

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 664**

51 Int. Cl.:
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 15/18 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03783851 .3**
96 Fecha de presentación: **12.08.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1543039**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2005**

54 Título: **LIPOPÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS NOVEDOSOS QUE COMPRENDEN EPÍTOPOS DE CÉLULAS T COOPERADORAS Y DE CÉLULAS B.**

30 Prioridad:
12.08.2002 US 402838 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.12.2011

73 Titular/es:
**THE COUNCIL OF THE QUEENSLAND INSTITUTE
OF MEDICAL RESEARCH
300 HERSTON ROAD
HERSTON, QLD 4029, AU**

72 Inventor/es:
**JACKSON, David y
ZENG, Weiguang**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 369 664 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

Lipopéptidos inmunogénicos novedosos que comprenden epítomos de células T cooperadoras y de células B

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general al campo de la inmunología, y más particularmente a reactivos para generar respuestas de anticuerpos y/o celulares contra un inmunógeno peptídico, y a métodos para usar dichos reactivos para potenciar la respuesta inmunitaria de un sujeto, o para la vacunación de un sujeto. Incluso más específicamente, la presente invención se refiere a lipopéptidos novedosos que tienen actividad inmunogénica potenciada, a formulaciones y a composiciones de vacuna que comprenden dichos lipopéptidos, tales como, por ejemplo, en combinación con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y a métodos para preparar y
10 usar las formulaciones y composiciones de vacuna de la invención.

Antecedentes de la invención

1. General

15 Esta memoria descriptiva contiene información de secuencia de aminoácidos preparada usando PatentIn Versión 3.1, presentada en el presente documento tras el resumen. Cada secuencia se identifica en la lista de secuencias mediante el indicador numérico <210> seguido por el identificador de secuencia (por ejemplo, <210>1, <210>2, etc.). La longitud de cada secuencia y el organismo fuente se indican mediante la información proporcionada en el campo de indicador numérico <211> y <213>, respectivamente. Las secuencias a las que se hace referencia en la memoria descriptiva se definen mediante la expresión "SEQ ID NO:", seguida por el identificador de secuencia (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 se refiere a la secuencia designada como <400>1).

20 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "derivado de" debe considerarse como que indica que puede obtenerse un número entero especificado a partir de una fuente particular aunque no necesariamente de manera directa de esa fuente.

25 En toda esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de una etapa o elemento o número entero establecidos o grupo de etapas o elementos o números enteros pero no la exclusión de ninguna otra etapa o elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

30 La presente invención se realiza sin experimentación excesiva usando, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, virología, tecnología de ADN recombinante, síntesis de péptidos en disolución, síntesis de péptidos en fase sólida e inmunología. Tales procedimientos se describen, por ejemplo, en los siguientes textos que se incorporan como referencia:

1. Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Segunda Edición (1989), los Vol I, II, y III completos;
2. *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vol. I y II (D. N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, texto completo;
- 35 3. *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (M. J. Gait, ed., 1984) IRL Press, Oxford, texto completo, y particularmente los artículos en el mismo de Gait, págs.1-22; Atkinson *et al.*, págs. 35-81; Sproat *et al.*, págs. 83-115; y Wu *et al.*, págs 135-151;
4. *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, texto completo;
- 40 5. *Animal Cell Culture: Practical Approach*, Tercera Edición (John R.W. Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970, texto completo;
6. *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach* (1986) IRL Press, Oxford, texto completo;
7. Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984);
8. *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), series completas;
- 45 9. J.F. Ramalho Ortigao, "The Chemistry of Peptide Synthesis" En: Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website (Interactiva, Alemania);

10. Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. Land Fenichel, R.L. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73 336-342
11. Merrifield, R.B. (1963). *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154.
12. Barany, G. y Merrifield, R.B. (1979) en *The Peptides* (Gross, E. y Meienhofer, J. eds.), vol. 2, págs. 1-284, Academic Press, Nueva York.
- 5 13. Wunsch, E., ed. (1974) *Synthese von Peptidon en Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie* (Müller, E., ed.), vol. 15, 4ª ed., Partes 1 y 2, Thieme, Stuttgart.
14. Bodanszky, M. (1984) *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg.
15. Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg.
16. Bodanszky, M. (1985) *Int. J. Peptide Protein Res.* 25, 449-474.
- 10 17. *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).

Descripción de la técnica relacionada

15 La inmunoterapia o vacunación son técnicas atractivas para la profilaxis o terapia de una amplia variedad de trastornos, tales como, por ejemplo, ciertas enfermedades infecciosas o cánceres. Sin embargo, la aplicación y el éxito de tales tratamientos están limitados en parte por la escasa inmunogenicidad del antígeno diana. Muchos péptidos, glicopéptidos, lípidos, lipopéptidos, hidratos de carbono etc., son escasamente inmunogénicos. Se usan varias técnicas para potenciar la respuesta inmunitaria de un sujeto contra un inmunógeno peptídico.

20 Se conoce utilizar una formulación adyuvante que es extrínseca al inmunógeno peptídico (es decir, se mezcla con el inmunógeno antes de su uso), tal como, por ejemplo, adyuvante completo de Freund (CFA), para potenciar la respuesta inmunitaria de un sujeto contra un inmunógeno peptídico. Sin embargo, muchos de los adyuvantes disponibles actualmente son demasiado tóxicos para su uso en seres humanos, o simplemente son ineficaces. Además, los adyuvantes de este tipo requieren la formulación previa con el inmunógeno peptídico inmediatamente antes de la administración, teniendo tales formulaciones a menudo una baja solubilidad o siendo insolubles.

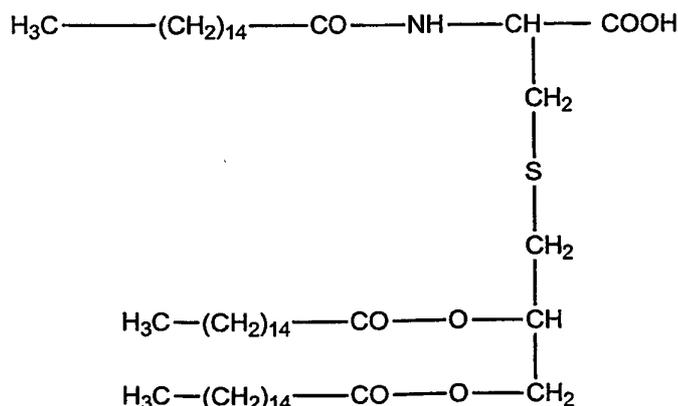
25 Los lipopéptidos, en los que un resto lipídico que se sabe que actúa como un adyuvante se acopla covalentemente a un inmunógeno peptídico, pueden ser capaces de potenciar la inmunogenicidad de un péptido inmunogénico de otro modo débil en ausencia de un adyuvante extrínseco [Jung *et al.*, *Angew Chem, Int Ed Engl* 10, 872, (1985); Martinon *et al.*, *J Immunol* 149, 3416, (1992); Toyokuni *et al.*, *J Am Chem Soc* 116, 395, (1994); Deprez, *et al.*, *J Med Chem* 38, 459, (1995); y Sauzet *et al.*, *Vaccine* 13, 1339, (1995); Benmohamed *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 27, 1242, (1997); Wiesmuller *et al.*, *Vaccine* 7, 29, (1989); Nardin *et al.*, *Vaccine* 16, 590, (1998); Benmohamed, *et al. Vaccine* 18, 2843, (2000); y Obert, *et al.*, *Vaccine* 16, 161, (1998)]. Los lipopéptidos adecuados no muestran ninguno de los efectos secundarios perjudiciales asociados con las formulaciones de adyuvante, y se han observado tanto respuestas de anticuerpos como celulares contra lipopéptidos.

30

35 Se conocen varios ácidos grasos diferentes para su uso en restos lipídicos. Los ácidos grasos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, grupos palmitoílo, miristoílo, estearoílo y decanoílo o, más generalmente, se piensa que es útil cualquier grupo de ácido graso C₂ a C₃₀ saturado, monoinsaturado o poliinsaturado.

El lipoaminoácido N-palmitoil-S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína, también conocido como Pam₃Cys o Pam₃Cys-OH (Wiesmuller *et al.*, *Z. PhysiolChem.* 364 (1983), p593), es una versión sintética del resto N-terminal de la lipoproteína de Braun que abarca las membranas interna y externa de bacterias Gram negativas. Pam₃Cys tiene la estructura de fórmula (I):

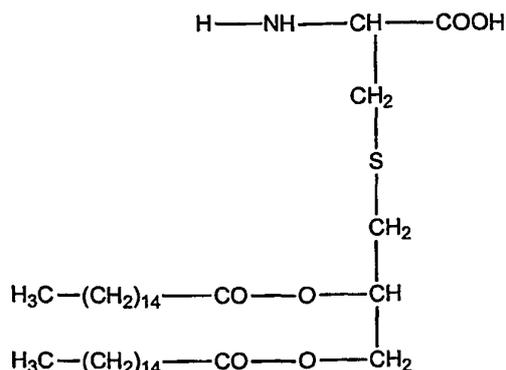
40



La patente estadounidense n.º 5.700.910 concedida a Metzger *et al* (23 de diciembre de 1997) describe varias N-acil-S-(2-hidroxi)alquil)cisteínas para su uso como productos intermedios en la preparación de lipopéptidos que se usan como adyuvantes sintéticos, estimulantes de linfocitos B, estimulantes de macrófagos o vacunas sintéticas. Metzger *et al.* también enseñan el uso de tales compuestos como productos intermedios en la síntesis de Pam₃Cys-OH (Wiesmuller *et al.*, Z. Physiol. Chem. 364, pág. 593, 1983), y de lipopéptidos que comprenden estos lipoaminoácidos o un análogo de los mismos en el extremo N-terminal.

Se ha demostrado que Pam₃Cys puede estimular respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de virus contra células infectadas con el virus *Influenza* (Deres *et al.*, Nature 342, 561, 1989) y provocar la formación de anticuerpos protectores contra la fiebre aftosa (Wiesmuller *et al.*, Vaccine 7, 29, 1989; patente estadounidense n.º 6.024.964 concedida a Jung *et al.*, 15 de febrero de 2000) cuando se acopla a los epítomos apropiados.

Recientemente se ha sintetizado Pam₂Cys (también conocido como dipalmitoil-S-gliceril-cisteína o S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína, un análogo de Pam₃Cys (Metzger, J. W., A. G. Beck-Sickingler, M. Loleit, M. Eckert, W. G. Bessler, y G. Jung. 1995. J Pept Sci 1:184.) y se ha demostrado que se corresponde con el resto lipídico de MALP-2, un lipopéptido que activa macrófagos aislado de *Mycoplasma* (Sacht, G., A. Marten, U. Deiters, R. Sussmuth, G. Jung, E. Wingender, y P. F. Muhlrardt. 1998. Eur J Immunol 28:4207; Muhlrardt, P. F., M. Kiess, H. Meyer, R. Sussmuth, y G. Jung. 1998. Infect Immun 66:4804; Muhlrardt, P. F., M. Kiess, H. Meyer, R. Sussmuth, y G. Jung. 1997. J Exp Med 185:1951). Pam₂Cys tiene la estructura de fórmula (II):



Se ha informado de que Pam₂Cys es un estimulador más potente de esplenocitos y macrófagos que Pam₃Cys (Metzger *et al.*, J Pept. Sci 1, 184, 1995; Muhlrardt *et al.*, J Exp Med 185, 1951, 1997; y Muhlrardt *et al.*, Infect Immun 66, 4804, 1998).

La generación de una respuesta de anticuerpos contra un antígeno dado requiere la generación de una fuerte respuesta de células T cooperadoras. En consecuencia, resulta deseable administrar un antígeno conjuntamente con al menos un epítipo de células T cooperadoras (Vitiello *et al.*, J. Clin. Invest. 95, 341-349, 1995; Livingston *et al.*, J. Immunol. 159, 1383-1392, 1997). Sin embargo, puesto que las respuestas de las células T cooperadoras se proporcionan por células T CD4⁺ que reconocen fragmentos de antígenos peptídicos en el contexto de las moléculas del MHC de clase II sobre la superficie de células presentadoras de antígeno (APC), la mayoría de las formas procesadas de los antígenos peptídicos sólo se presentan por uno o algunos alelos de haplotipos del MHC. Esto

hace que la respuesta de las células T cooperadoras contra un péptido antigénico dado esté estrictamente bajo el control genético de un individuo.

Para evitar una gran variación genética en las respuestas inmunitarias de una población dada de individuos contra un antígeno, se administra un antígeno conjuntamente con una gran proteína que tiene una variedad de epítomos de células T cooperadoras.

Alternativamente, se administran péptidos que contienen epítomos de células T cooperadoras permisivos o promiscuos conjuntamente con el antígeno. Péptidos que contienen epítomos de células T cooperadoras permisivos o promiscuos se presentan en el contexto de la inmensa mayoría de los haplotipos del MHC de clase II; de manera que inducen fuertes respuestas de células T cooperadoras CD4⁺ en la mayoría de una población humana no consanguínea. Ejemplos de epítomos de células T cooperadoras permisivos o promiscuos son el péptido del toxoide tetánico, pfg27 de *Plasmodium falciparum*, lactato deshidrogenasa, y gp 120 del VIH (Contreas *et al.*, Infect. Immun, 66, 3579-3590, 1998; Gaubert *et al.*, J. A.I.D.S. Human Retrovirol 14, 91-101, 1997; Kaumaya *et al.*, J. Mol. Recog. 6, 81-94, 1993; y Fern y Good J. Immunol. 148, 907-913, 1992). Ghosh *et al.*, Immunol 104, 58-65, 2001 y la solicitud de patente internacional n.º PCT/AU00/00070 (WO 00/46390) también describen epítomos de células T cooperadoras procedentes de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (F-VMC). Ciertos epítomos de células T cooperadoras promiscuos inducen fuertes respuestas de células B contra un antígeno dado, y pueden evitar ciertas respuestas inmunitarias limitadas por haplotipo (Kaumaya *et al.*, J. Mol. Recog. 6, 81-94, 1993).

De manera rutinaria, una preparación de vacuna comprenderá una mezcla de polipéptidos que comprenden el epítomo de células T cooperadoras y el epítomo antigénico, sin embargo también se conoce administrar un único polipéptido que comprende tanto el epítomo de células T cooperadoras como el epítomo antigénico (por ejemplo, Ghosh y Jackson, Int. Immunol. 11, 1103, 1999).

Nardin *et al.* (2001), J Immunol. 166, 481-489, dan a conocer una vacuna de polioxima que comprende un grupo lipídico unido a un residuo de lisina ubicado dentro de un núcleo peptídico tetrarramificado. Boeckler *et al.* (1999), Eur. J. Immunol. 29:2297-2308 dan a conocer constructos en los que epítomos de células B y de células T cooperadoras se unen a la superficie exterior de pequeños liposomas unilamelares a través de conjugación covalente a dos anclajes diferentes. Ghosh & Jackson (1999), International Immunology 11 (7):1103-1110 dan a conocer proteínas de fusión que comprenden epítomos de células B y de células T cooperadoras. El documento WO 93/22343 da a conocer un sistema de múltiples péptidos antigénicos que comprende un núcleo dendrítico que comprende múltiples residuos de lisina, un péptido y un resto de anclaje lipófilo.

Sumario de la invención

En el trabajo que condujo a la presente invención, los inventores buscaban producir lipopéptidos altamente inmunogénicos que tengan un resto lipídico y un resto polipeptídico que comprenden tanto un epítomo de células T cooperadoras como un epítomo de células B antigénicos contra los que se desea una respuesta inmunitaria. Los lipopéptidos de la invención tienen el resto lipídico unido a través del grupo amino de la cadena lateral terminal de una lisina interna, o un análogo de lisina interna tal como, por ejemplo, ornitina, ácido diaminopropiónico, o ácido diaminobutírico, en el resto polipeptídico. Esto es distinto de las uniones en el extremo N-terminal, o de las uniones en el extremo C-terminal (Grass-Masse *et al.* Vaccine, 14, 375, 1996), descritas anteriormente.

En consecuencia, situando dicho uno o más residuo(s) de lisina o análogo de residuo(s) de lisina en ubicaciones predeterminadas dentro del polipéptido durante la síntesis del péptido, se especifica fácilmente el sitio de unión del lípido. Por tanto, se dirige la colocación del resto lipídico en el lipopéptido para potenciar la utilidad del producto final para formulaciones de vacuna o adyuvante.

Sorprendentemente, los inventores han encontrado que la unión del resto lipídico a través del grupo épsilon-amino de cadena lateral de un residuo de lisina interna o el grupo de cadena lateral terminal de un residuo de análogo de lisina interna situado entre las secuencias de aminoácidos del epítomo de células T cooperadoras y el antígeno, potencia la solubilidad del producto de lipopéptido en muchos casos.

Una ventaja proporcionada por los lipopéptidos de la presente invención es que son suficientemente inmunogénicos de manera que generalmente no es necesario incluir un adyuvante extrínseco en formulaciones de vacuna que comprenden estos lipopéptidos.

La presente invención engloba claramente la unión de un resto lipídico a través del grupo épsilon-amino de un residuo de lisina interna o el grupo de cadena lateral terminal de un residuo de análogo de lisina interna presente en la secuencia de aminoácidos del epítomo de células T cooperadoras o el antígeno, siendo el único requisito que el resto lipídico no se una al extremo N-terminal ni al extremo C-terminal del péptido. Tal como se explica a modo de ejemplo en el presente documento, los inventores han demostrado claramente que, por ejemplo, el lípido puede unirse al grupo épsilon-amino de un residuo de lisina interna dentro del epítomo de células T cooperadoras sin

pérdida de la capacidad de los lipopéptidos objeto para generar una respuesta inmunitaria, en comparación con un lipopéptido en el que el lípido se añade al grupo épsilon-amino de una lisina situada entre el epítipo de células T cooperadoras y el epítipo de células B.

5 Mediante "interno" se quiere decir una ubicación distinta del extremo N-terminal o el extremo C-terminal de un polipéptido que comprende un epítipo de células T cooperadoras y un epítipo de células B antigénico.

Preferiblemente, el resto lipídico se une al resto peptídico a través del grupo épsilon-amino de un residuo de lisina o el grupo de cadena lateral terminal de un residuo de análogo de lisina interna situado entre las secuencias de aminoácidos del epítipo de células T cooperadoras y el epítipo de células B antigénico

10 Tal como conocerá el experto, la solubilidad de un antígeno es altamente deseable para producir formulaciones de vacuna en una base comercial. Con respecto a esto, los inventores han encontrado que los lipopéptidos más eficaces de la invención son altamente solubles. La capacidad relativa de los lipopéptidos de la invención para inducir una respuesta de anticuerpos en ausencia de adyuvante externo se reflejó por su capacidad para regular por incremento la expresión en superficie de moléculas del MHC de clase II en células dendríticas (DC) inmaduras.

15 Tal como se explica a modo de ejemplo en el presente documento, la estructura del resto lipídico no es esencial para la actividad del lipopéptido resultante, puesto que pueden usarse restos lipídicos que comprenden ácido palmítico, ácido láurico, ácido esteárico o ácido octanoico sin pérdida de inmunogenicidad. En consecuencia, la presente invención no está limitada por la estructura del resto lipídico, a menos que se especifique lo contrario, o que el contexto requiera otra cosa.

20 De manera similar, la adición de múltiples restos lipídicos al resto peptídico, aunque generalmente no se requiere, también está englobada por la invención, a menos que se especifique lo contrario o que el contexto requiera otra cosa. Tal como se explica a modo de ejemplo en el presente documento, la adición de múltiples restos lipídicos al resto peptídico, tal como, por ejemplo, a una posición dentro del epítipo de células T cooperadoras, y a una posición entre el epítipo de células T cooperadoras y el epítipo de células B, no afecta adversamente a la capacidad del lipopéptido para estimular la producción de IgG en comparación con un péptido que sólo tiene un único resto lipídico unido.

25 Resultará evidente a partir de lo anterior que el polipéptido se sintetiza convenientemente como una única cadena de aminoácidos, no requiriéndose de ese modo la modificación tras la síntesis para incorporar ambos epítipos.

30 Opcionalmente, se añade un espaciador de aminoácidos en cualquier lado de la lisina interna o análogo de lisina a los que va a unirse el resto lipídico, tal como, por ejemplo, entre los epítipos de células T cooperadoras y de células B.

35 Tal como se explica a modo de ejemplo en el presente documento, los presentes inventores produjeron el lipopéptido de la invención acoplado el resto lipídico a un grupo épsilon-amino expuesto de un residuo de lisina interna situado entre los epítipos de células T cooperadoras y de células B en el resto peptídico sintético, con o sin un espaciador. Espaciadores particularmente preferidos en este contexto consisten en dímeros, trímeros, tetrámeros, etc. de serina.

También puede añadirse un espaciador de cualquier tipo convencional entre el resto lipídico y el resto polipeptídico. Espaciadores particularmente preferidos en este contexto consisten en dímeros, trímeros tetrámeros, etc., de arginina o serina. Alternativamente, puede usarse un espaciador de ácido 6-aminohexanoico.

40 También se contemplan espaciadores alternativos. Por ejemplo, puede añadirse un espaciador al grupo épsilon-amino expuesto de una lisina interna o al grupo de cadena lateral terminal de un análogo de lisina interna antes de la adición del resto lipídico.

Alternativamente, puede añadirse un lipoaminoácido de fórmula (III) o (IV) directamente al grupo épsilon-amino del residuo de lisina interna o al grupo de cadena lateral terminal del análogo de lisina interna.

45 También se explica a modo de ejemplo en el presente documento que el lipopéptido de la presente invención induce la producción de un anticuerpo de alto título contra el resto de epítipo de células B cuando se administra a un sujeto animal, sin ninguna necesidad de un adyuvante lograr un título de anticuerpos similar. Esta utilidad está apoyada por la maduración potenciada de las células dendríticas tras la administración de los lipopéptidos objeto (es decir, la presentación de antígenos potenciada en comparación con lipopéptidos que tienen el lípido acoplado en el extremo N-terminal).

50 También se explica a modo de ejemplo en el presente documento que un lipopéptido de la presente invención que comprende un epítipo de células B antigénico de LHRH puede inducir esterilidad en un modelo de ratón

representativo de otros mamíferos en los que va a inducirse esterilidad. La producción sostenida de anticuerpos contra LHRH lograda por los lipopéptidos de la invención demuestra la utilidad general de los lipopéptidos objeto en la inducción de inmunidad humoral y como principio activo en la preparación de una vacuna.

5 También se explica a modo de ejemplo en el presente documento que un lipopéptido de la presente invención que comprende un epítipo de células B antigénico de la proteína M de *Streptococcus* del grupo A (en el presente documento "GAS") puede inducir protección en un modelo de ratón representativo de seres humanos y otros mamíferos en los que está indicada la vacunación contra GAS. Los datos facilitados en el presente documento indican que los lipopéptidos de la presente invención pueden inducir una producción sostenida de anticuerpos contra GAS (tanto IgG sérica, como IGA salival y fecal), y la opsonización de GAS, y la supervivencia de animales contra una exposición a GAS posterior. Estos datos demuestran la utilidad general de los lipopéptidos objeto en inducir inmunidad humoral y como principio activo en una preparación de vacuna contra GAS.

15 También se explica a modo de ejemplo en el presente documento que un lipopéptido de la presente invención que comprende un epítipo de células B antigénico de gastrina ("pentagastrina") puede inducir la producción sostenida de anticuerpos contra gastrina y/o colecistoquinina en un modelo de ratón de otros mamíferos en los que está indicada la inhibición de la secreción de ácido gástrico. Los datos facilitados en el presente documento demuestran la utilidad general de los lipopéptidos objeto en inducir inmunidad humoral contra gastrina y en la inmunoneutralización de gastrina, para bloquear de ese modo la secreción de ácido gástrico, en un animal que padece hipergastrinemia, Síndrome de Zollinger-Ellison, ulceración gástrica o ulceración duodenal debido a secreción excesiva y no regulada de ácido gástrico, o para reducir o evitar la formación de tumores dependientes de gastrina en el páncreas o en el duodeno (es decir, la profilaxis y/o la terapia del gastrinoma).

20 Como quedará claro para los expertos en la técnica, la naturaleza de los epítopos de células T cooperadoras y de células B no es crítica en el contexto de la presente invención. El enfoque novedoso de unir el resto lipídico al grupo épsilon-amino de uno o más residuos de lisina interna o residuos de análogo de lisina dentro de la parte polipeptídica del constructo tiene una aplicación amplia. En consecuencia, basándose en los resultados presentados en el presente documento, se entenderá que puede usarse una amplia variedad de epítopos de células T cooperadoras y de células B en los constructos de lipopéptido.

25 De hecho, la amplia variedad de aplicaciones explicadas a modo de ejemplo en el presente documento indican la generalidad de los lipopéptidos de la presente invención en la profilaxis y la terapia de varios estados diferentes en seres humanos y otros mamíferos en los que está indicada la generación de una respuesta inmunitaria contra un epítipo de células B antigénico. En consecuencia, la presente invención no se limita al tratamiento de ningún estado, dolencia o estado patológico específico.

Breve descripción de los dibujos:

35 La figura 1 es una representación de la estructuras de péptidos y lipopéptidos sintéticos (izquierda) y las solubilidades relativas de una muestra de esos péptidos y lipopéptidos en solución salina (derecha). Los péptidos se designaron de la siguiente forma:

(i) [Th] que consiste en un epítipo de células T cooperadoras CD4⁺ de la cadena ligera de hemaglutinina del virus *Influenza* (SEQ ID NO: 1) o el péptido P25 de F-VMC (SEQ ID NO: 24);

40 (ii) [B] que consiste en un epítipo de células B que consiste en residuos 1-10 de LHRH (SEQ ID NO: 2) o residuos 2-10 de LHRH (SEQ ID NO: 3) o residuos 6-10 de LHRH (SEQ ID NO: 4), un epítipo de células B de la proteína M de *Streptococcus* del grupo A ("péptido J14"; SEQ ID NO: 101); o un epítipo de células B de gastrina contenido dentro de los 5 residuos de gastrina del extremo C-terminal (es decir, "pentagastrina"; SEQ ID NO: 102);

(iii) [Th]-[B] que consiste en un polipéptido que tiene (i) y (ii) (por ejemplo, SEQ ID NO: 5, 103, 104, 105, 107, 109 ó 111); y

45 (iv) [Th]-Lys-[B] que consiste en un polipéptido que tiene (i) y (ii) separados por un residuo de lisina (por ejemplo, SEQ ID NO: 7, 9, 13, 106, 108, 110 ó 112).

Los lipopéptidos se designaron de la siguiente forma:

(i) Pam₃Cys-[Th]-[B] que consiste en un lípido de fórmula (I) conjugado con el extremo N-terminal del péptido [Th]-[B] citado anteriormente (es decir, con el extremo N-terminal de, por ejemplo, una cualquiera de SEQ ID NO: 5, 103, 104, 105, 107, 109 ó 111);

50 (ii) Pam₃Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] que consiste en un lipoaminoácido de fórmula (III) conjugado con el extremo N-terminal del péptido [Th]-[B] citado anteriormente (es decir, con el extremo N-terminal de, por ejemplo, una cualquiera de

SEQ ID NO: 5, 103, 104, 105, 107, 109 ó 111);

(iii) Pam₂Cys-[Th]-[B] que consiste en un lípido de fórmula (II) conjugado con el extremo N-terminal del péptido [Th]-[B] citado anteriormente (es decir, con el extremo N-terminal de, por ejemplo, una cualquiera de SEQ ID NO: 5, 103, 104, 105, 107, 109 ó 111);

5 (iv) Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] que consiste en un lípido de fórmula (IV) conjugado con el extremo N-terminal del péptido [Th]-[B] citado anteriormente (es decir, con el extremo N-terminal de, por ejemplo, una cualquiera de SEQ ID NO: 5, 103, 104, 105, 107, 109 ó 111);

10 (v) [Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B] que consiste en el péptido [Th]-Lys-[B] (por ejemplo, una cualquiera de SEQ ID NO: 7, 9, 13, 106, 108, 110 ó 112) y un lípido de fórmula (I) conjugado con el grupo épsilon-amino de la lisina interna (Lys) de dicho péptido;

(vi) [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B] que consiste en el péptido [Th]-Lys-[B] (por ejemplo, una cualquiera de SEQ ID NO: 7, 9, 13, 106, 108, 110 ó 112) y un lípido de fórmula (II) conjugado con el grupo épsilon-amino de la lisina interna (Lys) de dicho péptido; y

15 (vii) [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] que consiste en el péptido [Th]-Lys-[B] (por ejemplo, una cualquiera de SEQ ID NO: 7, 9, 13, 106, 108, 110 ó 112) conjugado en serie a través del grupo épsilon-amino de la lisina interna (Lys) con un homodímero de serina (es decir, Ser-Ser) y luego con un lípido de fórmula (II). Por tanto, para producir este lipopéptido ramificado se añadieron los dos residuos de serina al grupo épsilon-amino del residuo de lisina antes de que se uniera el resto lipídico.

20 La solubilidad relativa de los péptidos y lipopéptidos basándose en el epítipo de células T cooperadoras hemaglutinina del virus *Influenza* (SEQ ID NO: 1) y en el epítipo de células B LHRH 1-10 (SEQ ID NO: 2) se indica a la derecha de la figura, oscilando desde baja solubilidad (-) hasta alta solubilidad (++++).

25 La figura 2 es una representación fotográfica que muestra las solubilidades de lipopéptidos designados [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] (izquierda) y Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] (derecha) en la figura 1, en la que los restos polipeptídicos tienen las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 5, respectivamente. Ambas disoluciones son aproximadamente 1 mg/ml de lipopéptido en solución salina. La transparencia potenciada de la disolución que comprende el lipopéptido [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] es indicativa de su mayor solubilidad en comparación con el lipopéptido Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B].

30 La figura 3 es una representación gráfica que muestra los títulos de anticuerpo anti-LHRH obtenidos usando cada uno de los péptidos y lipopéptidos mostrados en la figura 1, en el que los restos polipeptídicos tienen las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7. Un lipopéptido de control negativo designado Pam₃Cys-Ser-Lys₄ consistió en el lípido de fórmula (I) conjugado con el extremo N-terminal de un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos Ser-Lys-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NO: 17). Todos los péptidos y lipopéptidos se administraron por vía subcutánea (s.c.) en solución salina tanto para la inoculación primaria (círculos abiertos) como para inoculaciones secundarias (círculos cerrados). Los dos péptidos no lipidados [Th]-Lys-[B] y [Th]-[B] se administraron en adyuvante completo de Freund (CFA) para las inoculaciones primarias, y en adyuvante incompleto de Freund (IFA) para las inoculaciones secundarias. Para la administración del péptido [Th]-[B] en combinación con el lipopéptido Pam₃Cys-S-Lys₄, el péptido se disolvió en solución salina y se mezcló con el lipopéptido en la razón molar 1:1 ó 1:5 tal como se indica. La dosis de los inmunógenos peptídicos y lipopeptídicos administrada fue de 20 nmoles. En todos los casos, los grupos de animales control recibieron solución salina emulsionada en CFA para la sensibilización y solución salina emulsionada en IFA para la inoculación secundaria.

35 La figura 4 es una representación gráfica que muestra títulos de anticuerpo anti-LHRH (log₁₀) en el eje de ordenadas para cada isotipo de anticuerpo anti-LHRH (es decir, IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, e Ig total) (eje de abscisas) obtenidos o provocados durante las respuestas secundarias de anticuerpos tras la inoculación con el lipopéptido [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] (SEQ ID NO: 7). Se extrajo sangre de ratones 2 semanas tras recibir la segunda dosis de la vacuna de lipopéptido administrada en solución salina o bien por vía subcutánea (cuadrados abiertos) o bien por vía intranasal (cuadrados cerrados) en solución salina.

45 La figura 5 es una representación gráfica que muestra las capacidades relativas de los péptidos y lipopéptidos mostrados en la figura 1 (es decir, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7) para potenciar la expresión de moléculas del MHC de clase II sobre la superficie de células dendríticas. Los péptidos y lipopéptidos se indican en cada panel según la nomenclatura de la figura 1. Para cada péptido o lipopéptido, se expusieron 8x10⁴ células D1 a 4,5 fmoles del péptido o lipopéptido y se incubaron durante la noche.

Se recogieron las células y se determinó la expresión de las moléculas del MHC de clase II mediante citometría de flujo tras tinción con anticuerpo monoclonal anti-I-E^{K,d} conjugado con FITC. Para cada muestra se analizaron

aproximadamente 3×10^4 células D1. Los datos mostrados son para una representación de cuatro experimentos independientes, e indican la tinción potenciada con anticuerpo monoclonal (es decir, maduración de células D1 potenciada) tras la administración de lipopéptidos, particularmente del lipopéptido [Th]-Lys (Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] que indujo una tasa de maduración de D1 que se aproximaba al nivel observado para las células D1 expuestas al lipopolisacárido (LPS). Los datos obtenidos usando el péptido no lipidado [Th]-Lys-[B] son sustancialmente iguales que para las células D1 incubadas en medio sin ningún péptido, lipopéptido o LPS añadido, lo que indica una tasa de maduración espontánea de aproximadamente el 26%.

La figura 6 es una representación gráfica que muestra respuestas de anticuerpos anti-LHRH provocados por [Th]-Lys (Pam₂Cys)-[B] lipidado en la que [Th] consiste en el epítipo de células T CD4⁺ de la cadena ligera de hemaglutinina de *Influenza* (SEQ ID NO: 1) y [B] es LHRH 1-10 (SEQ ID NO: 2) o LHRH 6-10 (es decir, los 5 residuos del extremo C terminal de LHRH; SEQ ID NO: 4), con o sin un espaciador de serina (Ser-Ser) situado entre los restos lípidos y peptídicos. El lipopéptido [Th]-Lys(Pam₂Cys)-GlyLeuArgProGly es estructuralmente similar a [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B], sin embargo este lipopéptido comprende SEQ ID NO: 4 en lugar de SEQ ID NO: 2.

La figura 7 es una representación que muestra los datos estructurales, los datos de espectros de masas y HPLC para diferentes constructos de lipopéptido basándose en el epítipo de células T cooperadoras P25 (SEQ ID NO: 24) y LHRH 2-10 (SEQ ID NO: 3), en los que el resto peptídico tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 9 y el resto lipídico se selecciona del grupo que consiste en: (i) Pam₂Cys; (ii) Ste₂Cys; (iii) Lau₂Cys; y (iv) Oct₂Cys. También se situaron diferentes espaciadores entre el resto lipídico y el resto peptídico, de la siguiente forma: (i) Ser-Ser, dos residuos de serina; (ii) Arg-Arg, dos residuos de arginina; y (iii) Ahx, ácido 6-aminohexanoico. Las estructuras de los lipopéptidos se indican en la columna de la izquierda; los cromatogramas de HPLC para cada lipopéptido se indican en la columna central; y los espectros de masas se muestran en la columna de la derecha de la figura.

La figura 8 es una representación gráfica que muestra la inmunogenicidad de aquellos lipopéptidos indicados en la leyenda de la figura 7 que tiene un espaciador de Ser-Ser entre el resto peptídico y el lipídico y en los que el resto lipídico se selecciona del grupo que consiste en: (i) Pam₂Cys; (ii) Ste₂Cys; (iii) Lau₂Cys; y (iv) Oct₂Cys. Se inocularon grupos de ratones BALB/c (6-8 semanas de edad) por vía subcutánea con 20 nmoles de inmunógenos peptídicos tanto para vacunaciones primarias como secundarias. Todos los lipopéptidos se administraron en solución salina. El péptido no lipidado [Th]-Lys-[B] se administró en CFA como control. Se obtuvieron los sueros de sangre extraída a las 4 semanas tras la vacunación primaria (círculos abiertos) y 2 semanas tras la vacunación secundaria (círculos cerrados).

La figura 9 es una representación gráfica que muestra la inmunogenicidad de los inmunógenos lipopeptídicos de la figura 7 que tienen diferentes espaciadores situados entre los restos lipídicos y peptídicos, en particular espaciadores que consisten en homodímeros de serina (Ser-Ser), homodímeros de arginina (Arg-Arg), o ácido 6-aminohexanoico (Ahx). Se inocularon grupos de ratones BALB/c (6-8 semanas de edad) por vía subcutánea con 20 nmoles de inmunógenos peptídicos tanto para vacunaciones primarias como secundarias. Todos los lipopéptidos se administraron en solución salina. El péptido no lipidado [Th]-Lys-[B] se administró en CFA como control. Se obtuvieron los sueros de sangre extraída a las 4 semanas tras la vacunación primaria (círculos abiertos) y 2 semanas tras la vacunación secundaria (círculos cerrados).

La figura 10 es una representación gráfica que muestra datos de control de calidad para un constructo de lipopéptido [Th](Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] en el que el resto lipídico es colgante del grupo épsilon-amino de un residuo de lisina interna (Lys-14) dentro del epítipo de células T cooperadoras del péptido indicado en SEQ ID NO: 103. Las estructuras del lipopéptido se indican en la columna de la izquierda; un cromatograma de HPLC para el lipopéptido se indica en la columna central; y los datos de los espectros de masas se muestran en la columna de la derecha de la figura.

La figura 11 es una representación gráfica que muestra la inmunogenicidad del lipopéptido inmunógeno descrito en la leyenda de la figura 10, en comparación con un lipopéptido inmunógeno que tiene el resto lipídico añadido a un residuo de lisina interna situado entre el epítipo de células T cooperadoras y el epítipo de células B (es decir, el resto lipídico se añade a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 9, que difiere de SEQ ID NO: 103 en que tiene una lisina interna añadida entre los epítipos de células T cooperadoras y de células B). También se usó como control un polipéptido no lipidado control que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 9 (es decir, [Th]-Lys-[B]). Se inocularon grupos de ratones BALB/c (6-8 semanas de edad) por vía subcutánea con 20 nmoles de inmunógenos peptídicos tanto para vacunaciones primarias como secundarias. Todos los lipopéptidos se administraron en solución salina. El péptido control no lipidado [Th]-Lys-[B] se administró en CFA. Se obtuvieron los sueros de sangre extraída a las 4 semanas tras la vacunación primaria (círculos abiertos) y 2 semanas tras la vacunación secundaria (círculos cerrados). El constructo de lipopéptido [Th](Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] tiene el resto lipídico unido al grupo épsilon-amino de un residuo de lisina (Lys-14) dentro del epítipo de células T cooperadoras. El constructo de lipopéptido [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] tiene el lípido unido al grupo épsilon-amino de un residuo de lisina situado entre los dos epítipos peptídicos.

La figura 12 es una representación gráfica que muestra la capacidad de un lipopéptido que comprende el epítipo de células T cooperadoras P25 (SEQ ID NO: 24) y un epítipo de células B de *Streptococcus* del grupo A ("J14"; SEQ ID NO: 101) y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 106, y uno o dos restos lipídicos para provocar IgG sérica en ratones. Se añadió el resto de lipoaminoácido Pam₂Cys-Ser-Ser a una lisina interna situada entre el epítipo de células T cooperadoras y el epítipo de células B en todos los lipopéptidos sometidos a prueba. En el lipopéptido [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[J14], éste es el único resto lipídico, mientras que en el lipopéptido Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[J14], se añadió un resto de lipoaminoácido adicional Pam₂Cys-Ser-Ser al grupo amino del extremo N-terminal del epítipo de células T cooperadoras. Otros inmunógenos fueron los siguientes: J14, péptido no lipidado que consiste en el péptido que contiene el epítipo de células B J14 (SEQ ID NO: 101); [Th]-[J14], un péptido no lipidado que consiste en el epítipo de células T cooperadoras (SEQ ID NO: 24) y el péptido J14 (SEQ ID NO: 101) y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 106; un péptido lipidado que consiste en el epítipo de células T cooperadoras (SEQ ID NO: 24) y el péptido que contiene el epítipo de células B LHRH (SEQ ID NO: 3) y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; y solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se inoculó a ratones Quackenbush hembra no consanguíneos de 4-6 semanas de edad (15/grupo) por vía intranasal con 60 µg de la vacuna basada en el péptido en un volumen total de 30 µl de PBS. Los ratones recibieron tres dosis de vacuna a intervalos de 21 días. Siete días tras la dosis final se extrajo sangre de los ratones de la vena de la cola y se determinó la IgG sérica específica de J14. Los ratones que recibieron cualquiera de los lipopéptidos que contenían J14 tuvieron títulos de IgG sérica significativamente superiores (P<0,05) que los grupos control.

La figura 13 es una representación gráfica que muestra la capacidad de opsonización de antisueros provocados por los péptidos no lipidados y los lipopéptidos indicados en la leyenda de la figura 12. Se inoculó a ratones Quackenbush hembra no consanguíneos de 4-6 semanas de edad (15/grupo) por vía intranasal con 60 µg de la vacuna basada en el péptido en un volumen total de 30 µl de PBS. Los ratones recibieron tres dosis de vacuna a intervalos de 21 días. Se realizaron ensayos bactericidas indirectos para determinar la capacidad de los sueros de ratones inmunizados para opsonizar o "eliminar" la cepa M1 de GAS *in vitro*. Los sueros recogidos de ratones inmunizados con cualquier lipopéptido que contenía J14 pudieron eliminar de manera significativa (P<0,05) GAS en comparación con los sueros recogidos de animales inmunizados con PBS o lipopéptidos o péptidos control.

La figura 14 es una representación gráfica que muestra la capacidad de los péptidos no lipidados y lipopéptidos indicados en la leyenda de la figura 12 para provocar IgA salival en ratones. Se inoculó a ratones Quackenbush hembra no consanguíneos de 4-6 semanas de edad (15/grupo) por vía intranasal con 60 µg de cada vacuna basada en péptidos en un volumen total de 30 µl PBS. Los ratones recibieron tres dosis de vacuna a intervalos de 21 días. Ocho días tras la dosis final se recogió la saliva de ratones individuales y se determinaron los títulos de anticuerpo IgA salival específico para J14 promedio mediante ELISA convencional. Los ratones inoculados con cualquier lipopéptido que contenía J14 tuvieron títulos significativamente superiores (P<0,05) que los grupos control que se inmunizaron con PBS o lipopéptidos o péptidos control.

La figura 15 es una representación gráfica que muestra la capacidad de péptidos que contienen J14 no lipidado indicados en la leyenda de la figura 12 para provocar IgA fecal en ratones. Se inoculó a ratones Quackenbush hembra no consanguíneos de 4-6 semanas de edad (15/grupo) por vía intranasal con 60 µg de la vacuna basada en el péptido en un volumen total de 30 µl de PBS. Los ratones recibieron tres dosis de vacuna a intervalos de 21 días. Se determinó la IgA fecal 6 días tras la última dosis de antígeno. Sólo los ratones inoculados con el péptido que contenía J4 monolipidado, en el que el resto lipídico estaba situado entre el epítipo de células T cooperadoras y el epítipo de células B (es decir, [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[J14]) tuvieron títulos de IgA fecal significativos (P<0,05).

La figura 16 es una representación gráfica que muestra la capacidad de ratones para sobrevivir a la exposición con bacterias tras la inoculación con los péptidos no lipidados y lipopéptidos indicados en la leyenda de la figura 12. Dos semanas tras la última dosis de antígeno, se expuso a los ratones por vía intranasal a la cepa M1 de GAS y después se determinó la supervivencia en diversos puntos de tiempo. Los ratones inoculados con el péptido que contenía J4 monolipidado, en el que el resto lipídico estaba situado entre el epítipo de células T cooperadoras y el epítipo de células B (es decir, [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[J14]) demostraron la mejor supervivencia tras la exposición.

La figura 17 es una representación gráfica que muestra la inmunogenicidad de inmunógenos lipopeptídicos basados en gastrina. Se inoculó a grupos (5 animales/grupo) de ratones BALB/c (6-8 semanas de edad) por vía subcutánea en la base de la cola con 20 nmoles de inmunógenos peptídicos. Los péptidos usados fueron gastrina-17 (SEQ ID NO: 113); [P25]-Lys-[pentagastrina] (SEQ ID NO: 110) en el que la pentagastrina es la secuencia del extremo C-terminal GW MDF de gastrina tal como se indica en (SEQ ID NO: 102); y [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[PentaGastrin] (SEQ ID NO: 110) lipidado añadidos a un residuo de lisina interna). Todos los lipopéptidos se administraron en PBS y los péptidos no lipidados se administraron en CFA. El control negativo fue solución salina emulsionada con CFA. Se obtuvieron los sueros de los animales 4 semanas tras la inmunización y al mismo tiempo los animales recibieron una segunda dosis similar de antígeno. Se extrajo sangre de los ratones por segunda vez 2 veces tras recibir la segunda dosis de antígeno y se detectaron los anticuerpos que podían reaccionar con la secuencia peptídica de gastrina-17 mediante ELISA. Los resultados se expresan como el título de anticuerpos anti-gastrina-17.

Descripción detallada de las reivindicaciones preferidas

Lipopéptidos

Un aspecto de la invención proporciona un lipopéptido aislado que comprende un polipéptido conjugado con uno o más restos lipídicos en el que:

5 (i) dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que comprende:

(a) la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células T cooperadoras (Th) y la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células B, en el que dichas secuencias de aminoácidos son diferentes; y

10 (b) uno o más residuos de lisina interna o residuos de análogos de lisina interna para la unión covalente de cada uno de dichos restos lipídicos a través del grupo épsilon-amino o el grupo de cadena lateral terminal de dicha lisina o análogo de lisina; y

(ii) cada uno de dicho uno o más restos lipídicos se une covalentemente directa o indirectamente a un grupo épsilon-amino de dicho uno o más residuos de lisina interna o a un grupo de cadena lateral terminal de dichos residuos de análogos de lisina interna.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "lipopéptido" significa cualquier composición que no se produce de manera natural de materia que comprende uno o más restos lipídicos y una o más secuencias de aminoácidos que se conjuga(n) directa o indirectamente, estando dicha composición de materia sustancialmente libre de proteína o lípido no conjugado no específico.

Mediante "directamente" se quiere decir que un resto lipídico y una secuencia de aminoácidos no están separados por una molécula espaciadora.

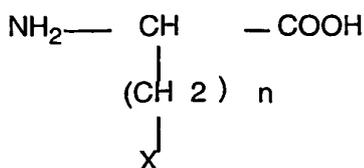
20 Mediante "indirectamente" se quiere decir que un resto lipídico y una secuencia de aminoácidos están separados por un espaciador que comprende una o más moléculas que contienen carbono, tales como, por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos puede ser de cualquier longitud, limitada por la necesidad de funcionalidad tanto del epítipo de células T cooperadoras como del epítipo de células B.

25 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "residuo de lisina interna" significa un residuo de lisina en el polipéptido que comprende tanto el epítipo de células T cooperadoras como el epítipo de células B, en el que dicha lisina no es el residuo de aminoácido del extremo N-terminal ni el residuo del extremo C-terminal de dicho polipéptido. Esto significa que el residuo de lisina interna al que se une el resto lipídico es un residuo que está presente en la secuencia de aminoácidos del epítipo de células T cooperadoras o la secuencia de aminoácidos del antígeno. El residuo de lisina interna también puede ser distinto del epítipo de células T cooperadoras o el epítipo de células B, en cuyo caso debe ligar estos dos epítipos del polipéptido.

35 De manera similar, la expresión "residuo de análogo de lisina interna" significa un residuo de análogo de lisina en el polipéptido que comprende tanto el epítipo de células T cooperadoras como el epítipo de células B, en el que dicho análogo de lisina no es el residuo de aminoácido del extremo N-terminal ni el residuo del extremo C-terminal de dicho polipéptido. Los criterios para establecer si un residuo de lisina es "interno" o no se aplicarán por analogía para determinar si un análogo de lisina es interno o no.

40 Mediante "análogo de lisina" se quiere decir un compuesto sintético que puede incorporarse en la parte interna de un péptido que tiene un grupo lateral adecuado al que puede acoplarse el resto lipídico, incluyendo un análogo de aminoácido o aminoácidos que no se producen de manera natural que tienen tal grupo lateral amino. Los análogos de lisina preferidos incluyen compuestos de la siguiente fórmula general (V):



en la que n es un número entero desde 0 hasta 3 y en la que X es un grupo de cadena lateral terminal de dicho residuo de análogo de lisina interna seleccionado del grupo que consiste en NH, O y S. Más preferiblemente, n es un número entero que tiene un valor de desde 1 hasta 3. Más preferiblemente, X es un amino grupo y el análogo de lisina es un compuesto de diamino. En una realización particularmente preferida, el análogo de lisina se selecciona del grupo que consiste en ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr), ácido 2,4-diaminobutírico (Dab) y ácido 2,5-diaminovalérico [es decir, ornitina (Orn)].

Los expertos en la técnica conocerán el significado de la expresión "grupo épsilon-amino".

La expresión "grupo de cadena lateral terminal" significa un sustituyente en la cadena lateral de un análogo de lisina que es distal al carbono alfa de dicho análogo, tal como, por ejemplo, un beta-amino de Dpr, gamma-amino de Dab, o delta-amino de Om.

Los inventores han encontrado que los lipopéptidos más eficaces son altamente solubles. La capacidad relativa de los lipopéptidos de la invención para inducir una respuesta de anticuerpos en ausencia de adyuvante externo se reflejó por su capacidad para regular por incremento la expresión en superficie de moléculas del MHC de clase II en células dendríticas (DC) inmaduras, particularmente en células D1 tal como describen Winzler *et al* J Exp Med 185, 317, 1997).

Tal como conocerán los expertos en la técnica, el grupo épsilon-amino de lisina es el grupo amino terminal de la cadena lateral de este aminoácido. El uso del grupo épsilon-amino de lisina o el grupo de cadena lateral terminal de un análogo de lisina para la ligación cruzada al resto lipídico facilita la síntesis del resto polipeptídico como una secuencia de aminoácidos colineal que incorpora tanto el epítipo de células T cooperadoras como el epítipo de células B. Existe una clara distinción estructural entre un lipopéptido en el que el lípido se une a través del grupo épsilon-amino de un residuo de lisina o el grupo de cadena lateral terminal de un análogo de lisina y un lipopéptido que tiene el lípido unido a través de un grupo alfa-amino de lisina, puesto que estos últimos lipopéptidos mencionados sólo pueden tener el resto lipídico conjugado con un residuo N-terminal.

En consecuencia, se prefiere particularmente que el al menos un residuo de lisina interna o el análogo de lisina interna al que se une el resto lipídico esté situado dentro del resto polipeptídico para separar los epítopos inmunológicamente funcionales. Por ejemplo, el residuo de lisina interna o el residuo de análogo de lisina interna puede actuar como un espaciador y/o residuo de ligación entre los epítopos. Naturalmente, cuando la lisina interna o el análogo de lisina interna se sitúa entre el epítipo de células T cooperadoras y el epítipo de células B, el resto lipídico se unirá en una posición que también está entre estos epítopos, aunque formando una ramificación desde la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Preferiblemente, se usa un único residuo de lisina interna o el análogo de lisina interna para separar epítopos de células B y de células T cooperadoras (por ejemplo, una cualquiera de SEQ ID NO: 7, 9, 13, 106, 108, 110 ó 112), en cuyo caso el resto lipídico se une a través del grupo épsilon-amino de un residuo de lisina o el grupo de cadena lateral terminal de un análogo de lisina situado entre las secuencias de aminoácidos del epítipo de células T cooperadoras y el epítipo de células B antigénico.

El grupo épsilon-amino de la lisina interna o el grupo de cadena lateral terminal de un análogo de lisina pueden protegerse mediante grupos químicos que son ortogonales a los usados para proteger los grupos funcionales de cadena lateral y alfa-amino de otros aminoácidos. De esta forma, el grupo épsilon-amino de lisina o el grupo de cadena lateral terminal de un análogo de lisina pueden exponerse selectivamente para permitir la unión de grupos químicos, tales como restos que contienen lípidos, específicamente al grupo épsilon-amino o al grupo de cadena lateral terminal, según resulte apropiado.

Para las síntesis de péptidos que usa la química de Fmoc, se proporciona un grupo épsilon de lisina adecuado protegido ortogonalmente mediante el residuo de aminoácido modificado Fmoc-Lys(Mtt)-OH (*N* α -Fmoc-N ϵ -4-metiltritol-L-lisina). Están disponibles grupos similares adecuados de cadena lateral protegida ortogonalmente para diversos análogos de lisina contemplados en el presente documento, por ejemplo, Fmoc-Orn (Mtt)-OH (*N* α -Fmoc-N δ -4-metiltritol-L-Ornitina), Fmoc-Dab(Mtt)-OH (ácido *N* α -Fmoc-N γ -4-metiltritol-L-diaminobutírico) y Fmoc-Dpr(Mtt)-OH (ácido *N* α -Fmoc-N β -4-metiltritol-L-diaminopropiónico). El grupo protector de cadena lateral Mtt es estable a condiciones en las que se elimina el grupo Fmoc presente en el grupo alfa-amino de lisina o un análogo de lisina pero puede eliminarse selectivamente con ácido trifluoroacético al 1% en diclorometano. También pueden usarse en este contexto Fmoc-Lys(Dde)-OH (*N* α -Fmoc-N ϵ -1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)etil-L-lisina) o Fmoc-Lys(ivDde)-OH (*N* α -Fmoc-N ϵ -1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutil-L-lisina), en los que los grupos protectores de cadena lateral Dde se eliminan selectivamente durante la síntesis de péptidos mediante el tratamiento con hidracina.

Para la síntesis de péptidos que usa química de Boc, puede usarse Boc-Lys(Fmoc)-OH. El grupo protector de cadena lateral Fmoc puede eliminarse selectivamente mediante tratamiento con piperidina o DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno) pero se mantiene en su sitio cuando el grupo Boc se elimina del extremo alfa-terminal usando ácido trifluoroacético.

5 La distancia óptima entre el epítipo de células T cooperadoras y el epítipo de células B, y por consiguiente, la colocación y el número de residuos de lisina interna o análogos de lisina precisos en el lipopéptido de la invención se determina fácilmente de manera empírica, para cada combinación de epítopos de células T cooperadoras, epítopos de células B, y lípidos. En el caso de los péptidos y polipéptidos sintéticos, las limitaciones de la metodología de síntesis usada para preparar los polipéptidos puede determinar en parte la separación entre el epítipo de células T cooperadoras y el epítipo de células B que puede lograrse, y el número y la colocación del/de los residuo(s) de lisina interna o análogo de lisina.

10 Preferiblemente, el epítipo de células T cooperadoras y el epítipo de células B están separados por al menos uno o dos o tres o cuatro o cinco residuos de aminoácidos incluyendo un único residuo de lisina interna o residuo de análogo de lisina.

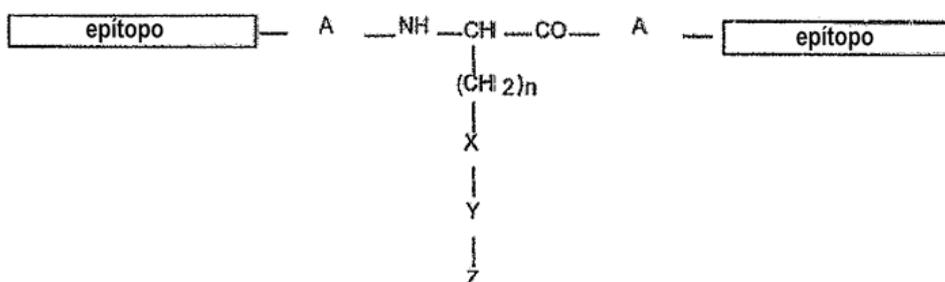
15 La presente invención contempla claramente la adición de múltiples restos lipídicos al resto polipeptídico. Para lograr esto, el polipéptido puede incluir múltiples residuos de lisina interna o múltiples residuos de análogos de lisina interna o una combinación de los mismos. Puede producirse un impedimento estérico en la adición del lípido si múltiples residuos de lisina interna o de análogo de lisina están situados más cerca entre ellos, produciendo de ese modo una mezcla de productos finales, o un rendimiento reducido.

20 En relación con esta consideración está el hecho de que no es necesario que toda la secuencia de aminoácidos que comprende el epítipo de células T cooperadoras o que toda la secuencia de aminoácidos que comprende el epítipo de células B tenga una función inmunitaria. En consecuencia, dichas secuencias de aminoácidos, aunque comprenden dichos epítopos, pueden tener una secuencia adicional que no posea actividad de célula T cooperadora o un epítipo de células B. Cuando tales secuencias adicionales incluyen uno o más residuos de lisina interna o de análogo de lisina, los grupos de cadena lateral terminal de tales residuos pueden servir como sitios de unión para el resto lipídico. Naturalmente, resulta esencial conservar la función de células T cooperadoras y la función de epítipo de células B.

25 La colocación del residuo de lisina interna o el análogo de lisina interna para la unión del resto lipídico también debe seleccionarse de manera que la unión del resto lipídico no interfiera con la función inmunitaria del epítipo de células T cooperadoras o el epítipo de células B en un sujeto al que se administra el lipopéptido. Por ejemplo, dependiendo de la selección del resto lipídico, la unión de dicho lípido dentro del epítipo de células B puede impedir estéricamente la presentación de antígenos.

30 Una forma preferida generalizada del lipopéptido de la invención, en la que la lisina interna o el análogo de lisina interna se sitúa entre los epítopos de células T cooperadoras y de células B se proporciona por la fórmula general (VI)

Fórmula (VI):



en la que:

epítipo es un epítipo de células T cooperadoras o epítipo de células B;

35 A está o bien presente o bien ausente y consiste en un espaciador de aminoácidos de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 aminoácidos de longitud;

n es un número entero que tiene un valor de 1, 2, 3 ó 4;

X es un grupo de cadena lateral terminal seleccionado del grupo que consiste en NH, O y S y preferiblemente que consiste en NH;

Y está o bien presente o bien ausente y consiste en un espaciador de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 aminoácidos de longitud, en el que se prefiere que dicho espaciador comprenda arginina, serina o ácido 6-aminohexanoico; y

5 Z es un resto lipídico, preferiblemente un resto de lipoaminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pam₂Cys, Pam₃Cys, Ste₂Cys, Lau₂Cys, y Oct₂Cys.

Los expertos en la técnica se darán cuenta de que Ste₂Cys se conoce también como S-[2,3-bis(estearoiloxi)propil]cisteína o diestearoil-S-gliceril-cisteína; que Lau₂Cys se conoce también como S-[2,3-bis(lauroiloxi)propil]cisteína o dilauoil-S-gliceril-cisteína; y que Oct₂Cys se conoce también como S-[2,3-bis(octanoiloxi)propil]cisteína o dioctanoil-S-glicerilcisteína).

10 El epítipo de células T cooperadoras es cualquier epítipo de células T cooperadoras conocido por el experto en la técnica para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto objetivo particular (es decir, un sujeto humano, o un sujeto animal no humano específico tal como, por ejemplo, una rata, ratón, cobaya, perro, caballo, cerdo o cabra). Los epítipos de células T cooperadoras preferidos comprenden al menos aproximadamente 10-24 aminoácidos de longitud, más generalmente de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 aminoácidos de longitud.

15 Se prefieren particularmente los epítipos de células T cooperadoras permisivos o promiscuos ya que se sintetizan fácilmente de manera química y obvian la necesidad de usar polipéptidos más largos que comprenden múltiples epítipos de células T cooperadoras.

Ejemplos epítipos de células T cooperadoras permisivos o promiscuos adecuados para su uso en los lipopéptidos de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en:

20 (i) un epítipo de células T cooperadoras de roedor o ser humano del péptido toxoide tetánico (TTP), tal como, por ejemplo los aminoácidos 830-843 de TTP (Panina-Bordignon *et al.*, Eur. J. Immun. 19, 2237-2242, 1989);

(ii) un epítipo de células T cooperadoras de roedor o ser humano de pfg27 de *Plasmodium falciparum*;

(iii) un epítipo de células T cooperadoras de roedor o ser humano de lactato deshidrogenasa;

25 (iv) un epítipo de células T cooperadoras de roedor o ser humano de la proteína de la envuelta del VIH o de gp120 del VIH (Berzofsky *et al.*, J. Clin. Invest. 88, 876-884, 1991);

(v) un epítipo de células T cooperadoras humano sintético (PADRE) predicho a partir de la secuencia de aminoácidos de proteínas de anclaje conocidas (Alexander *et al.*, Immunity 1, 751-761, 1994);

(vi) un epítipo de células T cooperadoras de roedor o ser humano de la proteína de fusión del virus del sarampión (F-VS; Muller *et al.*, Mol. Immunol. 32, 37-47, 1995; Partidos *et al.*, J. Gen. Virol., 71, 2099-2105, 1990);

30 (vii) un epítipo de células T cooperadoras que comprende al menos aproximadamente 10 residuos de aminoácidos de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (F-VMC) tal como, por ejemplo, de las posiciones de aminoácidos 148-283 de F-VMC (Ghosh *et al.*, Immunol. 104,58-66, 2001; publicación de patente internacional n.º WO 00/46390);

35 (viii) un epítipo de células T cooperadoras humano derivado de la secuencia peptídico del dominio de repetición en tándem extracelular de la mucina MUC1 (solicitud de patente estadounidense n.º 0020018806);

(ix) un epítipo de células T cooperadoras de roedor o ser humano de la hemaglutinina del virus *Influenza* (H-VI) (Jackson *et al.* Virol. 198, 613-623, 1994; y

40 (x) un epítipo de células T cooperadoras bovino o de camello de la proteína VP3 del virus de la fiebre aftosa (VFA-01 cepa Kaufbeuren), que comprende los residuos 173 a 176 de VP3 o los aminoácidos correspondientes de otra cepa del VFA.

45 Tal como conocerán los expertos en la técnica, un epítipo de células T cooperadoras puede reconocerse por uno o más mamíferos de diferentes especies. En consecuencia, la designación de cualquier epítipo de células T cooperadoras en el presente documento no se considera limitativa con respecto al sistema inmunitario de la especie en la que se reconoce el epítipo. Por ejemplo, un epítipo de células T cooperadoras de roedor puede reconocerse por el sistema inmunitario de un ratón, rata, conejo, cobaya u otro roedor, o un ser humano o perro.

Más preferiblemente, el epítipo de células T cooperadoras comprenderá una secuencia de aminoácidos

seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) GALNNRFQIKGVELKS de H-VI (SEQ ID NO: 1);
- (ii) ALNNRFQIKGVELKS de H-VI (SEQ ID NO: 18);
- (iii) LSEIKGVIVHRLEGV de F-VS (SEQ ID NO: 19);
- 5 (iv) TAAQITAGIALHQSNLN de F-VMC (SEQ ID NO: 20);
- (v) IGTDNVHYKIMTRPSHQ de F-VMC (SEQ ID NO: 21);
- (vi) YKIMTRPSHQYLVIKLI de F-VMC (SEQ ID NO: 22);
- (vii) SHQYLVIKLIPNASLIE de F-VMC (SEQ ID NO: 23);
- (viii) KLIPNASLIENCTKAEL de F-VMC (SEQ ID NO: 24);
- 10 (ix) LIENCTKAELGEYEKLL de F-VMC (SEQ ID NO: 25);
- (x) AELGEYEKLLNSVLEPI de F-VMC (SEQ ID NO: 26);
- (xi) KLLNSVLEPINQALTLM de F-VMC (SEQ ID NO: 27);
- (xii) EPINQALTLMTKNVKPL de F-VMC (SEQ ID NO: 28);
- (xiii) TLMTKNVKPLQSLGSGR de F-VMC (SEQ ID NO: 29);
- 15 (xiv) KPLQSLGSGRRQRRFAG de F-VMC (SEQ ID NO: 30);
- (xv) SGRRQRRFAGVVLGVA de F-VMC (SEQ ID NO: 31);
- (xvi) FAGWLAGVALGVATAA de F-VMC (SEQ ID NO: 32);
- (xvii) GVALGVATAAQITAGIA de F-VMC (SEQ ID NO: 33);
- (xviii) GIALHQSNLNAQAIQSL de F-VMC (SEQ ID NO: 34);
- 20 (xix) NLNAQAIQSLRTSLEQS de F-VMC (SEQ ID NO: 35);
- (xx) QSLRTSLEQSNKAIEEI de F-VMC (SEQ ID NO: 36);
- (xxi) EQSNKAIEEIREATQET de F-VMC (SEQ ID NO: 37);
- (xxii) SSKTQHTQQRPPQPS de F-VMC (SEQ ID NO: 38);
- (xxiii) QPSTELEETRTSRARHS de F-VMC (SEQ ID NO: 39);
- 25 (xxiv) RHSTTSAQRSTHYDPRT de F-VMC (SEQ ID NO: 40);
- (xxv) PRTSDRPVSYTMNRTRS de F-VMC (SEQ ID NO: 41);
- (xxvi) TRSRKQTSHRLKNIPVH de F-VMC (SEQ ID NO: 42);
- (xxvii) TELLIFGPSLRDPISA de F-VMC (SEQ ID NO: 43);
- (xxviii) PRYIATNGYLISNFDES de F-VMC (SEQ ID NO: 44);
- 30 (xxix) CIRGDTSSCARTLVSGT de F-VMC (SEQ ID NO: 45);
- (xxx) DESSCVFVSESAICSQN de F-VMC (SEQ ID NO: 46);

(xxxix) TSTIINQSPDKLLTFIA de F-VMC (SEQ ID NO: 47);

(xxxvii) SPDKLLTFIASDTCPLV de F-VMC (SEQ ID NO: 48);

(xxxviii) STAPPAHGVTSAPDTRPAGSTAPP de MUC-1 (SEQ ID NO: 49);

(xxxix) GVTSAPDTRPAGSTASSL de MUC-1 (SEQ ID NO: 50);

5 (xxxv) GVTSAPDTRPAGSTASL de MUC-1 (SEQ ID NO: 51);

(xxxvi) TAPPAHGVTSAPDTRPAGSTAPPKKG de MUC-1 (SEQ ID NO: 52);

(xxxvii) STAPPAHGVTSAPDTRPAGSTAPPK de MUC-1 (SEQ ID NO: 53);

(xxxviii) GVAE de la proteína VP3 del VFA (SEQ ID NO: 54);

(xxxix) TASGVAETTN de la proteína VP3 del VFA (residuos 170 a 179) (SEQ ID NO: 55); y

10 (xl) TAKSKKFPSYTATYQF del VFA (SEQ ID NO: 56).

Los epítomos de células T cooperadoras dados a conocer en el presente documento se incluyen para fines de explicación a modo de ejemplo únicamente. Usando técnicas de síntesis de péptidos convencionales conocidas por el experto en la técnica, los epítomos de células T cooperadoras a los que se hace referencia en el presente documento se sustituyen fácilmente por un epítomo de células T cooperadoras diferentes para adaptar el lipopéptido de la invención para su uso en una especie diferente. En consecuencia, no se excluyen epítomos de células T cooperadoras adicionales que el experto sabe que son útiles para provocar o potenciar una respuesta inmunitaria en una especie objetivo.

15

Los epítomos de células T cooperadoras adicionales pueden identificarse mediante un análisis detallado, usando técnicas de estimulación de células T *en vitro* de las proteínas componentes, fragmentos de proteínas y péptidos para identificar las secuencias apropiadas (Goodman y Sercarz, Ann. Rev. Immunol., 1, 465, (1983); Berzofsky, En: "The Year in Immunology, Vol. 2" página 151, Karger, Basel, 1986; y Livingstone y Fathman, Ann. Rev. Immunol., 5, 477, 1987).

20

El epítomo de células B se deriva convenientemente de la secuencia de aminoácidos de una proteína, lipoproteína o glicoproteína inmunogénicas de un virus, organismo procarionta o eucariota, incluyendo pero sin limitarse a un antígeno derivado de un sujeto mamífero o una bacteria, hongo, protozoo o parásito que infecta a dicho sujeto. Se incluyen específicamente los epítomos de células B idiotípicos y anti-idiotípicos contra los que se desea una respuesta inmunitaria, ya que son epítomos de células B modificados lipidados. Alternativamente, el epítomo de células B puede ser un antígeno de hidrato de carbono, tal como, por ejemplo, un antígeno del grupo sanguíneo ABH, un antígeno de trasplante (por ejemplo, Gal alfa1-3Gal beta1-4GlcNAc; Sandrin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11391-11395, 1993; Galili *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1369-1373, 1987; Schofield *et al.*, Nature 418: 785-789, 2002) o un conjugado de los mismos.

25
30

El epítomo de células B podrá provocar la producción de anticuerpos cuando se administra a un mamífero, preferiblemente un anticuerpo neutralizante, y más preferiblemente, un anticuerpo neutralizante de alto título.

Se prefieren los epítomos de células B más cortos, para facilitar la síntesis de péptidos.

35 Preferiblemente, la longitud del epítomo de células B no superará aproximadamente 30 aminoácidos de longitud. Más preferiblemente, la secuencia del epítomo de células B consiste en aproximadamente 25 residuos de aminoácidos o menos, y más preferiblemente menos de 20 residuos de aminoácidos, e incluso de manera más preferible aproximadamente 5-20 residuos de aminoácidos de longitud.

40 Preferiblemente, los péptidos adoptarán una conformación que imita la conformación del polipéptido nativo del que se deriva el epítomo de células B.

Los epítomos de células B de parásitos preferidos son aquellos asociados con leishmania, malaria, tripanosomiasis, babesiosis o esquistosomiasis, tales como, por ejemplo un epítomo de células B seleccionado del grupo que consiste en:

(i) un epítomo de células B de *Plasmodium falciparum* (NANP) 3 (Good *et al.*, J. Exp. Med. 164, 655 1986);

- (ii) un epítopo de células B de *Circumsporozoa* (Good *et al.*, Protein Sci., 235, 1059, 1987);
- (iii) un epítopo de células B que comprende los residuos de aminoácidos 326-343 del péptido repetitivo de *Leishmania donovani* (Liew *et al.*, J. Exp. Med. 972, 1359 (1990));
- 5 (iv) un epítopo de células B de la proteína de superficie P30 de *Toxoplasma gondii* (Darcy *et al.*, J. Immunol. 149, 3636 (1992)); y
- (v) un epítopo de células B del antígeno Sm-28GST de *Schistosoma mansoni* (Wolowxuk *et al.*, J. Immunol 146:1987 (1991)).
- Los epítopos de células B específicos de virus preferidos se derivan de y/o pueden generar anticuerpos contra rotavirus, herpesvirus, coronavirus, picornavirus (por ejemplo, *Aphthovirus*), virus respiratorio sincitial, virus *Influenza*, virus *Parainfluenza*, adenovirus, virus de la viruela, virus del herpes bovino tipo I, virus de la diarrea viral bovino, rotavirus bovinos, virus del moquillo canino (VMC), virus de la rinitis equina A (VREA); virus de la rinitis equina B (VREV); virus de la fiebre aftosa (VFA), virus del sarampión (VS), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), virus de Epstein-Barr (VEB), o virus de la hepatitis, y similares. Los epítopos de células B virales adecuados incluyen, pero no se limitan a epítopos seleccionados del grupo que consiste en:
- 10 (i) bucle V-de gp120 del VIH, residuos de aminoácidos 308-331 (Jatsushita *et al.*, J. Virol. 62, 2107 (1988));
- (ii) gp120 del VIH, residuos de aminoácidos 428-443 (Ratner *et al.*, Nature 313:277 (1985));
- (iii) gp120 del VIH, residuos de aminoácidos 112-124 (Berzofsky *et al.*, Nature 334, 706 (1988));
- (iv) un epítopo de células B de la transcriptasa inversa del VIH (Hosmalin *et al.* Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 87, 2344 (1990));
- 20 (v) nucleoproteína del virus *Influenza*, residuos de aminoácidos 335-349 (Townsend *et al.* Cell 44, 959 (1986));
- (vi) nucleoproteína del virus *Influenza*, residuos de aminoácidos 366-379 (Townsend *et al.* Cell 44, 959 (1986));
- (vii) hemaglutinina del virus *Influenza*, residuos de aminoácidos 48-66 (Mills *et al.*, J. Exp. Med. 163, 1477 (1986));
- (viii) hemaglutinina del virus *Influenza*, residuos de aminoácidos 111-120 (Hackett *et al.*, J. Exp. Med 158, 294 (1983));
- 25 (ix) hemaglutinina del virus *Influenza*, aminoácidos 114-131 (Lamb y Green, Immunology 50, 659 (1983));
- (x) LMP del virus de Epstein-Barr, residuos de aminoácidos 43-53 (Thorley-Lawson *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 84, 5384 (1987));
- (xi) antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, residuos de aminoácidos 95-109 (Milich *et al.*, J. Immunol. 134, 4203 (1985));
- 30 (xii) antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, residuos de aminoácidos 140-154;
- (xiii) antígeno Pre-S del virus de la hepatitis B, residuos de aminoácidos 120-132 (Milich *et al.*, J. Exp. Med. 164, 532 (1986));
- (xiv) proteína gD del virus *Herpes simplex*, residuos de aminoácidos 5-23 (Jayaraman *et al.*, J. Immunol. 151, 5777 (1993));
- 35 (xv) proteína gD del virus *Herpes simplex*, residuos de aminoácidos 241-260 (Wyckoff *et al.*, Immunobiol., 177, 134 (1988));
- (xvi) glicoproteína de la rabia, residuos de aminoácidos 32-44 (MacFarlan *et al.*, J. Immunol. 133, 2748 (1984));
- (xvii) el epítopo principal del VFA que comprende al menos los residuos de aminoácidos 134-168 ó 137-160 o los residuos 142-160 o los residuos 137-162 o los residuos 145-150 de la proteína de la cápside VP1 del VFA serotipo O1, o los residuos de aminoácidos correspondientes de otros serotipos, tales como, por ejemplo, los serotipos A, C, SAT1, SAT2, SAT3, o ASIA1 (patentes estadounidenses N.ºs 5.864.008 y 6.107.021); y
- 40

(xviii) la región hipervariable 1 (RHV₁) de la proteína E2 del virus de la hepatitis C (VHC), variante AD78 (Zibert *et al.*, J. Virol. 71, 4123-4127, 1997).

5 Los epítomos de células B específicos de bacterias preferidos se derivan de y/o pueden generar anticuerpos contra *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Shigella*, y similares. Los epítomos de células B bacterianos adecuados incluyen, pero no se limitan a epítomos seleccionados del grupo que consiste en:

(i) la proteína de 65 Kd de *Mycobacterium tuberculosis*, residuos de aminoácidos 112-126 (Lamb *et al.*, EMBO J., 6, 1245 (1987));

10 (ii) la proteína de 65 Kd de *Mycobacterium tuberculosis*, residuos de aminoácidos 163-184 (Lamb *et al.*, EMBO J., 6, 1245 (1987));

(iii) la proteína de 65 Kd de *Mycobacterium tuberculosis*, residuos de aminoácidos 227-243 (Lamb *et al.*, EMBO J., 6, 1245 (1987));

(iv) la proteína de 65 Kd de *Mycobacterium tuberculosis*, residuos de aminoácidos 242-266 (Lamb *et al.*, EMBO J., 6, 1245 (1987));

15 (v) la proteína de 65 Kd de *Mycobacterium tuberculosis*, residuos de aminoácidos 437-459 (Lamb *et al.*, EMBO J., 6, 1245 (1987));

(vi) la proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis*, residuos 3-15 (Morten *et al.*, Infect. Immun. 66, 717-723, 1998);

(vii) la proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis*, residuos 40-62 (Morten *et al.*, Infect. Immun. 66, 717-723, 1998);

20 (viii) el alfa-antígeno de *Mycobacterium scrofulaceum*, residuos 279-290 (Mikiko *et al.*, Microb. Path. 23, 95-100, 1997);

(ix) la proteína nucleasa de *Staphylococcus aureus*, residuos de aminoácidos 61-80 (Finnegan *et al.*, J. Exp. Med. 164, 897 (1986));

(x) un epítomo de células B de la enterotoxina termoestable de *Escherichia coli* (Cardenas *et al.*, Infect. Immunity 61, 4629 (1993));

25 (xi) un epítomo de células B de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (Clements *et al.*, Infect. Immunity 53, 685 (1986));

(xii) un epítomo de células B del antígeno de *Shigella sonnei* de forma I (Formal *et al.*, Infect. Inmunidad 34, 746 (1981));

30 (xiii) un epítomo de células B del *Streptococcus* del grupo A, derivado preferiblemente de la proteína M, más preferiblemente de la mitad del extremo C-terminal de la proteína M y más preferiblemente de un péptido mínimo, helicoidal sin reacción cruzada con el huésped derivado de la mitad del extremo C-terminal conservada de la proteína M y que comprende un péptido distinto de la proteína M diseñado para mantener el plegamiento helicoidal y la antigenicidad presentada dentro de dicho péptido mínimo, helicoidal que no tiene reacción cruzada con el huésped. Por ejemplo, el péptido distinto de la proteína M (por ejemplo, el péptido J14) puede ligarse a uno o más péptidos de proteína M serotípicos usando química que permita que el inmunógeno se presente a todos los péptidos individuales colgantes de una estructura principal del alcano, confiriendo de ese modo inmunogenicidad y protección excelentes (patente estadounidense n.º 6.174.528; Brandt *et al.*, Nat. Med. 6: 455-459, 2000);

(xiv) un epítomo de células B de la subunidad B de la toxina colérica (CTB), tal como, por ejemplo se describe por Kazemi y Finkelstein, Mol. Immunol. 28, 865-876, 1991;

40 (xv) un epítomo de células B de una proteína de *Bacillus anthracis* (carbunco), tal como, por ejemplo, un epítomo de células B derivado de una proteína del exosporio externo del carbunco, tal como la glicoproteína de 250 kDa (Sylvestre *et al.*, En: Proc. 4ª Int. Conf. Anthrax, St John's College Annapolis, Maryland, CA 10-13 de junio de 2001, Abstract 31 B; y

(xvi) un epítomo de células B de una proteína tetánica, tal como, por ejemplo, la proteína toxoide tetánica.

45 Los epítomos de células B de sujetos mamíferos preferidos se derivan y/o pueden generar anticuerpos contra un

- antígeno tumoral. Los antígenos tumorales normalmente son antígenos nativos o extraños, cuya expresión está correlacionada con el desarrollo, crecimiento, presencia o recurrencia de un tumor. Dado que los antígenos tumorales son útiles en la diferenciación de tejido anómalo de normal, son útiles como objetivo para la intervención terapéutica. Los antígenos tumorales se conocen bien en la técnica. De hecho, varios ejemplos están bien caracterizados y son actualmente un centro de un gran interés en la generación de terapias específicas de tumor.
- 5 Ejemplos no limitativos de antígenos tumorales son el antígeno carcinoembrionario antígeno (CEA), el antígeno específico de próstata (PSA), los antígenos de melanoma (MAGE, BAGE, GAGE), y las mucinas, tales como MUC-1.
- Alternativamente, un epítipo de células B preferido de un mamífero sujeto se deriva de la proteína de la zona pelúcida tal como ZP3 (Chamberlin y Dean Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87, 6014-6018, 1990) o ZP3a (Yurewicz *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1174, 211-214, 1993)] de seres humanos u otros mamíferos tales como cerdos. Los
- 10 epítipos de células B particularmente preferidos dentro de esta categoría incluyen los residuos de aminoácidos 323-341 de ZP3 humana (Chamberlin y Dean Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87, 6014-6018, 1990); los residuos de aminoácidos 8-18 o los residuos 272-283 o los residuos 319-330 de ZP3a porcina (Yurewicz *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1174, 211-214, 1993).
- 15 Epítipos de células B preferidos adicionales de un mamífero sujeto se derivan y/o pueden generar anticuerpos contra una hormona peptídica, tales como, por ejemplo, una hormona de saciedad (por ejemplo, leptina), una hormona digestiva (por ejemplo, gastrina), o una hormona peptídica reproductora [por ejemplo, hormona de liberación de hormona luteinizante (LHRH), hormona estimuladora de folículos (FSH), hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (hCG; Carlsen *et al.*, J. Biol. Chem. 248, 6810-6827, 1973), o alternativamente, un
- 20 receptor de hormonas tal como, por ejemplo, el receptor de FSH (Kraaij *et al.*, J. Endocrinol. 158, 127-136, 1998). Los epítipos de células B particularmente preferidos dentro de esta categoría incluyen la parte del extremo C-terminal (CTP) de b-hCG que no tiene reacción antigénica cruzada con LH (Carlsen *et al.*, J. Biol. Chem. 248, 6810-6827, 1973).
- En una realización particularmente preferida, un péptido que comprende un epítipo de células B comprenderá una
- 25 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (i) EHWSYGLRPG derivada de LHRH (denominada en el presente documento "LHRH 1-10"; SEQ ID NO: 2);
- (ii) HWSYGLRPG derivada de LHRH (denominada en el presente documento "LHRH 2-10"; SEQ ID NO: 3);
- (ii) GLRPG derivada de LHRH (denominada en el presente documento "LHRH 6-10"; SEQ ID NO: 4);
- (iii) EAEEAARLQA de *Leishmani major* (SEQ ID NO: 57);
- 30 (iv) una secuencia de una proteína no estructural 3A, 3B, o 3C del VFA (patente estadounidense n.º 6.048.538) seleccionada del grupo que consiste en:
- FRERTLTGQRACNDVNSE (SEQ ID NO: 58),
- NPLETSGASTVGFRRERL (SEQ ID NO: 59),
- IRETRKRQKMVDDAVNEY (SEQ ID NO: 60),
- 35 AKAPWKEGPYEGPVKKPV (SEQ ID NO: 61),
- AGPLERQKPLKVKAKAPW (SEQ ID NO: 62),
- KVRAKLPQQEGPYAGPLER (SEQ ID NO: 63),
- GPYTGPLERQRPLKVRACL (SEQ ID NO: 64),
- VGRLIFSGEALTYKDIW (SEQ ID NO: 65),
- 40 TKHFRDTARMKKGTPWGV (SEQ ID NO: 66), y
- SGAPPTDLQKMVMGNTKPV (SEQ ID NO: 67);
- (v) NKYSASGSGVRGDFGSLAPRVARQLPASFNYGAIK del epítipo principal de VP1 del VFA (patente estadounidense n.º 6.107.021; SEQ ID NO: 68);

- (vi) una secuencia del antígeno específico de próstata (patente estadounidense n.º 6.326.471) seleccionada del grupo que consiste en: LYTKWHYRKWIKDTIVANP (SEQ ID NO: 69), AVKVMQLPQEPALGTTCTYA (SEQ ID NO: 70), IVGGWECEKHSQPWQVLVAS (SEQ ID NO: 71), CAQVHPQKVTKFML (SEQ ID NO: 72), YLMLLRLSEPAELTDDAVKVM (SEQ ID NO: 73), LLKNRFLRPGDSSSHDLMLLY (SEQ ID NO: 74), e ILLGRHSLFHPEDTGQVFQVY (SEQ ID NO: 75);
- (vii) TCDDPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGSDTPILPQ de b-hCG (SEQ ID NO: 76);
- (viii) CQDSKVTEIPTLPRNAI del receptor de FSH (SEQ ID NO: 77);
- (ix) NKGDCGTPSHSRRQPHVMS de la proteína ZP3 humana (SEQ ID NO: 78);
- (x) una secuencia de la proteína ZP3a porcina seleccionada del grupo que consiste en: WLCFPLCLALP (SEQ ID NO: 79) LGGLYCGPSSF (SEQ ID NO: 80), GSITRDSIFRLR (SEQ ID NO: 81), SALPVNIQVFTL (SEQ ID NO: 82), ELQIAKDERYGS (SEQ ID NO: 83), y VKLLREPIYVEV (SEQ ID NO: 84);
- (xi) PPAQYSWLIDGN del antígeno carcinoembrionario (CEA; SEQ ID NO: 85);
- (xii) una secuencia de la nucleasa de *Staphylococcus* (Cone *et al.*, J. Biol. Chem. 246, 3103-3110. 1971) seleccionada del grupo que consiste en: ANASQTDNGVNRSGSEDPTV (SEQ ID NO: 86) y PETKHPKKGVEKYGPEASAF (SEQ ID NO: 87);
- (xiii) una secuencia del antígeno de la superficie del virus de la hepatitis B (Kobayashi y Koike, Gene 30, 227-232, 1984) seleccionada del grupo que consiste en: LVLLDYQGMLPVCPL (SEQ ID NO: 88) y TKPSDGNCTCIPIPS (SEQ ID NO: 89);
- (xiv) MQWNSTTFHQALL del antígeno de superficie precursor de la hepatitis B (SEQ ID NO: 90);
- (xv) una secuencia de la nucleoproteína del virus *Influenza* (Gregory *et al.*, J. Gen. Virol. 82, 1397-1406, 2001) seleccionada del grupo que consiste en: AAFEDLRVSSFIRGT (SEQ ID NO: 91) y SNENMETMDSSTLE (SEQ ID NO: 92);
- (xvi) una secuencia de la hemaglutinina del virus *Influenza*, seleccionada del grupo que consiste en: HPLILDCTCTIEGLIYGNPS (SEQ ID NO: 93), YQRIQIFPDT (SEQ ID NO: 94), e IQIFPDTIWNVSYSYGTSK (SEQ ID NO: 95);
- (xvii) CKYSASGSGVRGDFGSLAPRVARCLPASFNTGAIKNKY de la glicoproteína VP1 de la envuelta del VFA (SEQ ID NO: 96);
- (xviii) una secuencia de la proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis* seleccionada del grupo que consiste en: EQQWNFAGIEAAA (SEQ ID NO: 97) y AAWGGSGSEAYQGVQKQKWDATA (SEQ ID NO: 98).
- (xix) GGPTRTIGGSQAQTASGLVSMFVSGPSQK (SEQ ID NO: 99) de HCV;
- (xx) KFQDAYNAAGGH (SEQ ID NO: 100) del antígeno alfa de *M. scrofulaceum*;
- (xxi) KQAEKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID NO: 101) de la proteína M de *Streptococcus* del grupo A (es decir, péptido designado en el presente documento como "J14"); y
- (xxii) GWMDF (SEQ ID NO: 102) de gastrina (es decir, pentagastrina que consiste en los residuos de aminoácidos de gastrina del extremo C-terminal).
- De la descripción anterior resultará evidente que el resto polipeptídico del lipopéptido objeto se sintetiza convenientemente como una única cadena de aminoácidos, no requiriéndose de ese modo la modificación tras la síntesis para incorporar ambos epítomos.
- Se prefiere particularmente un resto polipeptídico que comprende un epítipo de células B altamente inmunogénico de LHRH (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 ó 3 ó 4) ligado o bien a un epítipo de células T cooperadoras de hemaglutinina del virus *Influenza*, (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) o bien a un epítipo de células T cooperadoras de F-VMC (por ejemplo, SEQ ID NO: 20, 24, 26, o 44), tal como, por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (i) GALNNRFQIKGVLEKSEHWSYGLRPG (SEQ ID NO:5);

(ii) EHWSYGLRPGGALNNRFQIKGVELKS (SEQ ID NO: 6);

(iii) GALNNRFQIKGVELKSKEHWSYGLRPG (SEQ ID NO: 7);

(iv) EHWSYGLRPGKGALNNRFQIKGVELKS (SEQ ID NO: 8);

(v) KLIPNASLIENCTKAELKHWSYGLRPG (SEQ ID NO: 9);

5 (vi) AELGEYEKLLNSVLEPIKEHWSYGLRPG (SEQ ID NO: 10);

(vii) TAAQITAGIALHQSNLNKEHWSYGLRPG (SEQ ID NO: 11);

(viii) PRYIATNGYLISNFDESKEHWSYGLRPG (SEQ ID NO: 12);

(ix) KLIPNASLIENCTKAELKGLRPG (SEQ ID NO: 13);

(x) AELGEYEKLLNSVLEPIKGLRPG (SEQ ID NO: 14);

10 (xi) TAAQITAGIALHQSNLNKGLRPG (SEQ ID NO: 15);

(xii) PRYIATNGYLISNFDESKGLRPG (SEQ ID NO: 16);

(xiii) KLIPNASLIENCTKAELHWSYGLRPG (SEQ ID NO: 103); y

(xiv) KLIPNASLIENCTKAELGLRPG (SEQ ID NO: 104).

15 En una realización particularmente preferida, el epítipo de LHRH (es decir, LHRH1-10 se indica en SEQ ID NO: 2; LHRH 2-10 se indica en SEQ ID NO: 3; o LHRH 6-10 se indica en SEQ ID NO: 4) se sitúa de manera que el residuo de glicina del extremo C-terminal esté expuesto o no sea interno. En consecuencia, se prefiere particularmente la configuración indicada en una cualquiera de SEQ ID N.^{os} 5, 7 ó 9-16.

20 En una realización a modo de ejemplo, LHRH 1-10 se conjuga con el epítipo de células T cooperadoras de hemaglutinina del virus *Influenza* (es decir, SEQ ID NO: 1) tal como se describe mediante la secuencia indicada en SEQ ID NO: 5 ó 7, y LHRH 2-10 o LHRH 6-10 se conjuga con un epítipo de células T cooperadoras de CDV-F (es decir, SEQ ID NO: 24) tal como se describe mediante la secuencia indicada en SEQ ID NO: 9, 13, 103 ó 104. Obviamente, otras combinaciones son posibles y quedan abarcadas por la presente invención.

25 En una realización alternativa, se prefiere particularmente un resto polipeptídico que comprende un epítipo de células B altamente inmunogénico de la proteína M de un *Streptococcus* del grupo A (por ejemplo, el péptido J14 indicado en SEQ ID NO: 101) unido a un epítipo de células T cooperadoras de CDV-F (por ejemplo, SEQ ID NO: 24) o hemaglutinina del virus *Influenza* (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), tal como, por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i) KLIPNASLIENCTKAELKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID NO: 105);

(ii) KLIPNASLIENCTKAELKKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID NO: 106);

30 (iii) GALNNRFQIKGVELKSKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID NO: 107); y

(iv) GALNNRFQIKGVELKSKKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID NO: 108).

35 En una realización alternativa adicional, se prefiere particularmente un resto polipeptídico que comprende un epítipo de células B altamente inmunogénico de pentagastrina (por ejemplo, SEQ ID NO: 102) unido a un epítipo de células T cooperadoras de CDV-F (por ejemplo, SEQ ID NO: 24) o hemaglutinina del virus *Influenza* (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), tal como, por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i) KLIPNASLIENCTKAELGWMDF (SEQ ID NO: 109);

(ii) KLIPNASLIENCTKAELKGWMDF (SEQ ID NO: 110);

(iii) GALNNRFQIKGVELKSGWMDF (SEQ ID NO: 111); y

(iv) GALNNRFQIKGVELKSKGWMD (SEQ ID NO: 112).

El experto en la técnica podrá fácilmente sintetizar restos polipeptídicos adicionales a los mostrados a modo de ejemplo en el presente documento para su uso en los lipopéptidos objeto, sustituyendo el epítipo de células T cooperadoras y/o el epítipo de células B de una cualquiera de SEQ ID NO: 5-16 o una cualquiera de SEQ ID NO: 103-112 por otro epítipo de células T cooperadoras o epítipo de células B, tal como, por ejemplo un epítipo de células T cooperadoras indicado en una cualquiera de SEQ ID NO: 18-56, o un epítipo de células B indicado en una cualquiera de SEQ ID NO: 57-102. Además, la selección de combinaciones apropiadas de células B y epítipo de células T cooperadoras resultará evidente para el experto en la técnica a partir de la descripción proporcionada en el presente documento, según la especie diana y el antígeno contra el que se busca una respuesta inmunitaria.

Las secuencias de aminoácidos de los restos polipeptídicos descritas en el presente documento, incluyendo los polipéptidos mostrados a modo de ejemplo indicados en SEQ ID NO: 5-16 y SEQ ID NO: 103-112, pueden modificarse para fines particulares según métodos bien conocidos por los expertos en la técnica sin afectar de manera adversa a su función inmunitaria. Por ejemplo, pueden derivatizarse o modificarse químicamente residuos peptídicos particulares con el fin de potenciar la respuesta inmunitaria o permitir el acoplamiento del péptido a otros agentes, particularmente lípidos. También es posible cambiar aminoácidos particulares dentro de los péptidos sin perturbar la estructura global o antigenicidad del péptido. Por tanto, tales cambios se denominan cambios "conservativos" y tienden a basarse en la hidrofiliidad o polaridad del residuo. El tamaño y/o la carga de las cadenas laterales también son factores relevantes en la determinación de qué sustituciones son conservativas.

El experto en la técnica entiende bien que, inherente en la definición de un péptido o proteína equivalente biológicamente funcional, se encuentra el concepto de que hay un límite en cuanto al número de cambios que pueden realizarse dentro de una parte definida de la molécula y todavía dar como resultado una molécula con un nivel aceptable de actividad biológica equivalente. Por tanto, los péptidos equivalentes biológicamente funcionales se definen en el presente documento como los péptidos en los que aminoácidos específicos pueden estar sustituidos. Realizaciones particulares abarcan variantes que tienen una, dos, tres, cuatro, cinco o más variaciones en la secuencia de aminoácidos del péptido. Evidentemente, puede realizarse fácilmente una pluralidad de proteínas/péptidos distintos con diferentes sustituciones y usarse de acuerdo con la invención.

Los expertos en la técnica son conscientes de que las siguientes sustituciones son sustituciones conservativas permisibles (i) sustituciones que implican arginina, lisina y histidina; (ii) sustituciones que implican alanina, glicina y serina; y (iii) sustituciones que implican fenilalanina, triptófano y tirosina. Los péptidos que incorporan tales sustituciones conservativas se definen en el presente documento como equivalentes biológicamente funcionales.

La importancia del índice hidropático de aminoácido para conferir una función biológica interactiva a una proteína se entiende de manera general en la técnica (Kyte & Doolittle, J. Mol. Biol. 157, 105-132, 1982). Se sabe que determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen una puntuación o índice hidropático similar y todavía conservan una actividad biológica. El índice hidropático de aminoácidos también puede considerarse para determinar una sustitución conservativa que produce una molécula funcionalmente equivalente. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en sus características de hidrofobicidad y de carga, de la siguiente forma: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). Al realizar cambios basándose en el índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de +/-0,2. Más preferiblemente, la sustitución implicará aminoácidos que tienen índices hidropáticos dentro de +/- 0,1, y más preferiblemente dentro de aproximadamente +/- 0,05.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se realiza eficazmente basándose en la hidrofiliidad, particularmente cuando el péptido o proteína equivalente funcional biológico creado de ese modo está previsto para su uso en realizaciones inmunológicas, como en el presente caso (por ejemplo, patente estadounidense n.º 4.554.101). Tal como se detalla en la patente estadounidense n.º 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a residuos aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 +/- 0,1); glutamato (+3,0 +/- 0,1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 +/- 0,1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Al realizar cambios basándose en valores de hidrofiliidad similares, se prefiere sustituir aminoácidos que tienen valores de hidrofiliidad dentro de aproximadamente +/- 0,2 uno de otro, más preferiblemente dentro de aproximadamente +/- 0,1, e incluso más preferiblemente dentro de aproximadamente +/- 0,05.

Habiendo identificado péptidos adecuados para su uso como inmunógenos, también se contempla que pueden formularse otros compuestos estéricamente similares para imitar las partes clave de la estructura peptídica. Tales compuestos, que pueden denominarse peptidomiméticos, pueden usarse de la misma manera que los péptidos de la invención y por tanto también son equivalentes funcionales. La generación de un equivalente funcional estructural puede lograrse mediante las técnicas de modelado y diseño químico conocidas por los expertos en la técnica. Se

entenderá que todos de tales constructos estéricamente similares se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

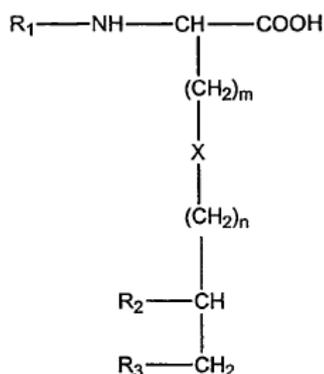
Otro método para determinar la "equivalencia" de péptidos modificados implica un enfoque funcional. Por ejemplo, se usa un péptido dado para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Entonces pueden usarse estos anticuerpos, a su vez, para examinar bibliotecas de péptidos degenerados que incluyen miles o cientos de miles de otros péptidos, identificando de ese modo estructuras que son, al menos en un determinado grado, inmunológicamente equivalentes. Evidentemente, estas estructuras pueden llevar cierta homología de secuencia primaria con respecto al péptido usado para generar los anticuerpos, pero también pueden ser bastante diferentes.

El resto polipeptídico se sintetiza fácilmente usando técnicas convencionales, tales como el método de síntesis de Merrifield (Merrifield, J Am Chem Soc, 85,;2149-2154, 1963) y la miríada de mejoras disponibles sobre esa tecnología (véase por ejemplo, Synthetic Peptides: A User's Guide, Grant, ed. (1992) W.H. Freeman & Co., Nueva York, pág. 382; Jones (1994) The Chemical Synthesis of Peptides, Clarendon Press, Oxford, pág. 230.); Barany, G. y Merrifield, R.B. (1979) en The Peptides (Gross, E. y Meienhofer, J. eds.), vol. 2, págs. 1-284, Academic Press, Nueva York; Wunsch, E., ed. (1974) Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie (Müller, E., ed.), vol. 15, 4ª ed., Partes 1 y 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 25, 449-474.

El resto lipídico puede comprender cualquier grupo acilo graso de C₂ a C₃₀ saturado, monoinsaturado, o poliinsaturado, lineal o ramificado, y preferiblemente un grupo de ácido graso seleccionado del grupo que consiste en: palmitoílo, miristoílo, estearoílo, lauroílo, octanoílo y decanoílo.

Lipoaminoácidos son restos lipídicos particularmente preferidos dentro del presente contexto. Tal como se usa en el presente documento, el término "lipoaminoácidos" se refiere a una molécula que comprende uno o dos o tres o más lípidos covalentemente unidos a un residuo de aminoácido, tales como, por ejemplo, cisteína o serina o lisina o un análogo del mismo. En una realización particularmente preferida, los lipoaminoácidos comprenden cisteína y opcionalmente, uno o dos o más residuos de arginina o de serina, o alternativamente, ácido 6-aminohexanoico.

El resto lipídico es preferiblemente un compuesto que tiene una estructura de fórmula general (VII):



en la que:

(i) X se selecciona del grupo que consiste en azufre, oxígeno, disulfuro (-S-S-), metileno (-CH₂-), y amino (-NH-);

(ii) m es un número entero que es 1 ó 2;

(iii) n es un número entero desde 0 hasta 5;

(iv) R₁ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, carbonilo (-CO-), y R'-CO- en el que R' se selecciona del grupo que consiste en alquilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono, alquenilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono, y alquinilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono, en el que dicho grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, amino, oxo, acilo o cicloalquilo;

(v) R₂ se selecciona del grupo que consiste en R'-CO-O-, R'-O-, R'-O-CO-, R'-NH-CO-, y R'-CO-NH-, en el que R' se selecciona del grupo que consiste en alquilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono, alquenilo que tiene de 7 a

25 átomos de carbono, y alquinilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono, en el que dicho grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, amino, oxo, acilo o cicloalquilo; y

- 5 (vi) R_3 se selecciona del grupo que consiste en R^1 -CO-O-, R^1 -O-, R^1 -O-CO-, R^1 -NH-CO-, y R^1 -CO-NH-, en el que R^1 se selecciona del grupo que consiste en alquilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono, alquenilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono, y alquinilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono, en el que dicho grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, amino, oxo, acilo o cicloalquilo

y en la que cada uno de R_1 , R_2 y R_3 son iguales o diferentes.

- 10 Dependiendo del sustituyente, el resto lipídico de estructura general VII puede ser una molécula quiral, en la que los átomos de carbono covalentemente unidos directa o indirectamente a número enteros de R_1 y R_2 son de configuración asimétrica dextrógira o levógira (es decir, R o S).

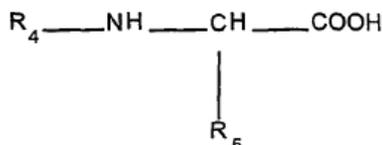
Preferiblemente, X es azufre, m y n son ambos 1; R_1 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, y R^1 -CO-, en el que R^1 es un grupo alquilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono; y R_2 y R_3 se seleccionan del grupo que consiste en R^1 -COO-, R^1 -O-, R^1 -O-CO-, R^1 -NH-CO-, y R^1 -CO-NH-, en el que R^1 es un grupo alquilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono.

- 15 Preferiblemente, R^1 se selecciona del grupo que consiste en: palmitoílo, miristoílo, estearoílo, lauroílo, octanoílo y decanoílo. Más preferiblemente, R^1 se selecciona del grupo que consiste en: palmitoílo, estearoílo, lauroílo, y octanoílo y decanoílo.

Cada número entero de R^1 en dicho resto lipídico puede ser igual o diferente.

- 20 En una realización particularmente preferida, X es azufre; m y n son ambos 1; R_1 es hidrógeno o R^1 -CO- en el que R^1 se selecciona del grupo que consiste en: palmitoílo, estearoílo, lauroílo, y octanoílo; y R_2 y R_3 son cada uno R^1 -CO-O en el que R^1 se selecciona del grupo que consiste en: palmitoílo, estearoílo, lauroílo, y octanoílo. Compuestos particularmente preferidos en los que R^1 es palmitoílo se muestran por la fórmula (I) y la fórmula (II) citadas anteriormente.

El resto lipídico también puede tener la siguiente fórmula general (VIII):



- 25 en la que:
- 30 (i) R_4 se selecciona del grupo que consiste en: (i) un residuo de alfa-acil-ácido graso que consiste en entre aproximadamente 7 y aproximadamente 25 átomos de carbono; (ii) un residuo de alfa-alquil-beta-hidroxi-ácido graso; (iii) un beta-hidroxíéster de un residuo alfa-alquil-beta-hidroxi-ácido graso en el que el grupo éster es preferiblemente una cadena lineal o cadena ramificada que comprende más de 8 átomos de carbono; y (iv) un residuo de lipoaminoácido; y

(ii) R_5 es hidrógeno o la cadena lateral de un residuo de aminoácido.

Preferiblemente, R_4 consiste en entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 átomos de carbono, y más preferiblemente entre aproximadamente 14 y aproximadamente 18 átomos de carbono.

- 35 Opcionalmente, cuando R_4 es un residuo de lipoaminoácido, la cadena lateral de los números enteros de R_4 y R_5 puede formar un enlace covalente. Por ejemplo, cuando R_4 comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, ornitina, ácido glutámico, ácido aspártico, un derivado de lisina, un derivado de ornitina, un derivado de ácido glutámico, y un derivado de ácido aspártico, entonces la cadena lateral de ese aminoácido o derivado está covalentemente unida, gracias a un enlace de amida o éster, a R_5 .

- 40 Preferiblemente, la estructura indicada en la fórmula general VIII es un resto lipídico seleccionado del grupo que consiste en: N,N'-diacil-lisina; N,N'-diacilornitina; di(monoalquil)amida o éster de ácido glutámico; di(monoalquil)amida o éster de ácido aspártico; un derivado de N,O-diacilo de serina, homoserina, o treonina; y un derivado de N,S-diacilo de cisteína u homocisteína.

También se prefieren moléculas anfipáticas, particularmente las que tienen una hidrofobicidad que no supera la hidrofobicidad de Pam₃Cys (fórmula (I)).

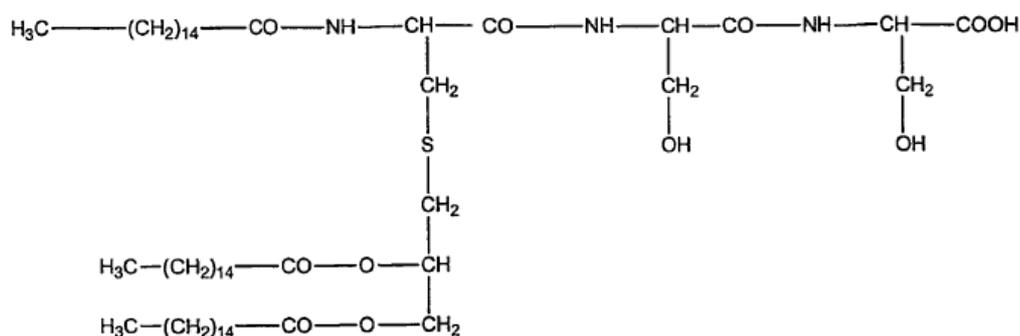
5 Los restos lipídicos de fórmula (I), fórmula (II), fórmula (VI) o fórmula (VIII) se modifican adicionalmente durante la síntesis o tras la síntesis, mediante la adición de una o más moléculas espaciadoras, preferiblemente un espaciador que comprende carbono, y más preferiblemente uno o más residuos aminoácido. Se añaden convenientemente a la estructura lipídica a través del grupo carboxilo terminal en una reacción convencional de condensación, adición, sustitución, u oxidación. El efecto de una molécula espaciadora de este tipo es separar el resto lipídico del resto polipeptídico para reducir efectos de impedimento estérico que podrían reducir de otro modo la inmunogenicidad del producto de lipopéptido.

10 Se prefieren particularmente para este fin dímeros, trímeros, tetrameros, etc. de arginina o serina, o alternativamente, ácido 6-aminohexanoico.

Preferiblemente, tales espaciadores incluyen un residuo de aminoácido protegido terminal para facilitar la conjugación posterior de los lipoaminoácidos modificados al polipéptido.

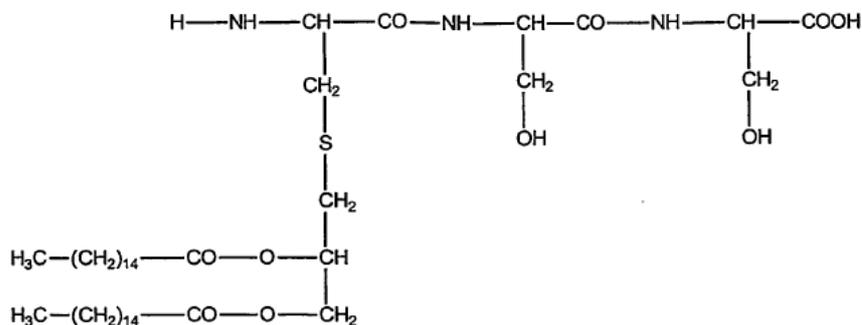
15 Lipoaminoácidos modificados a modo de ejemplo producidos según esta realización se presentan como fórmulas (III) y (IV), que se derivan fácilmente de las fórmulas (I) y (II), respectivamente mediante la adición de un homodímero de serina. Tal como se explica a modo de ejemplo en el presente documento, se sintetiza convenientemente Pam₃Cys de fórmula (I), o Pam₂Cys de fórmula (II) como los lipoaminoácidos Pam₃Cys-Ser-Ser de fórmula (III), o Pam₂Cys-Ser-Ser de fórmula (IV) para este fin.

Fórmula (III)



20

Fórmula (IV)



25 Como alternativa a la adición de un espaciador al resto lipídico, el espaciador puede añadirse al grupo épsilon-amino del residuo de lisina interna o al grupo de cadena lateral terminal de un análogo de lisina en el resto polipeptídico, o bien como un péptido corto, tal como, por ejemplo un homodímero, homotrímero, homotetrámero, etc. de arginina o de serina, o bien alternativamente, mediante la adición secuencial de residuos aminoácido, produciendo de ese modo una cadena de polipéptido ramificada. Este enfoque aprovecha la naturaleza modificada del grupo épsilon-amino en el residuo de lisina interna o el grupo de cadena lateral terminal de un análogo de lisina, según sea apropiado, para lograr especificidad en la adición del espaciador. Naturalmente, para evitar la adición de espaciador
 30 secuencial, preferiblemente debe protegerse el residuo de aminoácido terminal del espaciador, de manera que la

desprotección puede facilitar la conjugación del resto lipídico al polipéptido ramificado.

Alternativamente, el espaciador puede añadirse a un grupo épsilon-amino no modificado del polipéptido mediante reacción de sustitución nucleófila convencional. Sin embargo, se prefiere seguir este enfoque si el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un único residuo de lisina interna o análogo de lisina y un extremo N-terminal bloqueado.

El resto lipídico se prepara mediante medios sintéticos convencionales, tales como, por ejemplo, los métodos descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 5.700.910 y 6.024.964, o alternativamente, el método descrito por Wiesmuller *et al.*, Hoppe Seylers Zur Physiol. Chem. 364, 593 (1983), Zeng *et al.*, J. Pept. Sci 2, 66 (1996), Jones *et al.*, Xenobiotica 5, 155 (1975), o Metzger *et al.*, Int. J. Pept. Protein Res. 38, 545 (1991). Los expertos en la técnica podrán modificar fácilmente tales métodos para lograr la síntesis de un lípido deseado para su uso en conjugación con un polipéptido.

También se contemplan combinaciones de diferentes lípidos para su uso en los lipopéptidos de la invención. Por ejemplo, uno o dos lipoaminoácidos o lípidos que contienen miristoilo se unen mediante residuos de lisina interna o análogo de lisina al resto polipeptídico, opcionalmente separados del polipéptido por un espaciador. No se excluyen otras combinaciones.

Los lipopéptidos de la invención se modifican fácilmente para fines de diagnóstico. Por ejemplo, se modifica mediante adición de un hapteno natural o sintético, un antibiótico, hormona, esteroide, nucleósido, nucleótido, ácido nucleico, una enzima, sustrato de enzima, un inhibidor de enzima, biotina, avidina, polietilenglicol, un resto polipeptídico peptídico (por ejemplo, tuftsin, polilisina), un marcador de fluorescencia (por ejemplo, FITC, RITC, dansilo, luminol o cumarina), un marcador de bioluminiscencia, un marcador de espín, un alcaloide, amina biogénica, vitamina, toxina (por ejemplo digoxina, faloidina, amanitina, tetrodotoxina), o un agente formador de complejos.

Tal como se explica a modo de ejemplo en el presente documento, se proporcionan lipopéptidos altamente inmunogénicos y solubles que comprenden Pam₂Cys de fórmula (I), o Pam₂Cys de fórmula (II) o Ste₂Cys o Lau₂Cys o Oct₂Cys conjugados a través del grupo épsilon-amino de un residuo de lisina interna de un polipéptido que comprende: (i) la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células T cooperadoras CD4+ derivado de la cadena ligera de hemaglutinina del virus *Influenza* (Jackson *et al.* Virol. 198, 613-623, 1994; es decir, secuencia de aminoácidos GALNNRFQIKGVELKS, SEQ ID NO : 1) o un péptido derivado de la proteína CDV-F (SEQ ID NO: 24); (ii) un péptido que contiene epítipo de células B que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH; Fraser *et al.*, J. Endocrinol. 63, 399 (1974); Fraser y Baker, J. Endocrinol. 77, 85 (1978); es decir, "LHRH 1-10", secuencia de aminoácidos EHWSYGLRPG; SEQ ID NO: 2; "LHRH 2-10", secuencia de aminoácidos HWSYGLRPG; SEQ ID NO: 3; o "LHRH 6-10", secuencia de aminoácidos GLRPG; SEQ ID NO: 4), proteína M de *Streptococcus* de grupo A (GAS) (es decir, SEQ ID NO: 101), y pentagastrina (es decir, SEQ ID NO: 102); (iii) un residuo de lisina situada entre dicho epítipo de células T cooperadoras CD4+ y dicho epítipo de células B; y opcionalmente (iv) un residuo de lisina situada dentro de dicho epítipo de células T cooperadoras CD4+.

Preparación de lipopéptidos

También se da a conocer en el presente documento un método para producir un lipopéptido que comprende:

(i) producir un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende:

(a) la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células T cooperadoras (Th) y la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células B, en el que dichas secuencias de aminoácidos son diferentes; y

(b) uno o más residuos de lisina interna o residuos de análogos de lisina interna; y

(iii) unir covalentemente cada uno de dicho uno o más restos lipídicos directa o indirectamente a un grupo épsilon-amino de dicho uno o más residuos de lisina interna o al grupo de cadena lateral terminal de dicho uno o más residuos de análogos de lisina interna de modo que se produce un lipopéptido que tiene el resto lipídico unido al grupo épsilon-amino de dicho residuo de lisina interna o que tiene el resto lipídico unido al grupo de cadena lateral terminal de dicho residuo de análogo de lisina interna.

Preferiblemente, el método comprende además la producción del resto lipídico.

Síntesis químicas convencionales a las que se hace referencia en el presente documento son los medios preferidos para producir el resto polipeptídico y el resto lipídico.

Preferiblemente, el residuo de lisina interna o el análogo de lisina interna se modifica mediante eliminación selectiva

de un grupo de bloqueo (por ejemplo: Mtt) del grupo de cadena lateral terminal, particularmente del grupo amino de cadena lateral terminal, de modo que se permite la adición de un residuo de aminoácido, un espaciador o resto lipídico, incluyendo un lipoaminoácido, en esa posición.

5 Para la unión del lípido al polipéptido, resulta conveniente que los grupos funcionales del polipéptido estén protegidos de una manera conocida en la técnica de la síntesis de péptidos, para garantizar que no tiene lugar ninguna reacción indeseable en esos grupos a una tasa de reacción significativa.

10 Mediante procesos de acoplamiento conocidos, se sintetiza el polipéptido sobre un portador sólido o soluble, tal como un polímero (por ejemplo resina de Merrifield) y se pone a disposición para su conjugación con un espaciador, aminoácidos, o lípido. Por ejemplo, el grupo épsilon-amino de la lisina interna o el grupo de cadena lateral terminal de un análogo de lisina interna se protege mediante uno de diversos grupos protectores. Se usan grupos de bloqueo (también denominados grupos protectores o grupos de enmascaramiento) para proteger el grupo amino de los aminoácidos que tienen un grupo carboxilo activado que participa en la reacción de acoplamiento, o para proteger el grupo carboxilo de los aminoácidos que tienen un grupo amino acilado que participa en la reacción de acoplamiento. Para que se produzca el acoplamiento, debe eliminarse un grupo de bloqueo sin alterar una unión peptídica, o cualquier grupo protector unido a otra parte del péptido.

15 Para la síntesis de péptidos en fase sólida, se usan grupos de bloqueo que son estables para los tratamientos repetidos necesarios para la eliminación de los grupos de bloqueo de amino de la cadena peptídica en crecimiento y para los acoplamientos de aminoácidos repetidos, para proteger las cadenas laterales de aminoácidos. Adicionalmente, el anclaje péptido-resina que protege el extremo C-terminal del péptido debe protegerse a lo largo de todo el proceso sintético hasta que se requiera la escisión de la resina. En consecuencia, mediante una selección acertada de alfa-aminoácidos protegidos ortogonalmente, se añaden lípidos y/o aminoácidos en ubicaciones deseadas a un péptido en crecimiento mientras todavía está unido a la resina.

20 Los grupos de bloqueo de amino preferidos son fáciles de eliminar pero suficientemente estables para sobrevivir a las condiciones para la reacción de acoplamiento y otras manipulaciones, tales como, por ejemplo, modificaciones en los grupos de cadena lateral. Se seleccionan grupos de bloqueo de amino preferidos del grupo que consiste en: (i) un grupo benciloxicarbonilo (Z o carbobenzoxilo) que se elimina fácilmente mediante hidrogenación catalítica a temperatura ambiente y presión habitual, o usando sodio en amoniaco líquido y ácido bromhídrico en ácido acético; (ii) un grupo t-butoxicarbonilo (Boc) que se introduce usando azida de t-butoxicarbonilo o dicarbonato de di-terc-butilo y se elimina usando ácido leve tal como, por ejemplo, ácido trifluoroacético (TFA al 50% en diclorometano), o HCl en ácido acético/dioxano/acetato de etilo; (iii) un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) que se escinde en condiciones no hidrolíticas básicas leves, tales como, por ejemplo, usando una amina primaria o secundaria (por ejemplo, piperidina al 20% en dimetilformamida); (iv) un grupo 2-(4-bifenilil)propil(2)oxicarbonilo (Bpoc); (v) un grupo 2-nitro-fenilsulfenilo (Nps); y (vi) un grupo ditia-succinilo (Dts).

25 Los grupos protectores de cadena lateral variarán para las cadenas laterales funcionales de los aminoácidos que forman el péptido que está sintetizándose. Los grupos protectores de cadena lateral se basan generalmente en el grupo Bzl o el grupo tBu. Los aminoácidos que tienen alcoholes o ácidos carboxílicos en la cadena lateral se protegen como éteres de Bzl, éteres de Bzl, éteres de cHex, éteres de tBu, o éteres de tBu. La protección de cadena lateral protección de aminoácidos de Fmoc requiere grupos de bloqueo que de manera ideal son estables a bases y lábiles frente a ácidos débiles (TFA). Por ejemplo, el grupo épsilon-amino de lisina se protege usando Mtt (por ejemplo, Fmoc-lisina(Mtt)-OH). Alternativamente, se usa un derivado de bencilo halogenado tal como ClZ para proteger la cadena lateral de lisina si se requiere estabilidad frente a ácidos potenciada. El grupo tiol de cisteína, el imidazol de histidina, o el grupo guanidino de arginina, requieren generalmente una protección especializada. Se han descrito muchos grupos protectores diferentes para la síntesis de péptidos (véase *The Peptides*, Gross *et al.* eds., Vol. 3, Academic Press, Nueva York, 1981).

35 Las dos estrategias de protección más ampliamente usadas son las estrategias de Boc/Bzl y Fmoc/tBu. En Boc/Bzl, se usa Boc para la protección de amino y las cadenas laterales de los diversos aminoácidos se protegen usando grupos protectores basados en Bzl o cHex. Un grupo Boc es estable en condiciones de hidrogenación catalítica y se usa de manera ortogonal junto con un grupo Z para la protección de muchos grupos de cadena lateral. En Fmoc/tBu, se usa Fmoc para la protección de amino y las cadenas laterales se protegen con grupos protectores basados en tBu.

40 Los péptidos se lipidan mediante métodos bien conocidos en la técnica. Reacciones convencionales de condensación, adición, sustitución u oxidación (por ejemplo, formación de puentes de disulfuro o formación de enlaces de amida entre un grupo amino terminal en la lisina interna o el análogo de lisina interna con el grupo carboxilo terminal de un aminoácido o péptido o lipoaminoácido entrante) dan como resultado la adición de lípido al polipéptido.

45 En una realización alternativa, se produce un péptido de la presente invención para su uso como inmunógeno mediante ligación quimioselectiva o conjugación química. Tales métodos se conocen bien en la técnica, y permiten

producir los componentes de péptido individuales mediante medios químicos o recombinantes, seguido por su ligación quimioselectiva en una configuración o conformación u orden apropiado (por ejemplo, Nardin *et al.*, Vaccine 16, 590 (1998); Nardin *et al.*, J. Immunol. 166, 481 (2001); Rose *et al.*, Mol. Immunol. 32, 1031 (1995); Rose *et al.*, Bioconjug. Chem 7, 552 (1996); y Zeng *et al.*, Vaccine 18, 1031 (2000).

5 *Formulaciones de lipopéptido*

El lipopéptido se formula convenientemente en un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo, un disolvente acuoso, disolvente no acuoso, excipiente no tóxico, tal como una sal, conservante, tampón y similares. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los disolventes acuosos incluyen agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, soluciones salinas, vehículos parenterales tales como cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, etc. Los conservantes incluyen agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes. El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan según habilidades de rutina en la técnica.

La adición de un adyuvante extrínseco a la formulación de lipopéptido, aunque generalmente no se requiere, también queda abarcada por la invención. Tales adyuvantes extrínsecos incluyen todos los compuestos inmunoestimulantes aceptables tales como, por ejemplo, una citocina, toxina, o composición sintética. Los adyuvantes a modo de ejemplo incluyen IL-1, IL-2, BCG, hidróxido de aluminio, N-acetil-muramilo-L-treonil-D-isoglutamina (tur-MDP), N-acetil-nor-muramilo-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado nor-MDP), N-acetilmuramilo-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina (CGP 1983A, denominado MTP-PE), lípido A, MPL y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil-lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión del 2% de escualeno/Tween 80.

Puede ser deseable administrar conjuntamente modificadores de la respuesta biológica (BRM) con el lipopéptido, para regular por disminución la actividad de células T supresoras. Los BRM a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, cimetidina (CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA, EE.UU.); indometacina (IND; 150 mg/d) (Lederle, NJ, EE.UU.); o ciclofosfamida a dosis baja (CYP; 75, 150 ó 300 mg/m.sup.2) (Johnson/Mead, NJ, EE.UU.).

Uso del lipopéptido en inmunización

Los lipopéptidos novedosos de la invención se diferencian en aspectos esenciales de conjugados de lipopéptidos conocidos de antígenos en su solubilidad e inmunogenicidad potenciadas, y su capacidad para provocar respuestas inmunitarias sin la administración de adyuvante adicional. En consecuencia, una utilidad particular de los lipopéptidos de la presente invención es en los campos de la producción de anticuerpos, preparación de vacunas sintéticas, métodos de diagnóstico que emplean anticuerpos y ligandos de anticuerpos, e inmunoterapia para la medicina veterinaria y en seres humanos.

Más particularmente, el lipopéptido de la presente invención induce la producción específica de un anticuerpo de alto título contra el resto de epítipo de células B cuando se administra a un sujeto animal; sin requerir ningún adyuvante para lograr un título de anticuerpos similar. Esta utilidad se ve respaldada por la maduración potenciada de células dendríticas tras la administración de los lipopéptidos objeto (es decir, la presentación de antígenos potenciada en comparación con lipopéptidos que tienen lípido acoplado en el extremo N-terminal).

En consecuencia, también se da a conocer en el presente documento un método para provocar la producción de anticuerpo contra un epítipo de células B antigénico que comprende administrar un lipopéptido aislado que comprende un polipéptido conjugado con uno o más restos lipídicos a dicho sujeto durante un tiempo y en condiciones suficientes para provocar la producción de anticuerpos contra dicho epítipo de células B antigénico, en el que:

(i) dicho polipéptido comprende:

(a) la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células T cooperadoras (Th) y la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células B, en las que dichas secuencias de aminoácidos son diferentes; y

(b) uno o más residuos de lisina interna o residuos de análogos de lisina interna para la unión covalente de cada uno de dichos restos lipídicos a través un grupo épsilon-amino de dicha lisina interna o a través de un grupo de cadena lateral terminal de dicho análogo de lisina interna; y

(ii) cada uno de dicho uno o más restos lipídicos está covalentemente unido directa o indirectamente a un grupo épsilon-amino de dicho uno o más residuos de lisina interna o a un grupo de cadena lateral terminal de dicho uno o más residuos de análogos de lisina interna.

La cantidad eficaz de lipopéptido usada en la producción de anticuerpos varía según la naturaleza del epítipo de células B inmunogénico, la vía de administración, el animal usado para la inmunización, y la naturaleza del anticuerpo buscado. Todas de tales variables se determinan empíricamente mediante medios reconocidos en la técnica.

5 La referencia en el presente documento a anticuerpo o anticuerpos incluye anticuerpos monoclonales y policlonales completos, y partes de los mismos, ya sean solas o conjugadas con otros restos. Las partes de anticuerpo incluyen fragmentos Fab y F(ab)2 y anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos pueden prepararse *in vivo* en animales de laboratorio adecuados, o, en el caso de anticuerpos diseñados mediante ingeniería (anticuerpos monocatenarios o SCABS, etc.), usando técnicas de ADN recombinante *in vitro*.

10 Según este aspecto, los anticuerpos pueden producirse para los fines de inmunizar al sujeto, en cuyo caso se preferirán especialmente anticuerpos de alto título o neutralizantes que se unen al epítipo de células B. Por supuesto, los sujetos adecuados para la inmunización dependerán del epítipo de células B antigénico inmunizante. Se contempla que la presente invención podrá aplicarse de manera amplia a la inmunización de una amplia gama de animales, tales como, por ejemplo, animales de granja (por ejemplo, caballos, ganado, ovejas, cerdos, cabras, pollos, patos, pavos y similares), animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas, conejos), animales domésticos (gatos, perros, aves y similares), animales salvajes o exóticos (por ejemplo, comadreas, gatos, cerdos, búfalos, perros salvajes y similares) y seres humanos.

15 Alternativamente, los anticuerpos pueden ser para fines comerciales o de diagnóstico, en cuyo caso el sujeto al que se le administra el lipopéptido será lo más probablemente un animal de laboratorio o de granja. Se usa una amplia gama de especies animales para la producción de antisueros. Normalmente, el animal usado para la producción de antisueros es un conejo, un ratón, rata, hámster, cobaya, cabra, oveja, cerdo, perro, caballo, o pollo. Debido al volumen de sangre relativamente grande de conejos, un conejo es una elección preferida para la producción de anticuerpos policlonales. Sin embargo, tal como sabrán los expertos en la técnica, se requieren cantidades más grandes de inmunógeno para obtener anticuerpos de alto título a partir de animales grandes en oposición a animales más pequeños tales como ratones. En tales casos, será deseable aislar el anticuerpo a partir del animal inmunizado.

20 Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo de alto título. Mediante "alto título" se quiere decir un título lo suficientemente alto para ser adecuado para su uso en aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. Tal como se sabrá en la técnica, existe cierta variación en cuanto a lo que podría considerarse "alto título". Para la mayoría de las aplicaciones se prefiere un título de al menos aproximadamente 10^3 - 10^4 . Más preferiblemente, el título de anticuerpos estará en el intervalo de desde aproximadamente 10^4 hasta aproximadamente 10^5 , incluso más preferiblemente en el intervalo de desde aproximadamente 10^5 hasta aproximadamente 10^6 .

25 Más preferiblemente, en el caso de epítipos de células B de patógenos, virus o bacterias, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante (es decir, puede neutralizar la infectividad del organismo a partir del cual se deriva el epítipo de células B).

30 Para generar anticuerpos, el lipopéptido, opcionalmente formulado con cualquier portador, adyuvante, BRM o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado o deseado, se administra convenientemente en forma de una composición inyectable. La inyección puede ser intranasal, intramuscular, subcutánea, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, o mediante otra vía conocida. Los lipopéptidos de la presente invención han demostrado eficacia cuando se administran por vía intranasal. Para la inyección intravenosa, es deseable incluir uno o más reponedores de fluido nutrientes. En la técnica se conocen bien medios para preparar y caracterizar anticuerpos. (Véase, por ejemplo, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

35 La eficacia del lipopéptido en la producción de un anticuerpo se establece inmunizando a un animal, por ejemplo, un ratón, rata, conejo, cobaya, perro, caballo, vaca, cabra o cerdo, con una formulación que comprende el lipopéptido, y después monitorizando la respuesta inmunitaria contra el epítipo de células B, tal como se describe en los ejemplos. Se monitorizan las respuestas inmunitarias tanto primarias como secundarias. El título de anticuerpos se determina usando un inmunoensayo convencional, tal como, por ejemplo, ELISA, o radioinmunoensayo.

40 La producción de anticuerpos policlonales puede monitorizarse extrayendo muestras de sangre del animal inmunizado en diversos puntos de tiempo tras la inmunización. Puede administrarse una segunda inyección de refuerzo, si se requiere, para lograr un título de anticuerpos deseado. El proceso de reforzar y calcular el título se repite hasta que se logra un título adecuado. Cuando se obtiene un nivel deseado de inmunogenicidad, se sangra al animal inmunizado y se aísla y almacena el suero, y/o se usa el animal para generar anticuerpos monoclonales (AcM).

45 Para la producción de anticuerpos monoclonales (AcM) puede usarse una cualquiera de diversas técnicas bien conocidas, tales como, por ejemplo, el procedimiento mostrado a modo de ejemplo en la patente estadounidense n.º 4.196.265.

Por ejemplo, se inmunizará a un animal adecuado con una cantidad eficaz del lipopéptido de la invención y en condiciones suficientes para estimular células productoras de anticuerpos. Roedores tales como ratones y ratas son animales preferidos, sin embargo, también es posible el uso de células de conejo, oveja, o rana. El uso de ratas puede proporcionar ciertas ventajas, pero se prefieren ratones, siendo el ratón BALB/c lo más preferido como el animal usado de manera más rutinaria y uno que proporciona generalmente un alto porcentaje de fusiones estables.

Tras la inmunización, se seleccionan células somáticas que pueden producir anticuerpos, específicamente linfocitos B (células B), para su uso en el protocolo de generación de AcM. Estas células pueden obtenerse a partir de bazo, amígdalas o ganglios linfáticos sometidos a biopsia, o de una muestra de sangre periférica. Se prefieren células de bazo y células de sangre periférica, las primeras porque son una fuente rica de células productoras de anticuerpos que están en la fase plasmoblasto en división, y las segundas porque la sangre periférica es fácilmente accesible. Con frecuencia, se habrá inmunizado un panel de animales y se extrae el bazo del animal con el mayor título de anticuerpos. Se obtienen linfocitos de bazo mediante homogeneización del bazo con una jeringuilla. Normalmente, un bazo de un ratón inmunizado contiene aproximadamente de 5×10^7 a 2×10^8 linfocitos.

Entonces se fusionan las células B del animal inmunizado con células de una célula de mieloma inmortal, derivadas generalmente de la misma especie que el animal que se inmunizó con la formulación de lipopéptido. Preferiblemente las líneas celulares de mieloma adecuadas para su uso en procedimientos de fusión de producción de hibridoma no son productoras de anticuerpos, tienen una alta eficacia de fusión y deficiencias enzimáticas que hacen entonces imposible que crezcan en determinados medios selectivos que sólo soportan el crecimiento de las células fusionadas deseadas, o hibridomas. Puede usarse una cualquiera de diversas células de mieloma y las conocen los expertos en la técnica (por ejemplo, P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 murinas; o R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210 de rata; y U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6). Una célula de mieloma murina preferida es la línea celular de mieloma NS-1 (también denominada P3-NS-1-Ag4-1), que está fácilmente disponible del depósito de células mutantes genéticas humanas de NIGMS con el n.º de registro GM3573. Alternativamente, se usa una línea celular no productora de mieloma murino SP2/0 que es resistente a 8-azaguanina.

Para generar híbridos de células de ganglios linfáticos o de bazo productoras de anticuerpos y células de mieloma, se mezclan células somáticas con células de mieloma en una proporción de entre aproximadamente 20:1 y aproximadamente 1:1, respectivamente, en presencia de un agente o agentes (químicos o eléctricos) que fomentan la fusión de membranas celulares. Se han descrito métodos de fusión usando el virus Sendai por Kohler y Milstein, Nature 256, 495-497, 1975; y Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol. 6, 511-519, 1976. Se han descrito métodos que usan polietilenglicol (PEG), tal como PEG al 37% (v/v), en detalle por Gefter *et al.*, Somatic Cell Genet. 3, 231-236, 1977. El uso de métodos de fusión inducida eléctricamente también es apropiado.

Se amplifican híbridos mediante cultivo en un medio selectivo que comprende un agente que bloquea la síntesis *de novo* de nucleótidos en los medios de cultivo tisular. Agentes preferidos y a modo de ejemplo son aminopterina, metotrexato y azaserina. La aminopterina y el metotrexato bloquean la síntesis *de novo* tanto de purinas como de pirimidinas, mientras que la azaserina sólo bloquea la síntesis de purina. Cuando se usa aminopterina o metotrexato, los medios se complementan con hipoxantina y timidina como fuente de nucleótidos (medio HAT). Cuando se usa azaserina, los medios se complementan con hipoxantina.

El medio de selección preferido es HAT, porque sólo los hibridomas que pueden realizar rutas de recuperación de nucleótidos pueden sobrevivir en medio HAT, mientras que las células de mieloma carecen de enzimas clave de la ruta de recuperación, (por ejemplo, hipoxantina fosforibosil transferasa o HPRT), y no pueden sobrevivir. Las células B pueden realizar esta ruta de recuperación, pero tienen una vida limitada en cultivo y generalmente mueren en el plazo de aproximadamente dos semanas. En consecuencia, las únicas células que pueden sobrevivir en el medio selectivo son los híbridos formados por células B y de mieloma.

Los hibridomas amplificados se someten a una selección funcional para determinar la especificidad y/o título de anticuerpo, tal como, por ejemplo, mediante inmunoensayo (por ejemplo, radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático, ensayo de citotoxicidad, ensayo de placas, ensayo de inmunounión en puntos, y similares).

Los hibridomas seleccionados se diluyen en serie y se clonan en líneas celulares productoras de anticuerpos individuales, clones que entonces pueden propagarse de manera indefinida para proporcionar AcM. Las líneas celulares pueden aprovecharse para la producción de AcM de dos maneras básicas. Se inyecta una muestra del hibridoma, habitualmente en la cavidad peritoneal, en un animal histocompatible del tipo que se usó para proporcionar las células somáticas y de mieloma para la fusión original. El animal inyectado desarrolla tumores que secretan el anticuerpo monoclonal específico producido por el híbrido celular fusionado. Entonces pueden extraerse los fluidos corporales del animal, tales como suero o fluido ascítico, para proporcionar AcM en alta concentración. Las líneas celulares individuales también pueden cultivarse *in vitro*, en las que los AcM se secretan de manera natural en el medio de cultivo a partir del cual se obtienen fácilmente en altas concentraciones. Los AcM producidos mediante cualquiera de los medios pueden purificarse adicionalmente, si se desea, usando filtración, centrifugación y diversos métodos cromatográficos tales como HPLC o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también incluyen anticuerpos anti-idiotípicos producidos mediante métodos bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales también pueden ser heteroconjugados monoclonales, (es decir, híbridos de dos o más moléculas de anticuerpo). En otra realización, los anticuerpos monoclonales son anticuerpos monoclonales quiméricos. En un enfoque, el anticuerpo monoclonal quimérico se diseña mediante ingeniería clonando ADN recombinante que contiene las secuencias promotora, líder, y de región variable de una célula de ratón productora de anticuerpo anti-PSA y los exones de región constante de un gen de anticuerpo humano. El anticuerpo codificado por un gen recombinante de este tipo es una quimera ratón-ser humano. Su especificidad de anticuerpo se determina por la región variable derivada de secuencias de ratón. Su isotipo, que se determina por la región constante, se deriva de ADN humano.

En otra realización, los anticuerpos monoclonales son un anticuerpo monoclonal "humanizado", producido mediante técnicas bien conocidas en la técnica. Es decir, se transfieren regiones determinantes de complementariedad ("CDR") de cadenas V pesada y ligera de la Ig de ratón en un dominio V humano, seguido por la colocación de algunos residuos humanos en las regiones de entramado de sus equivalentes murinos. Los anticuerpos monoclonales "humanizados" son especialmente adecuados para su uso en métodos de diagnóstico y terapéuticos *in vivo*.

Tal como se mencionó anteriormente, los anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos se multiplican según métodos *in vitro* e *in vivo* bien conocidos en la técnica. La multiplicación *in vitro* se lleva a cabo en medios de cultivo adecuados tales como medio de Eagle modificado por Dulbecco o medio RPMI 1640, opcionalmente complementado mediante un suero de mamífero tal como suero de ternero fetal u oligoelementos y complementos que ayudan al crecimiento, por ejemplo, células alimentadoras, tales como células de exudado peritoneal de ratón normal, células de bazo, macrófagos de médula ósea o similares. La producción *in vitro* proporciona preparaciones de anticuerpos relativamente puras y permite la ampliación a escala para proporcionar grandes cantidades de los anticuerpos deseados. En la técnica se conocen técnicas para el cultivo de hibridoma a gran escala en condiciones de cultivo tisular e incluyen cultivo en suspensión homogénea, (por ejemplo, en un reactor con dispositivo de elevación de aire o en un reactor con agitación continua o cultivo de células inmovilizadas o atrapadas).

También pueden obtenerse grandes cantidades del anticuerpo monoclonal multiplicando células de hibridoma *in vivo*. Se inyectan clones celulares en mamíferos que son histocompatibles con las células originales (por ejemplo, ratones singénicos), para provocar el crecimiento de tumores productores de anticuerpos. Opcionalmente, se sensibilizan los animales con un hidrocarburo, especialmente aceites tales como pristano (tetrametilpentadecano) antes de la inyección.

Se obtienen fragmentos del anticuerpo monoclonal de la invención a partir de anticuerpos monoclonales producidos tal como se describió anteriormente, mediante métodos que incluyen la digestión con enzimas tales como pepsina o papaína y/o escisión de enlaces disulfuro mediante reducción química.

Los conjugados monoclonales se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, haciendo reaccionar un anticuerpo monoclonal preparado tal como se describió anteriormente, por ejemplo, con una enzima en presencia de un agente de acoplamiento tal como glutaraldehído o peryodato. Se preparan conjugados con marcadores de fluoresceína en presencia de estos agentes de acoplamiento, o mediante reacción con un isotiocianato. De manera similar se producen conjugados con quelatos metálicos.

Otros restos con los que pueden conjugarse anticuerpos incluyen radionúclidos tales como, por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{30}Cl , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{75}Se , y ^{152}Eu . Los anticuerpos monoclonales marcados radioactivamente se producen según métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se yodan anticuerpos monoclonales mediante contacto con yoduro de sodio o de potasio y un agente oxidante químico tal como hipoclorito de sodio, o un agente oxidante enzimático, tal como lactoperoxidasa. Pueden marcarse anticuerpos monoclonales con tecnecio⁹⁹ mediante un proceso de intercambio de ligando, por ejemplo, reduciendo pertechnetato con una disolución estannosa, quelando el tecnecio reducido en una columna de Sephadex y aplicando el anticuerpo a esta columna o mediante técnicas de marcaje directo, (por ejemplo, incubando pertechnetato, un agente reductor tal como SnCl_2 , una disolución tampón tal como disolución de ftalato de sodio-potasio, y el anticuerpo).

Puede usarse cualquier inmunoensayo para monitorizar la producción de anticuerpos por las formulaciones de lipopéptido. Los inmunoensayos, en su sentido más sencillo y directo, son ensayos de unión. Determinados inmunoensayos preferidos son los diversos tipos de ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) y radioinmunoensayos (RIA) conocidos en la técnica. La detección inmunohistoquímica usando secciones de tejidos también es particularmente útil. Sin embargo, se apreciará fácilmente que la detección no se limita a tales técnicas, y también puede usarse inmunotransferencia de tipo Western, transferencia en manchas, análisis de FACS, y similares.

Lo más preferiblemente, el ensayo podrá generar resultados cuantitativos.

Por ejemplo, se someten a prueba anticuerpos en ensayos de competición sencillos. Se incuba una preparación de anticuerpo conocido que se une al epítipo de células B y el anticuerpo de prueba con una composición de antígeno que comprende el epítipo de células B, preferiblemente en el contexto del antígeno nativo. "Composición de antígeno" tal como se usa en el presente documento significa cualquier composición que contiene alguna versión del epítipo de células B en una forma accesible. Se prefieren particularmente pocillos recubiertos de antígeno de una placa de ELISA. En una realización, se mezclarán previamente los anticuerpos conocidos con cantidades variables de los anticuerpos de prueba (por ejemplo, 1:1, 1:10 y 1:100) durante un periodo de tiempo previo a la aplicación a la composición de antígeno. Si uno de los anticuerpos conocidos está marcado, es posible la detección directa del marcador unido al antígeno; un ensayo de comparación con una muestra sin mezclar determinará la competición mediante el anticuerpo de prueba y, por tanto, la reactividad cruzada. Alternativamente, usando anticuerpos secundarios específicos o bien para el anticuerpo conocido o bien para el de prueba, podrá determinarse la competición.

Un anticuerpo que se une a la composición de antígeno podrá competir eficazmente para la unión del anticuerpo conocido y por tanto reducirá significativamente la unión de este último. La reactividad de los anticuerpos conocidos en ausencia de cualquier anticuerpo de prueba es el control. Una reducción significativa de la reactividad en presencia de un anticuerpo de prueba es indicativa de que un anticuerpo de prueba se une al epítipo de células B (es decir, tiene reacción cruzada con el anticuerpo conocido).

En un ELISA a modo de ejemplo, se inmovilizan los anticuerpos contra el epítipo de células B sobre una superficie seleccionada que muestra afinidad de proteína, tal como un pocillo en una placa de microtitulación de poliestireno. Entonces se añade una composición que contiene el epítipo de células B a los pocillos. Tras la unión y el lavado para eliminar complejos inmunitarios no unidos específicamente, puede detectarse el epítipo unido. La detección se logra generalmente mediante la adición de un segundo anticuerpo que se sabe que se une al epítipo de células B y está conectado a un marcador detectable. Este tipo de ELISA es un "ELISA de tipo sándwich" sencillo. También puede lograrse la detección mediante la adición de dicho segundo anticuerpo, seguido por la adición de un tercer anticuerpo que tiene afinidad de unión por el segundo anticuerpo, estando el tercer anticuerpo conectado a un marcador detectable.

Inducción de esterilidad

Un lipopéptido apropiadamente configurado de la presente invención que comprende un epítipo de células B antigénico de una hormona reproductora o un receptor de hormona puede inducir esterilidad en un sujeto.

También se da a conocer en el presente documento un método para inducir esterilidad en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un lipopéptido aislado que comprende un polipéptido conjugado con uno o más restos lipídicos, en el que:

(i) dicho polipéptido comprende:

(a) la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células T cooperadoras (Th) y la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células B de una hormona reproductora o receptor de hormona, y en el que dichas secuencias de aminoácidos son diferentes; y

(b) uno o más residuos de lisina interna o residuos de análogos de lisina interna para la unión covalente de cada uno de dichos restos lipídicos a través de un grupo épsilon-amino de dicha lisina interna o a través de un grupo de cadena lateral terminal de dicho análogo de lisina interna; y

(ii) cada uno de dicho uno o más restos lipídicos está covalentemente unido directa o indirectamente a un grupo épsilon-amino de dicho uno o más residuos de lisina interna o a un grupo de cadena lateral terminal de dicho uno o más residuos de análogos de lisina interna; y

(iii) dicho lipopéptido se administra durante un tiempo y en condiciones suficientes para provocar una respuesta inmunitaria humoral contra dicho epítipo de células B antigénico.

Los lipopéptidos pueden administrarse en forma de cualquier formulación de lipopéptido conveniente tal como se describe en el presente documento.

Mediante "respuesta inmunitaria humoral" se quiere decir que se genera una respuesta inmunitaria secundaria contra el epítipo de células B suficiente para prevenir la ovogénesis, espermatogénesis, fertilización, implantación, o desarrollo embrionario.

Preferiblemente, la inmunidad humoral generada incluye un nivel mantenido de anticuerpos contra el epítipo de células B en el sujeto. Mediante un "nivel mantenido de anticuerpos" se quiere decir un nivel suficiente de

anticuerpos circulantes contra el epítipo de células B para prevenir la ovogénesis, espermatogénesis, fertilización, implantación, o desarrollo embrionario.

5 Preferiblemente, los niveles de anticuerpos se mantienen durante al menos un único ciclo reproductivo de un sujeto hembra inmunizado, y más preferiblemente durante al menos aproximadamente seis meses o 9 meses o 12 meses o 2 años.

Preferiblemente, el epítipo de células B se deriva de la secuencia de aminoácidos de hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona leutinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (hCG), una proteína de zona pelúcida tal como ZP3, o un ZP3a receptor de FSH de seres humanos u otros mamíferos, tales como cerdos.

10 Los epítopos de células B particularmente preferidos dentro de esta categoría incluyen la parte C-terminal (CTP) de β -hCG; residuos de aminoácido 323-341 de ZP3 humana; residuos aminoácido 8-18 o residuos 272-283 o residuos 319-330 de ZP3a porcina.

15 Incluso más preferiblemente, el epítipo de células B comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, y SEQ ID NO: 84.

El epítipo de células T cooperadoras comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 44, sin embargo puede usarse una cualquiera de SEQ ID NO: 1 ó 18-56.

20 En una realización particularmente preferida de la invención, el epítipo de células T cooperadoras comprende una secuencia de aminoácidos tal como se indica en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 44, y el epítipo de células B comprende una secuencia de aminoácidos de LHRH tal como se indica en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. De acuerdo con tal realización preferida, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5-16, 103 ó 104. También de acuerdo con esta realización preferida, se prefiere (aunque no es esencial) que el resto lipídico comprenda un lipoaminoácido seleccionado del grupo que consiste en: (i) Pam₂Cys; (ii) Ste₂Cys; (iii) Lau₂Cys; y (iv) Oct₂Cys.

La producción sostenida de anticuerpos contra LHRH lograda mediante los lipopéptidos de la invención demuestra la utilidad general de los lipopéptidos objeto como principio activo en una preparación de vacuna para inducir esterilidad, o como agente anticonceptivo.

30 En consecuencia, un aspecto adicional de la invención proporciona un agente anticonceptivo que comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable y un lipopéptido que comprende un polipéptido aislado conjugado con uno o más restos lipídicos en el que:

(i) dicho polipéptido comprende:

35 (a) la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células T cooperadoras (Th) y la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células B de una hormona reproductora o receptor de hormona, en el que dichas secuencias de aminoácidos son diferentes; y

(b) uno o más residuos de lisina interna o residuos de análogos de lisina interna para la unión covalente de cada uno de dichos restos lipídicos a través de un grupo épsilon-amino de dicha lisina interna o a través de un grupo de cadena lateral terminal de dicho análogo de lisina interna; y

40 (ii) cada uno de dicho uno o más restos lipídicos está covalentemente unido directa o indirectamente a un grupo épsilon-amino de dicho uno o más residuos de lisina interna o a un grupo de cadena lateral terminal de dicho uno o más residuos de análogos de lisina interna.

La vacuna/agente anticonceptivo de la invención puede comprender uno o más portadores o excipientes u otros agentes tal como se describió anteriormente en el presente documento en "formulaciones de lipopéptido".

45 De manera similar, la administración de la vacuna/agente anticonceptivo objeto se logra por medios descritos anteriormente en el presente documento. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano, o un sujeto animal tal como, por ejemplo, un animal de granja, animal de laboratorio, animal doméstico, animal salvaje o animal exótico.

Inmunización contra Streptococcus del grupo A

Streptococcus del grupo A (GAS) es el agente bacteriano de enfermedad relativamente leve tal como, por ejemplo, "infección de garganta", e impétigo, así como enfermedades graves e incluso potencialmente mortales más poco frecuentes tales como, por ejemplo, fascitis necrotizante y síndrome de choque tóxico por estreptococos. Puede producirse enfermedad de GAS grave, algunas veces potencialmente mortal, cuando llegan bacterias a partes del organismo en las que habitualmente no se encuentran bacterias, tales como la sangre, músculos, o los pulmones, una infección denominada "enfermedad de GAS invasiva". Dos de las formas más graves de enfermedad de GAS invasiva son fascitis necrotizante y síndrome de choque tóxico por estreptococos (STSS). La fascitis necrotizante destruye músculos, grasa y tejido cutáneo. La STSS provoca que la tensión arterial disminuya rápidamente y fallo en los órganos (por ejemplo, riñón, hígado, pulmones). Aproximadamente el 20% de los pacientes con fascitis necrotizante y más de la mitad con STSS fallecen. Aproximadamente el 10%-15% de los pacientes con otras formas de enfermedad por estreptococos del grupo A invasiva fallecen. En los Estados Unidos solos en 1999 hubo aproximadamente 9,400 casos de enfermedad de GAS invasiva.

Las infecciones de GAS invasivas se producen generalmente cuando las bacterias llegan más allá de las defensas de la persona que está infectada, tal como, por ejemplo, cuando una persona tiene llagas u otras roturas en la piel que permiten que las bacterias lleguen al tejido, o cuando la capacidad de la persona para luchar contra la infección se ve disminuida debido a enfermedades crónicas o a una enfermedad que afecta al sistema inmunitario, incluyendo VIH/SIDA. Además, algunas cepas virulentas de GAS tienen más posibilidades de provocar enfermedad grave que otras. Las personas que padecen enfermedades crónicas tales como cáncer, diabetes, y diálisis renal, y las que usan medicaciones tales como esteroides tienen un mayor riesgo.

Tal como se explica a modo de ejemplo en el presente documento, un lipopéptido apropiadamente configurado de la presente invención que comprende un epítipo de células B antigénico de un antígeno de *Streptococcus* del grupo A, preferiblemente proteína M, puede inmunizar a un huésped animal contra GAS, y más particularmente inducir IgG en suero, IgA en saliva e IgA fecal contra la proteína M de GAS, y también proporcionar una respuesta inmunitaria protectora contra una exposición posterior a GAS reduciendo de ese modo la mortalidad inducida por GAS.

También se da a conocer en el presente documento un método para inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno de *Streptococcus* del grupo A en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un lipopéptido aislado que comprende un polipéptido conjugado con uno o más restos lipídicos, en el que:

(iv) dicho polipéptido comprende:

(b) la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células T cooperadoras (Th) y la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células B de un antígeno de *Streptococcus* del grupo A, en el que dichas secuencias de aminoácidos son diferentes; y

(c) uno o más residuos de lisina interna o residuos de análogos de lisina interna para la unión covalente de cada uno de dichos restos lipídicos a través de un grupo épsilon-amino de dicha lisina interna o a través de un grupo de cadena lateral terminal de dicho análogo de lisina interna; y

(v) cada uno de dicho uno o más restos lipídicos está covalentemente unido directa o indirectamente un grupo épsilon-amino de dicho uno o más residuos de lisina interna o a un grupo de cadena lateral terminal de dicho uno o más residuos de análogos de lisina interna; y

(vi) dicho lipopéptido se administra durante un tiempo y en condiciones suficientes para provocar una respuesta inmunitaria humoral contra dicho epítipo de células B antigénico.

Los lipopéptidos pueden administrarse en forma de cualquier formulación de lipopéptido conveniente tal como se describe en el presente documento.

Mediante "respuesta inmunitaria humoral" se quiere decir que se genera una respuesta inmunitaria secundaria contra el epítipo de células B suficiente para inducir IgG en suero, IgA en saliva o IgA fecal contra un péptido que comprende el epítipo de células B, o alternativamente o además, proporcionar una inmunidad protectora contra una exposición posterior a *Streptococcus* del grupo A.

Preferiblemente, la inmunidad humoral generada incluye un nivel mantenido de anticuerpos contra el epítipo de células B en el sujeto. Mediante un "nivel mantenido de anticuerpos" se quiere decir un nivel suficiente de anticuerpos circulantes contra el epítipo de células B para prevenir la expansión de la infección mediante un *Streptococcus* del grupo A tras una exposición posterior, y/o reducir la morbimortalidad en un sujeto que se expone posteriormente a un *Streptococcus* del grupo A.

Preferiblemente, los niveles de anticuerpos se mantienen durante al menos aproximadamente seis meses o 9 meses o 12 meses o 2 años.

Preferiblemente, el epítipo de células B se deriva de la secuencia de aminoácidos de la proteína M de *Streptococcus* del grupo A.

Los epítipos de células B particularmente preferidos dentro de esta categoría incluyen un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 101.

- 5 El epítipo de células T cooperadoras preferiblemente comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 44, sin embargo puede usarse una cualquiera de SEQ ID NO: 1 ó 18-56.

10 En una realización particularmente preferida de la invención, el epítipo de células T cooperadoras comprende una secuencia de aminoácidos tal como se indica en SEQ ID NO: 24 y el epítipo de células B comprende una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 101. De acuerdo con tal realización preferida, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 105-108. También de acuerdo con esta realización preferida, se prefiere (aunque no es esencial) que el resto lipídico comprenda un lipoaminoácido de fórmula (I) o (II), sin embargo cualquier lípido tal como se describe en el presente documento será útil.

15 La producción sostenida de anticuerpos contra el péptido J14 lograda por los lipopéptidos de la invención demuestra la utilidad general de los lipopéptidos objeto como principio activo en una preparación de vacuna para proporcionar inmunidad protectora contra *Streptococcus* del grupo A.

En consecuencia, un aspecto adicional de la invención proporciona una vacuna contra *Streptococcus* del grupo A que comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable y un lipopéptido que comprende un polipéptido aislado conjugado con uno o más restos lipídicos en la que:

20 (iii) dicho polipéptido comprende:

(b) la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células T cooperadoras (Th) y la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células B de un antígeno de *Streptococcus* del grupo A, en la que dichas secuencias de aminoácidos son diferentes; y

25 (c) uno o más residuos de lisina interna o residuos de análogos de lisina interna para la unión covalente de cada uno de dichos restos lipídicos a través de un grupo épsilon-amino de dicha lisina interna o a través de un grupo de cadena lateral terminal de dicho análogo de lisina interna; y

(iv) cada uno de dicho uno o más restos lipídicos está covalentemente unido directa o indirectamente a un grupo épsilon-amino de dicho uno o más residuos de lisina interna o a un grupo de cadena lateral terminal de dicho uno o más residuos de análogos de lisina interna.

30 La vacuna de la invención puede comprender uno o más portadores o excipientes u otros agentes tal como se describió anteriormente en el presente documento en "formulaciones de lipopéptido".

De manera similar, la administración de la vacuna objeto se logra por medios descritos anteriormente en el presente documento, preferiblemente por una vía intranasal. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano, o un sujeto animal tal como, por ejemplo, un animal de granja, animal de laboratorio, animal doméstico, animal salvaje o animal exótico.

35 *Inhibición o prevención de secreción de ácido gástrico excesiva y no regulada*

40 Se sabe que la gastrina estimula la secreción de ácido gástrico por células parietales, una actividad mediada mediante la unión de gastrina a receptores de gastrina o receptores de colecistoquinina. Los cuatro a cinco residuos aminoácido terminales de gastrina proporcionan la misma actividad y especificidad de receptor que la proteína de longitud completa. Los cinco residuos aminoácido terminales de gastrina se denominan "pentagastrina". La expresión y secreción de gastrina no regulada provoca hipergastrinemia, lo que conduce a síndrome de Zollinger-Ellison, la formación de úlceras gástricas y duodenales, o gastrinoma en el páncreas o el duodeno, como consecuencia de una secreción de ácido gástrico excesiva y no regulada. También se sabe que la inmunoneutralización de gastrina usando anticuerpos contra gastrina bloquea la secreción de ácido gástrico en respuesta a la secreción intragástrica de péptidos de gastrina.

45 Tal como se explica a modo de ejemplo en el presente documento, un lipopéptido apropiadamente configurado de la presente invención que comprende un epítipo de células B antigénico de un péptido de gastrina puede inmunizar a un huésped animal contra gastrina o un efecto de producción de gastrina excesiva en un modelo de ratón de otros mamíferos en el que la inhibición de secreción de ácido gástrico está indicada. Los datos facilitados en el presente documento demuestran la utilidad general de los lipopéptidos objeto para inducir inmunidad humoral contra gastrina y para la inmunoneutralización de gastrina, para de ese modo bloquear la secreción de ácido gástrico, en un animal

50

que experimenta hipergastrinemia, síndrome de Zollinger-Ellison, aparición de úlceras gástricas o aparición de úlceras duodenales debido a secreción excesiva y no regulada de ácido gástrico, o para reducir o prevenir la formación de tumores que secretan gastrina en el páncreas o el duodeno (es decir, la profilaxis y/o terapia de gastrinona).

5 También se da a conocer en el presente documento un método para inducir una respuesta inmunitaria contra un péptido de gastrina en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un lipopéptido aislado que comprende un polipéptido conjugado con uno o más restos lipídicos, en el que:

(vii) dicho polipéptido comprende:

10 (c) la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células T cooperadoras (Th) y la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células B de un antígeno de péptido de gastrina, en el que dichas secuencias de aminoácidos son diferentes; y

(d) uno o más residuos de lisina interna o residuos de análogos de lisina interna para la unión covalente de cada uno de dichos restos lipídicos a través de un grupo épsilon-amino de dicha lisina interna o a través de un grupo de cadena lateral terminal de dicho análogo de lisina interna; y

15 (viii) cada uno de dicho uno o más restos lipídicos está covalentemente unido directa o indirectamente a un grupo épsilon-amino de dicho uno o más residuos de lisina interna o a un grupo de cadena lateral terminal de dicho uno o más residuos de análogos de lisina interna; y

(ix) dicho lipopéptido se administra durante un tiempo y en condiciones suficientes para provocar una respuesta inmunitaria humoral contra dicho epítipo de células B antigénico.

20 Los lipopéptidos pueden administrarse en forma de cualquier formulación de lipopéptido conveniente tal como se describe en el presente documento.

Mediante "respuesta inmunitaria humoral" se quiere decir que se genera una respuesta inmunitaria secundaria contra el epítipo de células B suficiente para inducir IgG en suero contra un péptido de gastrina que comprende el epítipo de células B.

25 Preferiblemente, la inmunidad humoral generada incluye un nivel mantenido de anticuerpos contra el epítipo de células B en el sujeto. Mediante un "nivel mantenido de anticuerpos" se quiere decir un nivel suficiente de anticuerpos circulantes contra el epítipo de células B para prevenir la secreción de ácido gástrico excesiva o no regulada en respuesta a gastrina.

30 Preferiblemente, los niveles de anticuerpos se mantienen durante al menos aproximadamente seis meses o 9 meses o 12 meses o 2 años.

Preferiblemente, el epítipo de células B está contenido dentro de un péptido de pentagastrina. Los epítipos de células B particularmente preferidos dentro de esta categoría incluyen un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 102, sin embargo también puede usarse la proteína gastrina de longitud completa o cualquier fragmento inmunogénico de la misma que comprende un epítipo de células B.

35 El epítipo de células T cooperadoras preferiblemente comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 44, sin embargo puede usarse una cualquiera de SEQ ID NO: 1 ó 18-56.

40 En una realización particularmente preferida de la invención, el epítipo de células T cooperadoras comprende una secuencia de aminoácidos tal como se indica en SEQ ID NO: 24 y el epítipo de células B comprende una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 102. De acuerdo con tal realización preferida, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 109-112. También de acuerdo con esta realización preferida, se prefiere (aunque no es esencial) que el resto lipídico comprenda un lipoaminoácido de fórmula (I) o (II), sin embargo cualquier lípido tal como se describe en el presente documento será útil.

45 La producción sostenida de anticuerpos contra pentagastrina o gastrina que se logra mediante los lipopéptidos de la invención demuestra que la utilidad general de los lipopéptidos objeto como principio activo en una preparación de vacuna para reducir un efecto adverso de gastrina en un sujeto que lo necesita.

En consecuencia, un aspecto adicional de la invención proporciona una vacuna contra una enfermedad o un estado inducido por una secreción de gastrina excesiva en un sujeto que comprende un diluyente farmacéuticamente

aceptable y un lipopéptido que comprende un polipéptido aislado conjugado con uno o más restos lipídicos en la que:

(v) dicho polipéptido comprende:

5 (c) la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células T cooperadoras (Th) y la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células B de un antígeno de péptido de gastrina, en la que dichas secuencias de aminoácidos son diferentes; y

(d) uno o más residuos de lisina interna o residuos de análogos de lisina interna para la unión covalente de cada uno de dichos restos lipídicos a través de un grupo épsilon-amino de dicha lisina interna o a través de un grupo de cadena lateral terminal de dicho análogo de lisina interna; y

10 (vi) cada uno de dicho uno o más restos lipídicos está covalentemente unido directa o indirectamente a un grupo épsilon-amino de dicho uno o más residuos de lisina interna o a un grupo de cadena lateral terminal de dicho uno o más residuos de análogos de lisina interna.

La vacuna de la invención puede comprender uno o más portadores o excipientes u otros agentes tal como se describió anteriormente en el presente documento en "formulaciones de lipopéptido".

15 De manera similar, la administración de la vacuna objeto se logra por medios descritos anteriormente en el presente documento. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

La presente invención se describe adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos y a los dibujos.

EJEMPLO 1

20 Materiales y métodos

Productos químicos

A menos que se establezca otra cosa, los productos químicos eran de calidad analítica o su equivalente. Se obtuvieron N,N'-dimetilformamida (DMF), piperidina, ácido trifluoroacético (TFA), hexafluorofosfato de O'benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y diisopropiletilamina (DIPEA) y diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) de Auspep Pty. Ltd., Melbourne, Australia y Sigma-Aldrich Pty. Ltd., Castle Hill, Australia. Se obtuvo tetrafluoroborato de O'benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) de Bachem, (Bachem AG, Suiza). El diclorometano (DCM) y el dietil éter eran de Merck Pty Ltd. (Kilsyth, Australia). El fenol y el triisopropilsilano (TIPS) eran de Aldrich (Milwaulke, WI) y el ácido trinitrobenzilsulfónico (TNBSA) y la diaminopiridina (DMAP) de Fluka; se obtuvo 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) de Sigma y el ácido palmítico era de Fluka.

30 *Síntesis de restos lipídicos de fórmula (I)*

Se preparó Pam₃Cys según el método descrito por Weismuller *et al.*, Hoppe Seylers Z Physiol Chem 364, 593 (1983), modificado según el método descrito por Zeng *et al.*, J Pept Sci 2, 66 (1996). El lipoaminoácido Pam₃Cys se acopla al grupo épsilon-amino expuesto de la lisina según el procedimiento descrito por Zeng *et al.* (*citado anteriormente*). En resumen, se disolvió un exceso de 2 veces de Pam₃Cys, TBTU y HOBt en DCM y se añadió un exceso de 3 veces de DIPEA. Se añadió entonces esta disolución al péptido unido a resina para generar el lipopéptido.

Síntesis de restos lipídicos de fórmula (II)

Se prepararon Pam₂Cys y su derivado Fmoc-Pam₂Cys-OH según los métodos descritos por Jones *et al.*, Xenobiotica 5, 155 (1975) y Metzger *et al.*, Int J Pept Protein Res 38, 545 (1991).

40 *Síntesis de lipopéptidos*

Se acoplaron Pam₂Cys, Ste₂Cys, Oct₂Cys o Lau₂Cys a péptido usando una variación de los métodos descritos por Jones *et al.*, Xenobiotica 5, 155 (1975) y Metzger *et al.*, Int J Pept Protein Res 38, 545 (1991).

I. Síntesis of S-(2,3-dihidroxiopropil)cisteína:

Se añadió trietilamina (6 g, 8,2 ml, 58 mmoles) a clorhidrato de L-cisteína (3 g, 19 mmoles) y 3-bromopropan-1,2-diol

(4,2 g, 2,36 ml, 27 mmoles) en agua y se mantuvo la disolución homogénea a temperatura ambiente durante 3 días. Se redujo la disolución a vacío a 40°C dando un residuo blanco que se llevó a ebullición con metanol (100 ml), se centrifugó y se disolvió el residuo en agua (5 ml). Se añadió esta disolución acuosa a acetona (300 ml) y se aisló el precipitado mediante centrifugación. Se purificó el precipitado mediante varias precipitaciones en agua con acetona dando S-(2,3-dihidroxiopropil)cisteína como un polvo amorfo blanco (2,4 g, 12,3 mmoles, 64,7%).

II. Síntesis de N-Fluorenilmetoxicarbonil-S-(2,3-dihidroxiopropil)cisteína (Fmoc-Dhc-OH):

Se disolvió S-(2,3-dihidroxiopropil)cisteína (2,45 g, 12,6 mmoles) en carbonato de sodio al 9% (20 ml). Se añadió una disolución de fluorenilmetoxicarbonil-N-hidroxisuccinimida (3,45 g, 10,5 mmoles) en acetonitrilo (20 ml) y se agitó la mezcla durante 2 h, entonces se diluyó con agua (240 ml) y se extrajo con dietil éter (25 ml x 3). Se acidificó la fase acuosa hasta pH 2 con ácido clorhídrico concentrado y entonces se extrajo con acetato de etilo (70 ml x 3). Se lavó el extracto con agua (50 ml x 2) y disolución saturada de cloruro de sodio (50 ml x 2), se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó hasta sequedad. La recrystalización en éter y acetato de etilo a -20°C produjo un polvo incoloro (2,8 g, 6,7 mmoles, 63,8%).

III. Acoplamiento de Fmoc-Dhc-OH a péptido unido a resina:

Se activó Fmoc-Dhc-OH (100 mg, 0,24 mmoles) en DCM y DMF (1:1, v/v, 3 ml) con HOBt (36 mg, 0,24 mmoles) y DICl (37 μ l, 0,24 mmoles) a 0°C durante 5 min. Entonces se añadió la mezcla a un recipiente que contenía el péptido unido a resina (0,04 mmoles, 0,25 g de resina de amino-péptido). Tras agitar durante 2 h, se eliminó la disolución mediante filtración y se lavó la resina con DCM y DMF (3 x 30 ml cada uno). Se monitorizó la reacción para detectar su finalización usando la prueba de TNBSA. Si era necesario, se realizó un doble acoplamiento.

IVa. Palmitoilación de los dos grupos hidroxilo de la resina Fmoc-Dhc-péptido:

Se disolvieron ácido palmítico (204 mg, 0,8 mmoles), DICl (154 μ l, 1 mmoles) y DMAP (9,76 mg, 0,08 mmoles) en 2 ml de DCM y 1 ml de DMF. Se suspendió la resina Fmoc-Dhc-péptido unida a resina (0,04 mmoles, 0,25 g) en esta disolución y se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Se eliminó la disolución mediante filtración y entonces se lavó la resina con DCM y DMF meticulosamente para eliminar cualquier residuo de urea. Se logró la eliminación del grupo Fmoc con DBU al 2,5% (2 x 5 min.).

IVb. Estearoilación de los dos grupos hidroxilo de la resina Fmoc-Dhc-péptido:

Se disolvieron ácido esteárico (aproximadamente 0,8 mmoles), DICl (154 μ l, 1 mmoles) y DMAP (9,76 mg, 0,08 mmoles) en 2 ml de DCM y 1 ml de DMF. Se suspendió la resina Fmoc-Dhc-péptido unida a resina (0,04 mmoles, 0,25 g) en esta disolución y se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Se eliminó la disolución mediante filtración y entonces se lavó la resina con DCM y DMF meticulosamente para eliminar cualquier residuo de urea. Se logró la eliminación del grupo Fmoc con DBU al 2,5% (2 x 5 min.).

IVc. Lauroilación de los dos grupos hidroxilo de la resina Fmoc-Dhc-péptido:

Se disolvieron ácido láurico (aproximadamente 0,8 mmoles), DICl (154 μ l, 1 mmoles) y DMAP (9,76 mg, 0,08 mmoles) en 2 ml de DCM y 1 ml de DMF. Se suspendió la resina Fmoc-Dhc-péptido unida a resina (0,04 mmoles, 0,25 g) en esta disolución y se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Se eliminó la disolución mediante filtración y entonces se lavó la resina con DCM y DMF meticulosamente para eliminar cualquier residuo de urea. Se logró la eliminación del grupo Fmoc con DBU al 2,5% (2 x 5 min.).

IVd. Octanoilación de los dos grupos hidroxilo de la resina Fmoc-Dhc-péptido:

Se disolvieron ácido octanoico (aproximadamente 0,8 mmoles), DICl (154 μ l, 1 mmoles) y DMAP (9,76 mg, 0,08 mmoles) en 2 ml de DCM y 1 ml de DMF. Se suspendió la resina Fmoc-Dhc-péptido unida a resina (0,04 mmoles, 0,25 g) en esta disolución y se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Se eliminó la disolución mediante filtración y entonces se lavó la resina con DCM y DMF meticulosamente para eliminar cualquier residuo de urea. Se logró la eliminación del grupo Fmoc con DBU al 2,5% (2 x 5 min.).

Síntesis de péptidos

El procedimiento general usado para la síntesis de péptidos se ha descrito por Jackson *et al.*, Vaccine 18, 355 (1999). Para permitir la unión lipídica entre el epítipo de células T CD4⁺ y el epítipo de células B, se insertó Fmoc-lisina(Mtt)-OH en un punto entre los dos epítipos en el centro aproximado del péptido unido a resina. Si tenía que añadirse lípido a otra posición dentro del péptido, tal como, por ejemplo, el residuo Lys-14 de SEQ ID NO: 24, entonces se insertó también Fmoc-lisina(Mtt)-OH en esa posición. Tras la finalización de la síntesis de péptidos, se eliminó el grupo Mtt mediante lavado en flujo continuo con TFA al 1% en diclorometano a lo largo de un periodo de

30-45 min. para exponer el grupo épsilon-amino del residuo de lisina. Se acoplaron dos residuos de serina a este grupo épsilon-amino en el caso en el que se usaran dos residuos de serina como espaciador. Alternativamente, se acoplaron dos residuos de arginina a este grupo épsilon-amino en el caso en el que se usaran dos residuos de arginina como espaciador. Alternativamente, se acopló ácido 6-aminohexanoico a este grupo épsilon-amino. El acoplamiento posterior del resto lipídico, tal como, por ejemplo, Pam₃Cys, Pam₂Cys, Ste₂Cys, Oct₂Cys o Lau₂Cys, se describió anteriormente.

Se escindieron todos los constructos de péptido unido a resina del soporte de fase sólida con reactivo B (88% de TFA, 5% de fenol, 2% de TIPS, 5% de agua) durante 2 h, y se purificaron mediante cromatografía en fase inversa tal como se describe por Zeng *et al.*, Vaccine 18, 1031 (2000).

Se llevó a cabo cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa analítica (RP-HPLC) usando una columna Vydac C4 (4,6 x 250 mm) instalada en un sistema de HPLC Waters y se desarrolló a una velocidad de flujo de 1 ml/min. usando TFA al 0,1% en H₂O y TFA al 0,1% en CH₃CN como disolvente límite. Todos los productos presentaban un único pico principal en la RP-HPLC analítica y tenían la masa esperada cuando se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en un instrumento BIFLEX de Bruker equipado con extracción iónica retardada. Se realizó la cuantificación final de los inmunógenos midiendo la absorción a 280 nm aprovechando la presencia de un residuo de triptófano y uno de tirosina en los constructos de péptido (coeficiente de extinción molar de $6,6 \times 10^3$).

Para investigar el efecto de la serina incorporando dos residuos entre los restos peptídico y lipídico de los péptidos que contienen Pam₃Cys y los péptidos que contienen Pam₂Cys, se añadieron secuencialmente dos residuos de serina al péptido antes de la unión covalente del resto lipídico (cuyas estructuras se muestran en la figura 1). Se presentan resúmenes de sus características, llevados a cabo mediante RP-HPLC analítica y espectrometría de masas, en las tablas 1 y 2.

Protocolos de inmunización

Se inocularon grupos de cinco ratones BALB/c hembra, de 6 a 8 semanas de edad, en el día 0 y de nuevo en el día 28. Alternativamente, se inmunizaron por vía intranasal ratones Quackenbush no consanguíneos hembra, de 4-6 semanas de edad, y se les proporcionó refuerzos como para la inmunización primaria a intervalos de 21 días. Para las inoculaciones subcutáneas (s.c.) (100 µl de volumen por dosis), se prepararon constructos de lipopéptido en solución salina y péptidos no lipidados formulados como una emulsión en un volumen igual de adyuvante completo de Freund (CFA) para la inyección primaria o adyuvante incompleto de Freund para la inoculación secundaria. Para las inoculaciones intranasales (i.n.), se aplicaron 50 µl de péptido en solución salina a los orificios nasales de ratones anestesiados con pentano para su inhalación. Se prepararon sueros a partir de sangre extraída 4 semanas tras la inoculación primaria y dos semanas tras la inoculación secundaria o, alternativamente, de sangrías de la cola siete días tras la inmunización final.

Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA)

Se llevaron a cabo ensayos ELISA en muestras de suero tal como se describe esencialmente por Ghosh *et al.*, Int Immun. 11, 1103, (1999), usando el antígeno inmunizante (por ejemplo, LHRH, J14 o pentagastrina) como antígeno de recubrimiento. Se expresaron los títulos de anticuerpo como la inversa de la dilución más alta del suero que lograba una DO de 0,2, que representa aproximadamente 5 veces la unión de fondo en ausencia de anticuerpo. Se determinó el isotipo de anticuerpos específicos para LHRH o J14 usando antisueros de conejo dirigidos contra IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 o IgA de ratón (ICN Pharmaceuticals Inc., Costa Mesa, CA) tal como se describió anteriormente por Ghosh *et al.*, Int Immun. 11, 1103, (1999).

Estudios de fertilidad

Tras haberles inoculado el inmunógeno peptídico y tras su exposición a ratones macho, se sometieron a prueba ratones hembra para determinar su capacidad para parir crías. Se usó como control un grupo de ratones hembra inmunizados con solución salina en CFA. Se introdujo un ratón macho en una jaula en la que había dos o tres ratones hembra y se rotaron ratones macho entre cada jaula para exponer cada grupo de ratones hembra a cada macho. Se mantuvieron juntos machos y hembras durante un total de 2 semanas, tiempo al final del cual se retiraron los machos y se mantuvieron las hembras en observación.

50

Tabla 1

Elución de HPLC y características de masa de vacunas de péptido basadas en el epítipo de células T cooperadoras de hemaglutinina del virus <i>Influenza</i> (SEQ ID NO: 1) y el epítipo de células B LHRH (SEQ ID NO: 2).			
¹ Constructo de péptido	¹ Tiempo de retención (min.)	Masa esperada (Da)	² Masa determinada experimentalmente (Da)
[Th]-[B]	26,3	2957,1	2957,3
[Th]-Lys-[B]	26,0	3085,5	3084,7
Pam ₃ Cys-Ser-Ser-[Th]-[B]	51,5	4022,4	4020,8
Pa _{M2} Cys-Ser-Ser-[Th]-[B]	41,8	3785,1	3785,5
Pam ₂ Cys-[Th]-[B]	40,7	3609,3	3605,7
[Th]-Lys(Pam ₃ Cys)-[B]	50,4	3977,4	3969,5
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys)-[B]	40,7	3739,5	3739,6
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys-Ser-Ser)-[B]	40,3	3913,5	3912,1

¹Cromatografía en fase inversa llevada a cabo en una columna Vydac C4 (4,6 x 250 mm) instalada en un sistema de HPLC Waters y desarrollada a 1 ml/min. usando TFA al 0,1% en H₂O y TFA al 0,1% en CH₃CN como disolvente límite.

²Espectrometría de masas llevada a cabo usando un instrumento de MALDI-TOF Biflex de Bruker equipado con extracción iónica retardada. Se llevó a cabo el análisis en modo lineal.

Tabla 2

Elución de HPLC y características de masa de vacunas de péptido basadas en el epítipo de células T cooperadoras de P25 de CDV-F (SEQ ID NO: 24) y el epítipo de células B de pentagastrina (SEQ ID NO: 102).			
¹ Constructo de péptido	¹ Tiempo de retención (min.)	Masa esperada (Da)	² Masa determinada experimentalmente (Da)
[Th]-Lys-[B]	31,4	2621,5	2620,7
Pam ₂ Cys-Ser-Ser-[Th]-[B]	54,9	3449,7	3450,3
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys-Ser-Ser)-[B]	53,9	3505,7	3506,7

¹Cromatografía en fase inversa llevada a cabo en una columna Vydac C4 (4,6 x 250 mm) instalada en un sistema de HPLC Waters y desarrollada a 1 ml/min. usando TFA al 0,1% en H₂O y TFA al 0,1% en CH₃CN como disolvente límite.

²Espectrometría de masas llevada a cabo usando un espectrómetro de masas de trampa iónica 110 LC/MSD de Agilent.

5 Cultivo de células dendríticas

Se cultivaron células dendríticas (DC) en medio basado en IDDM completo. Consistía en medio de Dulbecco

modificado por Iscove (IMDM) que contenía HEPES 25 mM y sin alfa-tioglicerol o L-glutamina (JRH Bioscience, Lenexa, EE.UU.), complementado con un 10% (v/v) de suero de ternero fetal inactivado con calor (56°C, 30 min.) (CSL Ltd., Parkville, Victoria, Australia), gentamicina (24 µg/ml), glutamina (2 mM), piruvato de sodio (2 mM), penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (180 µg/ml) y 2-mercaptoetanol (0,1 mM). Para la generación de DC, se complementó adicionalmente el IMDM completo con un 30% de sobrenadante de células NIH/3T3 cultivadas y un 5% de GM-CSF en forma de un sobrenadante de células Ag8653 transfectadas con el gen de GM-CSF (medio de DC).

El método de cultivo para células dendríticas inmaduras se adaptó de Winzler *et al.*, J. Exp Med. 185, 317 (1997). Se sembraron células de bazo de un ratón BALB/c a $1,5 \times 10^6$ células por placa de 55 mm (Techno-Plas, S.A., Australia) en 3 ml de medio de DC y se incubaron a 37°C con un 5% de CO₂. Todo el equipo usado para el cultivo estaba libre de pirógenos. Se cambió el medio cada 4 días y se devolvieron todas las células a la placa. El día 12, se recogieron tanto las células suspendidas como las débilmente adherentes mediante pipeteo forzado y luego aspirando el medio. Se repitió el procedimiento con 2 ml de PBS. Se desecharon las células que permanecían fuertemente adheridas. Se sedimentaron las células recogidas mediante centrifugación y volvieron a sembrarse en una nueva placa. Se mantuvieron posteriormente las células en un ciclo alterno de cambio de medio y pase de 4 días. Tras 1 mes de cultivo continuo, las células en flotación y semiadherentes tomaron el aspecto y las características de tinción de DC inmaduras y se denominan células D1. En estas condiciones de pase, la mayoría de las células D1 cultivadas mantienen un fenotipo inmaduro caracterizado por un nivel de expresión intermedio de moléculas del MHC de clase II de la superficie celular.

20 *Análisis citométrico de flujo de células D1*

Se sembraron células D1 (1×10^5 células por muestra) en una placa de Petri nueva con 1 ml de medio DC y se incubaron con 0,0045 nmoles de lipopéptido, disuelto en medio IMDM completo. Se usó lipopolisacárido purificado de *E. coli* serotipo 0111:B4 (Difco, Detroit, Michigan, EE.UU., un amable presente del Dr. E. Margot Anders, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad de Melbourne) a 5 mg/ml como control positivo durante la maduración de DC. Tras la incubación durante la noche, se recogieron las células y se lavaron una vez con PBS con un 1% de FCS. Para prevenir la unión no específica a FCγRII/III, se preincubaron las células con 20 µl de suero de ratón normal durante 5 min. a temperatura ambiente. Se expusieron entonces las células a anticuerpo monoclonal conjugado con FITC 14-4-4S (IgG_{2a}, anti-I-E^{k,d}, Ozato *et al.*, J. Immunol., 124, 533, 1980) durante 30 min. en hielo. Se usó anticuerpo monoclonal 36/1 (Brown *et al.*, Arch Virol 114, 1 1990), que es específico para la hemaglutinina del virus *Influenza*, como control de isotipo. Se usaron todos los anticuerpos a 2,5 mg/ml. Se lavaron las muestras una vez con PBS que contenía un 1% de FCS y se fijaron con PBS que contenía un 4% de paraformaldehído en hielo durante 15 minutos. Se realizó el análisis de citometría de flujo usando un instrumento FACSort (Becton Dickinson, San Jose, EE.UU.) y se analizaron los datos usando el software FlowJo (Tree Star, Inc., San Carlos, CA, EE.UU.)

35 **EJEMPLO 2**

Estudios en lipopéptidos que comprenden epítomos de células B LHRH

Propiedades de solubilidad de lipopéptidos que comprenden LHRH

La inspección visual de las diferentes preparaciones de lipopéptidos que comprenden LHRH mostró que diferían notablemente en sus solubilidades (figura 2). Un aumento de solubilidad era lo más evidente en aquellos casos en los que el lípido se unía entre los dos epítomos en el centro aproximado de la molécula. Los lipopéptidos designados [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B] y [Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B] eran solubles en solución salina a concentraciones de al menos 8 mg/ml (no se examinaron concentraciones superiores), mientras que constructos en los que el lípido se unía al extremo N-terminal de la secuencia formaban disoluciones opalescentes a concentraciones de tan sólo 0,25 mg/ml.

Los esfuerzos por mejorar adicionalmente la solubilidad de péptidos con lípido unido al extremo N-terminal mediante la incorporación de dos residuos de serina hidrófilos entre los restos lipídico y peptídico (es decir, Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] y Pam₃Cys-Ser-Ser-[Th]-[B]), demostraron ser insatisfactorios. De hecho, el lipopéptido Pam₃Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] era tan insoluble que no pudo purificarse mediante RP-HPLC en las condiciones usadas para los otros lipopéptidos. Se consideró que la naturaleza insoluble de este constructo impediría considerarlo como una proposición viable para su fabricación como vacuna.

50 *Inmunogenicidad de lipopéptidos que comprenden epítomos de células B LHRH*

Los tres lipopéptidos designados Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B], [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B] y [Th]-Lys (Pam₃Cys)-[B], cuando se administran s.c. en solución salina, indujeron altos niveles de anticuerpo anti-LHRH. De hecho, los títulos de anticuerpo inducidos tras dos dosis de estos lipopéptidos eran similares a los obtenidos con [Th]-[B] o [Th]-Lys-[B] cuando se administra en CFA (figura 3). Los títulos de anticuerpo anti-LHRH en sueros de ratones que habían

recibido Pam₃Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] o Pam₂Cys-[Th]-[B] eran ligeramente inferiores. Los dos lipopéptidos solubles [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B], [Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B] indujeron niveles de 10 a 100 veces superiores de anticuerpo anti-LHRH tras la inoculación primaria que los otros constructos de lipopéptido menos solubles. Dos grupos de cinco ratones que recibieron [Th]-[B] mezclado con Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ en la razón de 1:1 o 1:5 no provocaron niveles significativos de anticuerpo anti-LHRH, un hallazgo que contrasta con otros resultados notificados usando Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ como adyuvante (Jung, G., y W. G. Bessler. (1995) En: "Immunological recognition of peptides in medicine and biology", N. D. Zegers, W. J. A. Boersma, y E. Claassen, eds.. CRC Press, Boca, Nueva York, Londres, Tokio, p. 159).

Los resultados del estudio de fertilidad llevado a cabo dos semanas tras la segunda inoculación con los diversos lipopéptidos se muestran en la tabla 3.

Ninguno de los ratones que recibió o bien los dos constructos de lipopéptido solubles, [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B] o [Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B], administrados en solución salina, o bien los dos constructos no lipidados [Th]-[B] o [Th]-Lys-[B] administrados en CFA, quedó preñado. Un ratón del grupo que recibió Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B], y dos animales de los grupos que recibieron Pam₃Cys-Ser Ser-[Th]-[B] o Pam₂Cys-[Th]-[B] parieron crías. Todos los miembros de grupos control de ratones que recibieron solución salina en CFA o el péptido [Th]-[B] comezclado con Pam₃Cys-S-(Lys)₄ parieron crías.

Se siguieron los niveles de anticuerpo hasta 7 meses tras la segunda dosis de vacuna de péptido. Los títulos de anticuerpo anti-LHRH presentes en ratones sensibilizados con lipopéptido y en ratones sensibilizados con péptido no lipidado administrado en CFA disminuyen entre 4 y 20 veces durante un periodo de 26 semanas. Tres meses tras la inoculación secundaria, un estudio de fertilidad llevado a cabo en todos los ratones produjo resultados similares al ensayo posinmunización de 2 semanas. Los ratones que habían recibido los lipopéptidos solubles, [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B] o [Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B], en solución salina o el [Th]-[B] y [Th]-Lys-[B] no lipidados en CFA eran todavía estériles.

Tabla 3 Títulos de anticuerpo anti-LHRH e incidencia de preñez tras inoculación con constructos de péptido

¹ Inóculo	² Títulos anti-LHRH medios (log10) semanas tras la segunda dosis					incidencia de preñez	
	2 semanas	7 semanas	10 semanas	20 semanas	28 semanas	2 semanas tras la 2 ^a dosis	13 semanas tras la 2 ^a dosis
Pam ₂ Cys-[Th]-[B]	4,24±0,60	3,38±0,18	3,34±0,97	3,18±0,63	3,16±0,53	2/5	3/5
Pam ₃ Cys-Ser-Ser-[Th]-[B]	3,36±0,23	3,12±0,16	3,04±0,24	2,78±0,19	2,75±0,23	2/5	0/5
Pam ₂ Cys-Ser-Ser-[Th]-[B]	4,78±0,18	3,96±0,10	3,80±0,16	3,52±0,25	3,48±0,25	1/5	2/5
[Th]-Lys (Pam ₃ Cys)-[B]	4,48±0,62	4,18±0,43	4,06±0,38	3,86±0,54	3,75±0,48	0/5	0/5
[Th]-Lys (Pam ₂ Cys)-[B]	4,68±0,40	3,96±0,34	3,94±0,38	3,78±0,21	3,70±0,29	0/5	0/5
[Th]-[B]	4,92±0,32	4,32±0,32	4,28±0,32	4,06±0,36	3,98±0,35	0/5	0/5
[Th]-Lys-[B]	4,70±0,18	4,36±0,15	4,24±0,16	4,12±0,20	3,82±0,08	0/5	0/5
[Th]-[B] + Pam ₃ Cys-Ser-Lys ₄ (mezcla 1:5)	<2	ND	ND	ND	ND	5/5	ND
Solución salina	<2	ND	ND	ND	ND	5/5	3/5

(continuación)

¹ Inóculo	² Títulos anti-LHRH medios (log10) semanas tras la segunda dosis					incidencia de preñez	
	2 semanas	7 semanas	10 semanas	20 semanas	28 semanas	2 semanas tras la 2 ^a dosis	13 semanas tras la 2 ^a dosis
<p>¹ Se administraron [Th]-[B], [Th]-Lys-[B] y solución salina cada uno en CFA, todos los otros constructos de péptido se administraron en solución salina. La dosis de cada uno fue de 20 nmoles administrados por vía subcutánea.</p> <p>² Los títulos representan las medias geométricas de grupos de cinco ratones BALB/c hembra.</p>							

Pam₂Cys es un adyuvante más potente que Pam₃Cys

5 Los resultados presentados en la figura 3 y la tabla 2 indican que los dos lipopéptidos ramificados [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B] y [Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B] eran no sólo más solubles sino que también provocaban títulos de anticuerpo superiores, particularmente en la respuesta de anticuerpos primaria, que los inmunógenos Pam₂Cys-[Th]-[B], Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] y Pam₃Cys-Ser-Ser-[Th]-[B].

10 Para examinar esto adicionalmente, se investigó el efecto de disminuir la dosis en la inmunogenicidad de [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B] y [Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B]. A dosis de 10 nmoles y 1 nmol, [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B] indujo títulos de anticuerpo superiores que [Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B] (tabla 4). Se observó una diferencia más llamativa en el ensayo de apareamiento; 1 de 5 y 0 de 5 ratones que recibieron 10 y 1 nmol de [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B], respectivamente, parieron crías mientras que 3 de 5 y 5 de 5 ratones que recibieron [Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B] a estas dosis parieron crías (tabla 4). Estos resultados indican que los péptidos que contienen Pam₂Cys son mejores inmunógenos que los péptidos que contienen Pam₃Cys.

15 El efecto de incluir dos residuos de serina adicionales en los inmunógenos que contienen Pam₂Cys tuvo poco o ningún efecto sobre el estado de fertilidad de los animales aunque hubo una mejora en los títulos de anticuerpo que se generaron tras la segunda dosis (tabla 4).

Tabla 4

Títulos de anticuerpo anti-LHRH y estado de fertilidad de ratones inoculados con diferentes dosis de vacunas de péptido.		
¹ Inóculo	Título de anticuerpo anti-LHRH medio (log10) 2 semanas tras la segunda dosis	² Estado de preñez (n.º de animales por grupo que parieron crías)
[Th]-Lys(Pam ₃ Cys)-[B] 10 nmoles	3,76±0,36	3/5
[Th]-Lys(Pam ₃ Cys)-[B] 1 nmoles	3,22±0,51	5/5
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys)-[B] 10 nmoles	4,22±0,33	1/5

(continuación)

Títulos de anticuerpo anti-LHRH y estado de fertilidad de ratones inoculados con diferentes dosis de vacunas de péptido.		
¹ Inóculo	Título de anticuerpo anti-LHRH medio (log10) 2 semanas tras la segunda dosis	² Estado de preñez (n.º de animales por grupo que parieron crías)
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys)-[B] 1 nmoles	3,61±1,18	0/5
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys-Ser-Ser)-[B] 10 nmoles	4,64±0,23	0/5
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys-Ser-Ser)-[B] 1 nmoles	3,92±0,65	1/5
[Th]-[B] en CFA 10 nmoles	4,72±0,21	1/5
[Th]-[B] en CFA 1 nmoles	3,56±0,22	3/5
Solución salina en CFA	<2	5/5
¹ Se administraron los lipopéptidos en solución salina y se inocularon el péptido no lipidado [Th]-[B] y los controles de solución salina en CFA para la inoculación primaria y adyuvante incompleto de Freund para la inoculación secundaria. Se administraron todas las vacunas por la vía subcutánea. ² Se iniciaron los experimentos de fertilidad dos semanas tras la segunda dosis de vacuna.		

Respuestas de anticuerpos sistémicas tras inmunización intranasal (i.n.)

- 5 Se inocularon [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] y Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] en solución salina por la vía intranasal. Se incluyeron también las mismas vacunas por la vía subcutánea y se midieron las respuestas de anticuerpos anti-LHRH sistémicas. La disolución usada para la inoculación de [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] era transparente y la de para Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] era opalescente, los que indica diferencia de solubilidad entre las dos preparaciones.
- 10 Tras dos inoculaciones intranasales, cada una de las vacunas indujo títulos similares de anticuerpos anti-LHRH séricos que eran ligeramente inferiores a los inducidos tras la inoculación subcutánea (tabla 5). El [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] más soluble indujo niveles significativamente superiores de anticuerpo anti-LHRH 4 semanas tras una única dosis que el Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] menos soluble (p = 0,00007); de hecho, esto era similar al resultado obtenido tras la inoculación subcutánea. El ensayo de fertilidad mostró que dos inoculaciones intranasales de [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] impidieron que todos los ratones quedaran preñados en contraposición a los
- 15 animales que recibieron Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] por vía intranasal en los que 3 de 5 ratones quedaron preñados.
- Se muestra también en la tabla 5 una comparación de la longevidad de las respuestas inducidas mediante los dos constructos cuando se administraron por las dos diferentes vías. Veintiséis semanas tras la segunda dosis de vacuna, los niveles de anticuerpo en todos los ratones habían descendido por debajo de los observados 2 semanas tras recibir la segunda dosis. La disminución de anticuerpo anti-LHRH en el grupo que recibió [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] por vía subcutánea, sin embargo, era mucho menos evidente, lo que indica de nuevo la superioridad de
- 20 una configuración en este contexto en la que Pam₂Cys-Ser-Ser se une en el centro aproximado de la molécula.

ES 2 369 664 T3

Tabla 5 Títulos de anticuerpo anti-LHRH y estado de fertilidad de ratones inoculados por vía intranasal o por vía subcutánea con diversos constructos de péptido y lipopéptido

¹ Inóculo	Media geométrica de títulos de anticuerpo anti-LHRH (log10)				² Preñez N.º de animales por grupo que parieron crías
	4 semanas tras la 1ª dosis	2 semanas tras la 2ª dosis	10 semanas tras la 2ª dosis	26 semanas tras la 2ª dosis	
Pam ₂ Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] (subcutáneo)	2,40±0,5	4,60±0,35	3,80±0,40	3,30±0,39	0/5
Pam ₂ Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] (intranasal)	1,88±0,42	4,28±0,75	3,18±0,45	2,90±0,23	3/5
[Th]-Lys (Pam ₂ Cys-Ser-Ser)-[B] (subcutáneo)	3,46±0,35	4,62±0,35	4,18±0,32	4,02±0,44	0/5
[Th]-Lys (Pam ₂ Cys-Ser-Ser)-[B] (intranasal)	3,52±0,25	4,22±0,19	3,46±0,35	3,02±0,18	0/5
[Th]-[B] en CFA (subcutáneo)	4,12±0,41	4,70±0,36	3,88±0,30	3,62±0,37	0/5
Solución salina en CFA (subcutáneo)	1,0	ND	ND	ND	5/5

(continuación)

¹Se inocularon las vacunas de lipopéptido en solución salina, y se inocularon el [Th]-[B] no lipidados y los controles de solución salina en CFA para la inoculación primaria y adyuvante incompleto de Freund para la inoculación secundaria.

²Se iniciaron los experimentos de fertilidad dos semanas tras la segunda dosis de vacuna.

5 Se determinaron también los títulos de isotipos de anticuerpos individuales que estaban dirigidos hacia LHRH y se obtuvieron de animales tras dos dosis subcutáneas o intranasales del lipopéptido soluble [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] (figura 4). La inoculación intranasal parecía inducir niveles superiores de IgG3, IgG2b y posiblemente IgM que la inoculación subcutánea aún cuando la cantidad de Ig total inducida mediante inoculación intranasal era menor.

10 *La exposición de DC a péptidos y lipopéptidos induce diferentes niveles de moléculas del MHC de clase II de la superficie celular*

15 La sensibilización de células T CD4⁺ sin tratamiento previo en órganos linfoides secundarios mediante células dendríticas está precedida por la maduración de DC tras la exposición a antígeno. Esta maduración se caracteriza por regulación por incremento de productos del MHC y moléculas coestimuladoras en la superficie de DC. Por tanto, se determinó si los diversos péptidos y lipopéptidos podían activar de manera diferencial células dendríticas en un intento de explicar las propiedades inmunogénicas diferentes de estos candidatos a vacuna.

20 Los resultados de experimentos en los que una línea de células DC, D1 inmaduras se expusieron a péptidos, se tiñeron para detectar la expresión superficial de moléculas del MHC de clase II y se analizaron entonces mediante citometría de flujo, demostraron que [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] era el más eficaz y Pam₂Cys-[Th]-[B] era el menos eficaz para provocar la maduración de DC (figura 5). La capacidad de [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] para regular por incremento la expresión de clase II se aproximaba a la del lipopolisacárido bacteriano (LPS) y Pam₂Cys-Ser-Ser[Th]-[B] y [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B] presentaban niveles intermedios de activación. El péptido no lipidado no pudo inducir la maduración de células D1 mayor del 26% que se produce espontáneamente en cultivo. La capacidad de los lipopéptidos para inducir la maduración de células D1 era dependiente de la concentración (datos no mostrados). Las capacidades relativas de estos lipopéptidos para inducir la maduración de células D1 reflejaban directamente su capacidad para inducir anticuerpos, proporcionando un posible mecanismo para producir diferencias en inmunogenicidad.

Respuestas de anticuerpos al pentapéptido C-terminal de LHRH

30 Tal como se muestra en la figura 6, se provocan respuestas de anticuerpos aproximadamente equivalentes mediante [Th]-Lys (Pam₂Cys)-[B] lipidado en el que [Th] consiste en el epitopo de células T CD4⁺ de la cadena ligera de hemaglutinina de *Influenza* (SEQ ID NO: 1) y [B] es LHRH 1-10 (SEQ ID NO: 2) o LHRH 6-10 (es decir, los últimos 5 residuos C-terminales de LHRH; SEQ ID NO: 4), con o sin un espaciador de serina (Ser-Ser) situado entre los restos lipídico y peptídico. Estos datos apoyan la proposición de que la utilidad de los lipopéptidos no se limita a ninguna secuencia de aminoácidos específica que se use como antígeno inmunizante.

Lípidos distintos de Pam₂Cys son útiles en los constructos de lipopéptido

35 Se inocularon por vía subcutánea grupos de ratones BALB/c (6-8 semanas de edad) con 20 nmoles de los inmunógenos peptídicos mostrados en la figura 7, que comprenden los restos lipídicos Pam₂Cys; Ste₂Cys; Lau₂Cys; o Oct₂Cys conjugados con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 9 (es decir, un péptido que comprende el epitopo CDV-F de células T cooperadoras de SEQ ID NO: 24 conjugado con LHRH 2-10 tal como se indica en SEQ ID NO: 3, con un residuo de lisina interna situado entre estos epitopos), para las vacunaciones tanto primaria como secundaria. Las estructuras de los péptidos se muestran en la figura 7. Todos los lipopéptidos se administraron en solución salina. Se administraron los péptidos no lipidados en CFA como control. Se obtuvieron los sueros de la sangre extraída a las 4 semanas tras la vacunación primaria y 2 semanas tras la vacunación secundaria.

45 Los datos mostrados en la figura 8 indican que puede obtenerse fuertes respuestas de anticuerpos primarias y secundarias cuando el resto Pam₂Cys se sustituye por otro resto lipídico en los constructos de lipopéptido.

Pueden usarse diferentes espaciadores para separar el lípido del péptido en los lipopéptidos

Se inocularon por vía subcutánea grupos de ratones BALB/c (6-8 semanas de edad) con 20 nmoles de los

5 inmunógenos peptídicos mostrados en la figura 7, que comprenden el resto lipídico Pam₂Cys conjugado con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 9 y separados de la misma usando un espaciador que consiste en un homodímero de serina, homodímero de arginina o ácido 6-aminohexanoico. Se muestran las estructuras de los péptidos en la figura 7. Todos los lipopéptidos se administraron en solución salina. Se administraron los péptidos no lipidados en CFA como control. Se obtuvieron los sueros de la sangre extraída a las 4 semanas tras la vacunación primaria y 2 semanas tras la vacunación secundaria.

Los datos mostrados en la figura 9 indican que pueden obtenerse fuertes respuestas de anticuerpos primarias y secundarias cuando el resto Pam₂Cys está separado del resto peptídico en los constructos de lipopéptido usando una variedad de diferentes espaciadores.

10 *El resto lipídico puede unirse a un residuo de lisina interna dentro del epítipo de células T cooperadoras*

15 Para determinar la rigurosidad de un requisito para colocar el residuo de lisina interna al que está unido el resto lipídico, se estudió también la inmunogenicidad de un constructo de lipopéptido en el que el lípido estaba unido a un residuo de lisina interna dentro del epítipo de células T cooperadoras. Se inocularon por vía subcutánea grupos de ratones BALB/c (0 semanas y 4 semanas de edad) con 20 nmoles de los inmunógenos peptídicos que comprenden el resto lipídico Pam₂Cys conjugado con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 9 entre el epítipo de células T cooperadoras y el epítipo de células B o, alternativamente, conjugado con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 103 en la posición Lys-14 dentro del epítipo de células T cooperadoras. Se muestran las estructuras de los péptidos en las figuras 7 y 10. Todos los lipopéptidos se administraron en solución salina. Se administró el péptido no lipidado en CFA como control. Se obtuvieron los sueros de la sangre extraída a las 4 semanas tras la vacunación primaria y 2 semanas tras la vacunación secundaria.

Los datos mostrados en la figura 11 indican que pueden obtenerse fuertes respuestas de anticuerpos usando lipopéptidos en el que el resto lipídico se une en cualquier posición, lo que sugiere que la colocación estricta de la lisina interna y, como consecuencia, el resto lipídico, no es esencial para la inmunogenicidad.

Discusión

25 En este estudio se describe el ensamblaje de una variedad de inmunógenos de lipopéptido compuestos por un epítipo de células T CD4⁺, el propio péptido LHRH que incluye uno o más epítopos de células B y Pam₃Cys o Pam₂Cys.

30 Sin poner ningún requisito estricto sobre la necesidad de la colocación aproximadamente central del lípido, se encontró que la solubilidad de la vacuna resultante se mejoraba enormemente colocando los lípidos en el centro aproximado del inmunógeno peptídico entre el epítipo de células T y LHRH en lugar de en la posición más habitual en el extremo N-terminal. Podía obtenerse fácilmente una disolución transparente en solución salina a la concentración requerida para la inoculación con estas estructuras ramificadas. En cambio, los inmunógenos en los que el lípido estaba acoplado en el extremo N-terminal eran menos solubles, dando una disolución turbia u opalescente en solución salina. La investigación de las respuestas de anticuerpos y los ensayos de fertilidad posteriores indicaron que los lipopéptidos solubles en agua inducían títulos de anticuerpo superiores 4 semanas tras la inoculación primaria y eran también más eficaces en la prevención de la preñez que los lipopéptidos menos solubles en los que el lípido se unía al extremo N-terminal. Una vacuna autoadyuvante soluble en agua tiene ventajas claras con respecto al material parcialmente soluble o insoluble al permitir la simplificación del proceso de fabricación y también una dosificación más precisa de la dosis.

40 Las investigaciones de la rigurosidad del requisito de colocación del resto lipídico indicaron que es posible algo de flexibilidad, puesto que se observaban también respuestas de anticuerpos en animales inmunizados cuando el lípido estaba colocado dentro del epítipo de células T cooperadoras, en vez de entre el epítipo de células T cooperadoras y el epítipo de células B.

45 Las investigaciones de los efectos de la variación de la dosis de lipopéptido indicaron que lipopéptidos que contienen Pam₂Cys son mejores inmunógenos que péptidos que contienen Pam₃Cys. Sin embargo, otros lipopéptidos eran también útiles en la generación de fuertes respuestas de anticuerpos, tales como, por ejemplo, lipopéptidos que contienen Ste₂Cys, lipopéptidos que contienen Lau₂Cys y lipopéptidos que contienen Oct₂Cys.

50 Se encontró en el presente estudio que la inserción de dos residuos de serina o dos residuos de arginina entre el resto lipídico y la secuencia peptídica aumentaba la potencia de los inmunógenos que contienen Pam₂Cys resultantes. Cuando se une lípido al extremo N-terminal, los dos residuos de serina podrían o bien actuar como un espaciador inerte entre el lípido y la secuencia peptídica o bien como una extensión del epítipo de células T cooperadoras y quizá modular la actividad inmunológica. En aquellos casos en los que el lípido se acopla al grupo épsilon-amino de un residuo de lisina en el centro de la molécula, los dos residuos de serina o los dos residuos de arginina actúan como un espaciador, porque el espaciador inerte, ácido 6-aminohexanoico logró resultados

similares.

Se encontró también que la inmunogenicidad de constructos de lipopéptido no dependía de la secuencia de aminoácidos específica del epítipo de células T cooperadoras o el epítipo de células B usado, lo que indica la utilidad general del enfoque adoptado para producir una amplia gama de lipopéptidos contra diferentes epítopos de células B antigénicos y en varios huéspedes animales diferentes.

Se entiende que los macrófagos se estimulan mediante productos microbianos que se unen a receptores de la superficie celular; la señal resultante de este acontecimiento de unión se transmite a través de receptores tipo Toll y da como resultado la producción de quimiocinas y citocinas proinflamatorias. Estos receptores están también presentes en poblaciones de DC y, cuando se acoplan, transmiten señales para la migración y maduración celular así como para la producción de moléculas requeridas para lograr una presentación de antígenos eficaz.

Se encontró que las diversas vacunas de lipopéptido sintéticas usadas en este estudio inducían la regulación por incremento de moléculas del MHC de clase II, un marcador usado para evaluar la maduración de DC, en la superficie de DC inmaduras. En cambio, el constructo de péptido no lipidado no podía provocar la maduración de DC, lo que indica que el resto lipídico es responsable del efecto. La jerarquía de la maduración inducida por lipopéptido de DC refleja la jerarquía de la inmunogenicidad presentada por los constructos de lipopéptido e implica que la capacidad de la vacuna para interactuar con e inducir la maduración de DC conduce a una mejor respuesta inmunitaria, posiblemente aumentando la eficacia de la sensibilización de células T CD4⁺ mediante DC que han experimentado señalización para madurar y migrar al ganglio linfático drenante.

Los lipopéptidos pueden desencadenar una respuesta inmunitaria en ausencia de adyuvante adicional y por tanto pueden administrarse por vías no parenterales. Por tanto, se investigó respuesta de anticuerpos tras la inoculación intranasal de péptidos que contienen Pam₂Cys. Los resultados obtenidos en este caso mostraron que la inoculación intranasal de [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] o Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] indujo títulos inferiores de anticuerpo anti-LHRH sistémico que los inducidos mediante la inoculación por la vía subcutánea y también que los perfiles de isotipos de las inmunoglobulinas eran diferentes. La inoculación intranasal del lipopéptido soluble [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] indujo niveles superiores IgG2b y IgG3, pero niveles inferiores de IgG1 y IgG2a en comparación con la inmunización subcutánea. Esto puede indicar que las dos vías de inmunización dan como resultado la inducción de subconjuntos algo diferentes de células T proporcionando ayuda para la producción de anticuerpos que puede, en parte, deberse a las diferentes poblaciones de DC encontradas en sitios diferentes. Esto puede reflejar también la preferencia que tienen las células dendríticas por moléculas con geometrías inusuales.

La inoculación intranasal del constructo de péptido soluble en agua [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] indujo títulos de anticuerpo anti-LHRH significativamente superiores 4 semanas tras la primera dosis de vacuna que el Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] insoluble. Los ensayos de fertilidad llevados a cabo con estos ratones demostraron que sólo la inoculación intranasal con [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] pudo impedir totalmente la reproducción. Aunque eran evidentes títulos de anticuerpo similares en ambos grupos de ratones tras la segunda dosis de antígeno, sólo se provocaban altos títulos de anticuerpo durante la respuesta primaria a [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B]. Por tanto, es posible que para que una vacuna anticonceptiva sea eficaz, el tiempo durante el cual están presentes altos títulos de anticuerpo sea un determinante importante de la eficacia.

Conjuntamente, las mediciones de los títulos de anticuerpo y los resultados de los ensayos de fertilidad demuestran que la colocación de Pam₂Cys entre el epítipo de células B y el epítipo de células T cooperadoras, en el centro aproximado de una vacuna de péptido totalmente sintética aumenta la solubilidad y también la inmunogenicidad de la vacuna. Esta inmunogenicidad mejorada se aumenta adicionalmente mediante la introducción de dos residuos de serina entre el lípido y la secuencia peptídica de estas vacunas de péptido ramificado. El hallazgo de que la incorporación de restos lipídicos, autoadyuvantes en diferentes posiciones de vacunas a base de péptidos altera profundamente las propiedades físicas, inmunogénicas y biológicas proporciona otra estrategia para lograr un diseño de vacunas satisfactorio.

EJEMPLO 3

Estudios en lipopéptidos que comprenden un epítipo de células B de la proteína M de un *Streptococcus* del grupo A

El efecto de múltiples lípidos

Para someter a prueba si la inmunogenicidad de los lipopéptidos dependía del número de lípidos conjugados a los péptidos, y para demostrar que podían formarse lipopéptidos eficaces frente a diferentes péptidos que contienen epítopos de células B antigénicos, se produjeron lipopéptidos que comprendían un resto peptídico que comprende el epítipo de células T cooperadoras de P25 de CDV-F y un epítipo J14 de células B de un *Streptococcus* del grupo A (es decir, el resto peptídico tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105), y uno o dos restos lipídicos. Se añadió el resto de lipoaminoácido Pam₂Cys-Ser-Ser a una lisina interna situada entre el epítipo de células T

cooperadoras y el epítipo de células B y, en un constructo, se añadió también un resto adicional de lipoaminoácido Pam₂Cys-Ser-Ser a una lisina N-terminal en el epítipo de células T cooperadoras.

5 Se inocularon por vía intranasal ratones Quackenbush consanguíneos hembra de 4-6 semanas de edad (15/grupo) con 60 mg de vacuna a base de péptidos en un volumen total de 30 ml de PBS. Los ratones recibieron tres dosis de vacuna a intervalos de 21 días. Se determinó la IgA fecal 6 días tras la última dosis de antígeno. Siete días tras la
 10 dosis final, se extrajo sangre de la vena de la cola de los ratones y se determinó la IgG sérica específica de J14. Se realizaron también ensayos bactericidas indirectos para determinar la capacidad de los sueros de ratones inmunizados para opsonizar o “destruir” la cepa M1 de GAS *in vitro*. Ocho días tras la dosis final, se recogió saliva de ratones individuales y se determinaron los títulos de anticuerpo IgA salival específico de J14 mediante ELISA convencional. Dos semanas tras la última dosis antígeno, se expusieron los ratones por vía intranasal a la cepa M1 de GAS y se determinó la supervivencia a diversos puntos de tiempo después.

15 Los datos en la figura 12 indican que se provocaron títulos de IgG sérica significativos ($P < 0,05$) usando cualquier lipopéptido en comparación con péptidos no lipidados o PBS, lo que indica que los constructos de lipopéptido no dependen de la selección de epítipo de células B o células T cooperadoras, y que pueden usarse lipopéptidos que comprenden restos lipídicos múltiples o individuales para provocar niveles de IgG sérica elevados tras la inmunización intranasal.

20 Los datos presentados en la figura 13 también indican que sueros recogidos de ratones inmunizados con lipopéptidos que contienen J14 que tienen uno o dos restos lipídicos también podrían destruir significativamente ($P < 0,05$) GAS en comparación con sueros recogidos de animales inmunizados con péptidos no lipidados de control o PBS.

Los datos presentados en la figura 14 indican que ratones inoculados con lipopéptidos que contienen J14 que tienen uno o dos restos lipídicos tenían títulos de IgA salival significativamente superiores ($P < 0,05$) que los grupos de control que se inmunizaron con péptidos no lipidados de control o PBS. Sin embargo, el péptido monolipidado era muy superior que el péptido bilipidado en la inducción de niveles de IgA salival mediante administración intranasal.

25 De manera interesante, sólo los ratones inoculados con péptido que contiene J14 monolipidado, en el que el resto lipídico estaba situado entre el epítipo de células T cooperadoras y el epítipo de células B (es decir, [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[J14]) tenían títulos de IgA fecal significativos ($P < 0,05$) a los 6 días tras la inmunización final, en comparación con PBS o péptido no lipidado (figura 15). Esto puede ser una consecuencia del momento, puesto que se determinó la IgA fecal antes de determinar los niveles de IgG sérica o IgA salival. Alternativamente, puede ser una consecuencia de la vía de administración intranasal. No pueden excluirse otras explicaciones en la actualidad.
 30

35 Tal como se muestra en la figura 16, los ratones inoculados con péptido que contiene J14 monolipidado, en el que el resto lipídico estaba situado entre el epítipo de células T cooperadoras y el epítipo de células B (es decir, [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[J14]) también demostró la mejor supervivencia tras la exposición intranasal a GAS, en comparación con el péptido bilipidado o el péptido no lipidado. Sin embargo, se confirió inmunidad protectora mediante tanto el péptido bilipidado como el péptido no lipidado en comparación con el péptido J14 solo o PBS.

40 En resumen, los datos presentados en los ejemplos 2 y 3 indican que las formulaciones de lipopéptido de la presente invención pueden aplicarse ampliamente para inducir fuertes respuestas de anticuerpos en animales, particularmente modelos murinos, con una variedad de epítipos de células T cooperadoras y epítipos de células B. Adicionalmente, las formulaciones de lipopéptido son particularmente adecuadas para administración intranasal, puesto que se obtienen fuertes respuestas de IgG e IgA mediante esta vía. Sin embargo, los datos indican que, al menos para inmunógenos J14, los péptidos monolipidados pueden servir como mejores adyuvantes mucosales que los lipopéptidos que comprenden múltiples restos lipídicos.

EJEMPLO 4

45 Estudios en lipopéptidos que comprenden un epítipo de células B de gastrina

50 Se determinó la inmunogenicidad de inmunógenos de lipopéptido basados en gastrina. Se inocularon por vía subcutánea ratones BALB/c hembra en la base de la cola con 20 nmoles de inmunógenos de péptido o lipopéptido. Todos los lipopéptidos se administraron en PBS y los péptidos no lipidados se administraron en CFA. Se usó solución salina emulsionada con CFA como control negativo. Los péptidos usados fueron Gastrina-17 (secuencia EGPWLEEEEEEAYGWMDf; SEQ ID NO: 113); [P25]-Lys-[PentaGastrin] (SEQ ID NO: 110) en el que PentaGastrin es la secuencia C-terminal GWMDf de gastrina-17 (es decir, SEQ ID NO: 102); y [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[PentaGastrin]. 4 semanas tras la inmunización, se obtuvieron sueros de los animales y al mismo tiempo recibieron una segunda dosis similar de antígeno. Se extrajo sangre de los ratones una segunda vez otras 2 semanas tras la segunda dosis de antígeno y se determinaron en ELISA los anticuerpos que podían reaccionar con la secuencia

peptídica de gastrina-17.

5 Tal como se muestra en la figura 17, los ratones inoculados con Gastrina-17 en CFA contenían niveles de anticuerpos anti-Gastrina-17 equivalentes al control negativo de solución salina en CFA. Mientras que la inmunización con el péptido no lipidado [P25]-Lys-[PentaGastrin] provocó niveles muy bajos de anticuerpos anti-Gastrina-17, los ratones expuestos al lipopéptido [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[PentaGastrin] mostraron títulos de anticuerpo altos similares a los provocados tras la inmunización con el péptido en CFA. Estos datos ilustran de nuevo que las formulaciones de lipopéptido de la presente invención pueden aplicarse ampliamente a la inducción de fuertes respuestas de anticuerpos en animales, con una variedad de epítopos de células T cooperadoras y epítopos de células B.

10 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Council of the Queensland Institute of Medical Research

120> Lipopéptidos inmunogénicos novedosos que comprenden epítopos de células T cooperadoras y de células B

130> 94946/MRO

150> US 60/402838

15 151> 08-12-2002

160> 113

170> PatentIn versión 3.1

210> 1

211> 16

20 212> PRT

213> sintético

400> 1

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

210> 2

25 211> 10

212> PRT

213> sintético

400> 2

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

30 210> 3

211> 9

212> PRT

ES 2 369 664 T3

213> sintético

400> 3

His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
1 5

210> 4

5 211> 5

212> PRT

213> sintético

400> 4

Gly Leu Arg Pro Gly
1 5

10 210> 5

211> 26

212> PRT

213> sintético

400> 5

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

Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

15

210> 6

211> 26

212> PRT

213> sintético

20 400> 6

ES 2 369 664 T3

Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gly Ala Leu Asn Asn Arg
1 5 10 15

Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser
20 25

210> 7

211> 27

212> PRT

5 213> sintético

400> 7

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

Lys Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

210> 8

211> 27

10 212> PRT

213> sintético

400> 8

Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Lys Gly Ala Leu Asn Asn
1 5 10 15

Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser
20 25

15 210> 9

211> 27

212> PRT

213> sintético

400> 9

ES 2 369 664 T3

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

Leu Lys His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

210> 10

211> 28

212> PRT

5 213> sintético

400> 10

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

Ile Lys Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

210> 11

211> 28

10 212> PRT

213> sintético

400> 11

Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Asn Leu

1 5 10 15

Asn Lys Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

15 210> 12

211> 28

212> PRT

213> sintético

ES 2 369 664 T3

400> 12

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

Ser Lys Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

210> 13

211> 23

5 212> PRT

213> sintético

400> 13

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

Leu Lys Gly Leu Arg Pro Gly
20

210> 14

10 211> 23

212> PRT

213> sintético

400> 14

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

Ile Lys Gly Leu Arg Pro Gly
20

15 210> 15

211> 23

212> PRT

213> sintético

400> 15

ES 2 369 664 T3

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

Asn Lys Gly Leu Arg Pro Gly
20

210> 16

211> 23

212> PRT

5 213> sintético

400> 16

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

Ser Lys Gly Leu Arg Pro Gly -
20

210> 17

211> 5

10 212> PRT

213> sintético

400> 17

Ser Lys Lys Lys Lys
1 5

210> 18

15 211> 15

212> PRT

213> sintético

400> 18

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

20 210> 19

ES 2 369 664 T3

211> 15

212> PRT

213> sintético

400> 19

Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val
1 5 10 15 .

5

210> 20

211> 17

212> PRT

213> sintético

10 400> 20

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

Asn

210> 21

211> 17

15 212> PRT

213> sintético

400> 21

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

Gln

210> 22

20 211> 17

212> PRT

213> sintético

400> 22

ES 2 369 664 T3

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

Ile

210> 23

211> 17

212> PRT

5 213> sintético

400> 23

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

Glu

210> 24

211> 17

10 212> PRT

213> sintético

400> 24

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

Leu

210> 25

15 211> 17

212> PRT

213> sintético

400> 25

ES 2 369 664 T3

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

Leu

210> 26

211> 17

212> PRT

5 213> sintético

400> 26

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

Ile

210> 27

211> 17

10 212> PRT

213> sintético

400> 27

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

Met

210> 28

15 211> 17

212> PRT

213> sintético

400> 28

ES 2 369 664 T3

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

Leu

210> 29

211> 17

212> PRT

5 213> sintético

400> 29

Thr Leu Met Thr Lys Asn Val Lys Pro Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly
1 5 10 15

Arg

210> 30

211> 17

10 212> PRT

213> sintético

400> 30

Lys Pro Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly Arg Arg Gln Arg Arg Phe Ala
1 5 10 15

Gly

210> 31

15 211> 17

212> PRT

213> sintético

400> 31

ES 2 369 664 T3

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

Ala

210> 32

211> 17

212> PRT

5 213> sintético

400> 32

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

Ala

210> 33

211> 17

10 212> PRT

213> sintético

400> 33

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

Ala

210> 34

15 211> 17

212> PRT

213> sintético

400> 34

ES 2 369 664 T3

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

Leu

210> 35

211> 17

212> PRT

5 213> sintético

400> 35

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

Ser

210> 36

211> 17

10 212> PRT

213> sintético

400> 36

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

Ile

210> 37

15 211> 17

212> PRT

213> sintético

400> 37

ES 2 369 664 T3

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

Thr

210> 38

211> 17

5 212> PRT

213> sintético

400> 38

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

Ser

210> 39

10 211> 17

212> PRT

213> sintético

400> 39

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

Ser

15 210> 40

211> 17

212> PRT

213> sintético

400> 40

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

Thr

210> 41

211> 17

212> PRT

5 213> sintético

400> 41

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

Ser

210> 42

211> 17

10 212> PRT

213> sintético

400> 42

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

His

210> 43

15 211> 17

212> PRT

213> sintético

400> 43

ES 2 369 664 T3

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

Ala

210> 44

211> 17

212> PRT

5 213> sintético

400> 44

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

Ser

210> 45

211> 17

10 212> PRT

213> sintético

400> 45

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

Thr

210> 46

15 211> 17

212> PRT

213> sintético

400> 46

ES 2 369 664 T3

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

Asn

210> 47

211> 17

212> PRT

5 213> sintético

400> 47

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

Ala

210> 48

211> 17

10 212> PRT

213> sintético

400> 48

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

Val

210> 49

15 211> 24

212> PRT

213> sintético

400> 49

ES 2 369 664 T3

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg
1 5 10 15

Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro
20

210> 50

211> 19

212> PRT

5 213> sintético

400> 50

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
1 5 10 15

Ser Ser Leu

210> 51

211> 18

10 212> PRT

213> sintético

400> 51

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
1 5 10 15

Ser Leu

210> 52

15 211> 27

212> PRT

213> sintético

400> 52

ES 2 369 664 T3

Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro
1 5 10 15

Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Lys Lys Gly
20 25

210> 53

211> 26

212> PRT

5 213> sintético

400> 53

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg
1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Lys
20 25

210> 54

211> 4

10 212> PRT

213> sintético

400> 54

Gly Val Ala Glu
1

210> 55

15 211> 10

212> PRT

213> sintético

400> 55

Thr Ala Ser Gly Val Ala Glu Thr Thr Asn
1 5 10

20 210> 56

ES 2 369 664 T3

211> 16

212> PRT

213> sintético

400> 56

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
1 5 10 15

5

210> 57

211> 10

212> PRT

213> sintético

10 400> 57

Glu Ala Glu Glu Ala Ala Arg Leu Gln Ala
1 5 10

210> 58

211> 18

212> PRT

15 213> sintético

400> 58

Phe Arg Glu Arg Thr Leu Thr Gly Gln Arg Ala Cys Asn Asp Val Asn
1 5 10 15

Ser Glu

210> 59

211> 18

20 212> PRT

213> sintético

400> 59

ES 2 369 664 T3

Asn Pro Leu Glu Thr Ser Gly Ala Ser Thr Val Gly Phe Arg Glu Arg
1 5 10 15

Thr Leu

210> 60

211> 18

212> PRT

5 213> sintético

400> 60

Ile Arg Glu Thr Arg Lys Arg Gln Lys Met Val Asp Asp Ala Val Asn
1 5 10 15

Glu Tyr

210> 61

211> 19

10 212> PRT

213> sintético

400> 61

Ala Lys Ala Pro Val Val Lys Glu Gly Pro Tyr Glu Gly Pro Val Lys
1 5 10 15

Lys Pro Val

210> 62

15 211> 19

212> PRT

213> sintético

400> 62

ES 2 369 664 T3

Ala Gly Pro Leu Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val Lys Ala Lys Ala
1 5 10 15

Pro Val Val

210> 63

211> 19

212> PRT

5 213> sintético

400> 63

Lys Val Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gln Glu Gly Pro Tyr Ala Gly Pro
1 5 10 15

Leu Glu Arg

210> 64

211> 19

10 212> PRT

213> sintético

400> 64

Gly Pro Tyr Thr Gly Pro Leu Glu Arg Gln Arg Pro Leu Lys Val Arg
1 5 10 15

Ala Lys Leu

210> 65

15 211> 18

212> PRT

213> sintético

400> 65

ES 2 369 664 T3

Val Gly Arg Leu Ile Phe Ser Gly Glu Ala Leu Thr Tyr Lys Asp Ile
1 5 10 15

Val Val

210> 66

211> 19

212> PRT

5 213> sintético

400> 66

Thr Lys His Phe Arg Asp Thr Ala Arg Met Lys Lys Gly Thr Pro Val
1 5 10 15

Val Gly Val

210> 67

10 211> 19

212> PRT

213> sintético

400> 67

Ser Gly Ala Pro Pro Thr Asp Leu Gln Lys Met Val Met Gly Asn Thr
1 5 10 15

Lys Pro Val

15 210> 68

211> 35

212> PRT

213> sintético

400> 68

ES 2 369 664 T3

Asn Lys Tyr Ser Ala Ser Gly Ser Gly Val Arg Gly Asp Phe Gly Ser
1 5 10 15

Leu Ala Pro Arg Val Ala Arg Gln Leu Pro Ala Ser Phe Asn Tyr Gly
20 25 30

Ala Ile Lys
35

210> 69

211> 20

212> PRT

5 213> sintético

400> 69

Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr Ile
1 5 10 15

Val Ala Asn Pro
20

210> 70

211> 19

10 212> PRT

213> sintético

400> 70

Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Gln Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr
1 5 10 15

Cys Tyr Ala

210> 71

15 211> 20

212> PRT

213> sintético

400> 71

ES 2 369 664 T3

Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val
1 5 10 15

Leu Val Ala Ser
20

210> 72

211> 14

212> PRT

5 213> sintético

400> 72

Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val Thr Lys Phe Met Leu
1 5 10

210> 73

211> 21

10 212> PRT

213> sintético

400> 73

Tyr Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu Pro Ala Glu Leu Thr Asp Asp
1 5 10 15

Ala Val Lys Val Met
20

210> 74

15 211> 21

212> PRT

213> sintético

400> 74

ES 2 369 664 T3

Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp
1 5 10 15

Leu Met Leu Leu Tyr
20

210> 75

211> 21

212> PRT

5 213> sintético

400> 75

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

Val Phe Gln Val Tyr
20

210> 76

211> 37

10 212> PRT

213> sintético

400> 76

Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
1 5 10 15

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
20 25 30

Pro Ile Leu Pro Gln
35

210> 77

15 211> 17

212> PRT

213> sintético

ES 2 369 664 T3

400> 77

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

Ile

210> 78

211> 19

5 212> PRT

213> sintético

400> 78

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

Val Met Ser

210> 79

10 211> 11

212> PRT

213> sintético

400> 79

Trp Leu Cys Phe Pro Leu Cys Leu Ala Leu Pro
1 5 10

15 210> 80

211> 11

212> PRT

213> sintético

400> 80

Leu Gly Gly Leu Tyr Cys Gly Pro Ser Ser Phe
1 5 10

20

ES 2 369 664 T3

210> 81

211> 12

212> PRT

213> sintético

5 400> 81

Gly Ser Ile Thr Arg Asp Ser Ile Phe Arg Leu Arg
1 5 10

210> 82

211> 12

212> PRT

10 213> sintético

400> 82

Ser Ala Leu Pro Val Asn Ile Gln Val Phe Thr Leu
1 5 10

210> 83

211> 12

15 212> PRT

213> sintético

400> 83

Glu Leu Gln Ile Ala Lys Asp Glu Arg Tyr Gly Ser
1 5 10

210> 84

20 211> 12

212> PRT

213> sintético

400> 84

Val Lys Leu Leu Arg Glu Pro Ile Tyr Val Glu Val
1 5 10

25 210> 85

ES 2 369 664 T3

211> 12

212> PRT

213> sintético

400> 85

Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu Ile Asp Gly Asn
1 5 10

5

210> 86

211> 20

212> PRT

213> sintético

10 400> 86

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

Asp Pro Thr Val
20

210> 87

211> 20

212> PRT

15 213> sintético

400> 87

Pro Glu Thr Lys His Pro Lys Lys Gly Val Glu Lys Tyr Gly Pro Glu
1 5 10 15

Ala Ser Ala Phe
20

210> 88

20 211> 15

212> PRT

213> sintético

ES 2 369 664 T3

400> 88

Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu
1 5 10 15

210> 89

211> 15

5 212> PRT

213> sintético

400> 89

Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser
1 5 10 15

210> 90

10 211> 13

212> PRT

213> sintético

400> 90

Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu
1 5 10

15 210> 91

211> 15

212> PRT

213> sintético

400> 91

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

20

210> 92

211> 14

212> PRT

213> sintético

25 400> 92

ES 2 369 664 T3

Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met Asp Ser Ser Thr Leu Glu
1 5 10

210> 93

211> 19

212> PRT

5 213> sintético

400> 93

His Pro Leu Ile Leu Asp Thr Cys Thr Ile Glu Gly Leu Ile Tyr Gly
1 5 10 15

Asn Pro Ser

210> 94

211> 10

10 212> PRT

213> sintético

400> 94

Tyr Gln Arg Ile Gln Ile Phe Pro Asp Thr
1 5 10

210> 95

15 211> 18

212> PRT

213> sintético

400> 95

Ile Gln Ile Phe Pro Asp Thr Ile Trp Asn Val Ser Tyr Ser Gly Thr
1 5 10 15

Ser Lys

20 210> 96

211> 38

ES 2 369 664 T3

212> PRT

213> sintético

400> 96

Cys Lys Tyr Ser Ala Ser Gly Ser Gly Val Arg Gly Asp Phe Gly Ser
1 5 10 15

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

Ala Ile Lys Asn Lys Tyr
35

5 210> 97

211> 13

212> PRT

213> sintético

400> 97

Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala
1 5 10

10

210> 98

211> 23

212> PRT

213> sintético

15 400> 98

Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln
1 5 10 15

Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala
20

210> 99

211> 29

212> PRT

ES 2 369 664 T3

213> sintético

400> 99

Gly Gly Pro Thr Arg Thr Ile Gly Gly Ser Gln Ala Gln Thr Ala Ser
1 5 10 15

Gly Leu Val Ser Met Phe Ser Val Gly Pro Ser Gln Lys
20 25

210> 100

5 211> 12

212> PRT

213> sintético

400> 100

Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His
1 5 10

10 210> 101

211> 29

212> PRT

213> sintético

400> 101

Lys Gln Ala Glu Asp Lys Val Lys Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln
1 5 10 15

Val Glu Lys Ala Leu Glu Gln Leu Glu Asp Lys Val Lys
20 25

15

210> 102

211> 5

212> PRT

213> sintético

20 400> 102

ES 2 369 664 T3

Gly Trp Met Asp Phe
1 5

210> 103

211> 26

212> PRT

5 213> sintético

400> 103

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

Leu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

210> 104

211> 22

10 212> PRT

213> sintético

400> 104

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

Leu Gly Leu Arg Pro Gly
20

210> 105

15 211> 46

212> PRT

213> sintético

400> 105

ES 2 369 664 T3

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

Leu Lys Gln Ala Glu Asp Lys Val Lys Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys
 20 25 30

Gln Val Glu Lys Ala Leu Glu Gln Leu Glu Asp Lys Val Lys
 35 40 45

210> 106

211> 47

212> PRT

5 213> sintético

400> 106

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

Leu Lys Lys Gln Ala Glu Asp Lys Val Lys Ala Ser Arg Glu Ala Lys
 20 25 30

Lys Gln Val Glu Lys Ala Leu Glu Gln Leu Glu Asp Lys Val Lys
 35 40 45

210> 107

211> 45

10 212> PRT

213> sintético

400> 107

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

Lys Gln Ala Glu Asp Lys Val Lys Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln
 20 25 30

Val Glu Lys Ala Leu Glu Gln Leu Glu Asp Lys Val Lys
 35 40 45

ES 2 369 664 T3

210> 108

211> 46

212> PRT

213> sintético

5 400> 108

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

Lys Lys Gln Ala Glu Asp Lys Val Lys Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys
20 25 30

Gln Val Glu Lys Ala Leu Glu Gln Leu Glu Asp Lys Val Lys
35 40 45

210> 109

211> 22

212> PRT

10 213> sintético

400> 109

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

Leu Gly Trp Met Asp Phe
20

210> 110

211> 23

15 212> PRT

213> sintético

400> 110

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

Leu Lys Gly Trp Met Asp Phe
20

ES 2 369 664 T3

210> 111

211> 21

212> PRT

213> sintético

5 400> 111

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

Gly Trp Met Asp Phe
20

210> 112

211> 22

212> PRT

10 213> sintético

400> 112

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

Lys Gly Trp Met Asp Phe
20

210> 113

211> 17

15 212> PRT

213> sintético

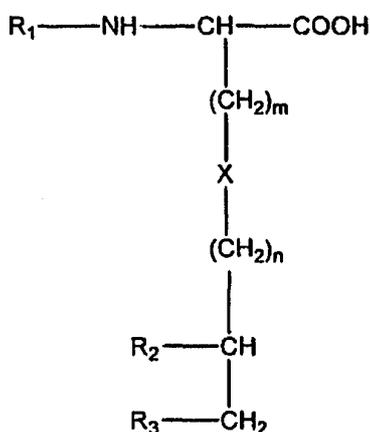
400> 113

Glu Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp
1 5 10 15

Phe

REIVINDICACIONES

1. Lipopéptido que comprende un polipéptido conjugado con uno o más restos lipídicos en el que:
- (i) dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que comprende:
- 5 (a) la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células T cooperadoras (Th) y la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células B, en el que dichas secuencias de aminoácidos son diferentes; y
- (b) uno o más residuos de lisina interna o residuos de análogos de lisina interna para la unión covalente de cada uno de dichos restos lipídicos a través del grupo épsilon-amino o el grupo de cadena lateral terminal de dicha lisina o análogo de lisina; y
- 10 (ii) cada uno de dicho uno o más restos lipídicos se une covalentemente a un grupo épsilon-amino de dicho uno o más residuos de lisina interna o a un grupo de cadena lateral terminal de dicho uno o más residuos de análogos de lisina interna;
- en el que el residuo de lisina interna o el residuo de análogo de lisina interna al que se une un resto lipídico se sitúa (a) entre el epítipo de Th y el epítipo de células B, o (b) dentro del epítipo de Th.
2. Lipopéptido según la reivindicación 1, en el que el lípido se une al grupo épsilon-amino de un residuo de lisina.
- 15 3. Lipopéptido según la reivindicación 1 ó 2, que comprende dos restos lipídicos.
4. Lipopéptido según la reivindicación 3, en el que un residuo de lisina interna al que se une un resto lipídico se sitúa entre el epítipo de Th y el epítipo de células B y un residuo de lisina interna al que se une un resto lipídico se sitúa dentro del epítipo de Th.
- 20 5. Lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el resto lipídico tiene una estructura de fórmula general (VII):



en la que:

- (i) X se selecciona del grupo que consiste en azufre, oxígeno, disulfuro (-S-S-), y metileno (-CH₂), y amino (-NH-);
- (ii) m es un número entero que es 1 ó 2;
- 25 (iii) n es un número entero desde 0 hasta 5;
- (iv) R₁ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, carbonilo (-CO-), y R'-CO- en el que R' se selecciona del grupo que consiste en alquilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono, alquenilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono, y alquinilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono, en el que dicho grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, amino, oxo, acilo o cicloalquilo;

(v) R_2 se selecciona del grupo que consiste en $R'-CO-O-$, $R'-O-$, $R'-O-CO-$, $R'-NH-CO-$, y $R'-CO-NH-$, en el que R' se selecciona del grupo que consiste en alquilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono, alquenilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono, y alquinilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono, en el que dicho grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, amino, oxo, acilo o cicloalquilo; y

5 (vi) R_3 se selecciona del grupo que consiste en $R'-CO-O-$, $R'-O-$, $R'-O-CO-$, $R'-NH-CO-$, y $R'-CO-NH-$, en el que R' se selecciona del grupo que consiste en alquilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono, alquenilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono, y alquinilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono, en el que dicho grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, amino, oxo, acilo o cicloalquilo

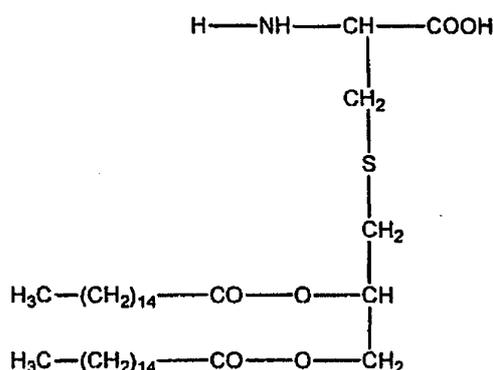
y en el que cada uno de R_1 , R_2 y R_3 son iguales o diferentes.

10 6. Lipopéptido según la reivindicación 5, en el que X es azufre; m y n son ambos 1; R_1 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, y $R'-CO-$, en el que R' es un grupo alquilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono; y R_2 y R_3 se seleccionan del grupo que consiste en $R'-CO-O-$, $R'-O-$, $R'-O-CO-$, $R'-NH-CO-$, y $R'-CO-NH-$, en el que R' es un grupo alquilo que tiene de 7 a 25 átomos de carbono.

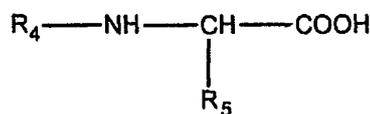
15 7. Lipopéptido según la reivindicación 6, en el que R' se selecciona del grupo que consiste en: palmitoilo, miristoilo, estearoilo, lauroilo, octanoilo y decanoilo.

8. Lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el lípido está contenido dentro de un resto de lipoaminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Pam₂Cys, Pam₃Cys, Ste₂Cys, Lau₂Cys, y Oct₂Cys.

9. Lipopéptido según la reivindicación 8, en el que el resto de lipoaminoácido tiene la estructura de fórmula (II):



20 10. Lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el resto lipídico tiene la siguiente fórmula general (VIII):



en la que:

25 (i) R_4 se selecciona del grupo que consiste en (i) un residuo de alfa-acil-ácido graso que consiste en entre aproximadamente 7 y aproximadamente 25 átomos de carbono; (ii) un residuo de alfa-alquil-beta-hidroxiácido graso; (iii) un beta-hidroxiéster de un residuo de alfa-alquil-beta-hidroxiácido graso; y (iv) un residuo de lipoaminoácido; y

(ii) R_5 es hidrógeno o la cadena lateral de un residuo de aminoácido.

11. Lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el resto lipídico está separado del resto peptídico por un espaciador.

30 12. Lipopéptido según la reivindicación 11, en el que el espaciador comprende arginina, serina o ácido 6-

aminohexanoico.

13. Lipopéptido según la reivindicación 11 ó 12, en el que el espaciador consiste en un homodímero de serina.
14. Lipopéptido según la reivindicación 11 ó 12, en el que el espaciador consiste en un homodímero de arginina.
15. Lipopéptido según la reivindicación 11 ó 12, en el que el espaciador consiste en ácido 6-aminohexanoico.
- 5 16. Lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la lisina interna o el análogo de lisina interna está anidado dentro de una secuencia de aminoácidos sintéticos que tiene baja inmunogenicidad.
17. Lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que el epítipo de células T cooperadoras es un epítipo de células T cooperadoras de hemaglutinina del virus *Influenza* o un epítipo de células T cooperadoras de la proteína F del virus del moquillo canino (F-VMC).
- 10 18. Lipopéptido según la reivindicación 17, en el que el epítipo de células T cooperadoras de hemaglutinina del virus *Influenza* comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 18.
19. Lipopéptido según la reivindicación 17, en el que el epítipo de células T cooperadoras de la proteína F-VMC comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 24.
- 15 20. Lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que el epítipo de células B procede de una proteína inmunogénica, lipoproteína, o glicoproteína de un virus, un organismo procariota, o un organismo eucariota.
21. Lipopéptido según la reivindicación 20, en el que el epítipo de células B procede de la proteína M de un *Streptococcus* del grupo A o una hormona peptídica de un mamífero.
- 20 22. Lipopéptido según la reivindicación 21, en el que el epítipo de células B comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 101.
23. Lipopéptido según la reivindicación 21, en el que la hormona peptídica es una hormona digestiva o una hormona peptídica reproductora.
24. Lipopéptido según la reivindicación 23, en el que la hormona peptídica es gastrina, pentagastrina u hormona de liberación de hormona luteinizante (LHRH) o un fragmento de las mismas.
- 25 25. Lipopéptido según la reivindicación 24, que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 113.
26. Lipopéptido según la reivindicación 20, que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.
- 30 27. Lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (i) GALNNRFQIKGVELKSEHWSYGLRPG (SEQ ID NO: 5);
- (ii) GALNNRFQIKGVELKSKEHWSYGLRPG (SEQ ID NO: 7);
- (iii) KLIPNASLIENCTKAELKHWYSYGLRPG (SEQ ID NO: 9);
- 35 (iv) KLIPNASLIENCTKAELKGLRPG (SEQ ID NO: 13);
- (v) KLIPNASLIENCTKAELHWSYGLRPG (SEQ ID NO: 103);
- (vi) KLIPNASLIENCTKAELGLRPG (SEQ ID NO: 104);
- (vii) KLIPNASLIENCTKAELQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID NO: 105);

(viii) KLIPNASLIENCTKAELKKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID NO: 106);

(ix) GALNNRFQIKGVELKSKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID NO: 107);

(x) GALNNRFQIKGVELKSKKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID NO: 108);

(xi) KLIPNASLIENCTKAELGW MDF (SEQ ID NO: 109);

5 (xii) KLIPNASLIENCTKAELKGW MDF (SEQ ID NO: 110);

(xiii) GALNNRFQIKGVELKSGW MDF (SEQ ID NO: 111); y

(xiv) GALNNRFQIKGVELKSKGW MDF (SEQ ID NO: 112).

28. Lipopéptido que comprende un polipéptido conjugado con uno o más restos lipídicos en el que:

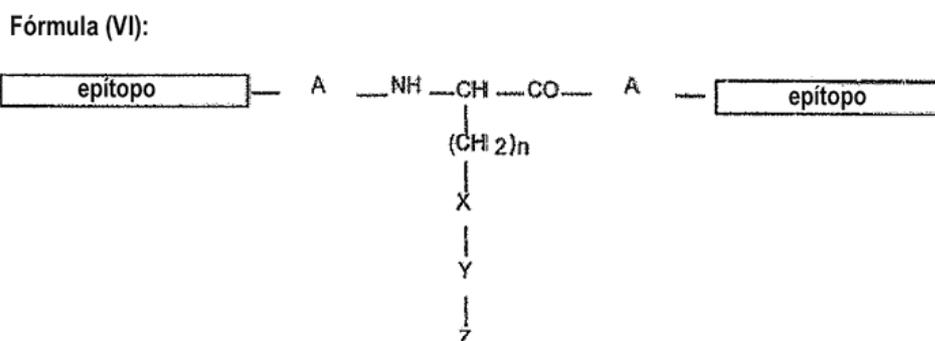
(i) dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que comprende:

10 (a) la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células T cooperadoras (Th) y la secuencia de aminoácidos de un epítipo de células B, en el que dichas secuencias de aminoácidos son diferentes; y

(b) uno o más residuos de lisina interna para la unión covalente de cada uno de dichos restos lipídicos a través del grupo épsilon-amino de dicho uno o más residuos de lisina;

15 (ii) cada uno de dicho uno o más restos lipídicos se une covalentemente a un grupo épsilon-amino de dicho uno o más residuos de lisina interna; y

(iii) dicho lipopéptido tiene la fórmula general (VI):



en la que:

epítipo es un epítipo de células T cooperadoras o epítipo de células B;

20 A está o bien presente o bien ausente y consiste en un espaciador de aminoácidos de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 aminoácidos de longitud;

n es un número entero que tiene un valor de 1, 2, 3 ó 4;

X es un grupo de cadena lateral terminal seleccionado del grupo que consiste en NH, O y S;

25 Y está o bien presente o bien ausente y consiste en un espaciador de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 aminoácidos de longitud, en el que dicho espaciador comprende arginina, serina o ácido 6-aminohexanoico; y

Z es un resto de lipoaminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pam₂Cys, Pam₃Cys, Ste₂Cys, Lau₂Cys, y Oct₂Cys.

29. Lipopéptido según la reivindicación 28, en el que el epítipo de células B comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

30. Lipopéptido según la reivindicación 28, en el que: (i) el epítipo de células B comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 101; (ii) Y está presente y consiste en un homodímero de serina; y (iii) Z consiste en Pam₂Cys.
- 5 31. Lipopéptido según la reivindicación 30, en el que el epítipo de células T cooperadoras comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 24 y en el que se une un resto lipídico al polipéptido a través del grupo épsilon-amino de un residuo de lisina dentro de SEQ ID NO: 24.
32. Lipopéptido según la reivindicación 28, en el que: (i) el epítipo de células B comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 102; (ii) Y está presente y consiste en un homodímero de serina; y (iii) Z consiste en Pam₂Cys.
- 10 33. Composición que comprende el lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32 y un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
34. Composición farmacéutica para provocar una respuesta inmunitaria humoral contra un epítipo de células B antigénico en un sujeto, comprendiendo la composición el lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32.
- 15 35. Composición farmacéutica según la reivindicación 34, siendo la composición para la administración por vía intranasal.
36. Composición farmacéutica según la reivindicación 34, siendo la composición para administración mediante inyección.
- 20 37. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 36, en la que el epítipo de células B antigénico procede de un agente patógeno.
38. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 37, comprendiendo además la composición un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
39. Agente anticonceptivo que comprende el lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, en el que el epítipo de células B procede de una hormona reproductora o receptor de hormona.
- 25 40. Vacuna que comprende el lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32.

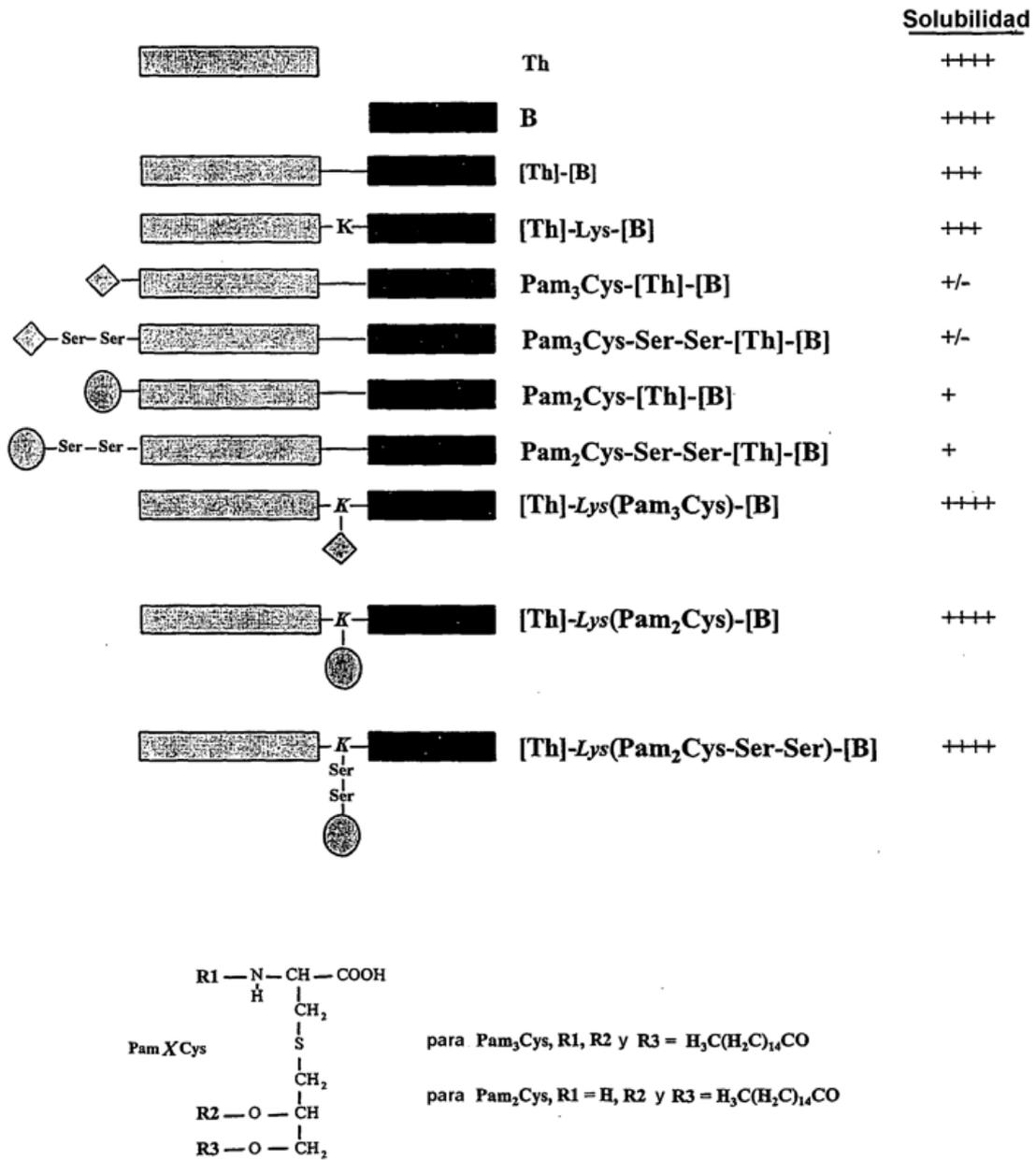


FIGURA 1



FIGURA 2

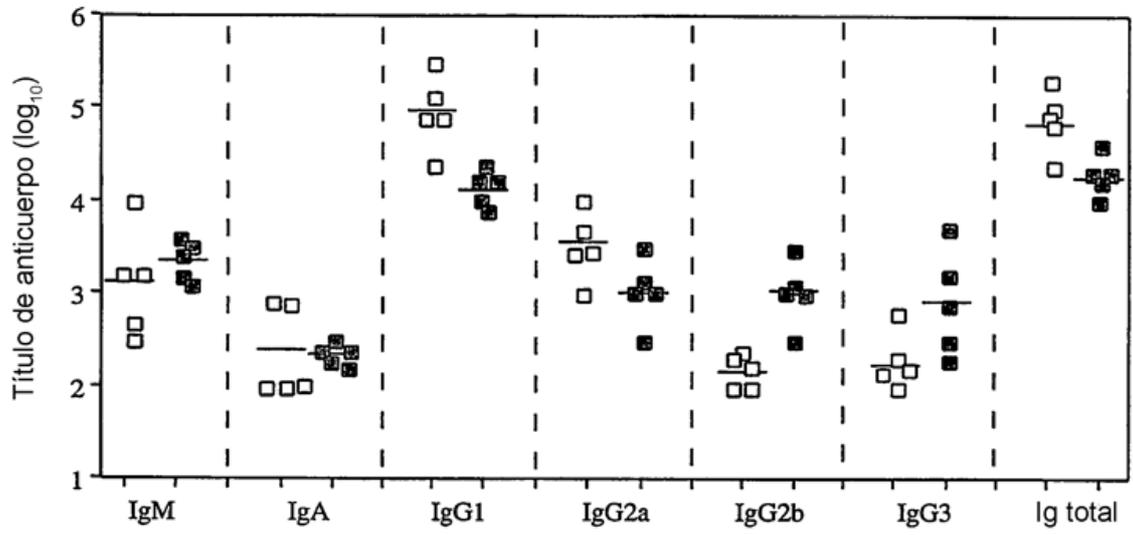


FIGURA 4

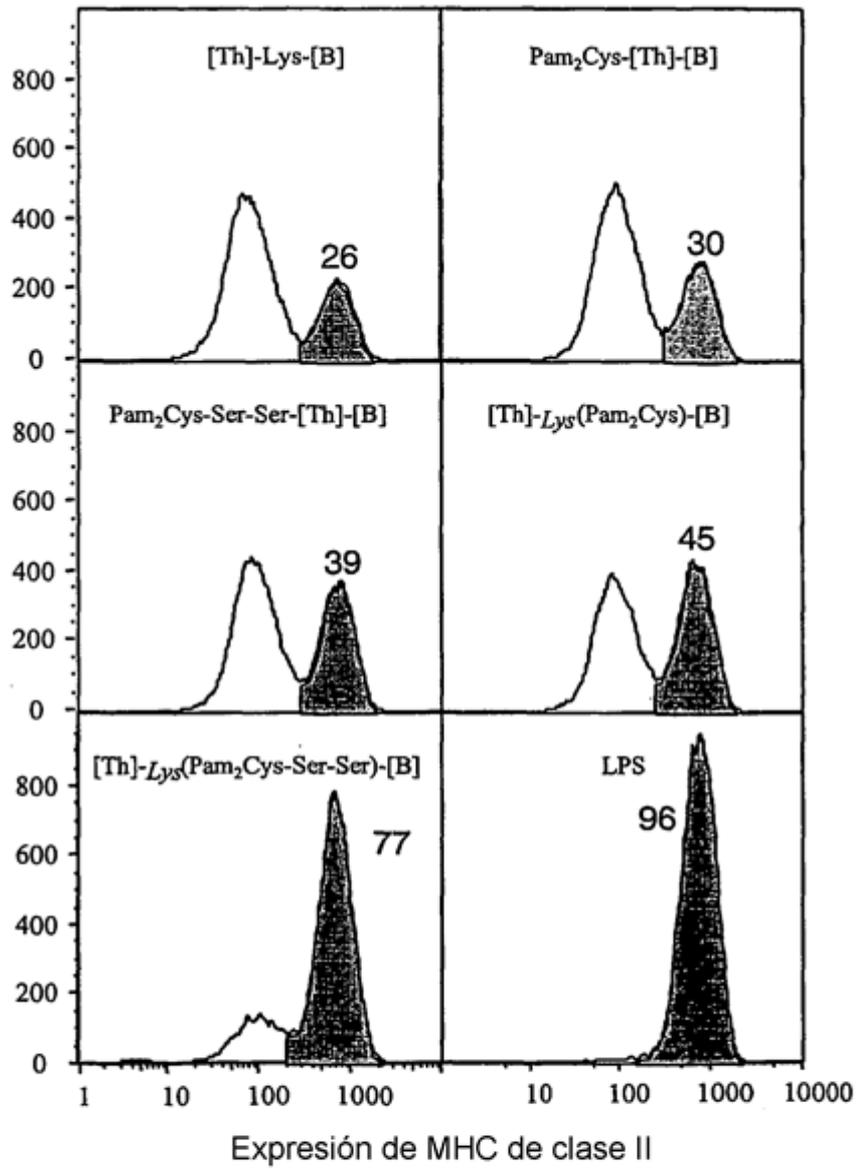


FIGURA 5

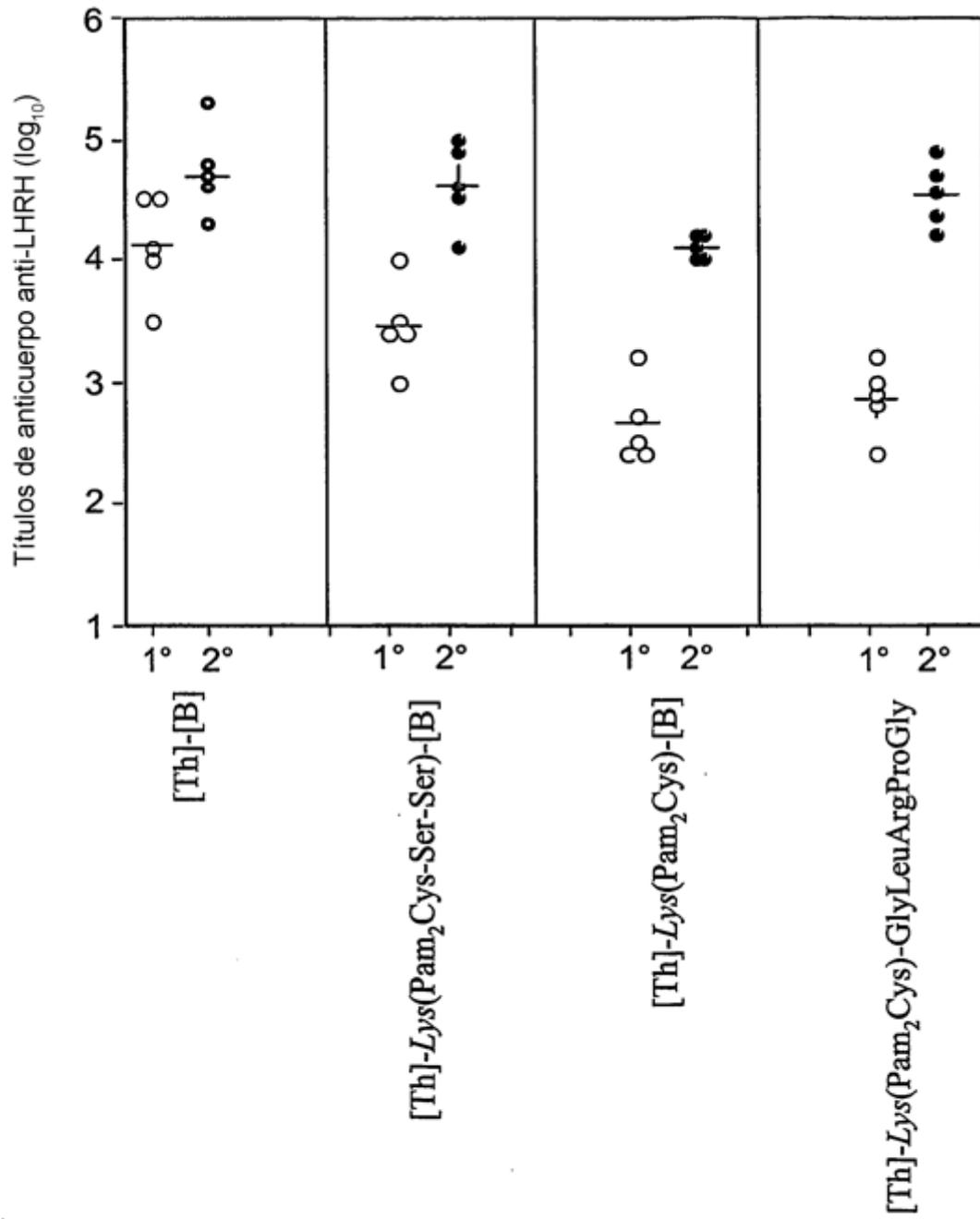


FIGURA 6

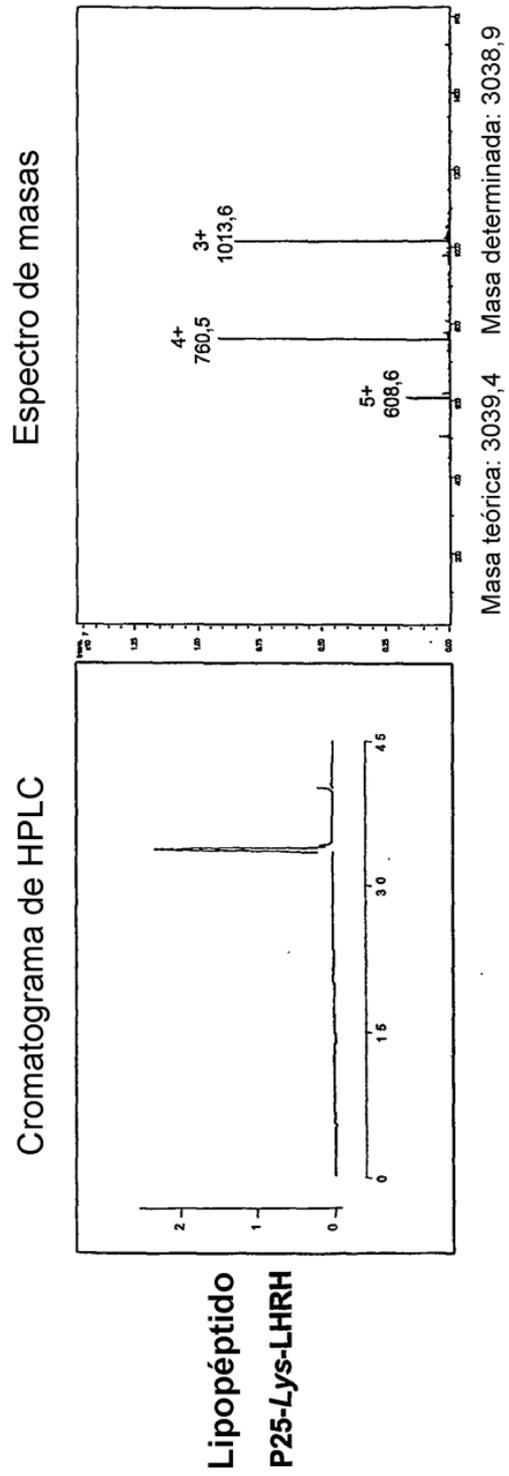


FIGURA 7a

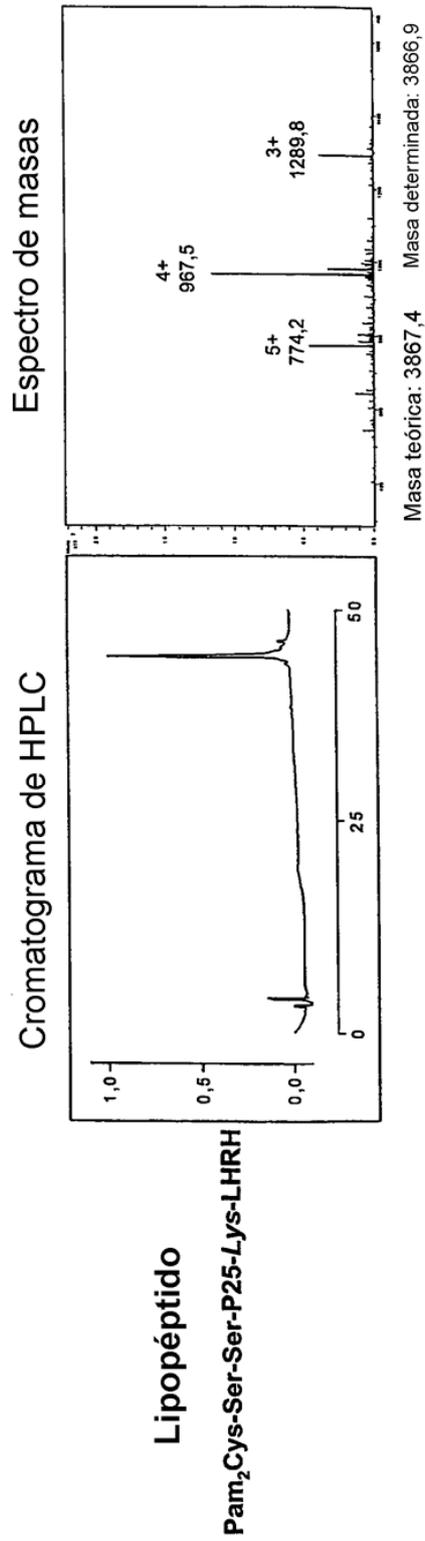


FIGURA 7b

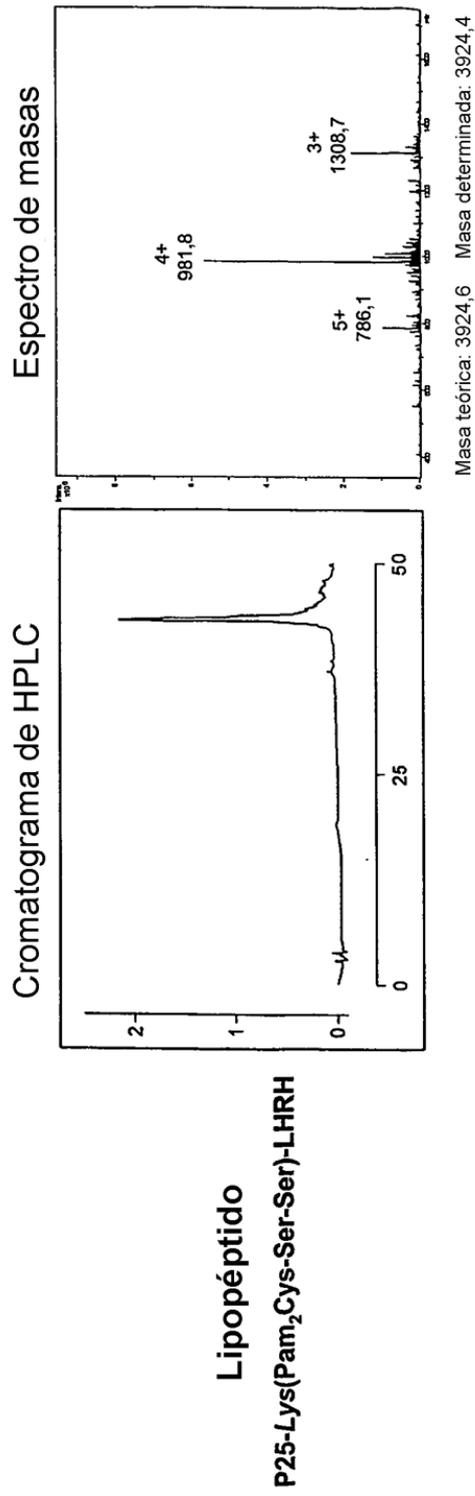


FIGURA 7c

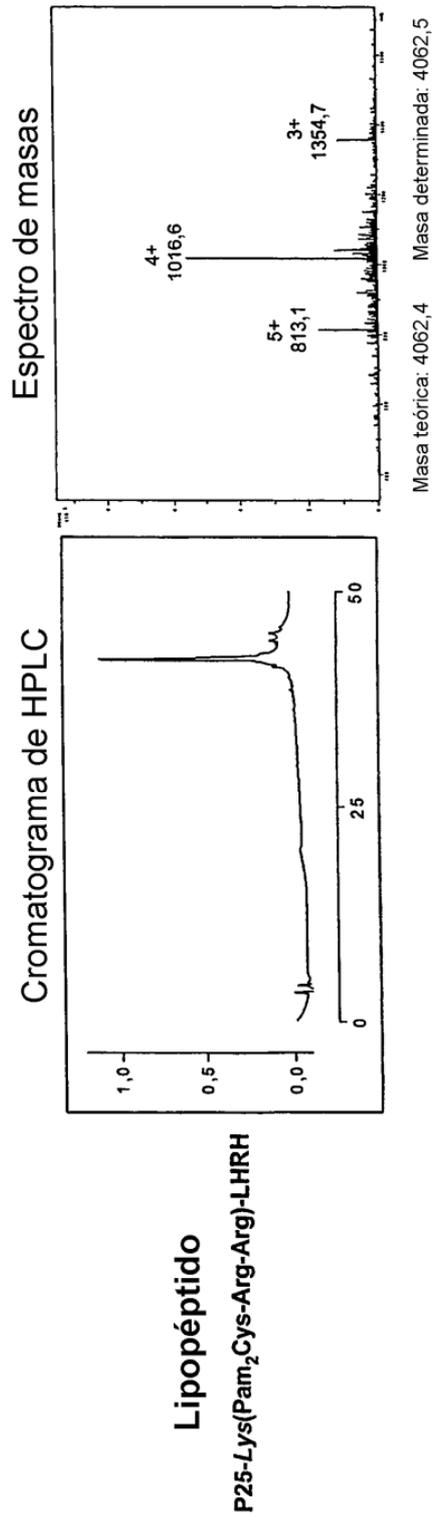


FIGURA 7d

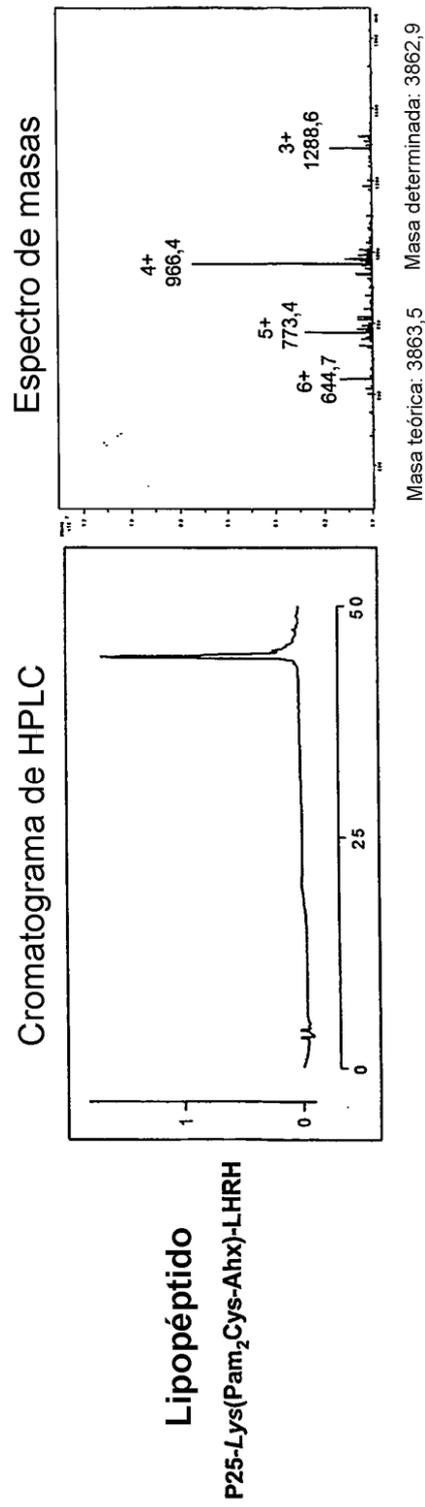


FIGURA 7e

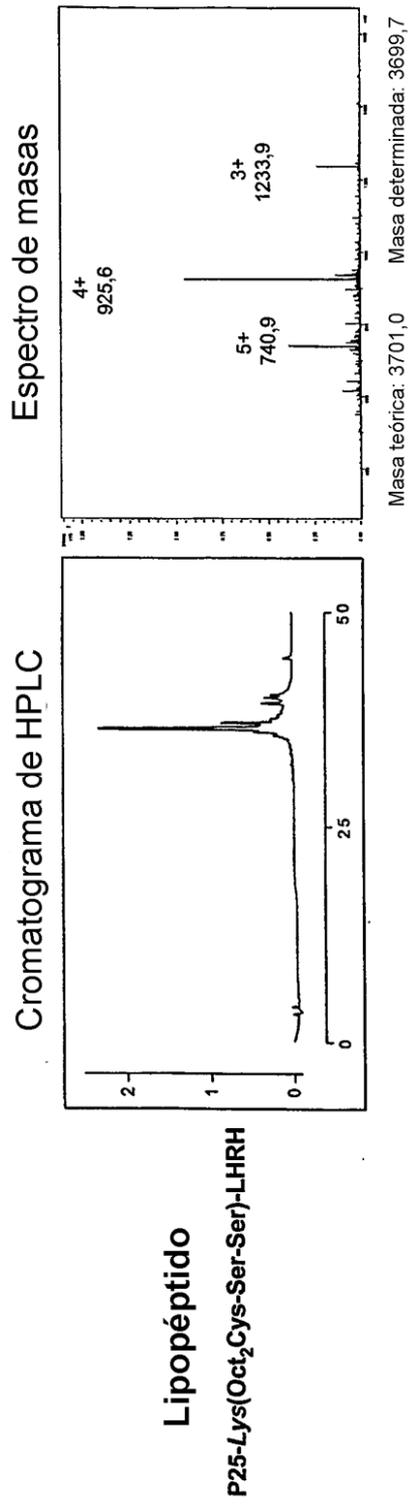


FIGURA 7f

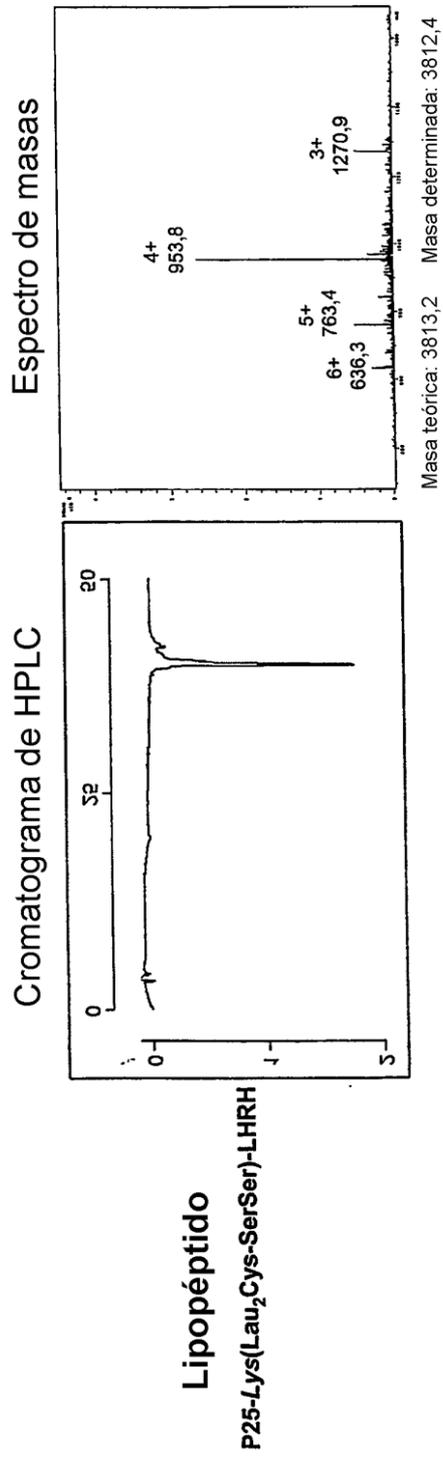


FIGURA 7g

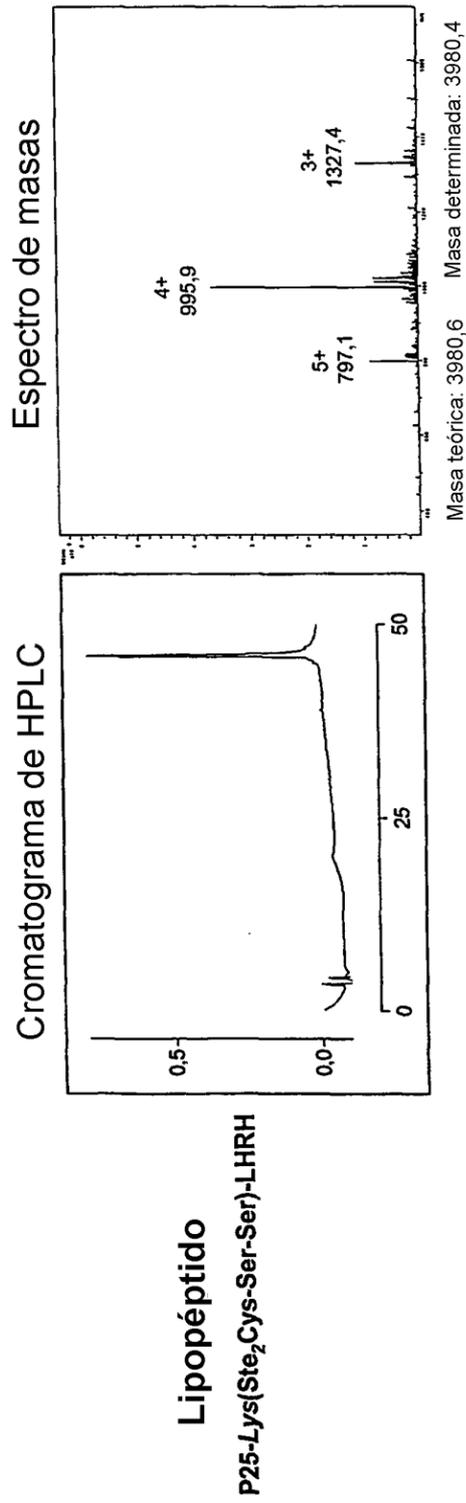


FIGURA 7h

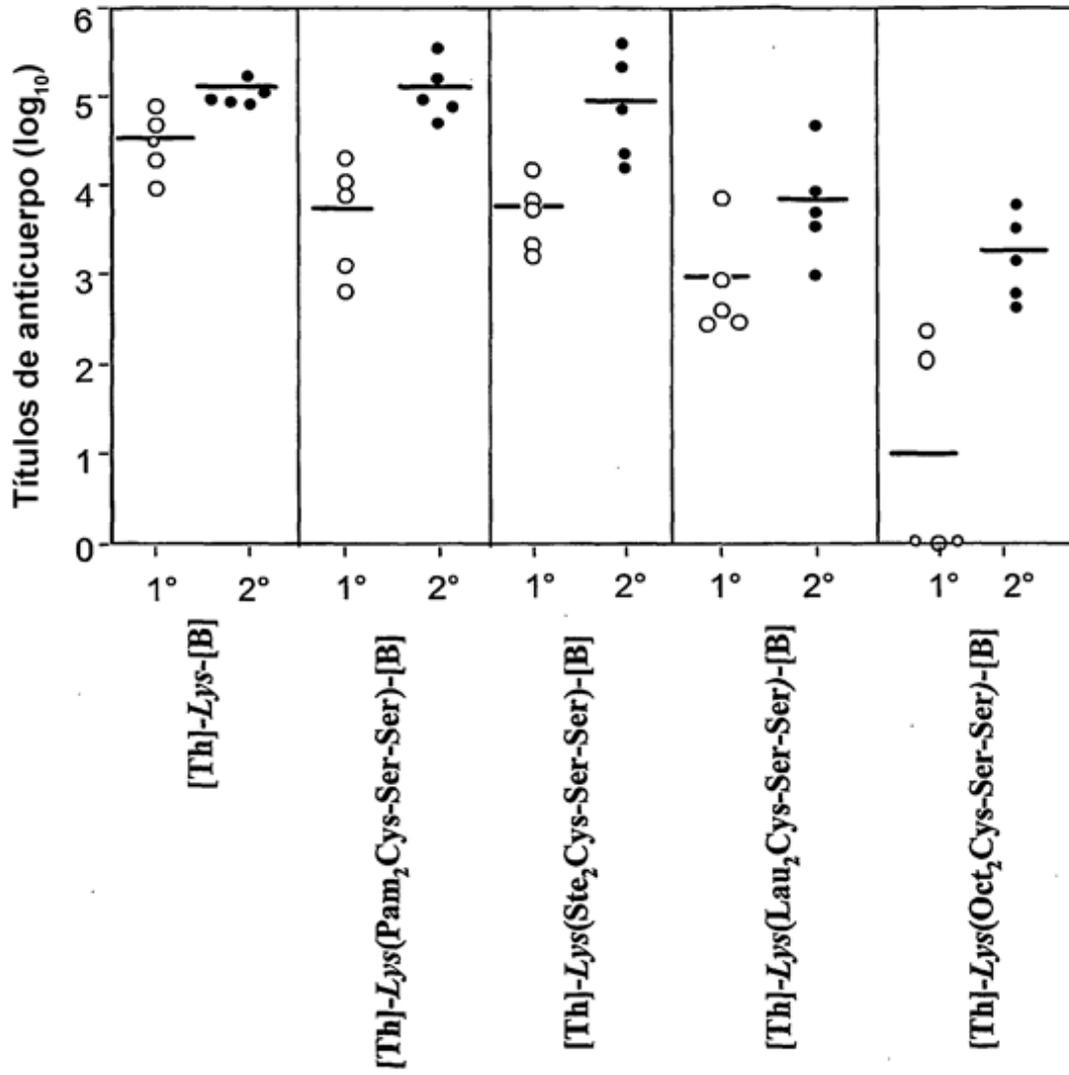


FIGURA 8

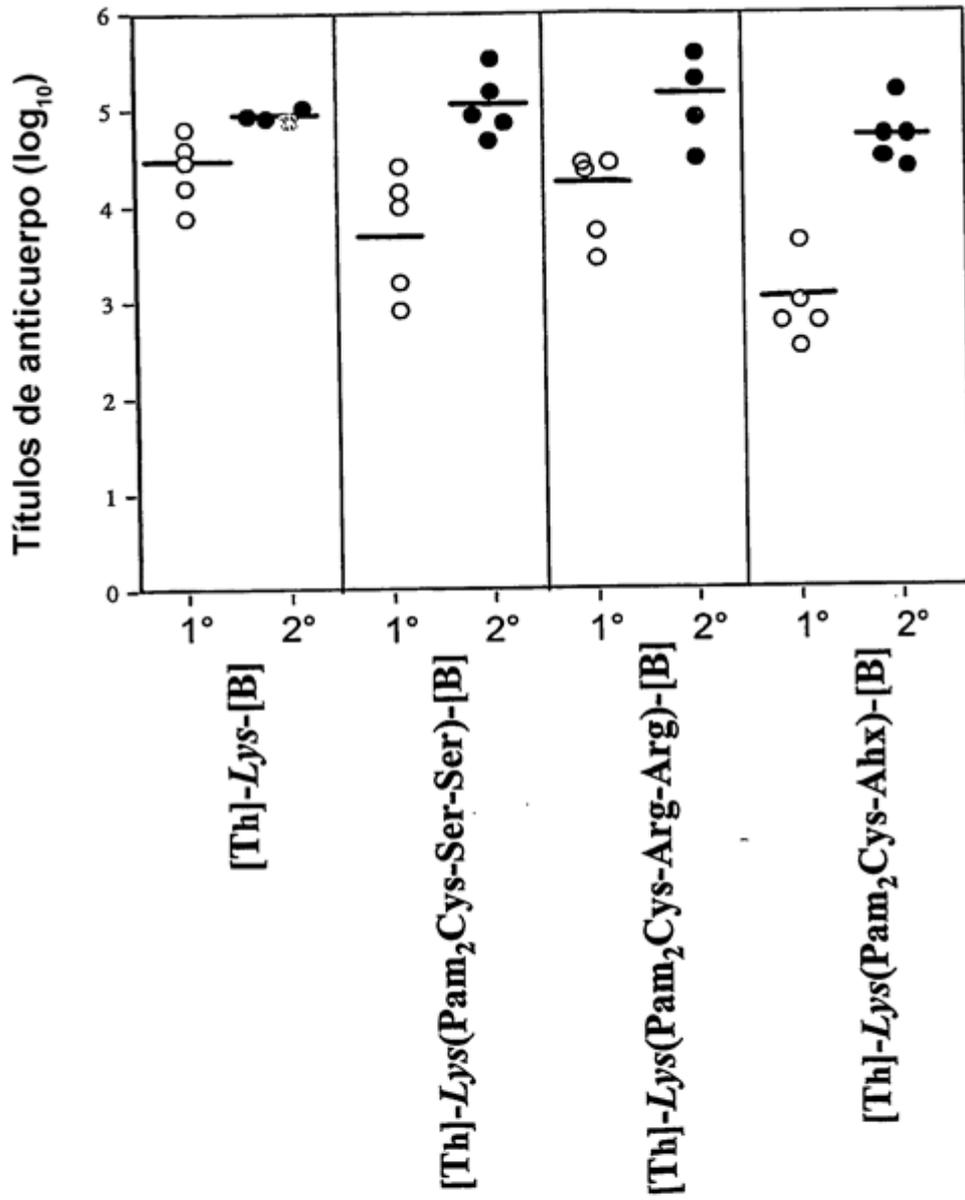


FIGURA 9

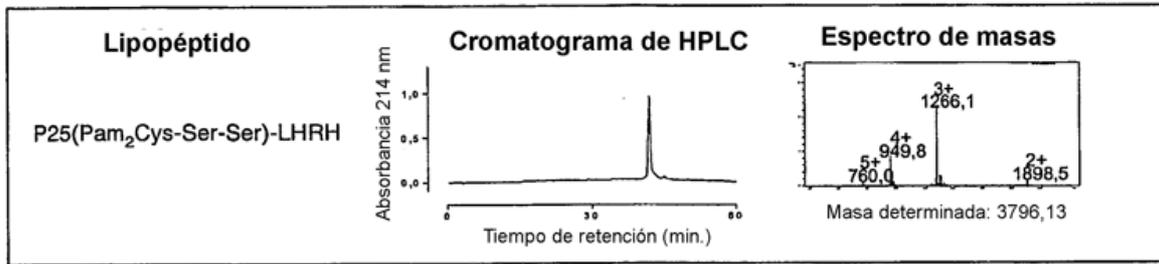


FIGURA 10

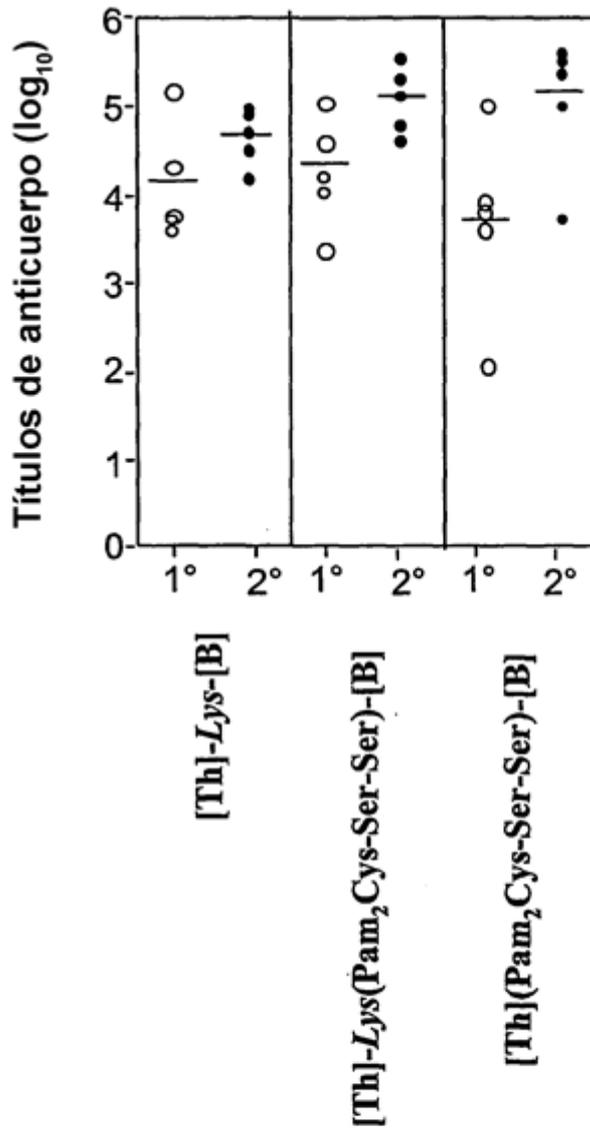


FIGURA 11

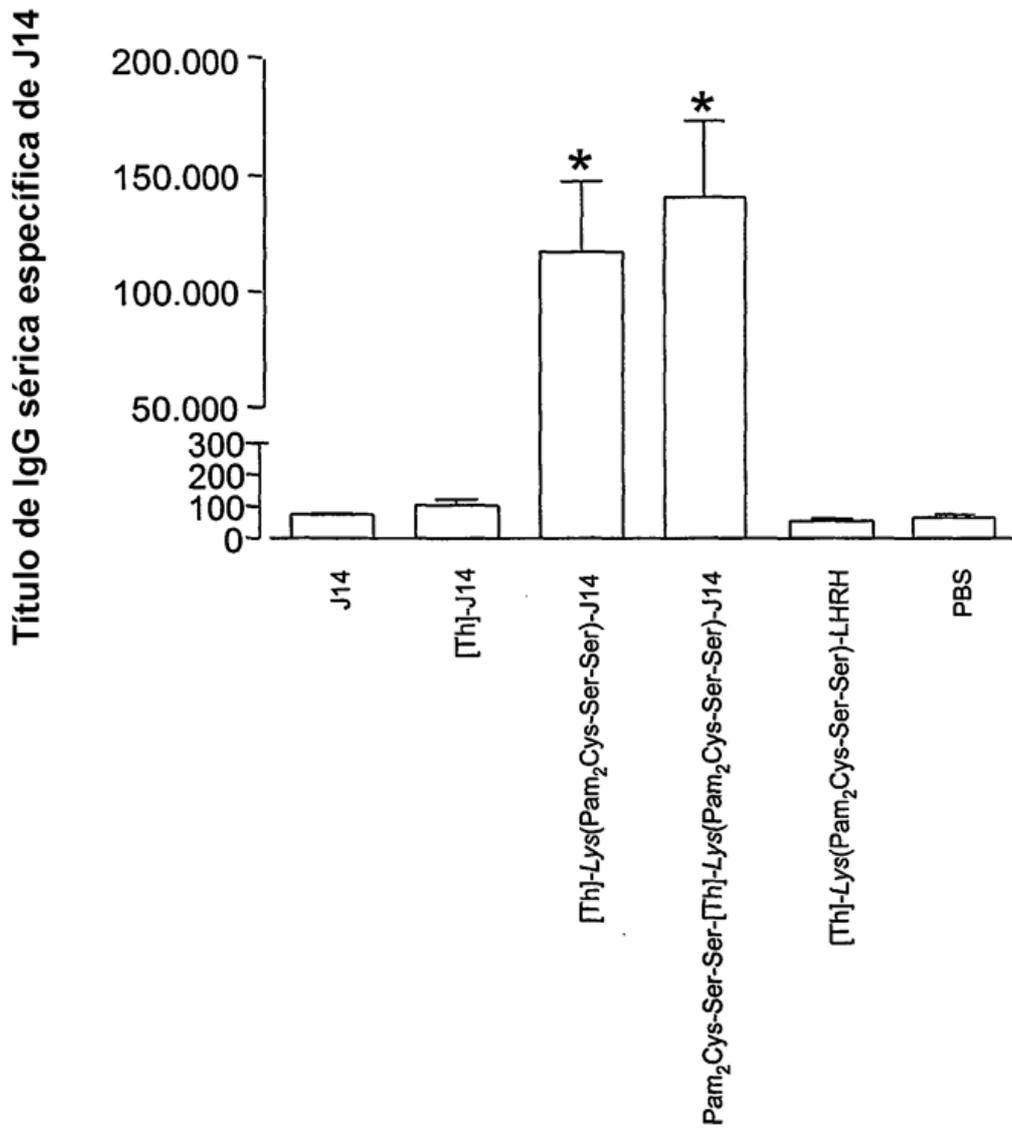


FIGURA 12

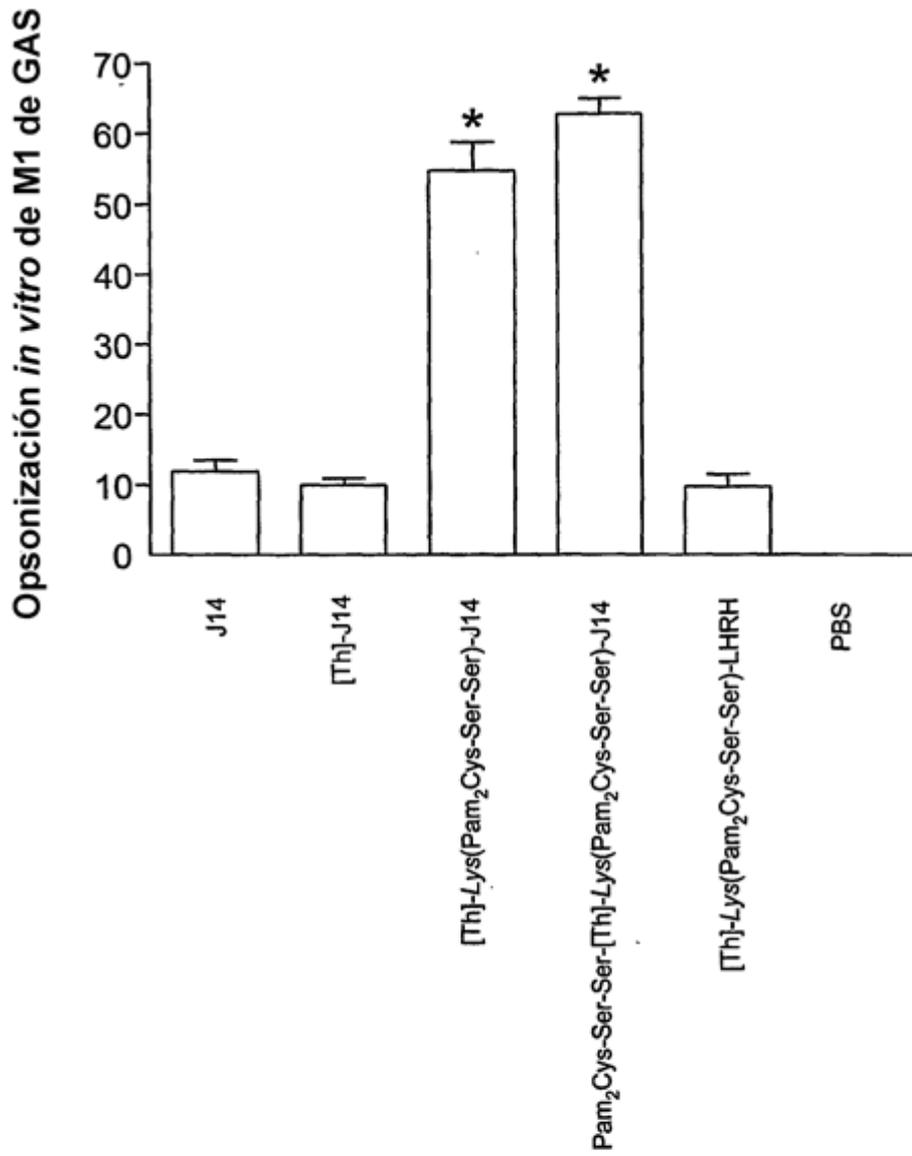


FIGURA 13

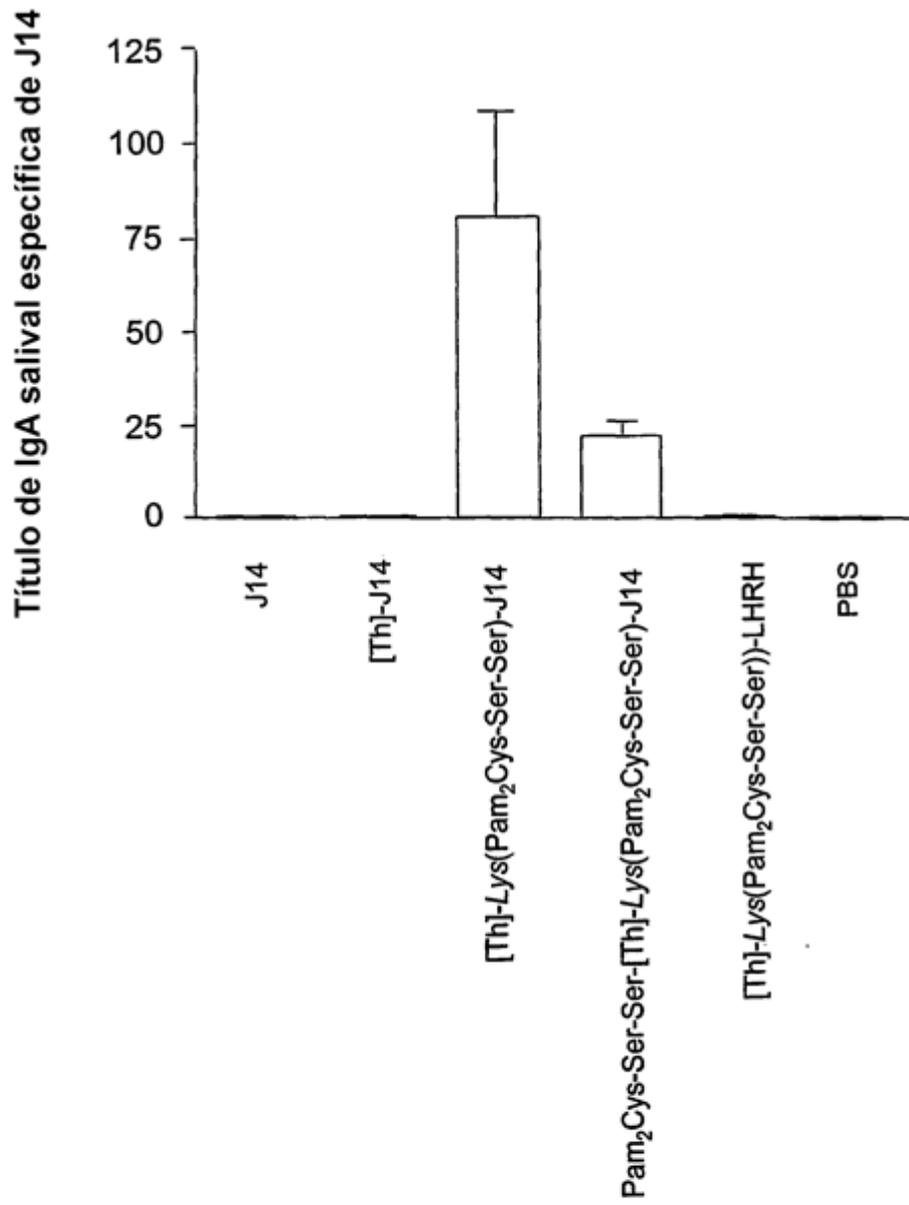


FIGURA 14

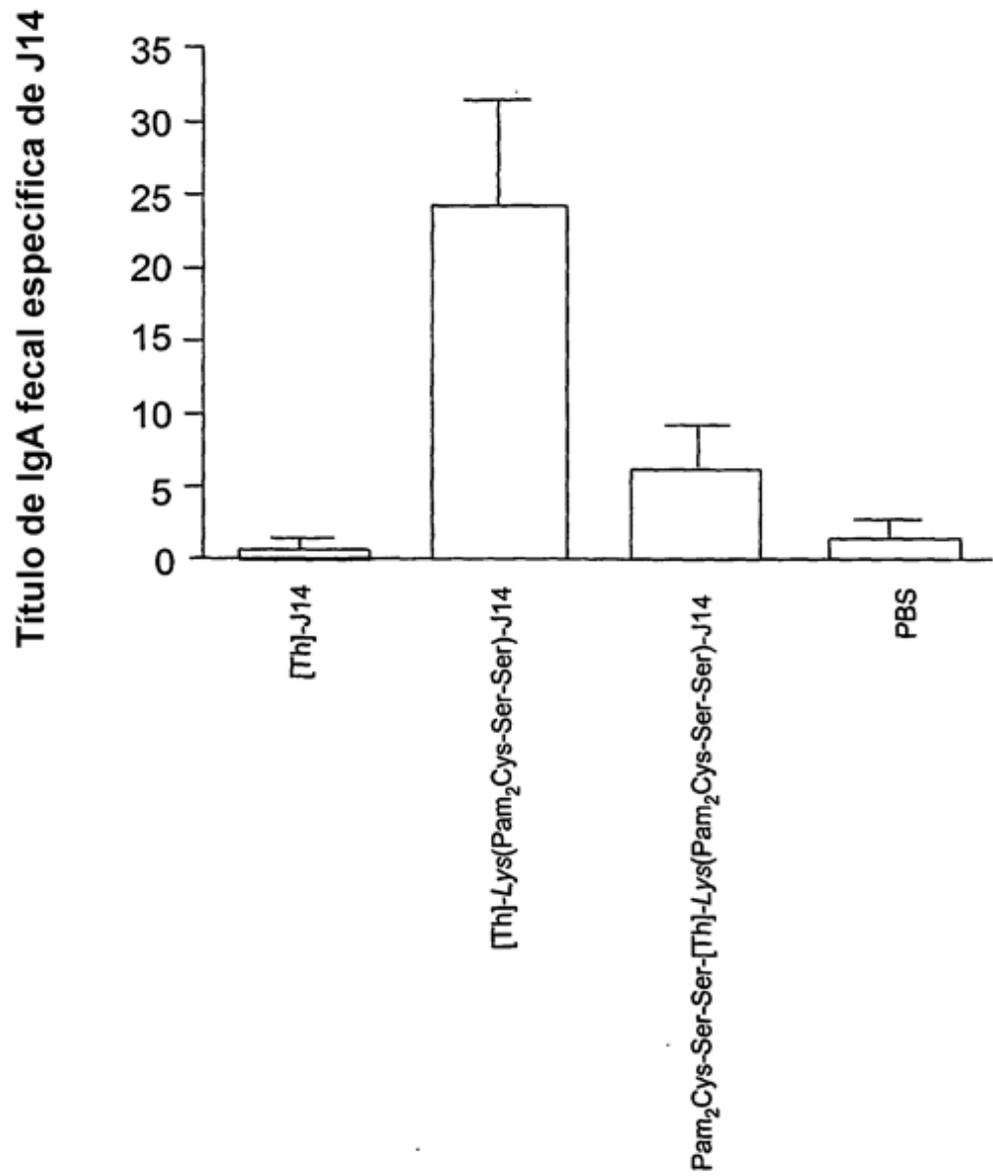
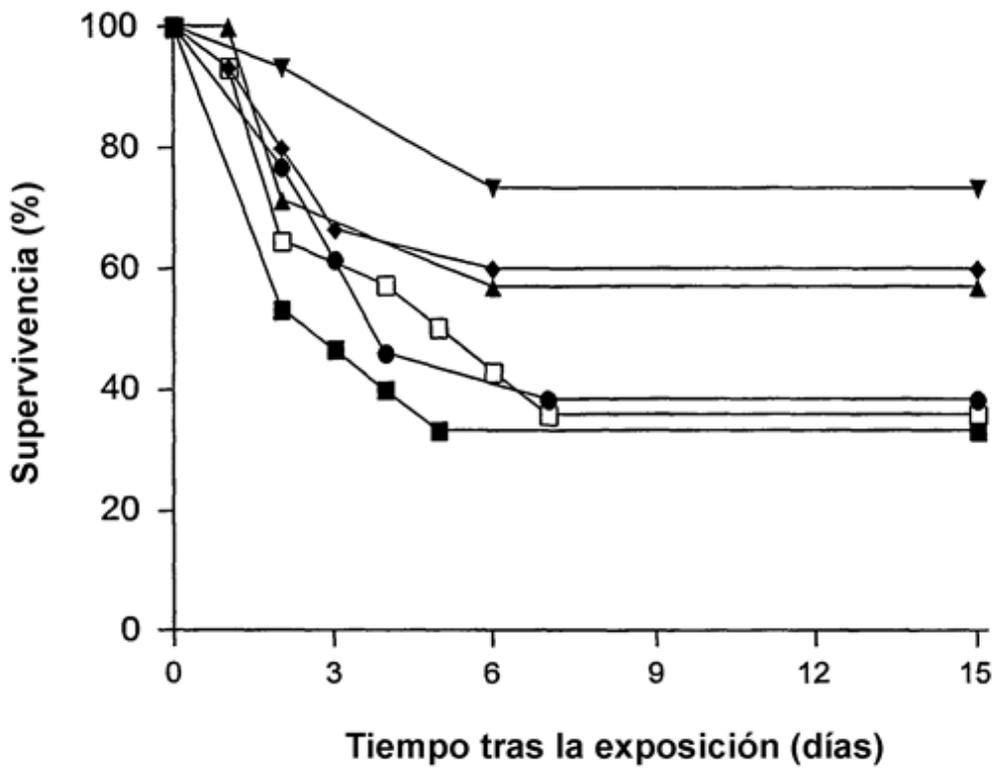


FIGURA 15



- ▼ [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-J14
- ◆ Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-J14
- ▲ [Th]-J14
- [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-LHRH
- J14
- PBS

FIGURA 16

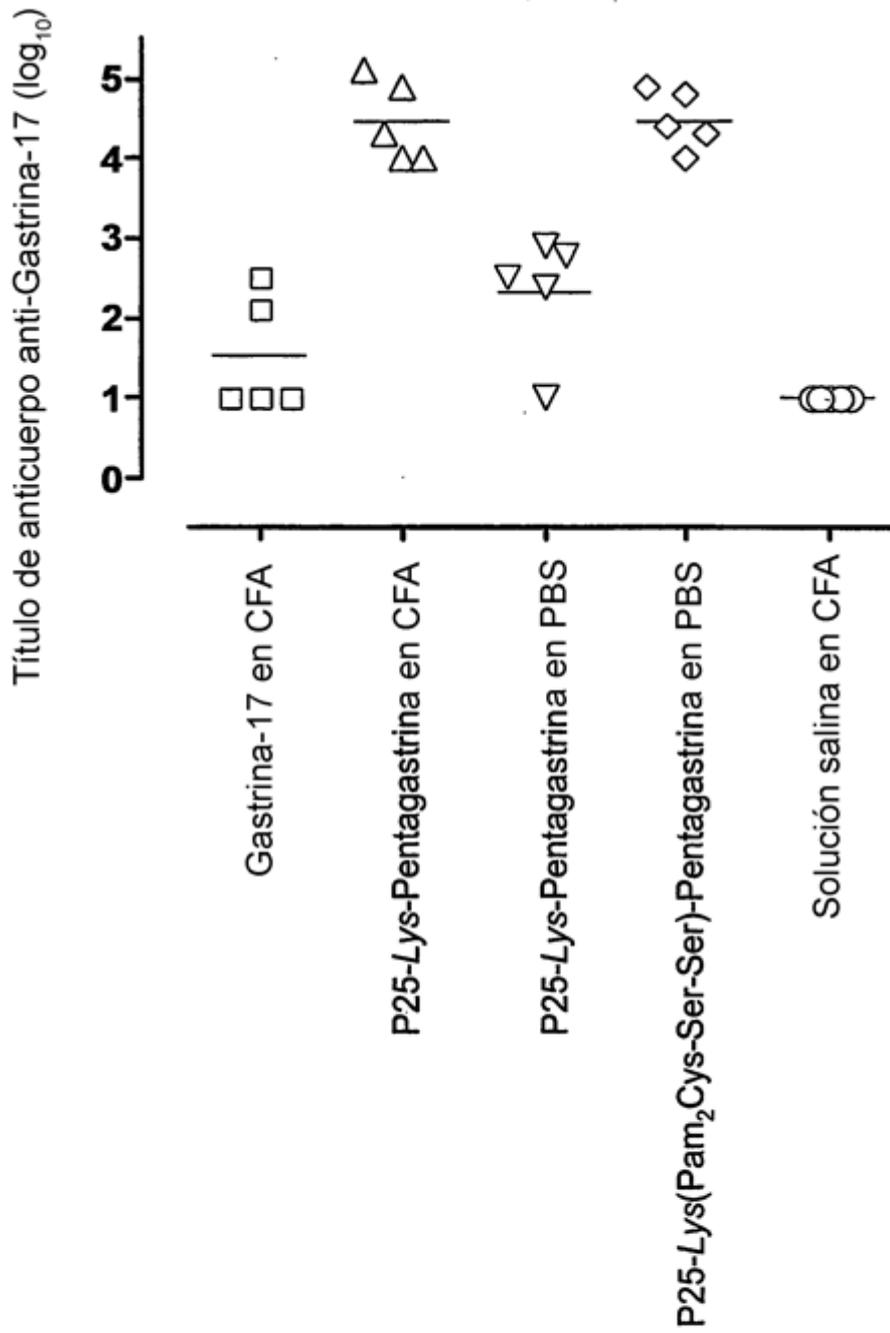


FIGURA 17