" se refiere a un aminoácido o mimético de aminoácido incorporado en un oligopéptido por un enlace amida o mimético de enlace amida.

Breve descripción de los dibujos

- 45 Figura 1 muestra motivos específicos de alelo refinados de los cinco alelos de tipo A3: A*0301, A*1101, A*3101, A*3301, y A*6801. Se muestran los restos individuales, o grupos de restos de naturaleza química similar, asociado para cada posición de no anclaje con capacidades de unión o bien buenas o escasas para cada alelo individual.

Figura 2 muestra el supermotivo de tipo A3. Los números en paréntesis indican el número de moléculas para el que se prefirió o es perjudicial el resto o grupo de restos.

- 50 Figura 3 resume los efectos secundarios que influyen en la capacidad de unión de péptidos para a) B*0702, b) B*3501, c) B51, d) B*5301, y e) B*5401. Estos mapas se usaron posteriormente para definir el supermotivo de

tipo B7 (f). Los valores en paréntesis indican la frecuencia en la que un resto o grupo de restos indica la frecuencia en la que un resto o grupo de restos se prefirió o es perjudicial.

Figura 4 muestra la capacidad de unión media relativa de los péptidos 9 mer del submotivo A*0101 en función de los restos diferentes que se producen en cada una de las posiciones de anclaje. Se analizaron los conjuntos de datos de cualquiera de los conjuntos de péptidos de los submotivos 2-9 mer (a) 3-9 mer (b) y se tabularon como se describe en el Material and Procedimientos. Los conjuntos 2 - 9 y 3 - 9 contenían 101 y 85 péptidos diferentes, respectivamente. También se muestran los mapas de efectos secundarios que influyen en la capacidad de unión de péptidos 9-mer que llevan los submotivos 2-9 (c) 3-9 mer (d) A*0101.

Figura 5 muestra la capacidad de unión media relativa de los péptidos 10 mer del submotivo A*0101 péptidos en función de los restos diferentes que se producen en cada una de las posiciones de anclaje. Se analizaron los conjuntos de datos de cualquiera de los conjuntos de péptidos de los submotivos 2-10 mer (a) o 3-10 (b) y se tabularon. Los conjuntos 2-10 y 3-10 contenían 91 y 89 péptidos diferentes, respectivamente. También se muestran los mapas de efectos secundarios que influyen en la capacidad de unión de péptidos 10 mer que llevan los submotivos 2-10 (c) mer y (1) y o 3-10 mer (d) de A1.

Descripción detallada

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no cae dentro de las reivindicaciones se proporciona para información solamente. La presente invención se refiere a la determinación de motivos y supermotivos de péptido específico de alelo para alelos de MHC de Clase I humana (denominada HLA), en particular, alelos de tipo HLA-A3. Estos motivos después se usan para preparar y modificar epítopes de células T de cualquier antígeno deseado, particularmente los asociados a enfermedades virales humanas, enfermedades parásitarias, enfermedades fúngicas, o cánceres.

Como se ha indicado anteriormente, alta afinidad de unión de HLA se correlaciona con mayor inmunogenicidad. La mayor inmunogenicidad se puede manifestar de varias formas diferentes. Por ejemplo, un péptido de mayor unión será inmunogénico más a menudo. Cerca del 90% de péptidos de alta unión son inmunogénicos, cuando se contrasta con aproximadamente 50% de los péptidos que se unen con afinidad intermedia. Un péptido de mayor unión también conducirá a una respuesta más vigorosa. Como resultado, se requiere menos péptido para inducir un efecto biológico similar. Los epítopes de alta unión se desean particularmente.

Se desea la identificación de epítopes subdominantes, en contraposición a los dominantes. En la nomenclatura adoptada en este documento (véase, Sercarz, et al., (1993), supra), un "epítipo dominante" induce una respuesta tras la inmunización con antígenos nativos enteros. Tal respuesta de reacción cruzada in vitro con el epítipo de péptido. Un "epítipo críptico" induce una respuesta mediante inmunización de péptido, pero no es de reacción cruzada in vitro cuando se usa proteína intacta entera se usa como un antígeno. Finalmente, un "epítipo subdominante" es un epítipo que provoca poca o ninguna respuesta tras la inmunización con antígenos enteros, pero para la que se puede obtener una respuesta mediante inmunización de péptido, y esta respuesta (a diferencia del tipo de epítopes crípticos) se detecta cuando se usa la proteína entera para recordar respuesta in vitro.

El concepto de dominancia y subdominancia es relevante para inmunoterapia de enfermedad viral y cáncer. En el curso de enfermedad viral crónica, el reclutamiento de epítopes subdominantes puede ser crucial para la eliminación exitosa de la infección, especialmente si especificidades de CTL dominantes se han inactivado por tolerancia, supresión, mutación de virus funcional y otros mecanismos (Franco, et al., Current Opinion in Immunology, 7: 524 - 531, (1995)). Además, en el caso de cáncer y antígenos de tumor, parece que el CTL que reconoce al menos alguno de los péptidos de unión más alta se pudiera haber inactivado funcionalmente mediante tolerancia y supresión, y péptidos de menor afinidad de unión se reconocen preferentemente.

En particular, se ha indicado que un número significativo de epítopes derivados de antígenos asociados a tumor no virales conocidos (TAA) se unen a la Clase I de HLA con afinidad intermedia (CI50% en el intervalo 50 - 500 mM). Se ha encontrado que 8 de 15 péptidos de TAA conocidos reconocidos por linfocitos de infiltración de tumor (TIL) o CTL unidos en el intervalo 50 - 500 mM. Estos datos están en contraposición con las estimaciones que 90% de los antígenos virales conocidos que se reconocen como péptidos unidos a HLA con CI50% de 50 μ M o menos mientras solamente aproximadamente 10% unidos en el intervalo 50 - 500 mM (Sette, et al., J. Immunol., 153: 5586 - 5592 (1994)). Este fenómeno se debe probablemente al establecimiento de cáncer para la eliminación, o eliminación funcional del CTL que reconoce varios de los péptidos de unión más alta, presumiblemente debido a los episodios de tolerancia de las células T.

Se describen en el presente documento procedimientos para modular afinidad de unión de péptidos inmunogénicos por selección de los restos deseados en las posiciones de anclaje primarios y secundario. Como se explica en detalle más adelante, un supermotivo para la unión potenciada a alelos de tipo A3 se proporciona en

este documento. Dependiendo del efecto deseado de afinidad de unión, los restos de anclaje en un péptido deseado están sustituidos. Los ejemplos de modulaciones que se pueden lograr incluyen afinidad aumentada para un alelo particular (por ejemplo, mediante sustitución de restos de anclaje secundario para el alelo), reactividad cruzada aumentada entre diferentes alelos (por ejemplo, por sustitución de restos de anclaje secundario compartidos por más de un alelo), y producción de un epítipo subdominante (por ejemplo, por sustitución de restos que incrementan la afinidad pero no están presentes en el epítipo inmunodominante).

Se pueden usar epítopes sobre un número de proteínas diana potenciales. Ejemplos de antígenos adecuados incluyen antígeno específico de próstata (PSA), antígenos del núcleo de hepatitis B y de superficie (HBVc, HBVs), antígenos de hepatitis C, antígenos de virus de Epstein-Barr, antígenos de melanoma (por ejemplo, MAGE-1), antígenos de virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y antígenos de virus de papiloma humano (HPV). Los ejemplos ejemplares fúngicos incluyen los derivados de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides* spp., *Histoplasma* spp., y *Aspergillus fumigatis*. Los antígenos de parásitos incluyen los derivados de *Plasmodium* spp., *Trypanosoma* spp., *Schistosoma* spp., *Leishmania* spp. y similares.

La preparación y evaluación de péptidos se describen en las publicaciones PCT WO 94/20127 y WO 94/03205. En resumen, péptidos que comprenden epítopes de un antígeno particular se sintetizan y se ensayan por su capacidad de unirse a las moléculas MHC apropiadas en los ensayos que usan, por ejemplo, moléculas de la clase I purificadas y péptidos radioyodados y / o células que expresan moléculas de la clase I vacías mediante, por ejemplo, tinción inmunofluorescente y microfluorimetría de flujo, ensayos de ensamblaje de la clase I dependiente de péptido, e inhibición de reconocimiento de CTL por competición de péptido. Esos péptidos que se unen a la molécula de la clase I además se evalúan para determinar su capacidad para servir como dianas para los CTL derivados de individuos infectados o inmunizados, así como por su capacidad de inducir respuestas primarias *in vitro* o *in vivo* de CTL que pueden dar lugar a poblaciones de CTL capaces de seleccionar células diana asociadas a una enfermedad.

A lo largo de esta descripción, los resultados se expresan en términos de CI50. Dadas las condiciones en las que se desarrollan los ensayos (es decir concentraciones limitantes de MHC y de péptido marcado), estos valores se aproximan a los valores de KD. Se debe indicar que los valores de CI50 pueden cambiar, a menudo notablemente, si las condiciones de ensayo varían, y dependiendo de los reactivos particulares usados (por ejemplo, preparación de MHC, etc.). Por ejemplo, concentraciones excesivas de MHC incrementarán la CI50 medida aparente de un ligando dado. Como se usa en el presente documento, "alta afinidad" se define en este documento como unión con una CI50 (o KD) de menos de 50nM. "Afinidad intermedia" es unión con una CI50 (o KD) de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 500 nM. Los ensayos para determinar la unión se describen en detalle en las publicaciones PCT WO 94/20127 y WO 94/03205.

Una forma alternativa que expresa los datos de unión es un valor relativo para un péptido de referencia. El péptido de referencia se incluye en cada ensayo. Como un ensayo particular que llega a ser más, o menos sensible, las CI50 de los péptidos ensayados pueden cambiar algo. Sin embargo, la unión relativa al péptido de referencia no cambiarán. Por ejemplo, en un ensayo desarrollado en condiciones de manera que la CI50 del péptido de referencia aumenta 10 veces, todos los valores de CI50 también se desplazarán aproximadamente 10 veces. Por lo tanto, para evitar ambigüedades, la determinación de si un péptido es un ligando bueno, intermedio, débil, o negativo se debe basar en su CI50, con relación a CI50 del péptido estándar.

La nomenclatura usada para describir compuestos de péptido sigue la práctica convencional en el que el grupo amino se presenta a la izquierda (el Extremo N) y el grupo carboxilo a la derecha (el extremo C) de cada resto de aminoácido. En las fórmulas, los grupos terminales amino- y carboxilo-, aunque no se muestran específicamente, están en la forma que se asumirían a valores de pH fisiológicos, salvo que se especifique de otra manera. En las formulas de estructura de aminoácido, cada resto está en general representado mediante designaciones convencionales de tres letras o una única letra. La forma L de un resto de aminoácido se representa por una única letra mayúscula o una primera letra mayúscula de un símbolo de tres letras, y la forma D para los aminoácidos que tienen las formas D se representa por una única letra de caja inferior o un símbolo de tres letras de caja inferior. Glicina no tiene átomo de carbono asimétrico y se denomina simplemente como "Gly" o G.

Los péptidos inmunogénicos se pueden preparar de manera sintética, o mediante tecnología de ADN recombinante o partir de fuentes naturales tales como virus enteros o tumores. Aunque el péptido estará sustancialmente libre de otras proteínas de de células huésped de origen natural y sus fragmentos, en algunas realizaciones los péptidos se pueden conjugar de manera sintética a fragmentos o partículas nativas.

Los polipéptidos o péptidos pueden tener una diversidad de longitudes, o bien en sus formas neutras (sin cargar) o en formas que son sales, y o bien sin modificaciones tal como glicosilación, oxidación de cadena lateral, o fosforilación o conteniendo estas modificaciones, sujetos a la condición de que la modificación no destruya la

actividad biológica de los polipéptidos como se describe en el presente documento.

De manera deseable, el péptido será tan pequeño como sea posible mientras que incluso sustancialmente manteniendo toda la actividad biológica del gran péptido. Cuando sea posible, puede ser deseable optimizar péptidos hasta una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 restos de aminoácido, típicamente 9 a 15, y preferiblemente 9 a 10, proporcionado en tamaño con los péptidos virales procesados de manera endógena o péptidos de células tumorales que se unen a moléculas MHC de Clase I en la superficie celular. Los supermotivos preferidos descritos en este documento adecuados para los péptidos de aproximadamente 9 restos de longitud. La identificación de supermotivos, anclajes primarios, y anclajes secundarios para péptidos de otras longitudes (por ejemplo, 8, 10, y 11 restos) se pueden llevar a cabo usando las técnicas descritas en el presente documento.

Los péptidos que tienen la actividad deseada se pueden modificar cuando sea necesario para proporcionar ciertos atributos deseados, por ejemplo, características farmacológicas deseadas, mientras se incrementa o al menos se mantiene sustancialmente toda la actividad biológica del péptido no modificado que se une a la molécula de MHC deseada y activan la célula T apropiada. Por ejemplo, los péptidos pueden estar sujetos a diversos cambios, tales como sustituciones, o bien conservadoras o no conservadoras, donde tales cambios podrían proporcionar ciertas ventajas en su uso, tal como unión de MHC mejorada. Por sustituciones conservadoras se entiende el reemplazo de un resto de aminoácido con otro biológica y / o químicamente similar, por ejemplo, un resto hidrófobo por otro, o un resto polar por otro. Las sustituciones incluyen combinaciones tales como Gly, Ala; Val, Ile, Leu, Met; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; Y Phe, Tyr. El efecto de sustituciones de aminoácidos individuales también se pueden probar usando aminoácidos D. Tales modificaciones se pueden realizar usando procedimientos de síntesis de péptidos bien conocidos, como se describe en por ejemplo, Merrifield, Science 232: 341 - 347 (1986), y Stewart y Young, Solid Phase Peptide Synthesis, (Rockford, Ill., Pierce), 2ª Ed. (1984).

Los péptidos también se pueden modificar mediante extensión o disminución de la secuencia de aminoácidos del compuesto, por ejemplo, mediante la adición o supresión de aminoácidos. Los péptidos o análogos también se pueden modificar alterando el orden o composición de ciertos restos, se apreciará que ciertos restos de aminoácido esencial para la actividad biológica, por ejemplo, aquellos en sitios de contacto crítico o restos conservados, pueden en general no estar alterados sin efecto adverso sobre la actividad biológica. Los aminoácidos no críticos necesitan no estar limitados a aquellos de origen natural en proteínas, tal como α -aminoácidos L, o sus isómeros D, pero pueden incluir aminoácidos no naturales también, tales como β -y- δ -aminoácidos, así como muchos derivados de α -aminoácidos L.

Típicamente, una serie de péptidos con sustituciones de aminoácido individuales se emplean para determinar el efecto de carga electrostática, hidrofobicidad, etc. en la unión. Por ejemplo, una serie de sustituciones de aminoácidos cargados positivamente (por ejemplo, Lys o Arg) o cargados negativamente (por ejemplo, Glu) se preparan a lo largo de la longitud del péptido revelando diferentes patrones de de sensibilidad hacia diversas moléculas MHC y receptores de células T. Además, las sustituciones múltiples usando restos pequeños relativamente neutros, tales como restos Ala, Gly, Pro, o similares se pueden emplear. Las sustituciones pueden ser homo-oligómeros o hetero-oligómeros. El número y tipos de restos que están sustituidos o añadidos depende del espaciado necesario entre puntos de contacto esenciales y ciertos atributos funcionales que se buscan (por ejemplo, hidrofobicidad contra hidrofiliidad). La afinidad de unión incrementada para una molécula de MHC o Receptor de células T también se puede lograr mediante tales sustituciones, comparado con la afinidad del péptido precursor. En cualquier caso, tales sustituciones deben emplear restos de aminoácido u otros fragmentos moleculares elegidos para evitar, por ejemplo, interferencia estérica y de carga que pudiera romper la unión.

Las sustituciones de aminoácido son típicamente de restos individuales. Las sustituciones, supresiones, inserciones o cualquiera de sus combinaciones se pueden combinar para llegar a un péptido final. Las variantes de sustitución son aquellas que en las que al menos un resto de un péptido se ha eliminado y un resto diferente está insertado en su lugar. Tales sustituciones en general se realizan de acuerdo con la siguiente Tabla 1 cuando se desea de manera sutil modular las características del péptido.

TABLA 1

Resto Original	Sustitución ejemplar
Ala	Ser
Arg	Lys, His
Asn	Gln

	Asp	Glu
	Cys	Ser
	Gln	Asn
	Glu	Asp
5	Gly	Pro
	His	Lys; Arg
	Ile	Leu; Val
	Leu	Ile; Val
	Lys	Arg; His
10	Met	Leu; Ile
	Phe	Tyr; Trp
	Ser	Thr
	Thr	Ser
	Trp	Tyr; Phe
15	Tyr	Trp; Phe
	Val	Ile; Leu

Se realizan cambios sustanciales en función (por ejemplo, afinidad para las moléculas MHC o receptores de células T) mediante selección de sustituciones que son menos conservadoras que las de la Tabla 1, es decir, seleccionando restos que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) la estructura de la estructura central de péptido en el área de la sustitución, por ejemplo en forma de una hoja o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que produzcan los cambios mayores en las propiedades del péptido serán aquellas en las que (a) resto hidrófilo, por ejemplo serilo, está sustituido por (o mediante) un resto hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo, o histidilo, se sustituye por (o mediante) un resto electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (c) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye por (o mediante) uno que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina.

Los péptidos también pueden comprender isómeros de dos o más restos en el péptido inmunogénico. Un isómero como se define en este documento es una secuencia de dos o más restos que pueden estar sustituidos por una segunda secuencia debido a que la conformación estérica de la primera secuencia se encaja a un sitio de unión específico para la segunda secuencia. El término específicamente incluye modificaciones de la estructura central de péptido bien conocida por los expertos en la técnica. Tales modificaciones incluyen las modificaciones del nitrógeno de amida gen, el carbono α , carbonilo de amida, reemplazo completo del enlace amida, extensiones, supresiones o reticulaciones de la estructura central. Véase, en general, Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. VII (Weinstein ed., 1983).

Modificaciones de péptidos con diversos miméticos de aminoácido o aminoácidos no naturales son particularmente útiles en el incremento de la estabilidad del péptido in vivo. Estabilidad se puede ensayar de un número de formas. Por ejemplo, peptidasas y diversos medios biológicos, tal como plasma y serum humanos, se han usado para ensayar la estabilidad. Véase, por ejemplo, Verhoef et al., Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin 11: 91 - 302 (1986). La semivida de los péptidos se determina de manera conveniente usando un ensayo de suero humano al 25 % (v/v). El protocolo es en general como sigue. Suero humano combinado (Tipo AB, no inactivador por calor) se deslipida mediante centrifugación antes de uso. El suero después se diluye hasta 25% con medio de cultivo de tejido RPMI y se usó para ensayar la estabilidad del péptido. A intervalos de tiempo predeterminados se retira una pequeña cantidad de solución de reacción y se añade a o bien ácido tricloroacético acuoso al 6% o etanol. Se enfría la muestra de reacción turbia (4°C) durante 15 minutos y después se centrifugó para sedimentar las proteínas de suero precipitadas. La presencia de los péptidos se determina después mediante HPLC de fase inversa usando las

condiciones de cromatografía específicas de estabilidad.

Los péptidos o sus análogos que tienen actividad de estimulación de CTL se puede modificar para proporcionar los atributos deseados diferentes de la semivida de suero mejorado. Por ejemplo, la capacidad de los péptidos para inducir la actividad de CTL se pueden potenciar mediante la unión a una secuencia que contiene al menos un epítipo que es capaz de inducir una respuesta de células auxiliares T. Particularmente los conjugados de péptidos inmunogénicos /conjugados auxiliares preferidos están unidos por una molécula espaciadora. El espaciador típicamente comprende moléculas, relativamente neutras, tales como aminoácidos o miméticos de aminoácido, que están sustancialmente no cargados en condiciones fisiológicas. Los espaciadores están típicamente seleccionados entre, por ejemplo, Ala, Gly, u otros espaciadores neutros de aminoácidos no polares o aminoácidos polares neutros. Se entenderá que el espaciador opcionalmente presente necesita no estar comprendido por los mismos restos y de este modo puede ser un hetero- u homo-oligómero. Cuando está presente, el espaciador será usualmente de al menos uno o dos restos, más usualmente tres a seis restos. Como alternativa, el péptido de CTL puede estar unido al péptido auxiliar T sin un espaciador.

El péptido inmunogénico se pueden ligar al péptido auxiliar T o bien directamente o mediante un espaciador o bien mediante en el extremo amino o carboxi del péptido CTL. El extremo amino de o bien el péptido inmunogénico o el péptido auxiliar T puede estar acilado. Los péptidos auxiliares T usados se pueden modificar de la misma manera que los péptidos CTL. Por ejemplo, se pueden modificar para que incluyan aminoácidos D o conjugarse a otras moléculas tales como lípidos, proteínas, azúcares y similares. Los péptidos auxiliares T ejemplares incluyen toxoide de tétanos 830 - 843, influenza 307 - 319, malaria circumsporozoita 382 - 398 y 378 - 389.

Como alternativa, el péptido auxiliar T es uno que está reconocido por las células auxiliares T en la mayoría de la población. Esto se puede llevar a cabo mediante la selección de secuencias de aminoácidos que se unen a muchos la mayoría, o todas las moléculas de la clase II de MHC. Éstas son conocidas como secuencias auxiliares T "débilmente restringidas de MHC-" o "promiscuas". Ejemplos de secuencias de aminoácidos que son promiscuas incluyen secuencias de antígenos tal como toxina de Tétanos en las posiciones 830 - 843 (QYIKANSKFIGITE), Proteína de *Plasmodium falciparum* CS en las posiciones 378 - 398 (DIEKKIAKMEKASSVFNVVNS), y proteína de *Streptococcus* de 18kD en las posiciones 1 - 16 (GAVDSILGGVATYGAA).

Como alternativa, es posible preparar péptidos sintéticos capaces de estimular linfocitos auxiliares T, de una manera flojamente restringida de MHC, usando secuencias de aminoácidos no encontrados en la naturaleza (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 95/07707). Estos compuestos sintéticos llamados epítipo de unión de Pan-DR (PADRE) se diseñan en base a su actividad de unión a la mayoría, de las moléculas HLA-DR (clase II de MHC humana). Por ejemplo, un péptido que tiene la formula: aKXVWANTLKAAa, donde X = ciclohexilalanina, fenilalanina, o tirosina, y a = D-alanina o L-alanina, no se ha encontrado que se una a la mayoría de los alelos de HLA-DR, y estimular la respuesta de linfocitos auxiliares T de la mayoría de los individuos, independientemente de su tipo de HLA. Los epítopos auxiliares T se pueden modificar para incrementar su efecto biológico. Por ejemplo, epítopos auxiliares T que presentan péptidos pueden contener aminoácidos D para incrementar su resistencia a las proteasas y de este modo ampliar su semivida en suero. También, los péptidos auxiliares T se pueden conjugar a otras moléculas tales como lípidos, proteínas o azúcares, o cualquier otro compuesto sintético, para incrementar su actividad biológica. Específicamente, el péptido auxiliar T se puede conjugar a una o más cadenas de ácido palmítico en cualquiera de los extremos amino o carboxilo.

En algunas realizaciones puede ser deseable incluir en las composiciones farmacéuticas al menos un componente que ceba CTL. Lípidos se han identificado como agentes capaces de cebar CTL *in vivo* contra antígenos virales. Por ejemplo, restos de ácido palmítico se pueden unir a los grupos amino alfa y epsilon de un resto Lys y después ligarse, por ejemplo, mediante uno o más restos de unión tales como Gly, Gly-Gly-, Ser, Ser-Ser, o similares, a un péptido inmunogénico. El péptido lipidado se puede después inyectar directamente en una forma micelar, incorporarse en un liposoma o emulsionarse en un adyuvante, por ejemplo, adyuvante de Freund incompleto. En una realización preferida un inmunógeno particularmente eficaz comprende ácido palmítico unido a grupos amino alfa y epsilon de Lys, que está unido mediante enlace, por ejemplo, Ser-Ser, el extremo amino del péptido inmunogénico.

Como otro ejemplo de cebado de lípido de respuestas de CTL, lipoproteínas de *E. coli*, tal como tripalmitoil-S-glicerilcisteiniseril-serina (P₃CSS) I se puede usar para cebar CTL específico de virus cuando se une covalentemente a un péptido apropiado. Véase, Deres et al., Nature 342:561 - 564 (1989). Los péptidos se pueden acoplar a P₃CSS, por ejemplo, y administrarse el lipopéptido a un individuo para cebar de manera específica una respuesta de CTL al antígeno Diana. Además, ya que la inducción de la neutralización de anticuerpos también se puede cebar con P₃CSS conjugado a un péptido que muestra un epítipo apropiado, las dos composiciones se pueden combinar para inducir más eficazmente tanto respuesta humoral como mediada por células a infección.

Además, se pueden añadir aminoácidos adicionales a los extremos de un péptido para proporcionar la facilidad de

unión de péptidos entre sí, para acoplamiento a un soporte vehículo o péptido mayor, para modificar las propiedades físicas o químicas del péptido u oligopéptido, o similares. Los aminoácidos tales como tirosina, cisteína, lisina, ácido glutámico o aspártico, o similares, se pueden introducir en el extremo C- o N del péptido u oligopéptido. La modificación en el extremo C en algunos casos puede alterar las características de unión del péptido. Además, las secuencias de péptido u oligopéptido pueden diferir de la secuencia natural modificándose mediante acilación NH₂ terminal, por ejemplo, por alcanilo (C₁-C₂₀) o acetilación por tioglicolilo, amidación carboxilo terminal, por ejemplo, amoníaco, metilamina, etc. En algunos casos estas modificaciones pueden proporcionar sitios para la unión a un soporte u otra molécula.

Los péptidos se pueden preparar en una amplia diversidad de formas. Debido a su tamaño relativamente corto, los péptidos se pueden sintetizar en solución o sobre un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Están comercialmente disponibles diversos sintetizadores automáticos y se pueden usar de acuerdo con protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Stewart y Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2^a. ed., Pierce Chemical Co. (1984), supra.

Como alternativa, se puede emplear tecnología de ADN recombinante en la que una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido inmunogénico de interés se inserta en un vector de expresión, transformado o transfectado en una célula huésped apropiada y se cultiva en condiciones adecuadas para expresión. Estos procedimientos son en general conocidos en la técnica, como se describe en general en Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1982). De este modo, se pueden usar proteínas de fusión que comprenden una o más secuencias de péptido descritas para presentar el epítipo de células T.

Ya que la secuencia de codificación de péptidos de la longitud contemplada en el presente documento se puede sintetizar mediante técnicas químicas, por ejemplo, en procedimiento fosfotriéster de Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 103:3185 (1981), la modificación se puede realizar simplemente mediante sustitución de la (s) base (s) apropiada (s) por las que codifican la secuencia de péptidos. La secuencia de codificación después se puede proporcionar con engarces apropiados y ligarse en vectores de expresión disponibles de manera común en la técnica, y los vectores usados para transformar huéspedes adecuados para producir la proteína de fusión. Están ahora disponibles un número de tales vectores y sistemas de huéspedes adecuados. Para la expresión de proteínas de fusión, la secuencia de codificación se proporcionará con codones de inicio y parada unidos de manera operativa, regiones promotoras y de terminación y usualmente un sistema de replicación para proporcionar un vector de expresión para la expresión en el huésped celular deseado. Por ejemplo, secuencias promotoras compatibles con huéspedes bacterianos se proporcionan en plásmidos que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de la secuencia de codificación deseada. Los vectores de expresión resultantes transformados en huéspedes bacterianos adecuados. De hecho, también se pueden usar huéspedes de levaduras o células de mamífero, empleando vectores adecuados y secuencias de control.

Los péptidos y composiciones farmacéuticas y de vacunas mencionadas en el presente documento son útiles para la administración a mamíferos, particularmente seres humanos, para tratar y / o prevenir la infección viral y cáncer. Ejemplos de enfermedades que se pueden tratar usando los péptidos inmunogénicos incluyen cáncer de próstata, hepatitis B, hepatitis C, SIDA, carcinoma renal, carcinoma cervical, linfoma, CMV y condiloma acuminatum. Además, los péptidos se pueden usar para tratar cualquier número de enfermedades infecciosas, tales como infecciones virales, fúngicas, y parásitas. Los antígenos adecuados se describen, por ejemplo, en el documento WO 94/20127 y WO 94/03205.

Como se ha indicado anteriormente, los péptidos inducen respuestas inmunes de CTL cuando se ponen en contacto con un CTL específico para un epítipo en el péptido. La manera en la que el péptido se pone en contacto con el CTL no es crítica, sin embargo. Por ejemplo, el péptido se puede poner en contacto con el CTL o bien *in vivo* o *in vitro*. Si el contacto se produce *in vivo*, el propio péptido se puede administrar al paciente u otros vehículos (por ejemplo, se pueden usar vectores de ADN que codifican uno o más péptidos, vectores virales que codifican los péptidos, liposomas y similares), como se describe más adelante.

Para las composiciones farmacéuticas, los péptidos inmunogénicos, o ADN que los codifican, se administran a un individuo que ya sufre cáncer o infectado con el patógeno de interés. Los péptidos o ADN que los codifican se pueden administrar de manera individual o en forma de fusiones de una o más de las secuencias de péptidos descritas en este documento. Aquellos en la fase de incubación o la fase aguda de infección se pueden tratar con los péptidos inmunogénicos de manera separada o conjuntamente con otros tratamientos, según sea apropiado. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente en una cantidad suficiente para inducir una respuesta de CTL eficaz para el virus o antígeno de tumor y para curar al menos detener parcialmente los síntomas y / o complicaciones. Una cantidad adecuada para llevar a cabo esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz." Cantidades eficaces para este uso dependerán, por ejemplo, de la composición particular administrada, la manera de administración, la fase y gravedad de la enfermedad que se está tratando, el

peso y estado general de salud del paciente, y el juicio del médico que prescribe, pero en general varían para la inmunización inicial (esto es para la administración terapéutica o profiláctica) entre aproximadamente 1,0 µg a aproximadamente 5000 µg de péptido para un paciente de 70 kg, seguido de dosificaciones de refuerzo entre aproximadamente 1,0 µg a aproximadamente 1000 µg de péptido consiguiendo a un régimen de refuerzo durante semanas a meses dependiendo de la respuesta y condición del paciente mediante medición de la actividad de CTL específica en la sangre del paciente. Se debe tener en cuenta que los péptidos y composiciones descritos pueden en general emplearse en estados patológicos graves, esto es, situaciones que amenazan la vida o potencialmente que amenazan la vida. En tales casos, en vista de la minimización de sustancias extrañas y la naturaleza no tóxica relativa de los péptidos, es posible y puede ser deseable por el médico de tratamiento administrar excesos sustanciales de estas composiciones de péptido.

Para uso terapéutico, la administración debe comenzar en el primer signo de infección viral o la detección o eliminación quirúrgica de tumores o en breve tiempo después de diagnóstico en el caso de infección aguda. A esto sigue las dosis de refuerzo hasta que al menos los síntomas están sustancialmente disminuidos y durante un período después de esto. En la infección crónica, se pueden requerir dosis de carga seguidas de dosis de refuerzo.

El tratamiento de un individuo infectado con las composiciones descritas en el presente documento pueden precipitar la resolución de la infección en individuos infectados de manera aguda. Para los individuos susceptibles (o predispuestos) para desarrollar infección crónica las composiciones son particularmente útiles en los procedimientos para evitar la evolución de la infección aguda a crónica. Cuando los individuos susceptibles se identifican antes o durante la infección, por ejemplo, como se describe en el presente documento, la composición se puede dirigir a ellos, minimizando la necesidad de administración a una población mayor.

El péptido u otras composiciones también se puede usar para el tratamiento de infección crónica y para estimular el sistema inmune para eliminar las células infectadas por patógeno en vehículos. Es importante proporcionar una cantidad de péptido inmuno potenciado en una formulación y modo de administración suficiente para estimular de manera eficaz una respuesta de células T citotóxicas. De este modo, para el tratamiento de infección crónica, una dosis representativa está en el intervalo de aproximadamente 1,0 µg a aproximadamente 5000 µg, preferiblemente aproximadamente 5 µg a 1000 µg para un paciente de 70 kg por dosis. Las dosis de inmunización seguido de las dosis de refuerzo a intervalos establecidos, por ejemplo, se puede requerir entre una y cuatro semanas, posiblemente durante un período de tiempo prolongado para inmunizar de manera eficaz a un individuo. En el caso de infección crónica, administración debe continuar hasta que al menos los ensayos de síntomas clínicos o de laboratorio indican que la infección viral se ha eliminado o sustancialmente disminuido y durante un período después de esto.

Las composiciones farmacéuticas para tratamiento terapéutico se pretenden para administración parenteral, tópica, oral o local. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intradérmica, o intramuscular. De este modo se describen en el presente documento las composiciones para administración parenteral que comprenden una solución de los péptidos inmunogénicos disueltos o suspendidos en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Se puede usar una diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,8%, glicina al 0,3%, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización bien conocidas en la técnica, o se pueden esterilizar por filtración. Las soluciones acuosas resultante se pueden empaquetar para uso como está, o liofilizarse, estando la preparación liofilizada combinada con una solución estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para las condiciones fisiológicas apropiadas, tales como ajuste de pH y agentes de tamponación, agentes de ajuste de tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina, etc.

La concentración de péptidos estimuladores de CTL en las formulaciones farmacéuticas pueden variar de manera amplia, es decir, entre menos de aproximadamente 0,1%, usualmente en o al menos aproximadamente 2% hasta como mucho 20% a 50% o más en peso, y se seleccionará principalmente mediante volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con la forma particular de administración seleccionada.

Los péptidos también se pueden administrar mediante liposomas, que sirven para dirigir los péptidos a un tejido particular, tal como tejido linfático, o dirigido de manera selectiva a células infectadas, así como para incrementar la semivida de la composición del péptido. Liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monolamellares insolubles, cristales líquidos, dispersiones de fosfolípidos, capas lamelares y similares. En estas preparaciones el péptido a administrar se incorpora como parte de un liposoma, sólo o junto con una molécula que se une a, por ejemplo, un receptor prevalente entre células linfoides, tales como anticuerpos monoclonales que se unen al antígeno CD45, o con otras composiciones terapéuticas o inmunogénicas. De este modo, liposomas o bien

cargados o decorados con un péptido deseado se puede dirigir al sitio de células linfoides, donde los liposomas se administran después a composiciones de péptido seleccionadas terapéuticas/inmunogénicas. Los liposomas se forman a partir de lípidos formadores de vesículas estándar, que en general incluyen fosfolípidos neutros y cargados negativamente y un estero, tal como colesterol. La selección de lípidos en general se guía por una consideración de, por ejemplo, tamaño de liposoma, labilidad del ácido y estabilidad de los liposomas en el torrente sanguíneo. Una diversidad de procedimientos están disponibles para preparar liposomas, como se describe en por ejemplo, Szoka et al., An. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980), Patentes de Estados Unidos números. 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028, y 5.019.369.

Para la dirección a las células inmunes, un ligando a incorporar en el liposoma puede incluir, por ejemplo, anticuerpos o sus fragmentos específicos para los determinantes de la superficie celular de las células del sistema inmune deseadas. Se puede administrar una suspensión de liposomas que contiene un péptido por vía intravenosa, local, tópica, etc. en una dosis que varía de acuerdo con, entre otros, la manera de administración, el péptido que se está administrando, y la fase de la enfermedad que se está tratando.

Para las composiciones sólidas, se pueden usar vehículos sólidos no tóxicos convencionales que incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares. Para la administración oral, una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable formada mediante la incorporación de cualquiera de los excipientes empleados, tales como los vehículos enumerados anteriormente, y en general 10 - 95% de ingrediente activo, esto es, uno o más péptidos, y más preferiblemente a una concentración de 25% - 75%.

Para la administración de aerosol, los péptidos inmunogénicos se suministran preferiblemente en forma finamente dividida junto con un tensioactivo y propulsor. Los porcentajes típicos de péptidos son 0,01 % - 20 % en peso, preferiblemente 1 % - 10 %. El tensioactivo debe ser, de hecho, no tóxico, y preferiblemente soluble en el propulsor. Los representantes de tales agentes son los esters o esters parciales de ácidos grasos que contienen entre 6 y 22 átomos de carbono, tales como ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linolénico, olestérico y oleico con un alcohol polihidroxílico alifático o su anhídrido cíclico. Se pueden emplear ésteres mixtos, tales como glicéridos mixtos o naturales. El tensioactivo puede constituir 0,1%-20% en peso de la composición, preferiblemente 0,25 - 5%. El equilibrio de la composición es de manera ordinaria propulsor. También se puede incluir un vehículo, según se desee, como con, por ejemplo, lecitina para administración intranasal.

También existe referencia en el presente documento a vacunas que contienen como ingrediente activo una cantidad inmunogénicamente eficaz de uno o más péptidos inmunogénicos como se describe en el presente documento. El (los) péptido (s) se puede (n) introducir en un huésped, que incluye seres humanos, ligado (s) a su propio vehículo o como un homopolímero o heteropolímero de unidades de péptido activo. Tal polímero tiene la ventaja de aumento de la reacción inmunológica y, cuando se usan péptidos diferentes para la formación del polímero, la capacidad adicional de inducir anticuerpos y / o los CTL que reaccionan con diferentes determinantes antigénicos del virus o células tumorales. Los vehículos útiles son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, tiroglobulina, albúminas tales como albúmina sérica humana, toxoide de tétanos, poliaminoácidos tales como poli(ácido lisina:glutámico); influenza, proteína del núcleo de virus de hepatitis B, vacuna recombinante de virus de hepatitis B y similares. Las vacunas también pueden contener un diluyente fisiológicamente tolerable (aceptable) tales como agua, solución salina tamponada con fosfato, o solución salina, y además típicamente incluyen un adyuvante. Adyuvantes tales como adyuvante de Freund incompleto, fosfato de aluminio, o alumbre son conocidos en la técnica Y, como se ha mencionado anteriormente, respuestas de CTL se puede cebar mediante la conjugación de péptidos a lípidos, tal como P₃CSS. Tras la inmunización con una composición de péptido como se describe en el presente documento, mediante inyección, aerosol, oral, transdérmica u otra vía, el sistema inmune del huésped responde a la vacuna mediante la producción de grandes cantidades de los CTL específicos para el antígeno deseados, y el huésped se vuelve al menos parcialmente inmune a una posterior infección, o resistente al desarrollo de infección clínica.

Las composiciones de vacuna que contienen los péptidos se administran a un paciente susceptible a o de otra manera en riesgo de infección viral o cáncer para inducir una respuesta inmune contra el antígeno y de este modo potencian las capacidades de la respuesta inmune del propio paciente. Tal cantidad se define para que sea una "dosis inmunogénicamente eficaz." En este uso, las cantidades precisas del mismo modo dependen del estado de salud y peso del paciente, la forma de administración, la naturaleza de la formulación, etc., pero en general varían entre aproximadamente 1,0 µg y aproximadamente 5000 µg por paciente de 70 kilogramos, más comúnmente entre aproximadamente 10 µg y aproximadamente 500 µg mg por 70 kg de peso corporal.

En algunos casos puede ser deseable combinar las vacunas de péptido descritas en el presente documento, con vacunas que inducen respuestas de anticuerpos neutralizantes al virus de interés, particularmente a antígenos de envuelta viral.

Para los propósitos terapéuticos o de inmunización, los péptidos también se pueden expresar mediante huéspedes virales atenuados, tales como vaccinia o viruela aviar. Este planteamiento implica el uso de virus vaccinia como un vector que expresa secuencias de nucleótidos que codifican los péptidos. Tras la introducción en un huésped infectado intensamente o crónicamente o en un huésped no infectado, el virus vaccinia recombinante expresa el péptido inmunogénico, y por lo tanto induce una respuesta de CTL en el huésped. Los vectores de Vaccinia vectores y procedimientos útiles en los protocolos de inmunización se describen en, por ejemplo, Patente de Estados Unidos nº 4.722.848. Otro vector es BCG (Bacille Calmette Guérin). Los vectores BCG se describen en Stover et al. (Nature 351:456 - 460 (1991)). Una amplia diversidad de otros vectores útiles para la administración terapéutica o inmunización de los péptidos de la invención, por ejemplo, vectores de Salmonella Typhi y similares, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción en el presente documento.

También se pueden usar péptidos antigénicos para inducir CTL *ex vivo*. El CTL resultante, se puede usar para tratar infecciones crónicas (virales o bacterianas) o tumores en pacientes que no responden a otras formas convencionales de terapia, o no responderán a un planteamiento de vacuna de péptido de terapia. Las respuestas de CTL *ex vivo* a un patógeno particular (agente infeccioso o antígeno tumoral) se inducen mediante la incubación en cultivo de tejidos de las células precursoras CTL del paciente (CTLp) conjuntamente con una fuente de células que presentan antígeno (APC) y el péptido inmunogénico apropiado. Después de un tiempo de incubación apropiado (típicamente 1 - 4 semanas), en el que las CTLp se activan y maduran y expanden dentro del CTL efector, las células se vuelven a infundir en el paciente, donde destruirán su célula diana específica (una célula infectada o una célula tumoral).

El ADN que codifica uno o más de los péptidos también se pueden administrar al paciente. Este planteamiento se describe, por ejemplo, en Wolff et. al., Science 247: 1465 - 1468 (1990) así como en las Patentes de Estados Unidos números 5.580.859 y 5.589.466.

Un medio preferido de administración de ácidos nucleicos que codifican los péptidos usa construcciones de minigen que codifican epítopes múltiples. Para crear una secuencia de ADN que codifica los epítopes de CTL seleccionados (minigen) para la expresión en células humanas, las secuencias de aminoácidos de los epítopes se traducen de manera inversa. Una tabla de uso de codón humano se usa para guiar la elección de codón para cada aminoácido. Estas secuencias de ADN que codifican epítopes se juntan directamente, creando una secuencia de polipéptidos continua. Para optimizar la expresión y / o inmunogenicidad, elementos adicionales se pueden incorporar en el diseño del minigen. Ejemplos de secuencia de aminoácidos que se pueden traducir de manera inversa e incluir en la secuencia de minigen incluyen: epítopes de linfocitos T auxiliares, una secuencia guía (señal), y una señal de retención de retículo endoplásmico. Además, la presentación de MHC de epítopes de CTL se pueden mejorar mediante la inclusión de secuencias que flanquean sintéticas (por ejemplo, poli-alanina) o de origen natural adyacentes a los epítopes CTL.

La secuencia de minigen se convierte a ADN mediante ensamblaje de oligonucleótidos que codifican las hebras más y menos del minigen. Los oligonucleótidos de superposición (30 - 100 bases de longitud) se sintetizan, fosforilan purifican y se hibridizan en condiciones apropiadas usando técnicas bien conocidas, los extremos de los oligonucleótidos se juntan usando ligasa de ADN de T4. Este minigen sintético, que codifica el polipéptido de epítope de CTL, se puede después clonar en un vector de expresión deseado.

Las secuencias reguladoras convencionales son bien conocidas por los expertos en la técnica se incluyen en el vector para asegurar la expresión en las células diana. Se requieren varios elementos de vector: un promotor con un sitio de clonación cadena abajo para la inserción del minigen; una señal poliadenilación para la terminación de la transcripción; un origen de *E. coli* de replicación; y un marcador seleccionable de *E. coli* (por ejemplo, resistencia a ampicilina o kanamicina). Se pueden usar numerosos promotores para este propósito, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus humano (hCMV). Véanse, Patentes de Estados Unidos números 5.580.859 y 5.589.466 para otras secuencias promotoras adecuadas.

Pueden ser deseables modificaciones de vectores adicionales para optimizar la expresión del minigen e inmunogenicidad. En algunos casos, se requieren intrones para la expresión génica eficaz, y uno o más intrones sintéticos o de origen natural se podrían incorporar en la región transcrita del minigen. La inclusión de las secuencias de estabilización de ARNm se puede considerar para la expresión del minigen. Se ha propuesto recientemente que las secuencias inmunoestimuladoras (ISSs o CpGs) juegan un papel en la inmunogenicidad de vacunas e ADN. Estas secuencias se podrían incluir en el vector, fuera de la secuencia de codificación del minigen, sin se encuentra para potenciar la inmunogenicidad.

En algunas realizaciones, se puede usar un vector de expresión bicistrónico, que permite la producción de los epítopes codificados por minigen y una segunda proteína incluida para potenciar o disminuir la inmunogenicidad. Los ejemplos de proteínas o polipéptidos que pueden potenciar de manera beneficiosa la respuesta inmune si se coexpresa incluyen citocinas (por ejemplo, IL2, IL12, GM-CSF), moléculas que inducen citocinas (por ejemplo,

LeIF) o moléculas coestimuladoras. Los epítopes auxiliares (HTL) se pueden unir a señales de dirección y expresarse de manera que se pare a partir de los epítopes CTL. Esto permitiría la dirección de los epítopes HTL a un compartimiento de células diferente de los epítopes CTL. Si se requiere, esto podría facilitar de manera más eficaz la entrada de los epítopes HTL en la ruta MHC clase II, por lo tanto mejorando la inducción de CTL. Al contrario a la inducción de CTL, que específicamente disminuye la respuesta inmune mediante la coexpresión de las moléculas inmunosupresoras (por ejemplo, TGF- β) pueden ser beneficiosas en ciertas enfermedades.

Una vez que se selecciona un vector de expresión, el minigen se clona en la región poliengarce cadena abajo del promotor. Este plásmido se transforma en una cepa apropiada de *E. coli*, y se prepara ADN usando técnicas convencionales. La orientación y secuencia de ADN del minigen, así como otros elementos incluidos en el vector, se confirman usando mapeado de restricción y análisis de secuencia de ADN. Se pueden almacenar las células bacterianas que albergan el plásmido correcto como un banco de células maestro y un banco de células de trabajo.

Se producen cantidades terapéuticas de ADN de plásmido por fermentación en *E. coli*, seguido de purificación. Alícuotas del banco de células de trabajo se usan para inocular el medio de fermentación (tal como caldo Terrific), y se hacen crecer hasta saturación en matraces de agitación o un biorreactor de acuerdo con técnicas bien conocidas. ADN de plásmido se puede purificar usando tecnologías de bioseparación convencionales tales como resinas de intercambio iónico de fase sólida suministradas por Qiagen. Si se requiere se puede aislar ADN a partir de las formas abiertas circulares y lineales usando electroforesis en gel u otros procedimientos.

Se puede preparar ADN de plásmido purificado para inyección usando una diversidad de formulaciones. La más sencilla de éstas es la reconstitución de ADN liofilizado en solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril. Este planteamiento conocido como "ADN desnudo," se está usando actualmente para administración intramuscular (IM) en ensayos clínicos. Para maximizar los efectos terapéuticos de las vacunas de ADN de minigen, puede ser deseable un procedimiento alternativo para la formulación de ADN de plásmido purificado. Se han descrito una diversidad de procedimientos, y nuevas técnicas pueden llegar a estar disponibles. También se pueden usar lípidos catiónicos en la formulación (véase, por ejemplo, como se describe por Debs y Zhu (1993) documento WO 93/24640; Mannino y Gould-Fogerite (1988) Bio-Techniques 6 (7): 682 - 691; Rose Patente de Estados Unidos Nº 5.279.833; Brigham (1991) documento WO 91/06309; y Felgner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 - 7414). Además, también se pueden formar complejos de glicolípidos, liposomas fusogénicos, péptidos y y compuestos denominados colectivamente como protectores, interactivos, no condensadores (PINC) para purificar ADN de plásmido para influenciar variables tales como estabilidad, dispersión intramuscular, o tráfico a órganos específicos o tipos de células.

Los ácidos nucleicos también se pueden administrar usando distribución balística como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos número. 5.204.253. Se pueden administrar partículas comprendidas únicamente por ADN. Como alternativa, ADN se puede adherir a partículas, tales como partículas de oro.

Se puede usar sensibilización de células Diana como un ensayo funcional para la expresión y presentación de la clase I MHC clase I de epítopes de CTL codificados por minigen. El ADN de plásmido se introduce en una línea celular de mamíferos que es adecuada como una diana para ensayos de liberación de cromógeno de CTL convencionales. El procedimiento de transfección usado dependerá de la formulación final. Se puede usar electroporación para ADN "desnudo", mientras que los lípidos catiónicos permiten la transfección directa *in vitro*. Se puede cotransfectar un plásmido que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) para permitir el enriquecimiento de células transfectadas usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Estas células se marcan después con cromógeno-51 labeled y se usó como células diana para las líneas de CTL específicas de epítopes. La citotoxicidad detectada por la liberación de ^{51}Cr , indica la producción de presentación de MHC de los epítopes de CTL codificados por minigen.

La inmunogenicidad *in vivo* es un Segundo planteamiento para el ensayo funcional de las formulaciones de ADN de minigen. Ratones transgénicos que expresan moléculas MHC apropiadas humanas se inmunizan con el producto de ADN. La dosis y vía de administración dependen de la formulación (por ejemplo, IM para ADN en PBS, IP para ADN complejo a lípidos). Veintiún días después de la inmunización, se recogen los esplenocitos y se vuelven a estimular durante una semana en la presencia de péptidos que que codifican cada epítipo que se está ensayando. Estas células efectoras (CTL) se ensayan para determinar la citotoxicidad de células diana cargadas con péptido, marcadas con cromógeno-51 usando técnicas convencionales. Lisis de células diana sensibilizadas por carga de MHC de péptidos correspondientes a epítopes codificados por minigen muestran la función de vacuna de ADN para la inducción *in vivo* de los CTL.

Los péptidos también pueden encontrar uso como reactivos diagnósticos. Por ejemplo, un péptido se puede usar para determinar la susceptibilidad de un individuo particular a un régimen de tratamiento que emplea el péptido o péptidos relacionados, y de este modo puede ser útil en la modificación de un protocolo de tratamiento existente o en la determinación de una prognosis para un individuo afectado. Además, los péptidos también se

pueden usar para predecir qué individuos estarán en riesgo sustancial de desarrollar infección crónica.

Ejemplo 1

Unión de supertipo de tipo A3

- 5 Este ejemplo proporciona motivos refinados para cada uno de los alelos de tipo A3 A3, A11, A*3101, A*3301, y A*6801, esquematizando las especificidades de unión a anclaje secundarias. Los motivos se derivaron por cálculo en cada posición de no anclaje a lo largo de la secuencia de péptidos el promedio relativo a la capacidad de unión de péptidos que llevan cada uno de los 20 aminoácidos comunes, agrupados de acuerdo a similitudes químicas individuales.

Materiales and Procedimientos

- 10 ***Purificación de la Clase I.*** Se usaron las siguientes líneas homocigóticas transformadas por virus Epstein-Barr (EBV) como fuentes de moléculas de clase I: GM3107 (A3, B7; Reposición Mutante Genética Humana); BVR (A11, B35.3, Cw4; Reposición Mutante Genética Humana); SPACH (A31, B62, Cw1/3; ASHI Colección de reposición); y LWAGS (A*3301, B14, Cw8; ASHI Colección de reposición) (Bodmer, et al., Hum Immunol 43:149 (1995)). Un transfectante C1R caracterizado por Dr. Walter Storkus (Universidad de Pittsburgh) se usó para el aislamiento de A*6801. Se mantuvieron las líneas celulares como se ha descrito previamente (Sidney, et al., J Immunol 154:2 47 (1995); Sette, et al., Mol Immunol 31: 813 (1994)).

- 20 Se prepararon lisados celulares y se purificaron las moléculas de la clase I como se ha descrito previamente (Sidney, et al., J Immunol 154: 247 (1995); Sette, et al., Mol Immunol 31:813 (1994)). En resumen, se lisaron las células a una concentración de 10^8 células/ml en 50 mM Tris-HCL, pH 8,5, que contenía 1% NP-40 (Fluka Biochemika, Buchs, Suiza), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, y 2 mM PMSF. Los lisados se pasaron a través de filtros de 0,45 μ M y se eliminaron los núcleos y desechos mediante centrifugación a 10.000 g durante 20 minutos. Se purificaron después las moléculas de complejo de histocompatibilidad principales (MHC) mediante cromatografía. Columnas de Sefarosa CL4B y Proteína A Sefarosa inactivadas se usaron como precolumnas. El lisado celular se empobreció de moléculas HLA-B y HLA-C mediante pase repetido de perlas de Proteína A Sefarosa conjugadas con el anticuerpo anti-HLA(B,C) B1.23.2 (Rebai, et al., Tissue Antigens 22: 107 (1983)). Típicamente dos a cuatro pases se requirieron para el empobrecimiento completo. Posteriormente, el anticuerpo anti HLA(A,B,C) W6/32 (Barnstable, et al., Cell 14:9 (1978)) se usó para capturar moléculas HLA-A. Se controló la pureza, concentración, y eficacia de las etapas de empobrecimiento de proteína por electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico - poliacrilamida (SDS-PAGE).

- 30 ***Ensayos de unión y definición de supermotivo.*** Se realizaron ensayos cuantitativos para evaluar la unión de péptidos a moléculas de la clase I solubles en la base de la inhibición de unión de péptido de sonda marcado estándar a moléculas MHC solubilizadas detergentes como se ha descrito previamente (Kubo, et al., J Immunol 152: 3913 (1994); Kast, et al., J Immunol 152: 3904 (1994); Sidney, et al., J Immunol 154: 247 (1995); Sette, et al., Mol Immunol 31:813 (1994); Ruppert, et al., Cell 74:929 (1993)). En resumen, 1-10 nM de péptido de sonda radiomarcado, yodado por el procedimiento Chloramine T (Greenwood, et al., Biochem J 89:114 (1963)), se incubaron conjuntamente a temperatura ambiente con diversas cantidades de MHC en la presencia de 1 μ M β -microglobulina humana (Scripps Laboratories, San Diego, CA, Estados Unidos) y un cóctel de inhibidores de proteasa. Al final de período de 2 días de incubación, se determinó el porcentaje de radiactividad unida a MHC mediante cromatografía de filtración en gel por exclusión de tamaño sobre una columna TSK 2000.

- 40 El péptido A3CON1 (secuencia KVFPYALINK) (Kubo, et al., J Immunol 152:3913 (1994)) se usó como la sonda radiomarcada para los ensayos de A3, A11, A31, y A*6801. Un análogo T₇ $\rightarrow$ Y de HBVc 141-151 (secuencia STLPETYVVR) (Missale, et al., J Exp Med 177:751 (1993)) se usó como la sonda radiomarcada para el ensayo de A*3301. En el caso de ensayos competitivos, se calculó la concentración de péptido que produce 50% de inhibición de la unión del péptido de sonda radiomarcado (CI50). Péptidos se ensayaron usualmente a una o dos dosis altas, y la CI50 de los péptidos que producen inhibición positiva se determinaron en experimentos posteriores, en los que se ensayaron dos a seis diluciones adicionales, según fuera necesario. Concentraciones de MHC que producen aproximadamente 15% de unión del péptido de sonda radiomarcado se usaron para todos los ensayos de unión competitiva. Debido a que en estas condiciones (mqrca) < (MHC) y CI50 > (MHC), las CI50 medidas son aproximaciones razonables de los valores verdaderos de kD. Cada péptido competidor se ensayó en dos a cuatro experimentos completamente independientes. Como control positivo, en cada experimento se ensayó la versión no marcada de la sonda radiomarcada relevante y se midió su CI50. Las medias de los valores de las CI50 de A3CON1 para los ensayos de A3, A11, A31, y A*6801 eran 11, 6, 18, y 8 nM, respectivamente. La media de average CI50 de péptido eh HBVc 141-151 en el ensayo A*3301 era 29 nM.

Definición de motivos de anclaje secundarios específicos de HLA-A Se usó una modificación del procedimiento

usado por Ruppert et al (Ruppert, et al., Cell 74:929 (1993)) para definir los motivos de anclaje secundarios A*0201. En resumen, los motivos de anclaje secundarios específicos de alelo se definieron mediante asignación del efecto sobre la unión de HLA de los 20 aminoácidos de origen común en cada posición de no anclaje de las secuencias de 9-mer. Se realizaron determinaciones mediante el cálculo de los valores medios de unión relativa para cada combinación posición-aminoácido (por ejemplo, posición 1, alanina; posición 2, alanina, etc.). Para superar los problemas de la baja aparición de ciertos aminoácidos, se agruparon algunos restos con otros de naturaleza similar como se ha descrito previamente (Ruppert, et al., Cell 74:929 (1993)). Tipos de restos asociados a una posición particular con capacidades de unión promedio de cuatro veces mayor (o menor) que la capacidad de unión promedio total del establecimiento de 200 péptidos entero se consideraron asociados a con buena (o escasa) capacidad de unión.

Síntesis de Péptido. Se sintetizaron péptidos o bien sintetizados como se ha descrito previamente (Ruppert, et al., Cell 74:929 (1993)), o comprados como material en bruto de Chiron Mimotopes (Chiron Corp., Australia). Los péptidos sintetizados se purificaron hasta > 95% de homogeneidad por cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (HPLC). La pureza de estos péptidos sintéticos se ensayo en una columna de fase inversa analítica y se determino su composición mediante análisis de aminoácido, secuenciación, y / o análisis de espectrometría de masa.

Cálculo de las frecuencias fenotípicas de supertipos de HLA en diversos dondos étnicos y cobertura de población proyectada. Se calcularon las frecuencias génicas para cada alelo de HLA a partir de frecuencias de antígeno o alelo (Imanishi, et al., Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference, Vol. 1, Tokyo, Oxford University Press (1992); Fernández-Viña, et al., Hum Immunol 33:163 (1992)) utilizando las fórmulas de distribución binomial $gf = 1 - (\text{SQRT}(1 - af))$ (Tiwari, et al., El complejo HLA, en: HLA and Disease Associates, NY, Springer-Verlag (1985)). Para obtener las formulas fenotípicas globales, se calcularon las frecuencias génicas acumuladas y las frecuencias de antígenos acumuladas mediante el uso de la fórmula inversa ($af = 1 - (1 - Cgf)^2$). Como se describe más adelante, cuando los datos de frecuencia no estaban disponibles se asumió el nivel de tipificación de ADN, correspondencia a las frecuencias de antígeno definidas anteriormente. Para obtener la cobertura de población potencial total no se asumió ningún desequilibrio de enlace y solamente se incluyeron los alelos confirmados como pertenecientes a cada uno de los supertipos (estimaciones mínimas). Las estimaciones de la cobertura potencial total logradas mediante combinaciones interloci se realizaron mediante la adición a la cobertura A de la proporción de la población no cubierta A que se podría esperar que se cubriera por los alelos B considerados (por ejemplo, total = $A + B \cdot (1 - A)$). Los miembros confirmados del supertipo de la línea A3- son A3, A11, A31, A*3301, y A*6801. Aunque el supertipo de tipo A3 puede incluir potencialmente A32, A66, y A*7401, estos alelos no se incluyeron en los cálculos de frecuencia global. Del mismo modo, mie, BROS confirmados miembros de la familia de supertipo de tipo o A2 A*0201, A*0202, A*0203, A*0204, A*0205, A*0206, A*6802, y A*6901 (potencialmente también A*3001). Finalmente, los alelos confirmados del supertipo de tipo B7 son B7, B*3501-03, B51, B*5301, B*5401, B*5501-2, B*5601, B*6701, y B*7801 (potencialmente también B*1401, B*3504-06, B*4201, y B*5602).

Resultados

Análisis estructural de las bolsas de unión a péptido de diversos alelos HLA.

Como se ha mencionada previamente, estudios previos han indicado que las moléculas de HLA A3, A11, y A*6801 están asociadas con especificidad para ligandos que llevan restos pequeños o hidrófobos en la posición 2, y extremos C cargados positivamente (Kubo, et al., J Immunol 152: 3913 (1994); Guo, et al., Nature 360:364 (1994); Falk, et al., Immunogenetics 40: 238 (1994); DiBrino, et al., J Immunol 151: 5930 (1993); DiBrino, et al., Proc Natl Acad Sci USA 90: 1508 (1993); Zhang, et al., Proc Natl Acad Sci USA 90: 2217 (1993); Sette, et al., Mol Immunol 31:813 (1994)). Los inventores decidieron evaluar la posible base estructural para estas similitudes evidentes en la especificidad de ligando en más detalle. E este fin, debido a que las cadenas laterales del resto en la posición 2 y en los extremos C de péptidos antigénicos se conocen que ponen en contacto los restos que forman las bolsas B y F de las moléculas de la clase I de HLA (Madden, et al., Cell 75: 693 (1993); Saper, et al., J Mol Biol 219: 277 (1991)), los restos que forman estas bolsas polimórficas se tabularon para diversas moléculas de clase I de HLA. Se encontró que los tipos de HLA que se sabe que reconocen restos pequeños o hidrófobos en la posición 2 (por ejemplo, A*0101, A*0201, A*0301, A*1101, A*6801, and A*6802) y tipos de HLA que reconocen los restos cargados positivamente en el extremo C (por ejemplo, A*0301, A*1101, A*6801, y B*2705) de sus ligandos de péptido compartían ciertas características estructurales clave. En particular, moléculas de HLA que unen restos pequeños e hidrófobos en la posición 2 llevaba restos alifáticos (M or V) en las posiciones 45 y 67, y restos que forman enlace de hidrógeno potenciales tales como N y K, o H y Q en las posiciones 66 y 70, respectivamente. Todas estas moléculas también llevaban un resto Y en la posición 99. Por el contrario, moléculas de la clase I que muestran diferentes especificidades de unión en una o más de estas posiciones. De manera similar, solamente las moléculas de la clase I que prefieren extremos C cargados positivamente llevaban D, T, L, y D en las posiciones 77,

80, 81, y 116, respectivamente. En conclusión, este análisis sugería que el conjunto de moléculas de la clase I de HLA (A3, A11, y A*6801) comparten ciertas características estructurales clave en sus bolsas B y F, y un motivo de ligando de péptido común caracterizados por restos pequeños o hidrófobos en la posición 2 y restos cargados positivamente en los extremos C. En este punto los inventores de manera tentativa designaron estas moléculas de la clase I de v como parte de un supertipo de tipo A3, y el correspondiente motivo como el supermotivo de tipo A3.

El análisis de otras moléculas de la clase I par alas que los motivos eran desconocidos, reveló que A*3101, A*3301, A*3401, A*6601, y A*7401 también compartían estas secuencias de consenso en sus bolsas B y F. Estas moléculas de este modo se predijeron que eran parte del supertipo de tipo A3. Los datos recientes (Falk, et al., Immunogenetics 40: 238 (1994)) han demostrado independientemente que A31 y A33 están de hecho caracterizados por un motivo del péptido de tipo A3.

Las moléculas de tipo A3 muestran superposición de especificidades de anclajes primarios y repertorios de unión de péptido.

Para comparar el intervalo de motivos reconocidos por alguna de las moléculas de tipo A3 más frecuentes (A3, A11, A31, A*3301, y A*6801), se emprendió un análisis molecular más detallado de las especificidades de unión del anclaje principal (posición 2 y terminal C) de estas moléculas. Los ensayos de unión de péptidos específicos de A3- y A11- que miden la capacidad de los péptidos de unión no marcados para inhibir la unión de un péptido de sonda radiomarcado a las moléculas de la clase I HLA se han descrito previamente (Kubo, et al., J Immunol 152:3913 (1994); Kast, et al., J Immunol 152: 3904 (1994); Sette, et al., Mol Immunol 31: 813 (1994)). Se desarrollaron ensayos de unión específica para A31, A*3301, y A*6801 usando planteamientos similares (Kubo, et al., J Immunol 152: 3913 (1994); Kast, et al., J Immunol 152: 3904 (1994); del Guercio, et al., J Immunol 154:685 (1995); Sidney, et al., J Immunol 154:247 (1995); Sette, et al., Mol Immunol 31:813 (1994); Ruppert, et al., Cell 74:929 (1993)).

Especificidades de anclaje primario de las moléculas de tipo A3 se exploraron posteriormente mediante ensayo de un panel de péptidos que llevan sustituciones en la posición 2 ó 9 de un prototipo poli-A péptido AXAAAAAX para evaluar su capacidad inhibidora para A3, A11, A31, A*3301, y A*6801. Cada molécula expresó preferencias individuales, pero en la mayoría de los casos considerados, se obtuvo una unión significativa cuando la posición 2 estaba ocupada por o bien A, I, L, M, S, T, o V, y el extremo C era o bien R o K. Estos dato están muy de acuerdo con los datos de secuenciación conjuntos generados por los inventores (Kubo, et al., J Immunol 152: 3913 (1994)) y otros (Falk, et al., Immunogenetics 40:238 (1994); Dibrino, et al., J Immunol 151:5930 (1993); DiBrino, et al., Proc Natl Acad Sci USA 90:1508 (1993)), y también se extiende a los casos de A31, A*3301, y A*6801 la definición de los motivos de anclajes primarios. En conclusión, estos datos sugieren que el supermotivo de anclaje de tipo A3 se puede definir como A, I, L, M, S, T, o V en la posición 2, y o bien R o K en el extremo C.

Las moléculas de tipo A3 comparten superposición repertorios de unión de péptido. El grado al que el motivo de anclaje primario del supertipo de tipo A3 permite la unión degenerada contra las moléculas de supertipo de tipo A3 se examinó a continuación. Se ensambló un conjunto de 200 secuencias de péptidos de origen natural de 9-mer que llevan restos A, I, L, M, S, T, o V en la posición 2 y K o R en la posición 9. A diferencia de la restricción de que cada posible combinación de anclaje se represente en proporción a la frecuencia natural de los aminoácidos individuales, los péptidos que comprenden el conjunto se seleccionaron al azar a partir de secuencias de antígenos virales y tumorales. Cuando se ensayó cada péptido para evaluar su capacidad de unirse a moléculas purificadas de A3, A11, A31, A*3301, y A*6801, era evidente que un único patrón de de unión estaba asociado a cada tipo alélico (datos no mostrados). Por ejemplo, algunos péptidos eran más selectivos, uniendo solamente un tipo de clase I, mientras otros ciertos péptidos reaccionaron de manera cruzada en lugar de extensamente, uniendo cuatro o cinco de las moléculas ensayadas.

Se encontró que, en general, aproximadamente 10% (5% - 16%) de las combinaciones péptido-HLA estaban asociadas con buena unión ($CI_{50} \leq 50$ nM), y aproximadamente 17% (11% - 24%) con unión intermedia ($CI_{50} 50 - 500$ nM) a cualquier alelo dado. Estas frecuencias de alta o intermedia unión son similares a las que se han indicado previamente para los péptidos que contienen motivos de secuenciación en conjunto de A*0201 pool (Ruppert, et al., Cell 74:929 (1993)). Lo más notable, sin embargo, fue el grado relativamente alto de reactividad cruzada observada. De los 127 péptidos que eran capaces de unirse a al menos una molécula de tipo A3, 43 de ellos (34%) unían tres o más de moléculas de supertipo de tipo A3. Cuatro péptidos unían las cinco moléculas de tipo A3 ensayadas. En comparación, en un conjunto de 39 péptidos que se ensayaron para evaluar la unión de las cinco moléculas de la clase I no relacionadas (A*0101, A3, A24, y B7), solamente tres (8%) se unían a dos moléculas, y ninguno se unía a tres o más moléculas. Los péptidos identificados como ligandos altos o intermedios para al menos cuatro de las cinco moléculas de tipo A3 ensayadas se enumeran en la Tabla 2. En la tabla, se definen buenas o intermedias capacidades se definen como $CI_{50} \leq 500$ mM, y están subrayadas por sombreado.

Tomados conjuntamente, estos datos demuestran superposición significativa en los repertorios de unión de las moléculas de supertipo de tipo A3, y validan el motivote anclaje de primario del supertipo de tipo A3.

El supermotivo de tipo A3 define restos de anclaje secundario que confieren la degeneración de ligandos de péptidos potenciales. Como se ha establecido anteriormente, aunque la superposición en los repertorios de unión de las moléculas de supertipo de tipo A3 es significativa, está también lejos de completa; cada uno de las moléculas de tipo A3 también retiene grados sustanciales de especificidad. Para entender la base de las reactividades cruzadas observadas, los inventores intentaron definir un tipo de supermotivo de tipo A3 que debería describir las características de ligandos de péptido que están asociadas a la degeneración del supertipo de tipo A3, y que podría ser útil en la predicción de ligandos de tipo A3 degenerados

Primero, motivos refinados para cada uno de los alelos de tipo A3 analizados en el presente documento (A3, A11, A31, A*3301, y A*6801), que esquematizan las especificidades de unión de anclajes secundarios, se derivan como se ha descrito en los Materiales y Procedimientos. Este planteamiento es similar al usado anteriormente para definir un motivo refinado A*0201 (Ruppert, et al., Cell 74: 929 (1993)). Los motivos se derivaron mediante el cálculo en cada posición de no anclaje a lo largo de la secuencia de péptidos el promedio de la capacidad de unión péptidos relativa que lleva cada uno de los 20 aminoácidos comunes, se agruparon de acuerdo a similitudes químicas individuales. La representación de los datos generados por este procedimiento, los valores calculados para A3 se muestran en la Tabla 3A. Después de esto como un ejemplo, 21 se ensayaron péptidos diferentes que poseían un resto aromático (F, W, Y) en la posición 3 de su secuencia. Estos péptidos tenían una capacidad de unión promedio relativa a A3 31,7-fold mayor que la media global del conjunto de 200 péptidos. Por analogía a lo que se ha descrito previamente en el caso de A*0201, los restos preferidos y perjudiciales se definen como restos asociados a las capacidades de unión promedio que eran cuatro veces mayor que, respectivamente, el promedio global. De acuerdo con lo anterior, los restos aromáticos en la posición 3 se consideraron restos "preferidos" para unión de A3.

Tabla 2. Péptidos de reacción cruzada del supermotivo de tipo A3

Péptido	Secuencia	Capacidad de unión (CIS0 mM)				
		A3	A11	A31	A*33	A*68
					01	01
A. Péptidos de reactividad cruzada del supermotivo de tipo A3 identificados en el análisis inicial						
HIV pol 1227	YLPWVP A H K	14	106	327	33	2
		33				
MAGE-2 299	ISYPEL H E R	32	214	23	336	81
		6				
HIV pol 1075	IVTACK T P K	12	16	18	97	242
		9				
HIV pol 1434	AVFTIN F K R	57	3.3	3.2	109	42
HBV syp 713	IMEAPF Y P K	11	41	11	59	4103
HBV adr pol 601	RLPDEG L N R	10	245	146	397	3137
		8				
HBV adr "X" 1548	KVFVIG G C R	26	73	30	498	2712
		5				
P. falciparum TRAP 611	LACAGL A Y K	16	207	124	92	71
		8		1		
HBV adr pol 621	NVSIFW T H K	15	79	211	260	82
		3		76		
MAGE-1 96	SLFRAY I T K	2	2.2		1250	43
		7		2.8		
				1		
P. falciparum LSAI 94	QTFNKS L L R	36	138	220	1657	63
		9				
HBV pol 398	GSHVS W P K	49	1.1	125	6744	77
HIV env 370	RAKWN T L K	42	188	25	--	500
PSA 299	YTRVWH Y R K	18	104	15	10	6.3
		33				
		3				
MAGE-1 66	TTINFT R Q R	68	5.3	38	38	8.9
		1				

HBV X 69	CALPFT S A R	30	316	41	40	17	4
		14					
HBV adr pol 711	AVNHVF K T R	15	61	10	50	70	4
		57					
HIV pol 859	MTKILE P F R	--	378	82	70	26	4
B. Additional A3-like supermotif cross-reactive peptides							
C-ERB2 669	VVFGIL I K R	96	8	12	73	4	5
FLU A NP 166	LMOGST L P R	35	58	67	43	421	5
		5					
MAGE 1 66	TTINFT R Q R	25	16	21	47	5	5
		9					
MAGE 2 66	TTINVT L W R	12	5	71	245	6	5
		4					
HCV ENV1290	QLFTFS P R R	15	182	480	4496	3	4
MAGE3 226	SVLEVF E G R	--	44	129	50	69	4
HCV CORE 51	KTSEFS Q P R	69	94	81	1871	225	4
HBV adr POL 1257	HLYPVA R Q R	20	3077	92	330	410	4
C-ERB2 754	VIRENT S P K	28	462	180	353	--	4
C-ERB2 852	LVKSPN H V K	23	86	300	659	90	4

TABLA 3. Preferencias de anclaje secundario específica de alelo determinadas por valores de unión relativa

Grupo	Posición								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A. A3									
A	2.8		1.8	0.73	4.5	1.2	0.54	0.75	
G	0.52	A	0.53	2.4	0.59	1.2	1.4	0.64	A
DE	0.22	N	0.16	0.36	0.29	0.28	0.35	0.51	N
RHK	7.8	C	0.45	6.2	0.95	0.42	0.59	2.3	C
LIVM	1.1	H	1.0	0.43	1.4	1.7	1.6	0.41	H
YFW	0.45	O	32	4.2	3.3	29	2.2	0.90	O
QN	0.57	P	0.64	0.36	0.66	0.90	0.67	0.96	P
STC	1.3		0.82	0.50	1.1	2.0	1.1	3.2	
P	0.21		0.55	14	3.6	0.49	0.91	6.6	
B. A11									
A	7.9		0.86	0.85	5.0	2.0	0.18	0.30	
G	1.5	A	0.44	0.68	0.37	1.5	1.4	0.22	A
DE	0.12	N	0.30	0.37	0.48	0.30	0.46	1.4	N
RHK	1.3	C	0.35	1.9	0.47	0.37	0.37	2.1	C
LIVM	1.3	H	1.8	0.52	3.1	1.5	2.9	0.38	H
YFW	0.31	O	6.2	5.1	3.6	13	14	3.9	O
QN	0.65	P	0.92	0.73	0.48	0.88	0.59	0.98	P
STC	3.8		1.3	1.	1.4	1.2	0.38	1.8	
P	0.17		0.45	3.2	1.6	1.5	0.77	18	
C. A31									
A	3.9		1.3	0.28	0.11	0.38	1.1	7.1	
G	0.34	A	0.34	0.99	0.85	1.2	0.44	1.9	A
DE	0.06	N	0.10	0.50	0.24	0.24	0.16	0.22	N
O									
RHK	11	H	3.3	1.5	2.0	2.0	1.7	0.79	G
LIVM	1.4	O	1.2	0.71	3.3	1.1	0.45	0.60	H
YFW	0.59	P	7.2	1.5	2.4	6.6	7.5	0.70	O
QN	0.57		0.49	1.7	0.44	1.4	0.82	1.6	P
STC	2.1		1.1	0.67	1.5	1.1	2.7	2.2	
P	0.07		0.40	21	0.55	0.72	0.80	5.8	
3									
D. A*3301									
A	0.48		0.62	1.4	0.74	0.65	4.9	1.2	
G	0.22	A	0.39	1.0	1.7	0.59	0.47	1.3	A
DE	1.5	N	0.24	1.1	0.36	0.43	0.54	0.41	N
RHK	0.64	O	2.3	1.0	0.88	1.4	1.1	0.76	C
LIVM	1.3	H	1.5	0.90	2.8	1.4	0.45	0.87	H
YFW	2.2	O	4.0	1.1	2.5	3.6	4.0	1.6	O
QN	1.3	P	1.7	0.77	0.44	0.72	1.2	1.4	P
STC	1.9		0.71	0.82	1.0	0.93	1.8	1.2	
P	0.21		0.41	2.7	1.4	1.2	0.85	3.6	

Un análisis similar se realizó para cada alelo (A3, A11, A31, A*3301) y se usó para derivar los mapas de requerimientos de anclajes secundarios específicos de alelo para cada posición (Tabla 3B-E). Los sumarios de los

motivos modificados obtenidos para cada alelo del supertipo de tipo A3 se muestran en la Fig. 1. Cada molécula mostró sus propios requerimientos de anclajes secundarios únicos. Por ejemplo, restos cargados positivamente (R, H, K) en la posición 4 se prefirieron por A3, pero no mediante cualquier otra molécula de tipo A3. De manera similar en la posición 8, glicina (G) se asoció con la capacidad de unión escasa solamente para A11, mientras que las cargas negativas (D, E) eran perjudiciales solamente para A31. además de estos tipos de características específicas de alelo únicas, ciertos restos estaban asociados a unión o bien escasa o buena, en la mayoría de las moléculas del supertipo A3. Por ejemplo, prolina (P) en la posición 1 era perjudicial para las cinco de de las moléculas de tipo A3 ensayadas. Los restos aromáticos (F, W, Y) en la posición 7 y prolina en la posición 8 se prefirieron entre las cuatro o cinco moléculas ensayadas (Fig. 1).

En base a los diversos motivos refinados individuales motivos, se construyó un supermotivo de tipo A3. Restos perjudiciales para al menos tres de los cinco alelos considerados se consideraron como restos perjudiciales en el supermotivo. De manera inversa, restos preferidos en al menos tres de los cinco alelos considerados, pero no también perjudiciales para cualquier alelo perjudicial, se definieron como restos preferidos. El supermotivo de tipo A3 derivado del siguiente planteamiento se muestra en la Fig. 2.

Un ensayo de la eficacia del supermotivo de A3- rn la predicción de péptidos de de alta reacción cruzada. Para ensayar la validez del supermotivo de tipo A3 definido anteriormente, un conjunto adicional de 108 péptidos no incluidos previamente en el análisis de los supermotivos se ensayó para evaluar la unión a A3, A11, A31, A*3301, y A*6801. Este conjunto incluía 30 péptidos que tenían al menos un resto de supermotivo preferido y ningún resto perjudicial (supermotivo positivo), 43 péptidos con al menos un resto perjudicial (supermotivo negativo), y 35 péptidos con ningún resto perjudicial preferido (supermotivo neutro). De los 30 supermotivos de positivos 30, 27 (90%) unidos a dos o más moléculas de tipo A3 y 16 (53 %) unidas a tres o más moléculas. Al contrario, 18 (51 %) de 35 péptidos de supermotivos neutros unidos a dos o más tipos de A3, y ocho (23 %) unidos a tres o más moléculas. Finalmente, los péptidos unidos de supermotivo eran mucho menos capaces de unirse a alelos múltiples, con seis (14 %) péptidos que se unen a dos moléculas de tipo A3, y ninguno de los péptidos que se unen a tres o más moléculas. Estos resultados son cualitativamente similares a los obtenidos cuando el conjunto original de péptidos usados para definir el supermotivo se sometió al mismo tipo de análisis, y están en contraste sorprendente con el nivel de reactividad cruzada observado en el caso del conjunto de control mencionado anteriormente de péptidos que se unen a alelos de HLA no relacionados, en los que una pocos péptidos (8%) unidos a un alelo diferentes del elemento de restricción original. A partir del conjunto de péptidos usados para validar el supermotivo de tipo A3, 10 péptidos adicionales que se unen aon afinidad alta o intermedia a al menos cuatro de las cinco moléculas de tipo A3 ensayadas (Tabla 2B).

Altas frecuencias fenotípicas de supertipos de HLA se conservan en todos los grupos étnicos principales. Para evaluar la relevancia potencial de los supertipos de HLA en general, y del supertipo de tipo A3 en particular, la incidencia de diversos alelos o antígenos de clase I de HLA se examinó. Hasta la fecha, la maypría de los datos de población de HLA-A y -B que están disponibles se basan en tipificación serológica. Estos datos no tienen resolución al nivel de alelos como se define por las secuencias de ADN, y de este modo no distinguen entre subtipos. Sin embargo, la comparación de las especificidades de unión a péptido de los subtipos, o bien a través de estudios de unión a péptido (del Guercio, et al., J Immunol 154 :685 (1995); Tanigaki, et al., Hum Immunol 39: 155 (1994)), pool sequencing analysis (Fleischer, et al., Tissue Antigens 44:311 (1994); Rötzschke, et al., Eur J Immunol 22:2453 (1992)), o análisis de estructura en bolsa basándose en la secuencia primaria, sugieren que en la mayoría de los subtipos de los casos tendrán especificidades de anclajes de péptido principales muy similares muy similares, si no idénticas,. De este modo en el siguiente análisis, si los datos de población al nivel de subtipo de ADN no estaban disponibles, excepto los datos de unión, motivos publicados, o análisis de secuencia sugerían que los los subtipos tendrán superposición de especificidades de unión a péptido, se asumió una correspondencia una a una entre los subtipos de alelo y los antígenos definidos serológicamente.

Cuando se examinó la incidencia de los diversos alelos de tipo A3 o antígenos en diferentes antecedentes étnicos, llegó a ser evidente que aunque la frecuencia de cada alelo individual o antígeno puede variar de manera notable entre los grupos étnicos (Imanishi, et al., Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop y Conference, Vol. 1, Tokyo, Oxford University Press (1992)), la frecuencia acumulada de los cinco alelos de tipo A3 es de manera notable constante (en el intervalo de 37% a 53%). Por ejemplo, A3 es común en Caucásicos, Negros de América del Norte, e Hispanos pero casi ausentes en Japoneses. De manera inversa, A31 es frecuente en Japoneses pero son raros en Caucásicos y negros De Norte América. Al contrario, en cada una de las cinco poblaciones examinadas, el supertipo de tipo A3 esta presente en al menos 37%, y tanto como 53%, de los individuos.

En este contexto también es interesante indicar que la existencia de un supertipo de tipo A3 no es un incidente aislado, as como los inventores han reseñado recientemente la existencia de los supertipos de tipo A2 (del Guercio, et al., J Immunol 154:685 (1995)) y de tipo B7 (Sidney, et al., J Immunol 154:247 (1995)). Cada uno de estos

supertipos adicionales es también muy prominente, con frecuencias acumuladas notablemente constantes (en el intervalo 40% a 60%) entre diferentes antecedentes étnicos. De hecho, se puede calcular fácilmente que al nivel del gen al menos una mitad de de las copias totales de los genes HLA-A o -B en existencia hoy parecen pertenecer a uno u otro de estos tres supertipos HLA.

5 Discusión

Los datos presentados en este documento demuestran que los productos de al menos cinco diferentes alelos de HLA (A3, A11, A31, A*3301, y A*6801), y probablemente al menos otros tres (A*3401, A*6601, y A*7401) predichos en base de análisis de bolsa, pueden estar agrupados en un único supertipo de tipo A3 funcional. La determinación se hizo en base a un número de observaciones. Como grupo, estas moléculas (a) comparten ciertas características estructurales clave dentro de sus regiones de unión a péptido, (b) tienen preferencias similares por sus restos de anclajes primarios, y (c) comparten ampliamente la superposición de repertorios de unión. Mediante examen de la actividad de unión de un gran panel de restos de anclaje que sobrepasan los péptidos preferidos por estas moléculas alélicas, también se definió una de supermotivo de tipo A3. Este supermotivo, que se basa en un mapa detallado de de los requerimientos de anclajes secundarios de cada una de las moléculas de supertipo de tipo A3, permite la predicción eficaz de péptidos de unión degenerados de tipo A3. Finalmente, se mostró que el supertipo de tipo A3, y los supertipos en general, se representan con frecuencias fenotípicas altamente notables en todos los grupos étnicos principales. Como tal, los supertipos de la clase I de HLA basándose en las especificidades de unión a péptido representan una alternativa funcional a la clasificación serológica y filogenética para entendimiento de las relaciones entre moléculas de clase I HLA.

Además de su uso para la generación del supermotivo de tipo A3, los mapas de anclajes secundarios individuales descritos en este estudio representan por sí mismos una contribución significativa al entendimiento de unión de péptido a moléculas de clase I. Debido a que estos mapas se derivaron usando péptidos de tamaño homogéneo, las determinaciones de preferencia en cada una de las posiciones secundarias puede ser más precisa que las derivadas de de la secuenciación de las combinaciones de los péptidos procesados de manera natural. También, los motivos definidos en el presente documento permiten la determinación de restos que tienen efectos perjudiciales sobre la unión a péptido.

Barber y colaboradores (Barber, et al., Curr Biol 5:179 (1995)) han demostrado que los péptidos se pueden reconocer en el contexto de dos moléculas los inventores han incluido en el supertipo de tipo HLA-B7, y otros dos péptidos se han reseñado por reconocerse en el contexto de más de un alelo de tipo A3 (Missale, et al., J Exp Med 177:751 (1993); Koenig, et al., J Immunol 145:127 (1990); Culmann, et al., J Immunol 146:1560 (1991)) (véase la Tabla 4). Usando un procedimiento para la inducción *in vitro* de los CTL primarios (Wentworth, et al., Mol Immunol 32:603 (1995)) los inventores observaron varios ejemplos en los que los péptidos se pueden reconocer en el contexto de tanto A3 como A11. Los inventores ensayaron los epítopes restringidos del supertipo de tipo A3 para evaluar la capacidad de unión a moléculas de supertipo de tipo A3, y se indicaron niveles relativamente altos de degeneración. De los siete epítopes enumerados en la Tabla 4, solamente uno era un nonúmero que se podría analizar para el supermotivo propuestos en la Fig. 2A (se desearán futuros estudios en la extensión del supermotivo a péptidos mayores de nueve meros). Este péptido era supermotivo positivo, y se unía a tres de las cinco moléculas de tipo A3. No obstante, es importante que cada uno de los epítopes conformados a las especificidades de anclajes primarios de supertipo de tipo A3.

La comparación de las clasificaciones del supertipo los inventores han propuesto basándose en la unión de péptido con la clasificación de alelos HLA-A basándose en las relaciones de las secuencias de ADN (y reactividad serológica) (Ishikawa, et al., Hum Immunol 39: 220 (1994); Firgaira, et al., Immunogenetics 40: 445 (1994); Karo, et al., J Immunol 143:3371 (1989)) revela tanto similitudes como diferencias. Por ejemplo, HLA-A3 y A11 parecen estar estrechamente correlacionados y derivados de un gen ancestral común (48-50). A31 y A33, sin embargo, derivan de un linaje antiguo que comprende los grupos A2/A10/A19, que es diferente de del linaje de A3 y A11. Finalmente, HLA-A*6901 pertenece al grupo de evolución de A28 HLA [Fernández-Viña, et al., Hum Immunol 33: 163 (1992); Ishikawa, et al., Hum Immunol 39: 220 (1994); Lawlor, et al., Annu Rev Immunol 8: 23 (1990)], que también contiene los alelos HLA-A*6802 y -A*6901. Incluso, basándose en la especificidad de unión a péptido, HLA A*6801 es un miembro del supertipo de tipo A3, mientras A*6802 y A*6901 se ha demostrado que pertenece al supertipo de tipo A2 [del Guercio, et al., J Immunol 154: 685 (1995)]. De este modo, basándose en el árbol filogenético de los alelos HLA [Ishikawa, et al., Hum Immunol 39: 220 (1994); Firgaira, et al., Immunogenetics 40: 445 (1994); Karo, et al., J Immunol 143: 3371 (1989)], alelos de tipo A3 se encuentran en ambos de los linajes antiguos de HLA: A1/A9 que incluye A3 y A11, y A2/A10/A19 que incluye A31, A33, y A*6801. Si la existencia del supertipo de tipo HLA-A3 es un reflejo de una estirpe común, después el motivo de tipo A3 podría de hecho representar la especificidad primitiva de unión de péptido clase I de HLA, y otras especificidades pueden representar adaptaciones al cambio de de ambientes patogénicos.

TABLA 4. Unión de péptidos restringidos de tipo A3

Péptido	Secuencia		Capacidad de unión (CI 50 nM)				
	1	2	3	4	5	6	7
	1	2	3	4	5	6	7
HBVc 141-151 ^a	STLPETTVVRR	A31 Aw68	3	4	181	181	25
HIV nef 73-82 ^b	QVPLRPMTYK	A3, A11	1	10	183	2164	133
MAGE 1 96-104	SLFRAVITK	A3, A11	3	2	248	10943	113
HIV env 43-52	TVYYGVVPVWK	A3, A11	1	4	163	10357	15
HCV lorf 1858-1867	GVAGALVAFK	A3, A11	2	4	330	27188	119
HIV env 42-52	VTVYYGVVPVWK	A3, A11	8	11	461	38667	172
HBV pol 152-161	TLWKAGILYK	A3, A11	2	17	292	30526	533

^a Se definieron buenas capacidades de unión como < 500 nM y se subrayan mediante sombreado

Estas observaciones, sin embargo, también incrementan la posibilidad intrigante de que pudieran existir, a nivel de población, una ventaja selectiva en el mantenimiento de altas frecuencias de los diversos alelos del supertipo de la clase I de HLA, generados o bien mediante estirpe común o mediante evolución convergente. Esta ventaja pudiera estar relacionada con la generación de un repertorio de unión a péptido a nivel de población. Esta observación es evidente desde el hecho de que diferentes moléculas de la misma familia filogenética pueden ser diferentes de las familias de supertipo de unión. También es posible que estos fenómenos podrían en parte estar relacionadas con la explotación óptima de la especificidad del péptido de transportador humano asociado a procesamiento de moléculas (TAP) (Androlewicz, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9130 (1993); Androlewicz, et al., *Immunity* 1:7 (1994); van Endert, et al., *Immunity* 1: 491 (1994); Heemels, et al., *Immunity* 1: 775 (1994); Momburg, et al., *Curr Opin Immunol* 6: 32 (1994); Neefjes, et al., *Science* 261:769 (1993)) que se ha mostrado que preferentemente transportan péptidos con ciertas características de secuencia tal como extremos C hidrófobos, aromáticos, o cargados positivamente. Estudios recientes, realizados por van Endert y asociados, en colaboración con el propio grupo de los inventores, evaluaron las afinidades relativas para TAP de una gran colección de péptidos, han descrito un motivo de unión extendido de TAP. De manera sorprendente, este motivo contiene muchas de las características estructurales asociadas al supermotivo de tipo A3, tal como la preferencia para restos aromáticos en las posiciones 3 y 7 de péptidos nonámeros y la ausencia de restos cargados negativamente en las posiciones 1 y 3, y P en la posición 1.

En base a la evidencia experimental presentada en el presente documento, parece que, además de la clasificación basada en serología de las relaciones filogenéticas, los alelos de HLA de clase I también se pueden volver a clasificar en supertipos basándose en su especificidad de ligando. Tres supertipos, de tipo de tipo A2, de tipo A3, y de tipo B7, se han identificado actualmente, y otros, tal como el supertipo de tipo B44, se sugieren a partir de la bibliografía (Fleischer, et al., *Tissue Antigens* 44: 311 (1994); Harris, et al., *J Immunol* 151: 5966 (1993); Thorpe, et al., *Immunogenetics* 40: 303 (1994); Falk, et al., *Immunogenetics* 41: 162 (1994); Falk, et al., *Immunogenetics* 41: 165 (1994)). Aunque permanece desconocido cuantos supertipos se identificarán y qué inclusión tendrán, los datos disponibles demuestran que el fenómeno de degeneración de especificidades de unión a péptido, anteriormente aunque restringido a clase II de HLA (Panina-Bordignon, et al., *Eur J Immunol* 19:2237 (1989); O'Sullivan, et al., *J Immunol* 145:1799 (1990); Busch, et al., *Int Immunol* 2:443 (1990)), es también una característica unión a péptido a la clase I de HLA. En cuanto a la aparición de los supertipos de clase I de HLA, su relevancia práctica potencial se debe subrayar. La disponibilidad de ensayos de unión cuantitativos y los supermotivos detallados permiten la identificación de péptidos de de péptidos con alta reacción cruzada. Esto debe, a su vez, permitir la cobertura amplia de la población con un cóctel de pocos epítopes CTL, una posibilidad de gran significación para el uso potencial de planteamientos basados en péptido para el desarrollo de vacunas (Vitiello, et al., *J Clin Invest* 95:341 (1995)).

Ejemplo 2

Unión de supertipo de tipo B7

El trabajo anterior (Sidney, et al., *J. Immunol.*, 154, 247 - 259 (1995); Hill, et al., *Nature* 360, 434-439 (1992); Falk, et al., *Immunogenetics* 38, 161-162 (1993b); Barber, et al., *Curr. Biol.* 5:179 (1995); Schönbach, et al. *J. Immunol.* 154: 5951 - 5958 (1995)) ha indicado que una familia relativamente grande de especificidades de HLA B, definidas colectivamente como supertipo de unión de tipo B7, se caracteriza por un motivo de unión a péptido común (P en la posición 2, y restos hidrófobos y aromáticos en el extremo C). En este ejemplo ensayos de unión molecular como se ha descrito anteriormente se usan para examinar en detalle las especificidades de anclaje primario (posición 2 y extremo C) de los cinco alelos más frecuentes de tipo B7 (B*0702, B*3501, B51, B*5301, y B*5401).

Para hacerlo así, los inventores sintetizaron y ensayaron para evaluar la unión de un panel de análogos de sustitución individuales del péptido 84 - 92 FHV nef (secuencia FPVRPQVPL). HIV nef 84-92 se une a B*0702, B*3501, B51, B*5301, y B*5401 con o bien alta afinidad ($CI_{50} \leq 50$ nM) o intermedia (CI_{50} 50-500 nM). Se encontró que las moléculas de supertipo de tipo B7 han compartido y mejor las especificidades posición 2 rigurosas. Para los cinco alelos, prolina era el resto preferido. Con la única excepción (A en el caso de B*3501) todas las sustituciones ensayadas en la posición 2 se asociaron con más de 10 veces disminución de afinidad de unión cuando se compara con la que lleva prolina del péptido precursor de anclaje C terminal. Al contrario cuando se analizó la especificidad de unión, cada tipo de HLA-B expresó un patrón de especificidad de unión único mejor en el extremo C. Por ejemplo, B*0702 preferido M, F y L, mientras que B*5101 preferidos L, I, y V. A pesar de estas diferencias, los patrones de especificidad C-terminal muestran un gran grado de superposición. Los restos alifáticos I y V son los preferidos por al menos cuatro de las cinco moléculas, y A, L, M, F, y W se prefirieron o o toleraron en una mayoría de casos. Otros restos, tales como Y o T, se toleraron solamente en casos aislados, aunque algunos (por ejemplo, K o D) no se toleraban en todos.

Estos datos con relación a especificidad de anclaje primario en buen acuerdo con el que se describe en Sidney, et

al., J. Immunol., 154, 247 - 259 (1995). Péptidos capaces de unión degenerada de supertipo de tipo B7 deben tener prolina en la posición 2 y un resto hidrófobo o aromático (V, I, L, M, F, W, A) en su extremo C. En la definición formal el motivo de anclaje primario de supertipo de tipo B7 los inventores también incluyeron de manera conservadora incluir Y, a pesar de su carencia relativa de degeneración, debido a que Y constituye la señal dominante en los análisis de secuenciación de combinación (Hill, et al., Nature 360, 434 - 439 (1992); Falk, et al., Immunogenetics 38, 161 - 162 (1993b), Schönbach, et al. J. Immunol. 154: 5951 - 5958 (1995)) de B*3501. En resumen, el motivo de anclaje primario del supertipo de tipo B7 se define como P en la posición 2, y A, I, L, M, V, F, W, y Y en el extremo C.

Tamaño preferido de ligandos de supertipo de tipo B7

Moléculas de la clase I usualmente prefieren péptidos entre 8 y 10 restos de longitud (Falk, et al., Nature 351, 290 - 296 (1991)), aunque se han mostrado péptidos más largos que están unidos (Massale, et al., J. Exp. Med. 177: 751 (1993); Chen, et al., J. Immunol. 152: 2874 (1994); Collins, et al. Nature 371 - 626 (1994)). Para determinar la longitud de péptido óptima para el supertipo de tipo B7, paneles de 8-, 9-, 10- y 11-mer péptidos representing naturally occurring viral, tumor, or bacterial secuencias, y each bearing the supertipo de tipo B7 primary anchor specificity described above, were synthesized y assayed for their de tipo B7 six por type binding capacities. It was concluded that 9 restos represents the optimal péptido length for all of the de tipo B7 moléculas examined. This assessment was true both in terms of the percent of péptidos of each size bound by any molecule, but also in terms of the degree of crossreactivity observed (data not shown).

Motivos de anclaje secundarios de alelos de tipo B7 y el supermotivo de tipo B7

Otros restos pueden actuar como anclajes secundarios, proporcionando de este modo energía de unión suplementaria a los péptidos (Ruppert, et al, Cell 74:929-937 (1993); Madden, et al. Cell 75, 693 - 708 (1993); Saito, et al., J. Biol. Chem. 268, 21309 (1993); Sidney, et al., Hu. Immunol. 45, 79 - 93 (1996); Kondo, et al, J. Immunol. 155:4307-4312 (1995); Parker, et al., J. Immunol. 152, 163 - 175 (1994)). También se muestra que ciertos restos pueden tener efectos negativos en la unión de péptido a moléculas de la clase I (Ruppert, et al, Cell 74:929-937 (1993); Sidney, et al., Hu. Immunol., 45, 79-93 (1996); Kondo, et al, J. Immunol. 155:4307 - 4312 (1995), Boehncke, et al., J. Immunol. 150, 331-341 (1993)).

Para desarrollar un supermotivo de tipo B7 que permita la selección eficaz de péptidos con capacidad de unión del tipo B7, los inventores buscaron definir anclajes secundarios y efectos secundarios implicados en la unión de péptido a las moléculas de tipo B7 usando los procedimientos descritos en el presente documento. La capacidad de unión para las cinco moléculas más comunes de tipo B7, B*0702, B*3501, B51, B*5301, y B*5401 de un gran panel de 199 péptidos nonámeros que representan secuencias virales de origen natural que contienen los anclajes primarios del supertipo de tipo B7 (prolina en la posición 2, y A, V, I, L, M, F, y W en el extremo C) se determinaron, y se analizaron los datos. Para cada posición la capacidad de unión relativa promedio (ARBC) de péptidos que llevan cada uno de los 20 aminoácidos y se compararon con ARBC del conjunto de péptidos completos. Debido a la rara ocurrencia de ciertos aminoácidos, se agruparon restos de acuerdo con similitudes químicas individuales como se ha descrito previamente (Ruppert, et al, Cell 74:929-937 (1993)). Este análisis se realizó de manera separada para B*0702, B*3501, B51, B*5301, y B*5401.

Se encontró que los patrones de las preferencias y aversiones, en términos de anclajes secundarios, mostrados por cada molécula eran mejor que única. Por ejemplo, en el panel ensayado, 18 péptidos tenían restos cargados positivamente (R, H o K) en la posición 1. Estos péptidos, como grupo, eran muy buenos ligandos de B*0702, que tienen un ARBC de 21. Para B51, sin embargo, los mismos péptidos ligandos relativamente pobres, con un ARBC de 0,25. Sin embargo, similitudes profundas en preferencias también se pueden indicar. Por ejemplo, péptidos que llevan restos aromáticos (F, W, y Y) en la posición uno eran, como grupo, muy buenos ligandos a través del conjunto de moléculas de supertipo de tipo B7, con ARBC de 4.2, 17, 16, 20, y 70 para B*0702, B*3501, B51, B*5301, y B*5401, respectivamente.

Los valores descritos anteriormente se usaron posteriormente para derivar mapas de requerimientos de anclajes secundarios específicos de alelo para cada posición. Para hacer esto, restos preferidos y perjudiciales se definieron como restos asociados a los ARBC que eran 3 veces mayor que, o 3 veces menor que, respectivamente, el promedio global. Estos efectos preferidos y perjudiciales se resumen en la Figura 3. Estos mapas de anclajes secundarios revelan más claramente que mientras cada molécula mostraba sus propios requerimientos de anclajes secundarios, ciertas características se conservaban en gran medida entre las moléculas de tipo B7. Por ejemplo, como se ha indicado anteriormente, restos aromáticos (F, W, y Y) en la posición 1 se prefirieron para las cinco de las moléculas de tipo B7. De manera inversa, en la posición 8, restos ácidos (D, E) estaban asociados con escasa capacidad de unión para las cinco moléculas.

Efectos secundarios preferidos para 3 o más de los cinco alelos considerados, pero también no perjudiciales para

cualquier molécula, por una parte, o efectos secundarios perjudiciales para 3 o más de las cinco moléculas, se definieron como compartidos. Las características compartidas se incorporaban después en un supermotivo de tipo B7 que definen restos asociados a o bien escasa o buena unión en la mayoría de las moléculas del supertipo de tipo B7.

Después de esta lógica, se debería esperar que los péptidos que llevan restos secundarios de supermotivos preferidos mostrarían un mayor grado de degeneración de supertipo de tipo B7 que los que no llevan ninguno, o que llevan restos perjudiciales. Esta suposición se ensayó mediante la determinación de la reactividad cruzada de unión de un conjunto independiente de péptidos que llevan la especificidad de anclaje primario de tipo B7. Como se ha predicho, péptidos que eran supermotivo positivo (es decir, péptidos con al menos un resto de supermotivo secundario preferido y sin restos perjudiciales) mostraban sustancialmente un mayor grado de reactividad cruzada entre el supertipo de tipo B7 que los péptidos negativos de supermotivo (péptidos con uno o más restos de supermotivo perjudiciales) (datos no mostrados).

Implementación del supermotivo para mejorar la capacidad de unión

Los supermotivos de HLA pueden ser valiosos en la predicción de péptidos altamente degenerados, como se demuestra en el presente documento. Sin embargo, de manera más interesante, la definición de los supermotivos de HLA debe también permitir modificar por ingeniería genética epítopes con alta reactividad cruzada mediante identificación de qué restos dentro de una secuencia de péptidos podrían ser análogos o, "fijos", para conferir una mayor degeneración de péptido dentro de un supertipo.

Para valorar esta posibilidad, se seleccionaron seis péptidos que se había mostrado que tienen un mayor grado de degeneración dentro del supertipo de tipo B7 (Tabla 5). Cada péptido ya unido a al menos tres de las cinco moléculas más comunes de tipo B7 con afinidades o bien altas ($CI_{50} < 50$ nM) o intermedias ($CI_{50} 50 - 500$ nM). Estos péptidos se analizaron en el contexto de tanto el supermotivo de tipo B7 como los motivos de anclaje secundarios específicos de alelo descritos anteriormente para determinar si restos particulares dentro de sus secuencias podrían estar "fijados" para incrementar además su unión a las moléculas de supertipo de tipo B7. Este establecimiento encontró que ninguno de los péptidos particulares considerados contenían un resto negativo de supermotivo. Tres péptidos (núcleo de HCV 168, MAGE 2 170, y MAGE 3 196) cada uno tenía un resto que era perjudicial para una única molécula de tipo B7 (Tabla 5).

A continuación, se sintetizaron un panel de análogos sustituidos individuales. Algunos análogos contenían sustituciones de anclajes secundarios que o bien eran positivos de supermotivo, o positivos en el contexto de un alelo particular sin ser perjudicial para ningún otro. Otras sustituciones se seleccionaron basándose en los valores descritos en este documento. Debido a que las preferencias para los anclajes primarios C-terminal eran únicos para cada alelo, sustituciones en esta posición también se consideraron. De este modo, por ejemplo, para ensayar si la degeneración se podría aumentar en un número de análogos se realizaron mediante sustitución del supermotivo positivo F para el resto positivo en la posición 1. Otras sustituciones, tal como C-terminal L para Y en HBV pol 541 se realizaron para dirigir la escasa unión del péptido precursor B*0702 y B*5401.

Cuando se ensayó este panel para determinar su capacidad de unión a moléculas del supertipo de tipo B7, se generaron los datos mostrados en la Tabla 5. En cada caso, una sustitución F en la posición mostró incremento de unión y / o degeneración comparado con la secuencia precursora. Por ejemplo, MAGE 2 170 unido con alta afinidad a B*0702, afinidad intermedia a B*3501, B51, y B*5301, pero solamente débilmente a B*5401. El análogo F1 de este péptido unía las cinco de las moléculas con alta afinidad.

El éxito de las sustituciones deseadas en las moléculas específicas era mucho más fuerte de generalizar. Por ejemplo, la sustitución de L en el extremo C de HBV pol 541 para el Y nativo era exitoso para conferir la unión a B*0702 mientras se incrementa la afinidad de unión a otras moléculas (de manera significativa en los casos de B51 y B*5401). En otros casos, el efecto observado no se anticipó, como se demuestra en el caso de HBV env 313. Este péptido unido con alta afinidad a B*0702, B*3501, B51, y B*5301, pero solamente débilmente a B*5401. Un M en análogo 5 se prepare para incrementar la unión de B*5401 basándose en la observación de los restos alifáticos (L, I, V, y M) en la posición 5 eran positivos para B*5401, y relativamente neutros para otras moléculas. Como se muestra en la Tabla 5, sin embargo, capacidad de unión altamente incrementada de B*5401 lograda con análogo M5 estaba en el gasto de unión reducida a B*0702, B51, y B*5301.

Aunque el éxito de los análogos individuales era variable, es notable que en cada caso al menos un análogo era capaz de o bien mejorar la afinidad de unión, o extender la degeneración del péptido precursor. De este modo, péptidos ya degenerados pueden estar discretamente "fijados" para mejorar su capacidad de unión y extender su degeneración.

TABLA 5

Sustituciones discretas mejoran la capacidad de unión de supertipo de tipo B7 y degeneración de ligandos de péptido

Fuente	Unión (CI50 nM)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	B*0701	B*3501	B*5101	B*5301	B*5401	x-rxn
HIV nef 84	F	P	V	R	P	Q	V	P	L	16	43	12	481	71	5
	F	P	V	R	P	Q	F	P	L	9.5	23	207	319	241	5
	F	P	V	R	P	Q	V	P	L	22	120.0	15	31	1.6	5
HBV ENV 313	I	P	I	P	S	S	W	A	F	42	2.6	2.3	12	2970	4
	F	P	I	P	S	S	W	A	F	24	1.2	305	1.7	105	5
	I	P	I	P	S	S	W	A	F	229	2.2	580	930	5.9	3
	I	P	F	P	S	S	W	A	F	186	1.7	16	3.8	826	4
	I	P	I	P	S	S	W	A	F	31	54	15	24	7.7	5
HBV POL 541	F	P	H	C	L	A	F	S	Y	-	14	83	17	503	3
	F	P	H	C	L	A	F	A	L	25	2.7	28	5.0	24	5
	F	P	H	C	L	A	F	S	L	74	2.4	4.5	15	7.7	5
	F	P	F	C	L	A	F	S	Y	-	6.5	27	4.8	5.1	4
	F	P	H	C	L	A	F	S	L	675	29	6.3	3.8	1.0	4
	F	P	H	C	L	A	F	S	A	3667	6.5	250	137	0.6	4
HCV Core 168	L	P	G	C	S	F	S	I	F	28	90	100	114	6897	4
	F	P	G	C	S	F	S	I	F	19	1.6	132	3.2	67	5
	L	P	V	C	S	F	S	I	F	8.7	2.5	13	2.7	5128	4
	L	P	G	C	M	F	S	I	F	24	28	53	39	2778	4
MAGE2 170	V	P	I	S	H	L	Y	I	L	22	171	96	238	3175	4
	F	P	I	S	H	L	Y	I	L	16	7.3	6.4	7.0	28	5
	V	P	I	S	M	L	Y	I	L	164	273	73	1075	1493	3
	V	P	I	S	H	L	Y	I	L	108	5333	8.3	326	91	4
MAGE3 196	M	P	K	A	G	L	L	I	I	940	5039	393	90	248	3
	F	P	K	A	G	L	L	I	I	162	1303	5.8	60	150	4
	M	P	V	A	G	L	L	I	I	86	66	1.0	2.3	112	5
	M	P	K	A	M	L	L	I	I	1528	-	5.8	186	24	3
	M	P	F	A	G	L	L	I	I	229	1.0	0.9	2.3	0.27	5

5

En conclusión, a partir de los datos mostrados en el presente documento, es evidente que péptidos con mayor afinidad de unión se pueden generar mediante sustitución de restos "negativos" o neutros de la secuencia, con o bien restos neutros o preferidos. Estos péptidos también pueden tener propiedades inmunológicas únicas en las que, aunque todavía con reactividad cruzada con las secuencias de tipo salvaje, podrían no estar sujetos a mecanismos de tolerancia, supresión o supresores, inactivación de CTL que responde a la secuencia de tipo salvaje, y se presentan como resultado de cáncer de infección crónica. El mismo conocimiento se puede utilizar para utilizar péptidos con mayores grados de reactividades cruzadas y, por lo tanto, más cobertura de la población favorable.

Ejemplo 3

Unión de supertipo de tipo A2

Los inventores también derivaron información adicional sobre los requerimientos estructurales de unión de A2.1.

Para hacer esto los inventores primero buscaron determinar el grado de permisividad de posiciones de anclaje 2 y 9. Para este propósito, se sintetizó un panel de análogos que llevan sustituciones individuales o bien en la posición 2 o 9 de un péptido modelo poli (A) 9-mer que contiene el motivo reseñado previamente A2.1 L en la posición 2 y V en la posición 9 (Ruppert, et al, Cell 74:929-937 (1993), y se midió su capacidad de unión. Se sintetizaron trece análogos diferentes para ambas posiciones de anclaje 2 y 9.

En buen acuerdo con el motivo reseñado anteriormente de A2.1, los péptidos que llevan L o metionina (M) en la posición 2 eran los mejores ligandos. Disminuciones notables en la capacidad de unión (10- a 100- veces) eran evidentes incluso con las sustituciones relativamente conservadoras tal como isoleucina (I), V, alanina (A), y treonina (T). Cambios más radicales (es decir, restos D, K, F, C, P, G, N, y S) abolían completamente la capacidad de unión. Resultados similares se obtuvieron en la posición 9, cuando solamente las sustituciones conservadoras, tal como L y I, unidas dentro de 10 veces del ligando del péptido de modelo no sustituido poli A A2.1 Análogos que llevan sustituciones A o M también unidas P, y R) estaban asociadas a la pérdida completa de la capacidad de unión a A2.1. De este modo, basándose en estos datos y en buen acuerdo con los estudios previos (19-20), un motivo "canónico" A2.1 se puede identificar como L o M en la posición 2 y L, V, o I en la posición 9.

A partir de estos resultados, los inventores derivaron que la unión a A2 de cualquier péptido que lleva un resto "no canónico" (pero todavía aceptable) en la posición 2 ó 9 (o 10) (por ejemplo I, V, A o T en 2 o A, M o T en 9 o 10) se podría incrementar reemplazándolo con uno o más anclajes "canónicos". Algunos ejemplos de cómo se puede llevar a cabo esto se proporcionan más adelante.

Por ejemplo, el péptido FHV Env 2181 con secuencia (LWVTVYYGV) se une a A2.1 con una CI50% de 12.500 nM, mientras el análogo sustituido de anclaje en la posición 2 LMVTVYYGV se une con una CI50% de 3,3 nM. La secuencia de origen natural de HBVc 18-27 FLPSPDFPSI se une a A2.1 con una CI50% 22 nM, pero su variante de anclaje sustituida C-terminal V10 se une a A2.1 con un valor de Kd de 2,5 nM. Finalmente, el péptido HBV pol 538 (YMDDVVLGA) se une a A2.1 con una CI50% de 200 nM, mientras la variante V9 se une con una CI50% de 5,1 nM. Otros ejemplos de péptidos de anclaje fijos se muestran en la Tabla 6. Algunos de los péptidos fijos se ensayaron para evaluar su capacidad de inducir respuestas de CTL. Por ejemplo, el péptido HIV Env 2181 y los péptidos HBV pol 721 se ensayaron en ensayos de CTL primarios (21), y se encontraron que eran positivos. Los datos de reconocimiento de CTL positivos existen también para los péptidos HBVc18-27 y HBV pol 538.

Experimentos adicionales revelaron un papel prominente para los restos de no anclaje en la determinación de la capacidad de unión. Los resultados de estos análisis también se describen en Ruppert et al., supra. De acuerdo con los análisis de los inventores, la frecuencia de un grupo de aminoácido dado en los ligandos de A2.1 se dividió por la frecuencia de no ligandos para obtener una relación de frecuencia. Esta relación indica si un grupo de restos dado se produce en una posición dada preferentemente en ligandos (relación > 1) o no ligandos (relación < 1). Para facilitar el análisis, se estableció un nivel umbral para las relaciones, de manera que los restos que tenían más de 4 veces mayor frecuencia en los ligandos comparados con los no ligandos se consideraron como restos favorecidos o preferidos y restos que tenían más de 4 veces menos frecuencia en los ligandos que en los no ligandos se consideraron como restos no favorecidos o perjudiciales. Después de este planteamiento, grupos de restos que muestran asociaciones prominentes con o bien capacidad de unión a A2.1 o carecen de la misma se identificaron. En general, los efectos más perjudiciales se observaron con los aminoácidos cargados. En la posición 1, tanto los restos P como ácidos (E y D) eran infrecuentes en los péptidos de unión a A2.1. En la posición 6, los restos básicos (H, R, y K) estaban asociados a péptidos de no de unión, mientras tanto los restos ácidos como básicos eran infrecuentes en buenos ligandos en las posiciones 3 y 7. De manera inversa, los restos aromáticos estaban asociados a una unión de afinidad en las posiciones 1, 3, y 5. Además, restos con cadenas laterales que contienen OH- o SH-, tales como S, T, o C, estaban favorecidos en la posición 4, mientras A estaba favorecido en la posición 7 y P en la posición 8. En conclusión, el análisis de frecuencia de diferentes grupos de aminoácidos permitía a los inventores definir un motivo más preciso de A2.1 que tiene en cuenta el impacto de las posiciones diferentes de las posiciones 2 y 9 de anclaje sobre la afinidad de unión de A2.1.

Análisis de Ligandos 10-mer A2.1

También se usó el mismo planteamiento descrito anteriormente para los péptidos 9-mer para analizar los datos obtenidos con un conjunto de péptidos 10-mer. En los extremos N- y C- de los péptidos, el patrón observado era bastante similar al observado con 9-mers. Por ejemplo, en el conjunto 10-mer, como en el caso de los péptidos 9-mer, posición 1 se caracterizó por una frecuencia aumentada de restos aromáticos en el conjunto de ligandos, mientras cargas negativas y P estaban del mismo modo asociados a escasa unión. De nuevo en la posición 3, carga negativa estaba asociada con escasa unión. De manera interesante, en esta posición, restos alifáticos (mayor que aromáticos) estaban asociados a unión de alta afinidad. En los extremos C de los péptidos, también se observaron ciertas similitudes. En el 10-mer, el resto penúltimo en la posición 9 (correspondiente a la posición 8 en el 9-mer) era completamente permisivo, encontrándose restos solamente básicos más frecuentemente en los no

ligandos. Similar con la situación en la posición 7 en el 9-mer, no se toleraban ni cargas positivas ni negativas en la antepenúltima posición 8 de los 10-mers. También, posición 7 no favorecía los restos positivos en los 10-mers, como se ha observado previamente en la posición 6 en los 9-mers. En analogía con lo que se observó en la posición 3, los restos asociados a buena unión eran, sin embargo, diferentes. Los restos aromáticos e hidrófobos eran frecuentes en ligandos de alta afinidad en la posición 8 (en oposición a solamente A que es frecuente en la posición 7 en los 9-mers).

Finalmente, se observó un patrón bastante distintivo en la mitad del péptido. En la posición 4, G estaba favorecido en ligandos altos, con tanto A como cargas positivas eran muy frecuentes en no ligandos. P, en la posición 5, estaba completamente ausente en los ligandos de A2.1. Es notable que ninguna de las tendencias observadas en las posiciones 4 y 5 en el conjunto 10-mer tenían análogo en la posición 4 ó 5 en el conjunto 9-mer set.

En resumen, un motivo detallado se puede generar para péptidos A2.1 10-mer, siguiendo una estrategia similar a la descrita para los péptidos 9-mer anteriores. Ambas diferencias importantes y similitudes sorprendentes se pueden observar en comparación con los conjuntos 9-mer y 10-mer en estas posiciones de no anclaje.

En conclusión, a partir de los datos mostrados en el presente documento, es evidente que péptidos de mayor unión de afinidad se pueden generar mediante sustitución de restos "negativos" o neutros a partir de la secuencia, con o bien restos neutros o preferidos. Estos péptidos también podrían tener propiedades inmunológicas únicas ya que, aunque incluso reaccionan de manera cruzada con las secuencias de tipo salvaje, podrían no estar sometidas a mecanismos de tolerancia, supresión o supresores, que inactivan los CTL que responden a la secuencia de tipo salvaje, y presentes como resultado de cáncer de infección crónica.

Unión de un antígeno de péptido a múltiples alelos HLA que permiten la definición de supertipo de tipo A2.

Se han desarrollado ensayos de unión de MHC con péptidos radiomarcados y células de mamífero que expresan HLA clase I tales como líneas celulares B transformadas por EBV y blastos activados por PHA. La unión significativa de la sonda radiomarcada se podría obtener si las células diana se incubaban previamente durante toda una noche a 26°C en la presencia de β 2-microglobulina. En estas condiciones, se examinó hasta un menor porcentaje de las moléculas de HLA expresadas por cualquier tipo de células se podrían unir mediante los péptidos marcados. Con estos ensayos, el grado de reactividad cruzada el péptido 18 - 27 de núcleo del virus de hepatitis B restringido de A*0201 con otros subtipos A2. Se determine que este epítipo de péptido también se une a los subtipos A*0202, A*0205, y A*0206 pero no a A*0207. Los experimentos de inhibición con paneles de análogos de péptidos sintéticos subrayaron las especificidades de ligandos similares de los alelos HLA-A*0201, A*0202, y A*0205. Análisis de los restos polimórficos que ayudan a formar las bolsas B y F de diversos alelos HLA permitían la predicción de unión del epítipo 18-27 del núcleo del virus de hepatitis B a otros dos alelos de HLA (HLA-A*6802 y A*6901). De este modo, parece que una familia de al menos seis moléculas diferentes de HLA definidas de manera colectiva como el supertipo A2, pueden compartir la superposición de especificidades de ligando (restos alifáticos en la posición 2 y en los extremos C). Estos resultados sugieren que los epítopos de péptido que reaccionaban de manera cruzada ampliamente se pueden identificar y potenciar en gran medida la viabilidad prospectiva de planteamientos de vacunación basados en péptido.

Además, estos datos sugieren un uso adicional de análogos sustituidos. Específicamente, esto es para potenciar de manera simultánea la afinidad de unión para varios miembros del supertipo A2.

Un ejemplo de cómo se puede realizar esto se proporciona por el péptido HPV 16 EF.86-93, TLGIVCPI y su análogo TLGIVXPI (donde X soporta ácido α -amino butírico). Se ensayaron después los patrones de unión de estos dos péptidos para los alelos de tipo A2. era evidente que la sustitución X incrementó en gran medida aumentaba la afinidad de unión para todos los alelos de tipo A2, de unión para todos los alelos de tipo A2, que da como resultado un péptido más útil y reactividad cruzada más amplia que su secuencia precursora original. Los experimentos posteriores que utilizan ratones transgénicos A2/Kb demostraron que CTL inducido por el péptido sustituido X sostenían completamente reactividad cruzada con la secuencia de tipo salvaje, y y el péptido X, como resultado de su mayor afinidad de unión, era un inmunógeno más potente.

Ejemplo 4

Unión de A24 y A1

Efectos secundarios y unión de A24

Los inventores utilizaron un péptido modelo poli (A) 9-mer que contenía el motivo específico de A24 de Y en la posición 2 y F en la posición 9. Se encontró que en la posición 2 no solamente Y, sino también F, M, y posiblemente W, se aceptaban. En los extremos C de 9 ó 10 ligandos de restos F y W eran los más preferidos, pero también L y I se aceptaban. M también se debería predecir que es aceptable en esta posición (Kubo, et al., J Immunol 152:3913

(1994)). A partir de estos resultados los inventores concluyeron que la unión de A24 de cualquier péptido que lleva un resto no canónico, pero incluso aceptable en la posición 2 ó 9 (o 10) (por ejemplo, F, M, W, en 2 o L, I, M, en 9 (o 10)) se podría incrementar mediante reemplazo de ese resto con un anclaje más canónico.

5 Los resultados de experimentos adicionales que describen el papel prominente de restos de no anclaje en la determinación de la capacidad de unión de se han descrito por Kondo, et al, J. Immunol. 155: 4307 - 4312 (1995)). La base de datos de unión global de A24 se completó, y para cada posición se calculó la afinidad de unión promedio relativa de los péptidos que llevan restos particulares.

10 En el caso de péptidos 9-mer se encontró, por ejemplo, que los péptidos que llevan restos G o cargados negativamente (D, E) en la posición 1 tienden a unirse escasamente, con una afinidad promedio de 10 veces inferior que la afinidad promedio del conjunto global de péptidos 141 9-mer, analizados. Al contrario, péptidos que llevan restos aromáticos (F, Y, W) en la posición 1 unidos muy bien con la afinidad promedio 11,8 veces mayor que el promedio global.

Péptidos con restos cargados positivamente (R, K, M en la posición también tendían a unirse bien, con afinidad promedio, 4,6 veces mayor que el promedio global.

15 Efectos secundarios negativos sobre la capacidad de unión de A24 también se detectaron o otras varias posiciones: D o E en la posición 3 y 6, G en la posición 4 y 7, cargas positivas (K, R, H) en la posición 6. A en la posición 8, P en la posición 5, y amidas (Q y N) en la posición 5 y 8. De manera inversa, se encontró que restos aromáticos (Y, F, W) favorecían la unión de A24 cuando se encontraban en la posición 7 u 8, y y pequeños restos de unión de hidrógeno tales como (S, T, C) tenían un efecto positivo cuando estaban presentes en la posición 4.

20 Es evidente que cada posición individual a lo largo de la secuencia de 9-mer se puede influir en la unión a A24. También es interesante que los restos hidrófobos (F, W, Y, L, I, V, y M) nunca se asociaban con escasa unión.

Un análisis similar también se realizó con los datos obtenidos de los péptidos 10-mer. En analogía con lo que se presentó en la sección precedente, también se discernieron varios efectos secundarios en el caso de 10 mers.

25 Como era el caso de los restos negativos de péptidos 9-mer, (D, E) en la posición 3 y 6 estaban asociados con escasa unión. En general, sin embargo, el mapa de efectos secundarios para 10-mers era completamente distinto del de los 9-mers. For ejemplo, P, en el caso de péptidos 9-mer, no estaba asociado a una aumento de unión significativa en cualquier posición y y estaba incluso asociado a la disminución de unión en la posición 5. Para 10-mers, P estaba asociado con un incremento de la capacidad de unión cuando se encontraba en las posiciones 4, 5, o 7 de los ligandos de péptidos 10-mer.

30 En los péptidos 10-mer, posición 5 parece ser más importante en términos de efecto secundario, con (además el ya mencionado P) Y, F, y W asociados con buena unión a A24 y R, H, y K asociados con escasa capacidad de unión. La presencia de A en las posiciones de los restos 7 y 9 y amida (Q, N) en las posiciones 4 y 8 también estaban asociados con escasa capacidad de unión.

Efectos secundarios y unión de A1

35 Un análisis similar al descrito anteriormente para A24 también se describió para las moléculas HLA-A*0101. En resumen, estudios previos han definido dos motivos diferentes de unión a péptidos específicos para HLA-A*0101. Los mapas 9 mer y 10 mer de interacciones secundarias se derivaron para ambos submotivos A*0101. Para derivar tales mapas de interacciones secundarias, los datos de unión de A*0101 relevantes de los conjuntos de péptido correspondientes a cada uno de los dos submotivos se recopilaron. Para cada posición, se calculó la afinidad de unión promedio relativa de péptidos que llevan cada resto particular. Para compensar la baja aparición de ciertos restos particulares, y para obtener un muestreo más significativo, aminoácidos que llevan cadenas laterales químicamente similares se combinaron como indican Ruppert et al., supra. Los resultados obtenidos por este tipo de análisis para los péptidos 9-mer se muestran en las Figuras 4a y 4b para los submotivos 2-9 y 3-9, respectivamente. Diagramas que ilustran los efectos secundarios detectados por este análisis también se muestran en la Figuras 4c y 4d (para los submotivos 2-9 y 3-9, respectivamente). Los aumentos o disminuciones en la afinidad promedio mayor que cuatro veces se han considerado arbitrariamente significativas, como se ha descrito anteriormente.

50 En general, para la mayoría posiciones estaba afectada la capacidad de unión, o bien de manera negativa o positiva, por la presencia de tipos de restos particulares. Por ejemplo, en el caso del submotivo 2-9, se encontró que los péptidos que llevan la posición D o E 1 se unían escasamente a las moléculas de A*0101, con una capacidad de unión promedio relativa (ARBC) de 0,20. De manera inversa, péptidos que llevan restos aromáticos (Y, F, o W) en la misma posición (posición 1) unidos con una afinidad, en promedio, cuatro veces mayor (ARBC 4-0)

que la capacidad de unión promedio global del conjunto de péptidos enteros.

Inspección de los diagramas revela algunas características interesantes de unión de péptido a A*0101. Primero, como se ha indicado anteriormente, los dos anclajes en la posición 2 y 3 actúan de manera sinérgica entre sí. La afinidad de péptidos que llevan los anclajes M, S o T en la posición 2 se incrementa notablemente por la presencia de D o E in 3 (y en un menor grado por A). De manera inversa, la afinidad de péptidos que llevan los anclajes D o E en la posición 3 se incrementa notablemente por la presencia de S, T, y M (pero también otras cadenas de moléculas cortas o hidrófobas como L, V, I, C y A).

El grado en el que los péptidos que llevan los dos submotivos difieren en su interacción con la molécula de A*0101 se revela mediante el examen de otras posiciones. La comparación de los valores en las Figuras 4a y 4b, es evidente que existen numerosos ejemplos donde los restos neutros en el contexto de un motivo tenía motivos positivos o negativos en el contexto del otro motivo. En la posición una, por ejemplo, en el motivo 2-9 G y restos aromáticos (Y, F, y W) se prefieren (ARBC > 4,0), Restos a y cargados positivamente (R, H, y K) son relativamente neutros (ARBCs entre 4,0 y 0,25), y restos cargados negativamente (D y E) son perjudiciales (ARBC < 0,25). En el caso de péptidos que llevan el submotivo 3-9 se indica un patrón diferente y, con la excepción de G, que incluso se prefiere, las preferencias están mezcladas. Restos cargados positivamente en la posición tienen una influencia positiva en la unión de péptidos (ARBC de 8,3), cargados negativamente y restos aromáticos son neutros (ARBC de 1,3 y 0,61, respectivamente), y A es perjudicial (ARBC de 0,15). Tipos similares de modulación se observaron en cada posición a lo largo del motivo. En conjunto los desplazamientos de preferencia de anclaje secundario del submotivo un submotivo se ve mejor en los en los diagramas del sumario mostrados en la Figura 3. En este contexto, se puede observar que, con la única excepción de la preferencia compartida para G en la posición una, y excluyendo la posición 2 y 3 de anclajes conjuntos, los motivos secundarios de los dos submotivos 9-mer A*0101 son de hecho completamente diferentes. De este modo en un sentido cuantitativo, los dos motivos de 9-mer tenían solamente un efecto secundario de 27 (3,7%) en común. El grado en el que estos motivos de A*0101 difieren está en un contraste sorprendente con similitudes múltiples indicadas entre los motivos extendidos de A24, A*0201, y moléculas de tipo A3 (20), donde se observó que entre 3 y 5 (13-26%) de efectos secundarios se compartían entre cualquiera de los dos motivos extendidos.

Definición de restos de anclaje secundario para ligandos de 10-mer.

En analogía con lo que se describe en la sección anterior para los ligandos 9-mer ligands, restos de anclaje secundario y efectos secundarios también se definieron para 2-10 y 3-10 submotivos. Los resultados de estos análisis se presentan en las Figuras 5a-d. De nuevo otra vez, parece que los anclajes presentes en la posición 2 y 3 podrían actuar de manera sinérgica entre sí. La presencia de D, E (y hasta mucho menor grado A, Q y N) en la posición 3, en el contexto del submotivo 2-10, y de restos hidrófobos (L, I, V, M) o de cadena corta (S, T, C) en la posición 2, en el contexto del submotivo 3-10, se asociaron con incrementos significativos en la capacidad de unión promedio.

La comparación de los dos motivos de 10-mer en las posiciones diferentes de 2, 3 y los extremos C indica que, como en el caso de los péptidos 9-mer, se produce la modulación en especificidad de anclajes secundarios dependiendo de los restos de anclajes secundarios. Por ejemplo, en la posición 7 A y S, T, y C se prefieren en el motivo 2-10, pero son neutros en el motivo 3 - 10. De manera inversa, G se prefiere en el motivo 3-10, pero es neutro en el motivo 2-10. Sin embargo, también es evidente que, al contrario de los submotivos 9-mer, estas diferencias observadas en 10-mers son mucho más sorprendentes. De hecho, los dos submotivos 10-mer comparten numerosas preferencias. Y, F, y W en las posiciones 1 y 5, A en 4, P en 7, y G en 8 tenían efectos positivos para ambos submotivos. De manera similar, R, H, y K en 8 eran perjudiciales en ambos submotivos 10-mer (Figuras 5c y 5d). En total, los dos motivos 10-mer compartían 6 efectos secundarios de 25 (24%).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de identificación de péptidos que se unen a al menos 3 moléculas de tipo HLA-A3 seleccionadas entre el grupo que comprende A*0301, A*1101, A*3101, A*3301 y A*6801, con una constante de disociación de menos de 500 nM, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:

5 rastrear una secuencia de aminoácidos de una proteína antigénica para la presencia de un supermotivo A3 que consta de una secuencia de 9 restos del extremo N al extremo C como sigue:

un primer resto de anclaje primario en la segunda posición seleccionado entre el grupo que consiste en A, L, I, V, M, S y T y un segundo resto de anclaje primario en la novena posición seleccionado entre el grupo que consiste en R y K; y

10 uno o más restos de anclaje secundario seleccionados entre el grupo que consiste en (i) Y, F, o W, en la tercera posición, (II) Y, F, o W en la sexta posición, (III) Y, F, o W en la séptima posición, (IV), P en la octava posición, y cualquier combinación de (I), (II), (III) y (IV);

15 seleccionar una o más subsecuencias en la proteína antigénica que tiene el motivo de unión;
preparar péptidos de ensayo de 8 y 11 restos que comprenden las subsecuencias seleccionadas;
determinar la capacidad de los péptidos de ensayo de unirse al producto génico;
identificar los péptidos con una constante de disociación de menos de 500 nM con al menos 3 moléculas de tipo HLA-A3- seleccionadas entre el grupo que comprende A*0301, A*1101, A*3101, A*3301 y A*6801.

20

A3	PREFERIDO	P									
		RHK	RHK								ANCLAJE C-TERMINAL
		1	3	4	5	6	7	8	R K		
	PERJUDICIAL	DE P	DE								

FIG. 1A.

A11	PREFERIDO	P									
		RHK	RHK								ANCLAJE C-TERMINAL
		1	3	4	5	6	7	8	R K		
	PERJUDICIAL	DE P	A G								

FIG. 1B.

A*3101	PREFERIDO	ANCLAJE POSICIÓN 2										ANCLAJE C-TERMINAL								
		RHK	A L I V M S T										A							
		1											P							
	PERJUDICIAL	DE P											DE A DE DE DE DE							

FIG. 1C.

A*3301	PREFERIDO	ANCLAJE POSICIÓN 2										ANCLAJE C-TERMINAL								
		RHK	A L I V M S T										A							
		1											YPW YPW YPW YPW YPW YPW YPW YPW YPW YPW YPW YPW							
		G											DE							
	PERJUDICIAL	P																		

FIG. 1D.

A*6801	PREFERIDO	YPW	ANCLAJE POSICIÓN 2					YPW					ANCLAJE C-TERMINAL	
		STC	A	L	I	V	M	LIVM	YPW	P			R	K
		1							3	4	5	6	7	8
	PERJUDICIAL	G						RHK	DE					A
		P							G					

FIG. 1E.

A3-LIKE SUPERMOTIF	PREFERIDO		ANCLAJE POSICIÓN 2					YPW (4)					ANCLAJE C-TERMINAL	
			A	L	I	V	M	YPW (3)	YPW (4)	P (4)			R	K
		1							3	4	5	6	7	8
	PERJUDICIAL	DE (3)						DE (4)						
		P (5)												

FIG. 2.

B*0702	PREFERIDO	RHK	ANCLAJE POSICIÓN 2								ANCLAJE C-TERMINAL							
		FWY																
		1	P															
		DE																
	PERJUDICIAL	QN																

FIG. 3A.

B*3501	PREFERIDO	FWY	ANCLAJE POSICIÓN 2								ANCLAJE C-TERMINAL							
		1	P															
		A																
		G																
	PERJUDICIAL	P																

FIG. 3B.

B51	PREFERIDO	LIVM	ANCLAJE POSICIÓN 2								ANCLAJE C-TERMINAL										
		FWY	P								FWY	STC	FWY	G	FWY	A					
		1									3	4	5	6	7	8	L				
	PERJUDICIAL	AGPDE									V										
		RHK									DE								G	DE	G
STC											QN	DE	DE	F							
																W					
																Y					

FIG. 3C.

B*5301	PREFERIDO	LIVM FWY	ANCLAJE POSICIÓN 2					ANCLAJE C-TERMINAL								
		1	P	FWY	STC	FWY	LIVM	FWY	A	L	I	V	M	F	W	Y
				3	4	5	6	7	8							
	PERJUDICIAL	A GP QN					G	RHK	DE							

FIG. 3D.

B*5401	PREFERIDO	FWY		FWY								ANCLAJE C-TERMINAL			
		FWY		ANCLAJE POSICIÓN 2				FWY	A	A	P	A			
		1		P				LIVM	LIVM	LIVM	LIVM	L			
	PERJUDICIAL	GP						G	DE	DE	QN	I			
		QN						DE	RHK	G	DE	V			
		DE						STC		DE		M			
												F			
												W			
												Y			

FIG. 3E.

B7-LIKE SUPERMOTIF	PREFERIDO	FWY	ANCLAJE POSICIÓN 2								ANCLAJE C-TERMINAL							
		1	P	FWY (4)				FWY (3)				A L I V M F W Y						
				3	4	5	6	7	8									
				DE (3) G (4) QN (4) DE (4)														
	PERJUDICIAL	P (5) DE (3) G (4) A (3) QN (3)																

FIG. 3F.

CAPACIDAD DE ANCLAJE MEDIA RELATIVA A HLA A1: PÉPTIDOS 9-MER												
		GRUPO	POSICIÓN									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	
			ANCLAJE POSICIÓN		ANCLAJE POSICIÓN	2	33	1,1	0,09	0,64	0,19	0,30
ANCLAJES: POSICIÓN 2 Y	A	1,1		4,50	0,09	0,64	0,19	0,30	0,27			
	G	8,4		0,69	0,34	0,10	1,4	0,31	0,55			
	DE	0,20			0,36	0,35	0,37	12	0,97			
	RHK	0,78		0,13	1,1	1,5	0,33	0,32	0,83			Y
	LIVM	0,50		0,17	0,97	2,2	1,7	1,2	1,7			
C-TERMINAL	YFW	4,0		1,8	4,5	2,6	3,4	2,4	6,2			
	QN	1,3		1,8	0,53	1,9	1,0	7,7	0,79			
	STC	1,4		2,4	2,6	1,0	2,0	0,74	0,97			
	P		0,60		0,17	1,2	0,57	22	0,27	0,87		

FIG. 4A

CAPACIDAD DE ANCLAJE MEDIA RELATIVA A HLA A1: PÉPTIDOS 9-MER											
	GRUPO	POSICIÓN									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ANCLAJES:	A	<u>0,15</u>	34	ANCLAJE	0,58	1,5	421	2,3	0,34	ANCLAJE	
POSICIÓN 3	G	27	0,63	POSICIÓN	63	3,2	0,49	<u>0,16</u>	<u>0,052</u>	C-	
	DE	1,3	<u>0,033</u>	3	<u>0,035</u>	0,38	0,37	2,5	4,0	TERMINAL	
	RHK	8,3	<u>0,029</u>		0,58	0,48	<u>0,20</u>	0,58	0,95		
	LIVM	0,72	16	D	2,1	1,7	0,92	5,4	2,3	Y	
C-TERMINAL	YFW	0,61	<u>0,035</u>	E	0,75	1,1	1,8	1,3	0,41		
	QN	0,27	0,43		0,47	<u>0,16</u>	1,4	1,4	2,4		
	STC	0,71	30		4,7	3,8	11	0,80	1,9		
	P	3,1	0,047		0,91	0,032	0,76	0,052	0,073		

FIG. 4B

MOTIVO DE ANCLAJE SECUNDARIO A HLA A1: PÉPTIDOS 9 -MER									
ANCLAJES: POSICIÓN 2 Y C- TERMINAL	PREFERIDO	ANCLAJE POSICIÓN 2	G	DE	DE	DE	DE	ANCLAJE C- TERMINAL <	

FIG. 4C.

MOTIVO DE ANCLAJE SECUNDARIO A HLA A1: PÉPTIDOS 9 -MER											
ANCLAJES POSICIÓN 3 Y C- TERMINAL	PREFERIDO	A		ANCLAJE POSICIÓN 3				ANCLAJE C-TERMINAL			
		G	STC	G	A			G			
		RHK	LIVM	STC	STC	LIVM	DE				
		1	2	4	5	6	7	8			
		A	RHK	DE	P	RHK	P	G			
			DE P		QN		G	P			

FIG. 4D.

CAPACIDAD DE ANCLAJE MEDIA RELATIVA A HLA A1: PÉPTIDOS 10-MER											
ANCLAJES: POSICIÓN 2 Y C-TERMINAL	GRUPO	POSICIÓN									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Y	A	2,3	ANCLAJE POSICIÓN	8,5	15	2,3	<u>0,23</u>	0,78	0,27	<u>0,058</u>	ANCLAJE C- TERMINAL
	G	<u>0,26</u>	3	<u>0,16</u>	0,31	0,67	1,8	0,65	14	0,87	
	DE	0,42		56	<u>0,22</u>	0,28	2,1	0,45	6,2	0,36	Y
	RHK	0,61		<u>0,080</u>	0,49	<u>0,19</u>	1,8	<u>0,13</u>	<u>0,077</u>	0,99	
	LIVM	2,1	D	<u>0,15</u>	0,89	0,75	1,1	0,66	2,3	1,5	
	YFW	10	E	0,94	0,26	5,5	1,4	<u>0,13</u>	2,5	2,0	
	QN	0,94		4,4	3,3	4,5	<u>0,13</u>	2,2	0,70	1,2	
	STC	1,2		0,71	2,8	0,83	1,0	4,5	1,1	0,71	
	P		0,21		2,2	0,77	0,72	0,77	18	1,1	
									4,3		

FIG. 5A

CAPACIDAD DE ANCLAJE MEDIA RELATIVA A HLA A1: PÉPTIDOS 10-MER											
ANCLAJES: POSICIÓN 3 Y C-TERMINAL	GRUPO	POSICIÓN									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Y	A	0,67	0,80	ANCLAJE POSICIÓN	11	0,67	1,5	1,7	0,67	0,26	ANCLAJE C- TERMINAL
	G	0,27	0,33	3	2,7	3,2	0,093	7,1	6,5	1,0	
	DE	1,4	<u>0,068</u>		0,40	1,4	0,50	0,34	1,0	1,0	Y
	RHK	<u>0,16</u>	<u>0,066</u>	D	0,52	0,63	0,98	0,40	0,20	0,66	
	LIVM	2,2	48	E	1,0	1,7	1,2	1,0	0,76	1,0	
	YFW	13	<u>0,066</u>		0,59	7,5	3,6	3,4	2,8	19	
	QN	0,66	0,76		1,6	0,48	0,57	1,9	1,4	<u>0,25</u>	
	STC	0,52	90		0,34	0,44	2,1	0,34	0,78	0,72	
	P	0,53	0,076		1,3	0,098	3,1	15	0,15	1,9	

FIG. 5B

MOTIVO DE ANCLAJE SECUNDARIO A HLA A1: PÉPTIDOS 10-MER									
ANCLAJES: POSICIÓN 2 Y C- TERMINAL	PREFERIDO	DE		P					
		ANCLAJE POSICIÓN 2		A	YFW	A	G	ANCLAJE C-TERMINAL	
		YFW		QN	A	STC	DE	P	
		1		3	4	5	6	7	8
		G		RHK	DE	RHK	QN	RHK	RHK
	PERJUDICIAL	P		G		A	YFW		A
LIVM									

FIG. 5C.

MOTIVO DE ANCLAJE SECUNDARIO A HLA A1: PÉPTIDOS 10-MER									
ANCLAJES: POSICIÓN 3 Y C- TERMINAL	PREFERIDO	ANCLAJE POSICIÓN 3		P					
		STC	LIVM	A	YFW	G	G	ANCLAJE C-TERMINAL	
		YFW						YFW	
		1	2	4	5	6	7	8	9
		RHK	RHK		P	G		P	QN
	PERJUDICIAL		DE P					RHK	
YFW									

FIG. 5D.