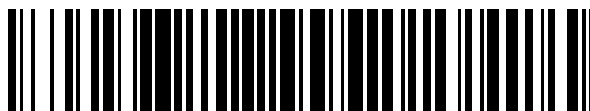


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 849**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00

(2006.01)

C12Q 1/70

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06711204 .5**

96 Fecha de presentación: **21.02.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1858548**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.11.2007**

54 Título: **Ccomposiciones de péptidos HSP60 y antígenos víricos para vacunación y diagnóstico**

30 Prioridad:
14.03.2005 US 661017 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2012

73 Titular/es:
**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD. (50.0%)
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL y
B.G. NEGEV TECHNOLOGIES AND
APPLICATIONS LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:
**COHEN, IRUN, R;
RAGER-ZISMAN, BRACHA;
PORGADOR, ANGEL y
HERKEL, JOHANNES**

74 Agente/Representante:
IZQUIERDO FACES, José

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).

ES 2 389 849 T3

DESCRIPCIÓN

Composiciones de péptidos hsp60 y antígenos víricos para vacunación y diagnóstico

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a vacunas que proporcionan inmunogenicidad potenciada que comprenden péptidos HSP60 conjugados con o mezclados con un antígeno vírico. La presente invención identifica

adicionalmente un epítipo novedoso y procedimiento de potenciación de la inmunogenicidad de un antígeno.

10 **Antecedentes de la invención**

A pesar de los sorprendentes logros en el desarrollo de vacunas para ciertas infecciones víricas (es decir, poliomielitis y sarampión) y la erradicación de virus específicos de la población humana (por ejemplo, viruela), las enfermedades víricas siguen siendo problemas médicos y para la salud pública importantes. De hecho, los virus son responsables de varias enfermedades "emergentes" (o re-emergentes) (por ejemplo, encefalitis del Nilo occidental y fiebre del dengue), y la infección vírica es una causa de morbilidad y mortalidad significativa en el mundo.

La presencia de la ayuda de linfocitos T adecuados es importante para la construcción de potentes vacunas. Las vacunas que inducen tanto linfocitos T colaboradores como CTL pueden ser más eficaces que aquellas que sólo inducen CTL. De hecho, la importancia de la colaboración entre linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se enfatiza en la vacunación terapéutica contra infección vírica crónica (Zajac y col., 1998; Matloubian y col., 1994).

Clásicamente, las vacunas se fabrican introduciendo organismos muertos o atenuados en el huésped junto con adyuvantes adecuados para iniciar la respuesta inmunitaria normal a los organismos mientras que, deseablemente, se evitan los efectos patogénicos del organismo en el huésped. El enfoque padece las muy conocidas limitaciones porque raramente es posible evitar la respuesta patogénica debido a la complejidad de la vacuna que incluye no sólo el determinante antigénico de interés, sino muchos materiales perjudiciales relacionados y sin relacionar, cualquier número de los cuales puede, en algunos o todos los individuos, inducir una reacción no deseable en el huésped.

Por ejemplo, las vacunas producidas en la forma clásica pueden incluir antígenos competitivos que son perjudiciales para la respuesta inmunitaria deseada, antígenos que incluyen respuestas inmunitarias no relacionadas, ácidos nucleicos del organismo o cultivo, endotoxinas y constituyentes de composición y fuente desconocida. Estas vacunas, generadas a partir de materiales complejos, tienen inherentemente una probabilidad relativamente alta de inducir respuestas competitivas incluso del antígeno de interés.

HSP60 pertenece a una familia de moléculas de chaperonas altamente conservada a lo largo de la evolución; una molécula de HSP60 similar está presente en todas las células, procariotas y eucariotas. La molécula de HSP60 humana se designó anteriormente HSP65, pero ahora se ha designado HSP60 en vista de la información del peso molecular más precisa; por cualquier designación, la proteína es la misma. Aparentemente, no puede existir célula sin la capacidad para expresar HSP60. HSP60 de mamífero es altamente homóloga a los cognados bacterianos, que muestran aproximadamente el 50% de identidad de aminoácidos (Jindal y col., 1989). Por tanto, HSP60 es compartida por el huésped y sus parásitos, y es inmunogénico, de reactividad cruzada y se expresa universalmente en inflamación. Además, HSP60 es bien reconocida por el sistema inmunitario (Konen Waisman y col., 1999, Konen Waisman y col., 1995) y es una parte del conjunto de auto-moléculas para las que existe autoinmunidad naturalmente; HSP60 es miembro del homúnculo inmunológico (Cohen, 1992). Choque térmico, IFN γ , infección bacteriana o vírica, e inflamación, todos producen la presentación de epítopes de HSP60 endógenos en moléculas de la clase II del MHC que conducen a la activación de linfocitos T específicos para HSP60, incluso en individuos sanos (Anderton y col., 1993; Hermann y col., 1991; Koga y col., 1989).

La patente europea EP 262 710 y la patente de EE.UU. nº 5.154.923 describen péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 171-240 y 172-192, respectivamente, de un polipéptido de 64 kD de *Mycobacterium bovis* BCG, que son útiles como inmunógenos que inducen resistencia a artritis autoinmunitaria y enfermedades autoinmunitarias similares.

La solicitud de patente PCT nº WO 90/10449 describe un péptido designado p277 que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 437-460 de la molécula de HSP65 humana que es útil como inmunógeno que induce resistencia a diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI). Un péptido de control, designado p278, correspondiente a las posiciones 458-474 de HSP65 humana, no indujo resistencia a DMDI.

Lussow y col. (1990) mostraron que la sensibilización de ratones con *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* (BCG) vivo e inmunización con el péptido sintético de la malaria repetitivo (NANP)₄₀ conjugado con derivado de proteína purificada (PPD) condujo a la inducción de altos títulos y de larga duración de anticuerpos IgG anti-péptido. Después, Lussow y col. (1991) mostraron que las proteínas de choque térmico (HSP) micobacterianas de 65 kDa (tipo GroEL) y 70 kDa (tipo ADNK) actuaron de moléculas de vehículo en ratones, previamente sensibilizadas con *Mycobacterium tuberculosis* var. *boris* (bacilo de Calmette-Guerin, BCG), para la inducción de altos títulos y de larga

duración de IgG contra el péptido sintético de la malaria repetitivo (NANP)₄₀. Los anticuerpos anti-péptido se indujeron cuando el péptido de la malaria, conjugado con la HSP micobacteriana, se administró en ausencia de cualquier adyuvante.

Barrios y col. (1992) han mostrado que ratones inmunizados con péptidos u oligosacáridos conjugados con la HSP de 70 kDa produjeron altos títulos de anticuerpos IgG en ausencia de cualquier sensibilización previa con BCG. La respuesta de anticuerpos anti-péptido persistió durante al menos 1 año. Este efecto de vehículo libre de adyuvante de la HSP de 70 kDa fue dependiente de linfocitos T, ya que no se indujeron ni anticuerpos IgG anti-péptido ni anti-70 kDa en ratones nu/nu atímicos. La inmunización previa de ratones con la HSP de 65 kDa o 70 kDa no tuvo ningún efecto negativo sobre la inducción de anticuerpos IgG anti-péptido después de la inmunización con conjugados de HSP-péptido en ausencia de adyuvantes. Además, la preinmunización con la HSP de 65 kDa podría sustituir al BCG en proporcionar sensibilización eficaz para la inducción de anticuerpos anti(NANP)₄₀. Finalmente, tanto HSP de 65 kDa como de 70 kDa actuaron de moléculas de vehículo para la inducción de anticuerpos IgG a oligosacáridos meningocócicos del grupo C, en ausencia de adyuvantes, sugiriendo que el uso de HSP como vehículos en construcciones conjugadas para la inducción de anticuerpos anti-péptido y anti-oligosacárido podría ser de valor en el diseño de nuevas vacunas para uso eventual en seres humanos.

La patente de EE.UU. nº 5.736.146 desvela conjugados de antígenos escasamente inmunogénicos con un vehículo de péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T derivado de la secuencia de la proteína de choque térmico humana HSP65, o un análogo de la misma, pudiendo dicho péptido o análogo aumentar sustancialmente la inmunogenicidad del antígeno escasamente inmunogénico. La patente 146 desvela conjugados de un péptido correspondiente a las posiciones 458-474 y 437-453 de HSP60 humana o de ratón y homólogos de la misma con una amplia variedad de antígenos que incluyen péptidos, proteínas y polisacáridos tales como polisacárido bacteriano (por ejemplo, polisacárido capsular (CPS) Vi de *Salmonella typhi*) y antígenos derivados del virus del VIH o de antígeno de la malaria.

La patente de EE.UU. nº 5.869.058 desvela conjugados de antígenos escasamente inmunogénicos, por ejemplo, péptidos, proteínas y polisacáridos, con un vehículo de péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T derivado de la secuencia de HSP65 de *E. coli* (GroEL), o un análogo de la misma, pudiendo dicho péptido o análogo aumentar sustancialmente la inmunogenicidad del antígeno escasamente inmunogénico. Un péptido adecuado según la invención es Pep278e, que se corresponde con las posiciones 437-453 de la molécula de HSP65 de *E. coli*.

El citomegalovirus humano (HCMV) es un virus de ADN bicatenario ubicuo del grupo de los betaherpesvirus; es endémico en todas las poblaciones humanas. En América del Norte, el HCMV infecta a aproximadamente el 50% de la población fuera de los centros urbanos y hasta al 90% de la población dentro de ciudades. La enfermedad del HCMV presenta dos problemas médicos principales: primero, es la infección vírica congénita más común, causando anomalías congénitas que incluyen mal desarrollo del sistema nervioso central; hasta el 25% de lactantes infectados asintomáticos desarrollarán secuelas neurológicas. Segundo, el HCMV se re-activa en pacientes inmunodeprimidos.

Una fase aguda autolimitante de la infección vírica, fases persistentes y latentes normalmente caracterizan la patogénesis de la infección por HCMV en el huésped inmunodeprimido. El desenlace clínico de la infección por HCMV se determina por la capacidad de los individuos infectados para organizar respuestas inmunitarias humores y mediadas por linfocitos T protectoras. En huéspedes inmunodeprimidos, que incluyen personas con infección por VIH, pacientes con cáncer y receptores de aloinjerto, la infección por HCMV primaria o reactivación de un virus latente produce enfermedad por HCMV multiorgánica asociada a altas tasas de morbilidad y mortalidad. Estas graves consecuencias clínicas enfatizan la necesidad de vacunas eficaces contra el HCMV para prevenir no sólo la infección primaria, sino también para limitar o prevenir la reactivación.

Actualmente no hay vacuna protectora disponible para el CMV. Los fármacos antivíricos actualmente disponibles que eligen como diana la replicación del ADN vírico son eficaces, pero presentan significativa toxicidad para el huésped y una alta tasa de resistencia espontánea.

El virus del Nilo occidental es un miembro de los Flaviviridae similares a alfa. El genoma del flavivirus es un ARN de sentido positivo monocatenario de aproximadamente 11 kb de longitud que contiene una región sin traducir en 5' (5'UTR); una región codificante que codifica las tres proteínas estructurales víricas; siete proteínas no estructurales, designada NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5; y una región sin traducir en 3' (3'UTR). Las proteínas estructurales víricas incluyen las proteínas de la cápside (C), premembrana/membrana (prM) y de la envuelta (E). Las proteínas estructurales y no estructurales se traducen como una única poliproteína. Entonces, la poliproteína se procesa por proteasas celulares y víricas.

El virus del Nilo occidental afecta a aves, además de a reptiles y mamíferos, junto con el hombre. El virus del Nilo occidental se transmite a aves y mamíferos por las picaduras de ciertos mosquitos (por ejemplo, *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*). La transmisión directa puede producirse del sujeto infectado por VNO al sujeto sano por transmisión oral (presa y transmisión por calostro) y transmisión portada por sangre/órgano. Extendido en África, la zona geográfica del VNO también incluye ahora Australia, Europa, Oriente medio, Asia occidental y EE.UU. El virus del

Nilo occidental puede producir una fuerte fiebre autolimitante, dolores corporales, hinchazón del cerebro, coma, parálisis y muerte.

No hay tratamiento eficaz para la enfermedad. Varias vacunas contra el VNO diferentes están ahora en diversas etapas de desarrollo y prueba (Monath, 2001; Pletnev y col., 2003; Tesh y col., 2002; Hall y col., 2003), pero presentemente no está disponible una vacuna humana autorizada para su prevención. La única forma actualmente eficaz para proporcionar resistencia inmediata al VNO es por administración pasiva de anticuerpos protectores (Casadevall, 2002). El control de mosquitos es considerado actualmente la estrategia práctica para combatir la extensión de la enfermedad, pero la pulverización eficaz es difícil de realizar en áreas urbanas. Claramente se necesita una vacuna eficaz para proteger a poblaciones en riesgo.

Sigue existiendo la necesidad de vacunas mejoradas que confieran protección contra infecciones víricas usando epítopes aislados. Además, se necesitan epítopes aislados para pruebas de diagnóstico mejoradas.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona composiciones adecuadas para vacunación contra infecciones víricas.

Según un aspecto, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende un antígeno y un adyuvante de péptido sintético KKARVEDALHATRAAVEEGV (Ec27; SEC ID N°: 76). Según otro aspecto, el antígeno está seleccionado del grupo que consiste en: un péptido, un derivado de péptido, una proteína, un polisacárido y un anticuerpo. Según otro aspecto más, el antígeno es un antígeno vírico. Según un aspecto, el antígeno está covalentemente unido a dicho adyuvante de péptido sintético. Según otro aspecto, la composición de vacuna comprende una mezcla del antígeno y dicho adyuvante de péptido sintético. Según otro aspecto más, dicho antígeno vírico tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 11-12, 21 y 25-44 y análogos, homólogos, derivados y sales del mismo. Según un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de potenciación de la inmunogenicidad de un antígeno que comprende conjugar covalentemente el antígeno con un vehículo de péptido sintético de SEC ID N°: 76.

La inmunogenicidad potenciada de dicho antígeno vírico puede medirse por al menos uno de lo siguiente: título del suero de anticuerpos dirigidos a dicho antígeno vírico; proliferación de linfocitos T en presencia de dicho antígeno vírico; secreción de citocinas inducida por dicho antígeno vírico; lisis mediada por linfocitos T específicos de células infectadas por virus; y reducción de la carga vírica detectable.

La invención puede proporcionar conjugados que comprenden un antígeno vírico covalentemente unido a un vehículo de péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T de HSP60. El vehículo de péptido sintético puede ser el vehículo de péptido conocido p458, un péptido limitado a la clase II del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) derivado de HSP60 murina (aa 458-474, también designado previamente p278m), o un análogo o derivado del mismo. El vehículo de péptido sintético puede ser Ec27, un péptido novedoso derivado de HSP60 de *E. coli* (GroEL, aa 391-410).

Según la presente invención, ahora se ha desvelado que los conjugados que comprenden un vehículo de péptido sintético seleccionado de Ec27 covalentemente unido a un antígeno vírico son inesperadamente eficaces en conferir inmunidad contra infecciones víricas. Ahora se ha demostrado por primera vez que estos conjugados potencian significativamente inmunidad eficaz contra el virus de tanto ADN como ARN, infecciones latentes y agudas y, cuando se combinan, con epítopes víricos limitados a CTL, linfocitos B y MHC II.

Los principios de la invención se ejemplifican por dos sistemas de modelo para infecciones víricas. La infección por el citomegalovirus de ratón (MCMV) en ratones es un sistema de modelo establecido para examinar infección humana con citomegalovirus humano (HCMV), un virus de ADN que se caracteriza por una infección latente tras una fase aguda autolimitante de infección vírica. La infección por el virus del Nilo occidental (VNO) en ratones sirve de modelo para la infección vírica aguda del VNO en seres humanos.

Puede proporcionarse un conjugado que comprende un antígeno vírico covalentemente unido a un vehículo de péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T de HSP60 en el que dicho vehículo de péptido sintético está seleccionado del grupo de péptidos que consiste en:

- (a) NEDQKIGIEIIKRTLKI (p458h; SEC ID N°: 1),
- (b) NEDQKIGIEIIKRALKI (p458; SEC ID N°: 2),
- (c) EGDEATGANIVKVALEA (p458mt; SEC ID N°: 3),
- (d) NEDQNVGIKVALRAMEA (p458e; SEC ID N°: 4),
- (e) un análogo de p458h (SEC ID N°: 1) que tiene al menos el 70% de la característica eléctrica y de hidrofilia/hidrofobia de HSP60 humana de la posición 458 a la posición 474, pudiendo dicho péptido o análogo aumentar sustancialmente la inmunogenicidad del antígeno vírico cuando el conjugado se administra *in vivo*, y derivados del mismo,
- (f) KKARVEDALHATRAAVEEGV (Ec27; SEC ID N°: 76) y análogos, fragmentos y derivados del mismo.

El péptido sintético puede ser un análogo de p458h (SEC ID N°: 1): ⁴⁵⁸NEDQKIGIEIHKRTLK⁴⁷⁴ en el que el residuo E⁴⁵⁹ es tanto E como D; el residuo D⁴⁶⁰ es tanto D como E; el residuo K⁴⁶² es tanto K como R u ornitina (Orn); el residuo I⁴⁶³ es tanto I como L, V, M, F, norleucina (Nle) o norvalina (Nva); el residuo I⁴⁶⁵ es tanto I como L, V, M, F, Nle o Nva; el residuo E⁴⁶⁶ es tanto E como D; el residuo I⁴⁶⁷ es tanto I como L, V, M, F, Nle o Nva; el residuo I⁴⁶⁸ es tanto I como L, V, M, F, Nle o Nva; el residuo K⁴⁶⁹ es tanto K como R como Orn; el residuo R⁴⁷⁰ es tanto R, K como Orn; el residuo L⁴⁷² es tanto L como I, V, M, F, Nle o Nva; el residuo K⁴⁷³ es tanto K como R u Orn; y el residuo I⁴⁷⁴ es tanto I como L, V, M, F, Nle o Nva.

Un péptido adyuvante novedoso derivado de la proteína HSP60 de *E. coli* (GroEL) es útil para las composiciones y procedimientos de la invención. El péptido adyuvante novedoso, en el presente documento designado Ec27, tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 391-410 de GroEL (correspondientes al número de acceso gi:45686198 sin el primer residuo de metionina, SEC ID N°: 83), del siguiente modo: KKARVEDALHATRAAVEEGV (SEC ID N°: 76). El péptido humano correspondiente presenta el 80% de homología, que tiene la secuencia expuesta en SEC ID N°: 86, del siguiente modo: KKDRVTDALNATRAAVEEGI (Ec27h). También pueden contemplarse análogos, fragmentos, derivados, conjugados y sales de Ec27.

Ahora se ha demostrado por primera vez que el péptido Ec27 aumenta significativamente la inmunogenicidad de una amplia matriz de antígenos que incluyen, pero no se limitan a, antígenos víricos, antígenos bacterianos y antígenos de mamífero, por ejemplo, antígenos de péptidos víricos, polisacáridos bacterianos y anticuerpos. Se encontró sorprendentemente que Ec27 aumenta la inmunogenicidad de antígenos cuando se conjuga covalentemente con el antígeno, además de cuando se mezcla con el antígeno. Inesperadamente, Ec27 podría incluso aumentar adicionalmente la inmunogenicidad de antígenos de la invención conjugados con los vehículos p458.

En otra realización, la invención proporciona además composiciones de vacuna que comprenden un antígeno y un adyuvante de péptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 76. En diversas realizaciones, el antígeno está seleccionado del grupo que consiste en: un péptido, un derivado de péptido, una proteína, un polisacárido (por ejemplo, un polisacárido bacteriano) y un anticuerpo. En una realización, la composición de vacuna comprende un conjugado del adyuvante de péptido y dicho antígeno. En realizaciones alternativas, dicha composición de vacuna comprende una mezcla de dicho adyuvante de péptido y dicho antígeno.

En otro aspecto, el antígeno vírico usado en los conjugados y composiciones comprende al menos un epítipo seleccionado de: un epítipo de CTL (un epítipo de linfocitos T limitado a MHC I), un epítipo de linfocitos B y un epítipo de linfocitos T limitado a MHC II.

El antígeno vírico usado en los conjugados puede derivarse de cualquier virus de interés. En ciertas realizaciones, el virus pertenece a la familia herpesviridae. El virus puede pertenecer a la subfamilia de betaherpesvirus. El antígeno vírico puede derivarse de la proteína del gen temprano inmediato 1 (IE-1) de un virus que pertenece a herpesviridae. El antígeno vírico puede comprender un epítipo de CTL. El virus puede ser CMV. El antígeno vírico puede derivarse de la proteína del gen temprano inmediato 1 (IE-1) del CMV. El antígeno vírico puede comprender un epítipo de CTL.

El virus puede pertenecer a la familia Flaviviridae. El virus puede pertenecer al género flavivirus. El virus pueden seleccionarse del grupo que consiste en: virus del Nilo occidental (VNO), virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis de san Luis, virus de la encefalitis del valle de Murray, virus de Kunjin, virus de la encefalitis japonesa, virus del dengue tipo 1, virus del dengue tipo 2, virus del dengue tipo 3 y virus del dengue tipo 4. El antígeno vírico puede derivarse del virus del Nilo occidental (VNO).

El antígeno vírico puede derivarse de la proteína de la envuelta (E) de un virus que pertenece a la familia flaviviridae. El antígeno vírico puede derivarse del dominio E3 de dicha proteína. Dicho antígeno vírico puede comprender un epítipo de linfocitos B y un epítipo limitado a MHC II. El antígeno vírico puede derivarse de la proteína de la envuelta (E) del VNO. El antígeno vírico puede derivarse del dominio E3 de dicha proteína. Dicho antígeno vírico puede comprender un epítipo de linfocitos B y un epítipo limitado a MHC II.

Otras realizaciones de la presente invención se refieren a antígenos de péptidos víricos aislados novedosos que se usan en conjugación con los vehículos de la invención para la vacunación antivírica como se especifica en el presente documento.

Puede proporcionarse un novedoso antígeno de péptido derivado del dominio E3 del VNO de la proteína E, designada por este documento p15, que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 355-369 de la proteína E. Dependiendo de la cepa de VNO particular, este antígeno novedoso tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: LVTVPFVSVATANS (SEC ID N°: 11) y LVTVPFVSVATANA (SEC ID N°: 12); y análogos, homólogos, fragmentos y derivados de la misma. Pueden proporcionarse proteínas, péptidos y conjugados que comprenden dicho antígeno. El péptido puede tener una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 34-35 (véase la Tabla 1).

Puede proporcionarse un antígeno de péptido homólogo de p15 derivado del dominio E3 de la proteína de la envuelta de un flavivirus seleccionado del grupo que consiste en: el virus del Nilo occidental (VNO), virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis de san Luis, virus de la encefalitis del valle de Murray, virus de Kunjin, virus de la encefalitis japonesa, virus del dengue tipo 1, virus del dengue tipo 2, virus del dengue tipo 3 y virus del dengue tipo 4. El antígeno homólogo de p15 puede tener una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 25-33 y 36-44 (véase la Tabla 1), y análogos, homólogos, fragmentos y derivados del mismo.

Puede proporcionarse un segundo antígeno de péptido del VNO novedoso derivado de la proteína E, denotada en el presente documento p17, que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: YIVVGRGEQQINHHWHK (SEC ID N°: 21) y análogos, homólogos, fragmentos y derivados de la misma.

En otra realización se proporcionan conjugados que comprenden un vehículo de péptido sintético de la invención y un antígeno vírico que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 11-12 y 34-35 y análogos, homólogos, fragmentos y derivados del mismo covalentemente unido a un vehículo de péptido sintético de la invención. El conjugado puede tener una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 13-16, 65-66 y 77-78. En otras realizaciones, los conjugados de la invención comprenden un antígeno vírico que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 25-33 y 36-44 covalentemente unido a un vehículo de péptido sintético de la invención. El conjugado puede tener una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 56-64 y 67-75. En otras realizaciones, los conjugados de la invención comprenden un antígeno vírico que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 21 covalentemente unido a un vehículo de péptido sintético de la invención. El conjugado puede tener una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 23-24 y 79 (véase la Tabla 4).

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones de vacuna que comprenden los conjugados de la invención y un vehículo, adyuvante, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la invención proporciona composiciones de vacuna que comprenden un antígeno vírico en mezcla con Ec27 y un vehículo, adyuvante, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la invención proporciona composiciones de vacuna que comprenden los novedosos antígenos de péptidos víricos aislados de la invención y un vehículo, adyuvante, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto más, la invención proporciona procedimientos para aumentar la inmunogenicidad de un antígeno vírico que comprende ligar el antígeno con un vehículo de péptido sintético de la invención.

Pueden proporcionarse procedimientos para inmunizar un sujeto en necesidad de los mismos contra una infección vírica que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición de vacuna que comprende un conjugado de la invención y un vehículo, adyuvante, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La composición de vacuna puede administrarse a dicho sujeto antes de la exposición de dicho sujeto al virus o después de exposición de dicho sujeto a dicho virus.

Los procedimientos pueden comprender:

- (a) aislar un antígeno vírico que comprende al menos un epítipo seleccionado de: un epítipo de CTL, un epítipo de linfocitos B y un epítipo limitado a MHC II;
- (b) conjugar dicho antígeno vírico con un vehículo de péptido sintético de la invención para formar un conjugado de péptido-vehículo; y
- (c) administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición de vacuna que comprende el conjugado y un vehículo, adyuvante, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones y procedimientos pueden ser adecuados para vacunar un sujeto seleccionado de un grupo que consiste en: seres humanos, mamíferos no humanos y animales no mamíferos.

Otros aspectos pueden referirse a kits y procedimientos de diagnóstico que utilizan los novedosos antígenos de péptidos víricos aislados para determinar la exposición de un sujeto a un flavivirus.

Puede proporcionarse un kit de diagnóstico que comprende al menos un antígeno de péptido vírico de la invención y medios para detectar si el antígeno de péptido está específicamente unido a una muestra biológica adecuada.

La invención puede proporcionar procedimientos para diagnosticar la exposición de un sujeto a un flavivirus y para diagnosticar una infección por flavivirus en un sujeto, que comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto una muestra biológica adecuada con un antígeno vírico que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 11-12, 25-44 y 21 y análogos, homólogos, derivados y sales del mismo en condiciones tales que pueda producirse una reacción inmunitaria;
- (b) determinar el grado de unión de antígeno específica a la muestra biológica, en el que un nivel

significativamente superior al nivel obtenido para una muestra obtenida de un sujeto no infectado es indicativo de exposición del sujeto al flavivirus.

Los kits y procedimientos de diagnóstico pueden ser útiles para el diagnóstico diferencial de una infección por flavivirus.

Estas y otras realizaciones de la presente invención serán evidentes conjuntamente con las figuras, descripción y reivindicaciones que siguen.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Cinética de infección por MCMV en bazo y glándula salival (GS) de ratones BALB/c. Los ratones se expusieron i.p. a 5×10^4 ufc de MCMV. **A.** Se midieron los títulos de virus infeccioso en bazo y glándula salival en diferentes momentos de tiempo después de la infección (calculado como $\log_{10}$ ufc/0,1 g de tejido). Los datos representan el promedio de 5 experimentos. **B.** Amplificación por PCR del producto de 356 pb de ADN de gB del MCMV en bazo y glándula salival en diferentes momentos de tiempo después de la infección. Los resultados son de 1 experimento representativo de 3 realizados.

Figura 2. La eficacia de la vacuna de p458-89pep. **A.** El diseño experimental. **B.** Títulos de MCMV infecciosos en glándula salival 14, 21 y 28 días después de la exposición. Los datos representan el título promedio ($\pm$ EE) de las glándulas salivales de 3 ratones individuales de cada grupo. En glándulas salivales de ratones inmunizados con p458-89pep, los títulos de virus en el día 28 (asteriscos) estuvieron por debajo de la detección (es decir, $< 2 \log_{10}$ ufc/0,1 g de tejido). **C.** Amplificación por PCR del producto de 356 pb de gB del MCMV. Se extrajo ADN mensajero de glándulas salivales de ratones inmunizados en el día 28 después de la exposición al MCMV. Inmunización con: a. IFA solo sin exposición; b. IFA solo; c. 89pep; d. p458-89pep; e. control-89pep; f. mezcla de PCR sin ADN mensajero (control de PCR negativo). Los resultados son de 1 experimento representativo de 2 realizados.

Figura 3. Secreción de IFN γ de cultivos de células del bazo y glándula salival (GS) de ratones infectados por MCMV. Se prepararon cultivos de células del bazo (Fig. 3A) y células mononucleares de la glándula salival fraccionada (Fig. 3B) en diferentes días después de la infección por el virus como se describe en los procedimientos. La secreción de IFN γ en sobrenadante se midió por ELISA después de 3 días de cultivo con (cuadrados) o sin (círculos) estimulación de 89pep (10 μ g/ml) *in vitro*. Los datos representan el promedio ($\pm$ EE) de 3 experimentos.

Figura 4. Niveles de IFN γ de cultivos de células del bazo después de la vacunación con p458-89pep. Se prepararon cultivos de células del bazo 10 días después de la vacunación con los diversos péptidos o después de la exposición de ratones sin tratamiento previo al MCMV. Un grupo de control recibió IFA sin ningún péptido. La secreción de IFN γ en sobrenadantes se midió por ELISA después de 3 días de estimulación *in vitro* con p458, 89pep (10 μ g/ml) o sin estimulación (Sin estim). Los datos representan el promedio de 6 experimentos ($\pm$ EE). * $p \leq 0,05$ en comparación con p458-89pep, prueba de la t bilateral.

Figura 5. Células del bazo positivas para IFN γ después de la vacunación con p458-89pep. Se prepararon cultivos de células del bazo 7 días después de la vacunación con diversos péptidos, o después de la exposición de ratones sin tratamiento previo al MCMV. Después de 5 días de estimulación *in vitro* con 89pep o sin estimulación (Sin estim), las células se tiñeron para marcadores de CD4 (Fig. 5A) o CD8 (Fig. 5B) y para IFN γ . Los números (27,43, 9,89 y 0,41) son el porcentaje de células IFN γ^+ en células CD8 $^+$ totales. Los resultados son de 1 experimento representativo de 2 realizados.

Figura 6. Actividad de CTL en cultivos de células del bazo después de la vacunación con p458-89pep. Se prepararon cultivos de células del bazo 7 días después de la inmunización con diversos péptidos o después de la exposición de ratones sin tratamiento previo al MCMV. Un grupo de control recibió IFA sin ningún péptido. La actividad de CTL se midió después de 6 días de estimulación *in vitro* con 89pep (10 μ g/ml). Las células diana fueron P815 pulsadas con 89pep (1 μ g/ml). La relación E:T es 25:1. Los datos representan el promedio ($\pm$ EE) de 3 experimentos diferentes.

Figura 7. Células mononucleares de glándulas salivales positivas para IFN γ 28 días después de la exposición al MCMV de ratones vacunados. Se vacunaron ratones y luego se expusieron al MCMV. Las células se tiñeron para CD8 y para IFN γ . Sin estimulación (Sin estim) o estimulación con 89pep (89pep) se refiere a la presencia de 89pep durante la incubación de 8 h con etapa de parada de golgi en el protocolo de

ICCS para IFN γ . Los resultados son de 1 experimento representativo de 2 realizados.

Figura 8. Reconocimiento de péptidos por IVIG-IL. Se recubrieron pocillos con los diferentes péptidos (1 μ g/pocillo) o con Ag de VNO (dilución 1:700). Después de bloquear y lavar, IVIG-IL se añadió a dilución 1:40 y la

unión se detectó como se describe en los procedimientos (ELISA). La referencia de ELISA (sin péptido en el pocillo, DO 0,078 a DO 0,120 en diferentes experimentos) se restó de cada punto experimental. Los resultados son el promedio de 4 experimentos de ELISA independientes. Barras, $\pm$ DE.

Figura 9. Reconocimiento de péptidos por suero de ratones infectados por VNO. Se recubrieron pocillos con los diferentes péptidos (1 μ g/pocillo) o con Ag de VNO (dilución 1:700). Después de bloquear y lavar se añadieron sueros murinos sin tratamiento previo (columnas grises) o infectados por VNO (columnas blancas) a dilución 1:40 y la unión se detectó como se describe en los procedimientos (ELISA). Los resultados son de 1 experimento representativo de 3 realizados. Cada punto experimental se realizó por triplicado. Barras, $\pm$ DE.

Figura 10. Proliferación de esplenocitos de ratones infectados por VNO tras la estimulación *in vitro* con los diferentes péptidos. Se infectaron ratones con 66 ufc de VNO. Seis días después, los bazo se recogieron y los esplenocitos se cultivaron con los diferentes péptidos (10 μ g/ml) o con ConA (5 μ g/ml) durante 3 días. La proliferación de células derivadas de ratones sin tratamiento previo (columnas grises) o infectados por VNO (columnas blancas) se midió usando el procedimiento de WST-1. Los resultados son el promedio de 3 experimentos de proliferación independientes. Barras, $\pm$ DE.

Figura 11. Ab anti-VNO en los sueros de ratones inmunizados con diferentes péptidos o con Ag de VNO. (A) Se inmunizaron ratones 3 veces con los diferentes péptidos o Ag de VNO a intervalos de 7 días. Siete días después de la 3ª inmunización, los ratones se sangraron y los sueros se probaron del siguiente modo. Los pocillos se recubrieron con Ag de VNO (dilución 1:700). Después de bloquear y lavar, los diferentes sueros se añadieron a dilución 1:40 y la unión se detectó como se describe en los procedimientos (ELISA). Los resultados son el promedio de 4 experimentos de ELISA independientes. Barras, $\pm$ DE. (B) Isotipos de anticuerpos anti-VNO.

Figura 12. Proliferación de esplenocitos de ratones inmunizados con p32 tras la estimulación *in vitro* con los diferentes péptidos. Se inmunizaron ratones 3 veces con p32 a intervalos de 7 días. Siete días después de la 3ª inmunización, los bazo se recogieron y los esplenocitos se cultivaron con los diferentes péptidos o Ag de VNO (10 μ g/ml) o con ConA (5 μ g/ml) durante 3 días. La proliferación celular se midió usando el procedimiento de WST-1. Los resultados son el promedio de 3 experimentos de proliferación independientes. Barras, $\pm$ DE.

Figura 13. Secreción de IFN γ en los bazo de ratones vacunados con p32 en el día 7 después de la inmunización. Se inmunizaron ratones 3 veces con p32 a intervalos de 7 días. Siete días después de la 3ª inmunización, los bazo se recogieron y los esplenocitos se cultivaron con los diferentes péptidos o Ag de VNO (10 μ g/ml) o con ConA (5 μ g/ml) durante 3 días. Los niveles de IFN γ en los sobrenadantes se midieron como se describe en los procedimientos. Los resultados son el promedio de 4 experimentos de proliferación independientes. Barras, $\pm$ DE.

Figura 14. p458-89pep reduce la carga vírica de ratones infectados por MCMV. A. El diseño experimental. B. Amplificación por PCR del producto de 363 pb del IE-1 del MCMV.

Figura 15. Cargas víricas tras la inmunización de p32 y la exposición a VNO.

Figura 16. Proliferación y secreción de IFN- γ de esplenocitos de ratones inmunizados por conjugados Ec27-p15 tras la estimulación *in vitro* con p15.

Figura 17. Reconocimiento específico de p15 (A, B) y p17 (B) por sueros de pacientes humanos infectados por VNO.

Figura 18. Respuesta proliferativa de células del ganglio linfático de BALB/c a péptidos GroEL solapantes después de la inmunización con bacterias *E. coli* (A) o GroEL (B)

Figura 19. Respuesta proliferativa de células del ganglio linfático de BALB/c a inmunización con el péptido Ec27

Figura 20. Respuesta proliferativa de diferentes cepas de ratón a inmunización con el péptido Ec27. Se inmunizaron ratones BALB/c (A), BALB/k (B), y BALB/b (C) y SJL (D) s.c. con 20 mg del péptido Ec27 emulsionado en IFA. Diez días después, las células del ganglio linfático (2×10^5 células por pocillo) se evaluaron para la proliferación específica para el péptido Ec27 (círculos negros), el péptido Ec35 (círculos blancos), o el péptido de receptor acetilcolina 259-271 (triángulos blancos). Después de 96 horas de incubación, la incorporación de 3 H-timidina se evaluó como una medida de la proliferación. Los resultados se muestran como cpm medias de pocillos cuádruples. Se indican las desviaciones estándar.

Figura 21. Efecto adyuvante del péptido Ec27. (A) reactividad anti-PAb-246; (B) reactividad anti-p53.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona novedosos conjugados que comprenden un antígeno vírico ligado covalentemente a un vehículo de péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T de HSP60. El vehículo es Ec27, un péptido novedoso derivado de *E. coli* GroEL (aa 391-410). La invención proporciona composiciones de vacuna que comprenden los conjugados de la invención.

La presente invención desvela inesperadamente que una composición de vacuna que comprende un conjugado de un antígeno vírico y un vehículo de péptido derivado de Ec27 es altamente eficaz en conferir inmunidad protectora contra una infección vírica *in vivo*. Ahora se ha demostrado por primera vez que Ec27 potencia la inmunidad eficaz incluso para conjugados que comprenden antígenos que no son escasamente inmunogénicos. Se encontró que el vehículo de péptidos de la invención potenciaba la inmunogenicidad del antígeno vírico al menos dos veces en comparación con el péptido sin el péptido HSP60.

La presente invención se basa, en parte, en estudios de la vacunación con el conjugado de p458-antígeno vírico para el tratamiento de una infección por citomegalovirus (CMV) crónica (latente) asociada a persistencia del virus en las glándulas salivales. Un conjugado que comprende 89pep, un antígeno derivado de la proteína del gen 1 temprano inmediato (IE-1) del CMV murino (MCMV), fusionado con p458, fue más eficaz que 89pep en inducir secreción de IFN γ específica para 89pep y actividad de CTL específica. El péptido quimérico p458-89pep indujo secreción de IFN γ sostenida en la glándula salival específica para 89pep y solo esta inmunización se asoció a la eliminación del virus de la glándula salival.

La presente invención también se basa, en parte, en estudios de la vacunación con el conjugado de p458-antígeno vírico y Ec27-antígeno vírico contra una infección vírica aguda por el virus del Nilo occidental (VNO). Un conjugado que comprende p15, un antígeno novedoso derivado de la proteína de la envuelta (E) del VNO, fusionado con p458 pudo, tras la inmunización, reducir significativamente la mortalidad asociada a la infección, mientras que la inmunización con p15 solo sólo pudo afectar moderadamente la tasa de mortalidad. El conjugado fue más eficaz que el antígeno vírico solo en inducir anticuerpos neutralizantes específicos para VNO, además de la proliferación de linfocitos T específica para VNO y la secreción de IFN γ . El conjugado de Ec27-p15 también fue más eficaz que p15 solo en inducir la proliferación de linfocitos T específica para p15 y secreción de IFN γ .

Por tanto, los conjugados de la invención demuestran en el presente documento que son eficaces contra tanto virus de ADN como de ARN, infecciones latentes y agudas y, cuando se combinan, con epítopes víricos limitados a CTL, linfocitos B y MHC II.

Se encontró que Ec27, un péptido adyuvante novedoso derivado de la proteína HSP60 de *E. coli* (GroEL), aumentaba significativamente la inmunogenicidad de una amplia matriz de antígenos que incluye, pero no se limita a, antígenos víricos, antígenos bacterianos y antígenos de mamífero, por ejemplo, antígenos de péptidos víricos, polisacáridos bacterianos y anticuerpos. Se encontró sorprendentemente que Ec27 aumentaba la inmunogenicidad de antígenos cuando se conjugaron covalentemente con el antígeno, además de cuando se mezclaron con el antígeno. Inesperadamente, Ec27 podría incluso aumentar adicionalmente la inmunogenicidad de antígenos conjugados con los vehículos de p458. Ec27 tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 391-410 de GroEL (correspondiente al número de acceso gi:45686198 sin el primer residuo de metionina, SEC ID N°: 83), del siguiente modo: KKARVEDALHATRAAVEEGV (SEC ID N°: 76).

Puede proporcionarse un conjugado que comprende un antígeno vírico covalentemente unido a un vehículo de péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T de HSP60 en el que dicho vehículo de péptido sintético está seleccionado del grupo de péptidos que consiste en:

- (a) NEDQKIGIEIIKRTLKI (p458h, derivado de HSP60 humana; SEC ID N°: 1),
- (b) NEDQKIGIEIIKRALKI (p458, derivado de HSP60 de ratón; SEC ID N°: 2),
- (c) EGDEATGANIVKVALEA (p458mt, derivado de HSP60 de *M. tuberculosis*; SEC ID N°: 3),
- (d) NEDQNVGIIKVALRAMEA (p458e, derivado de HSP60 de *E. coli*; SEC ID N°: 4. Debe observarse que la secuencia de aminoácidos de p458e se corresponde con las posiciones 432-448 de SEC ID N°: 83)
- (e) un análogo de p458h (SEC ID N°: 1) que tiene al menos el 70% de la característica eléctrica y de hidrofilia/hidrofobia de HSP60 humana de la posición 458 a la posición 474, pudiendo dicho péptido o análogo aumentar sustancialmente la inmunogenicidad del antígeno vírico cuando el conjugado se administra *in vivo*,
- (f) KKARVEDALHATRAAVEEGV (Ec27, derivado de HSP60 de *E. coli*; SEC ID N°: 76).

Los vehículos de péptido activos se caracterizan por estar altamente cargados, es decir, de propiedades eléctricas fuertes (7 de los 17 residuos de aminoácidos constituyentes de p458 están tanto negativamente como positivamente cargados) y ser altamente hidrófobos (6 residuos de aminoácidos). El péptido p458h se caracteriza adicionalmente por poseer un dominio del extremo N negativamente cargado polar, un dominio del extremo C positivamente cargado polar y un núcleo altamente hidrófobo. Estas características globales deben mantenerse con el fin de preservar la eficacia. Por tanto, siguiendo el esquema general anterior, cierta sustitución de aminoácidos conducirá a péptidos activos. Más específicamente, las posiciones 6, 8, 10, 11, 15 y 17 en la cadena de péptidos p458 (correspondiente a las posiciones 463, 465, 467, 468, 472 y 474 de la molécula de HSP60 humana) pueden

acoplarse por tanto I o L como por otros aminoácidos hidrófobos, naturales, tales como V, M, o F, o aminoácidos no naturales, tales como norleucina (Nle) o norvalina (Nva). Las posiciones 5, 12, 13 y 16 en la cadena de p458h (correspondientes a las posiciones 462, 469, 470 y 473 de la molécula de HSP60 humana) pueden ocuparse por tanto K o R como por aminoácidos positivamente cargados no naturales, tales como ornitina (Orn). El intercambio de E y D también puede conducir a derivados activos.

Con respecto al vehículo de péptidos, el término "análogos" se refiere a péptidos obtenidos por sustitución, delección o adición de residuos de aminoácidos a la secuencia, que opcionalmente incluye el uso de un residuo químicamente derivatizado en lugar de un residuo no derivatizado, en tanto que tengan la capacidad de potenciar sustancialmente la inmunogenicidad de moléculas de antígeno vírico. Análogos, en el caso de p458, son péptidos de forma que se conserve al menos el 70%, preferentemente el 90-100%, de las propiedades eléctricas y de la hidrofobia de la molécula de péptido. Estos péptidos pueden obtenerse, sin limitación, según las instrucciones en el párrafo anterior en este documento. Los análogos de Ec27 pueden tener al menos aproximadamente el 70%, o al menos aproximadamente el 80-90%, de similitud en su secuencia de aminoácidos de Ec27. Por ejemplo, el péptido humano correspondiente, que tiene la secuencia expuesta en SEC ID N°: 86 (KKDRVTDALNATRAAVEEGI, Ec27h), presenta el 80% de identidad de aminoácidos con Ec27.

Los términos "covalentemente unido" y "conjugado" como se usan en el presente documento se refieren a un conjugado que comprende un antígeno y un vehículo de péptido sintético ligado tanto como un péptido de fusión continuo como por medio de conjugación química (tanto directamente como por un espaciador), usando procedimientos muy conocidos en la técnica.

Por "sustancialmente creciente", la inmunogenicidad de una molécula de antígeno vírico indica que comprende tanto la inducción de un aumento en el nivel de anticuerpos (Ab) contra dicho antígeno, además de la presentación de dichos anticuerpos como principalmente del isotipo IgG. Alternativamente, el término puede representar un aumento en la respuesta de linfocitos T específica para antígeno, como se mide tanto como el aumento de la actividad de CTL (lisis dependiente de antígeno) como por el aumento de la proliferación de linfocitos T específica para antígeno o secreción de citocinas (por ejemplo, citocinas Th1 tales como IFN γ). Ejemplos no limitantes para medir el nivel de Ab específico y respuesta de linfocitos T específica para antígeno se presentan en los ejemplos en el presente documento más adelante.

El antígeno vírico puede comprender al menos un epítipo seleccionado de: un epítipo de CTL (un epítipo de linfocitos T limitado a MHC I), un epítipo de linfocitos B y un epítipo de linfocitos T limitado a MHC II. Los procedimientos para identificar epítopes candidatos adecuados están dentro de las capacidades de aquellos expertos en la materia (por ejemplo, sin limitación, usando software de predicción de epítopes).

El antígeno vírico usado en los conjugados puede derivarse de cualquier virus de interés. En ciertas realizaciones, el virus pertenece a la familia herpesviridae. Esta familia incluye, pero no se limita a, virus humanos tales como virus del herpes 1 humano (VHH-1, también conocido como virus del herpes simple 1, VHS1), VHH-2 (VHS2), VHH-3 (virus de la varicela zóster, VVZ), VHH-4 (virus de Epstein-Barr, VEB), VHH-5 (citomegalovirus, CMV), VHH-6, VHH-7 y VHH-8.

El virus puede pertenecer a la subfamilia de betaherpesvirus (por ejemplo, CMV y VEB). El virus puede ser CMV. El antígeno vírico puede derivarse de la proteína del gen 1 temprano inmediato (IE-1) de un virus del herpes. El antígeno vírico puede derivarse de la proteína del gen 1 temprano inmediato (IE-1) de un CMV. El antígeno vírico puede derivarse de la proteína de IE-1 que comprende un epítipo de CTL.

El virus puede pertenecer a la familia Flaviviridae. Esta familia contiene actualmente tres géneros, los flavivirus (por ejemplo, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa, dengue, fiebre amarilla y virus tales como virus Modoc y de Uganda), los pestivirus (por ejemplo, diarrea vírica bovina, enfermedad de Border) y los virus de la hepatitis C (por ejemplo, virus de la hepatitis C, VHC).

El virus puede seleccionarse del grupo que consiste en: el virus del Nilo occidental (VNO), virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis de san Luis, virus de la encefalitis del valle de Murray, virus de Kunjin, virus de la encefalitis japonesa, virus del dengue tipo 1, virus del dengue tipo 2, virus del dengue tipo 3 y virus del dengue tipo 4. El antígeno vírico puede derivarse del virus del Nilo occidental (VNO). El antígeno vírico puede derivarse de la proteína de la envuelta (E) del VNO. El antígeno vírico puede derivarse del dominio E3 de dicha proteína. Dicho antígeno vírico puede comprender un epítipo de linfocitos B y un epítipo limitado a MHC II.

Puede proporcionarse un antígeno novedoso derivado del dominio E3 del VNO de proteína E, designado por este documento p15, correspondiente a los aa 355-369 de la proteína E. El antígeno tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 11 y 12 (LVTNPFVSVATANS y LVTNPFVSVATANA, respectivamente). En otras realizaciones, la invención puede proporcionar proteínas, péptidos y conjugados que comprenden dicho antígeno. Por ejemplo, dicho antígeno puede conjugarse con un vehículo o adyuvante de péptido o de lípido.

En otra realización, los conjugados de la invención comprenden un antígeno vírico que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 11 y 12 covalentemente unido a un vehículo de péptido sintético de la invención. El conjugado puede tener una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 13 (NEDQKIGIEIKRALKILVTNPFVSVATANS),

14 (NEDQKIGIEHKRALKILVTNPFVSVATANA),
15 (NEDQKIGIEIKRTLKILVTNPFVSVATANS),
16 (NEDQKIGIEIKRTLKILVTNPFVSVATANA),
77 (KKARVEDALHATRAAVEEGVLVTNPFVSVATANS), y
78 (KKARVEDALHATRAAVEEGVLVTNPFVSVATANA).

También pueden proporcionarse homólogos, análogos, fragmentos y derivados de p15, como se detalla en el presente documento más adelante.

La invención puede proporcionar homólogos de p15 derivados de un flavivirus, y fragmentos activos y extensiones de los mismos, como se detalla en la Tabla 1:

Tabla 1: Epítopes homólogos de p15 de diversos flavivirus, fragmentos activos y extensiones de los mismos, y secuencias de nucleótidos que los codifican.

Virus	Secuencia de aminoácidos (SEC ID N°)	Secuencia de ácidos nucleicos (SEC ID N°)
Virus del Nilo occidental	LVTNPFVSVATANS (11)	19
	LVTNPFVSVATANA (12)	20
	GRLVTNPFVSVATANS (34)	54
	GRLVTNPFVSVATANA (35)	55
Virus de la fiebre amarilla	LVTNPIASTNDDEVIE (25)	45
	GILVTNPIASTNDDEVIE (36)	
Virus de la encefalitis de san Luis	LVTNPFISTGGANNKVM (26)	46
	GRLVTNPFISTGGANNKVM (37)	
Virus de la encefalitis del valle de Murray	MVTANPYVASSTANAKVL (27)	47
	GRMVTANPYVASSTANAKVL (38)	
Virus de Kunjin	LVTNPFVZSTANAKVL (28)	48
	GRLVTNPFVZSTANAKVL (39)	
Virus de la encefalitis japonesa	LVTNPFVATSSANSKVL (29)	49
	GRLVTNPFVATSSANSKVL (40)	
Virus del dengue tipo 1	LITANPIVDKEKPVNIE (30)	50
	GRLITANPIVDKEKPVNIE (41)	
Virus del dengue tipo 2	LITVNPIVTEKDSPVNIE (31)	51
	GRLITVNPIVTEKDSPVNIE (42)	
Virus del dengue tipo 3	LITANPVVTKKEEPVNIE (32)	52
	GRLITANPVVTKKEEPVNIE (43)	
Virus del dengue tipo 4	IISSTPLAENTNSVTNIE (33)	53
	GRIISSTPLAENTNSVTNIE (44)	

Sin embargo, debe entenderse que la secuencia de aminoácidos de estos epítopes homólogos puede alterarse en diferentes variantes y cepas de estos virus. Pueden proporcionarse adicionalmente péptidos homólogos de diferentes variantes y cepas de estos virus.

Con respecto a los novedosos antígenos de péptidos víricos, el término “análogos” se refiere a péptidos obtenidos por sustitución, delección o adición de residuos de aminoácidos a la secuencia, que opcionalmente incluye el uso de un residuo químicamente derivatizado en lugar de un residuo no derivatizado, en tanto que se retenga su capacidad para conferir inmunidad contra una infección vírica cuando se conjuga con los vehículos de la invención. El término

también incluye homólogos correspondientes a secuencias de aminoácidos que están significativamente relacionadas debido a una relación evolutiva, tanto entre especies (ortóloga) como dentro de una especie (paróloga). Las secuencias de péptidos que tienen dominios de secuencia de aminoácidos conservados son ejemplos de homólogos. Con respecto a los novedosos antígenos de péptidos víricos, los homólogos de péptidos pueden tener al menos aproximadamente el 40% de identidad en sus secuencias de aminoácidos, preferentemente al menos el 50%, más preferentemente al menos aproximadamente el 70% y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 90% de identidad. Estos valores reflejan la corta longitud de los péptidos.

En otro aspecto puede proporcionarse un segundo epítipo de VNO novedoso derivado de la proteína E, denotado en el presente documento p17, que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: YIVVGRGEQQINHHWHK (SEC ID N°: 21). También pueden proporcionarse análogos, homólogos, fragmentos y derivados de los mismos.

Estos péptidos y homólogos pueden usarse en conjugación con los vehículos de la invención. El conjugado puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 23-24 y 56-75.

Síntesis de péptidos y derivados

Los polipéptidos y péptidos de la invención pueden sintetizarse usando cualquier procedimiento recombinante o sintético conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a, procedimientos de síntesis en fase sólida (por ejemplo, química de Boc o f-Moc) y en fase de disolución. Para la síntesis de péptidos en fase sólida, un resumen de las muchas técnicas puede encontrarse en: Stewart y Young, 1963; y Meienhofer, 1973. Para una revisión de síntesis en disolución clásica véase Schroder y Lupke, 1965.

Se prefiere que los residuos de aminoácidos descritos en el presente documento estén en la forma isomérica "L". Sin embargo, los residuos en la forma isomérica "D" pueden estar sustituidos por algún residuo de L-aminoácido, en tanto que el péptido retenga sustancialmente la propiedad funcional deseada. El uso de aminoácidos "D" puede usarse como se conoce en la técnica para aumentar la estabilidad o semivida del péptido resultante.

Siempre que se mencionen los conjugados de p458 y Ec27 en la invención, también se contemplan sales y derivados funcionales de los mismos, en tanto que puedan potenciar sustancialmente la inmunogenicidad de las moléculas de antígeno. Por tanto, pueden englobarse polipéptidos o péptidos que contienen derivados de aminoácidos no naturales o cadenas laterales de no proteína.

El término derivado incluye cualquier derivado químico de los polipéptidos o péptidos que tienen uno o más residuos químicamente derivatizados haciendo reaccionar cadenas laterales o grupos funcionales. Tales moléculas derivatizadas incluyen, por ejemplo, aquellas moléculas en las que grupos amino libres han sido derivatizados para formar clorhidratos de amina, grupos p-toluenosulfonilo, grupos carbobenzoilo, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse para formar sales, ésteres metílicos y etílicos u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres pueden derivatizarse para formar derivados de O-acilo u O-alquilo. El nitrógeno de imidazol de la histidina puede derivatizarse para formar N-im-bencilhistidina. Como derivados químicos también se incluyen aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos que se producen naturalmente de los veinte residuos de aminoácidos convencionales. Por ejemplo: 4-hidroxiprolina puede estar sustituida con prolina; 5-hidroxilisina puede estar sustituida con lisina; 3-metilhistidina puede estar sustituida con histidina; homoserina puede estar sustituida con serina; y ornitina puede estar sustituida con lisina.

Además, un péptido o conjugado puede diferenciarse de la secuencia natural de los polipéptidos o péptidos de la invención por modificaciones químicas que incluyen, pero no se limitan a, acilación del NH₂ terminal, acetilación o amidación de ácido tioglicólico, y por carboxilamidación terminal, por ejemplo, con amoniaco, metilamina y similares. Los péptidos pueden ser tanto lineales, cíclicos como ramificados y similares, conformaciones que pueden lograrse usando procedimientos muy conocidos en la técnica.

Se desvelan tanto fragmentos activos más cortos derivados de los antígenos víricos denotados como SEC ID N°: 11-12, 21 y 25-33 como péptidos más largos que comprenden estas secuencias. Tales fragmentos o péptidos pueden comprender, por ejemplo, péptidos que tienen 1-3 aminoácidos delecionados en cualquier extremo, o adición de 1-3 residuos de aminoácidos o más de las secuencias flanqueantes de la proteína vírica a cualquier extremo, en tanto que se retenga su capacidad para conferir inmunidad contra una infección vírica cuando se conjugan con los vehículos de la invención. Debe entenderse que también pueden usarse péptidos más largos, por ejemplo, hasta 50 aminoácidos de longitud, para la vacunación. Sin embargo, se prefieren péptidos más cortos por ser más fáciles de fabricar. Tales extensiones de los novedosos antígenos de péptido no pretenden incluir ninguna proteína conocida de fragmento, tal como el dominio E3 de longitud completa de un flavivirus. Los antígenos víricos tienen preferentemente 5-50 aminoácidos de longitud, más preferentemente 8-20 aminoácidos de longitud. Fragmentos y extensiones a modo de ejemplo de p15 y homólogos de los mismos según la invención se presentan en la Tabla 1.

La adición de residuos de aminoácidos puede realizarse en cualquier extremo de los polipéptidos o péptidos de la invención con el fin de proporcionar un "ligador" por el que los péptidos puedan unirse convenientemente a un

vehículo. Tales ligadores son normalmente de al menos un residuo de aminoácido y pueden tener 40 o más residuos, más frecuentemente de 1 a 10 residuos. Residuos de aminoácidos típicos usados para la ligación son tirosina, cisteína, lisina, ácido glutámico y aspártico, o similares.

- 5 Los conjugados de la invención también pueden crearse por medio de conjugar químicamente un antígeno vírico con un péptido vehículo sintético de Ec27, usando procedimientos muy conocidos en la técnica.

Ácidos nucleicos

- 10 En otro aspecto pueden proporcionarse moléculas de ácidos nucleicos que codifican los antígenos de péptido.

Las moléculas de ácidos nucleicos pueden incluir ADN, ARN, o derivados de tanto ADN como ARN. Una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica un antígeno vírico o un péptido HSP60 puede obtenerse a partir de su fuente natural, tanto como un gen entero (es decir, completo) como una parte del mismo. También puede producirse una molécula de ácido nucleico usando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación) o síntesis química. Secuencias de ácidos nucleicos incluyen secuencias de ácidos nucleicos naturales y homólogos de las mismas que incluyen, pero no se limitan a, variantes alélicas naturales y secuencias de ácidos nucleicos modificadas en las que se han insertado, delecionado, sustituido y/o invertido nucleótidos de tal forma que tales modificaciones no interfieran sustancialmente con la capacidad de la molécula de ácido nucleico para codificar un péptido funcional.

- Un homólogo de molécula de ácido nucleico puede producirse usando varios procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989). Por ejemplo, pueden modificarse moléculas de ácidos nucleicos usando una variedad de técnicas que incluyen, pero no se limitan a, técnicas de mutagénesis clásica y técnicas de ADN recombinante, tal como mutagénesis dirigida a sitio, tratamiento químico de una molécula de ácido nucleico para inducir mutaciones, escisión por enzima de restricción de un fragmento de ácido nucleico, ligación de fragmentos de ácido nucleico, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o mutagénesis de regiones seleccionadas de una secuencia de ácidos nucleicos, síntesis de mezclas de oligonucleótidos y ligación de grupos de mezcla para "formar" una mezcla de moléculas de ácidos nucleicos y combinaciones de las mismas. Los homólogos de moléculas de ácido nucleico pueden seleccionarse de una mezcla de ácidos nucleicos modificados cribando la función de la proteína codificada por el ácido nucleico con respecto a la inducción de una respuesta antivírica, por ejemplo, mediante los procedimientos descritos en el presente documento.

- 35 Una secuencia de polinucleótidos u oligonucleótidos puede deducirse del código genético de una proteína; sin embargo, debe tenerse en cuenta la degeneración del código. Por ejemplo, un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácidos nucleicos: ctggtgaccgtgaatccattgtgtctgtggccacagccaactcg (SEC ID N°: 19) codifica un antígeno p15 derivado de la proteína E del virus del Nilo occidental: LVTVPFVSVATANS (SEC ID N°: 11). Sin embargo, las secuencias de ácidos nucleicos también incluyen secuencias, que están degeneradas como resultado del código genético, secuencias que pueden ser fácilmente determinadas por aquellos expertos habituales en la materia. En otras realizaciones particulares, los antígenos víricos están codificados por oligonucleótidos que tienen una secuencia de ácidos nucleicos como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 20, 22 y 45-55 (véase la Tabla 1).

- Los oligonucleótidos o polinucleótidos pueden contener un esqueleto de fosfato internucleosídico modificado para mejorar las propiedades de biodisponibilidad e hibridación del oligonucleótido o polinucleótido. Los enlaces están seleccionados del grupo que consiste en fosfodiéster, fosfotriéster, metilfosfonato, fosforoselenoato, fosfordiselenoato, fosforoanilotoato, fosforoanilidato, fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato o combinaciones de los mismos.

- 50 Enlaces de nucleasas adicionales incluyen alquilfosfotriéster tal como metil- y etilfosfotriéster, carbonato tal como éster carboximetílico, carbamato, morfolinocarbamato, 3'-tioformacetal, sililo tal como dialquil (C₁-C₆)- o difenilsililo, éster de sulfamato y similares. Tales enlaces y procedimientos para introducirlos en los oligonucleótidos se describen en muchas referencias, por ejemplo, revisadas generalmente por Peyman y Ulmann, (1990).

- 55 Una secuencia de ácidos nucleicos puede incluirse operativamente ligada a una o más secuencias de control de la transcripción para formar una molécula recombinante. La frase "operativamente ligado" se refiere al enlace de una secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de control de la transcripción de un modo tal que la molécula pueda expresarse cuando se transfecta (es decir, transforma, transduce o transfecta) en una célula huésped. Las secuencias de control de la transcripción son secuencias que controlan la iniciación, alargamiento y terminación de la transcripción. Secuencias de control de la transcripción particularmente importantes son aquellas que controlan la iniciación de la transcripción, tal como secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras. Secuencias de control de la transcripción adecuadas incluyen cualquier secuencia de control de la transcripción que pueda funcionar en al menos una de las células recombinantes. Una variedad de tales secuencias de control de la transcripción son conocidas para aquellos expertos en la materia. Las secuencias de control de la transcripción preferidas incluyen aquellas que funcionan en animal, bacterias, helminto, células de insecto y células animales.

Una molécula de ácido nucleico puede insertarse en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada.

5 Los vectores pueden introducirse en células o tejidos por uno cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos dentro de la materia, que incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Tales procedimientos se describen generalmente en Sambrook y col., (1989, 1992), en Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. 1989.

10 Una célula recombinante puede comprender una célula transfectada con una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno vírico. Pueden utilizarse una variedad de sistemas de vector de expresión/huésped para contener y expresar secuencias que codifican los antígenos víricos. Éstos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de bacteriófago recombinante, plásmido o ADN de cósmido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto infectados por vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales. La expresión de la construcción dentro de la célula huésped puede ser transitoria o puede integrarse establemente en el genoma de la misma.

20 **Composiciones de vacuna y procedimientos de uso**

Puede proporcionarse una vacuna que comprende un péptido antigénico vírico aislado y un péptido que comprende un epítipo de linfocitos T de HSP60, en la que el péptido HSP60 potencia la inmunogenicidad del péptido antigénico vírico al menos dos veces en comparación con el péptido sin el péptido HSP60. La inmunogenicidad puede potenciarse al menos 4-5 veces.

30 Las composiciones de vacuna pueden comprender un epítipo de linfocitos T de HSP60 adecuado para potenciar la inmunogenicidad cuando se usa como un péptido adyuvante que se mezcla con el antígeno vírico. El péptido adyuvante puede seleccionarse de Ec27 y análogos y derivados del mismo. La vacuna puede comprender un epítipo de linfocitos T de HSP60 adecuado para potenciar la inmunogenicidad del péptido antigénico vírico cuando se usa en conjugados en los que el péptido HSP60 está ligado covalentemente al péptido antigénico vírico. El vehículo de péptido puede seleccionarse de p458, Ec27 y análogos y derivados de los mismos. La inmunogenicidad potenciada de dicho antígeno vírico se mide por al menos uno de los siguientes: título del suero de anticuerpos dirigidos a dicho antígeno vírico; proliferación de linfocitos T en presencia de dicho antígeno vírico; secreción de citocinas inducida por dicho antígeno vírico; lisis mediada por linfocitos T específicos de células infectadas por virus; y reducción de la carga vírica detectable.

40 En otro aspecto, la invención proporciona composiciones de vacuna que comprenden los conjugados de la invención y un vehículo, adyuvante, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones de vacuna que comprenden un polipéptido o péptido, comprendiendo dicho polipéptido o péptido una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 11-12, 21 y 25-44, y un vehículo, adyuvante, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

45 La composición puede ser útil para tratar o prevenir una infección vírica en un sujeto en necesidad de la misma, como se describe en el presente documento.

50 La composición de vacuna de la invención se administra a un sujeto en necesidad de la misma en una cantidad eficaz. Según la presente invención, una "cantidad eficaz" es una cantidad que cuando se administra a un sujeto produce un aumento sustancial en la respuesta inmunitaria del sujeto a dicho antígeno vírico, como se describe en el presente documento.

55 El sujeto puede seleccionarse del grupo que consiste en seres humanos, mamíferos no humanos y animales no mamíferos (por ejemplo, aves).

60 Las composiciones farmacéuticas y veterinarias para su uso según estas realizaciones pueden formularse de manera convencional usando uno o más soportes o excipientes (vehículos) fisiológicamente aceptables. El (Los) vehículo(s) son "aceptables" en el sentido de que son compatibles con los otros componentes de la composición y no perjudiciales para el receptor de la misma. La composición de vacuna puede administrarse opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable, tal como solución salina fisiológica o polioles de etanol tales como glicerol o propilenglicol.

65 Los polipéptidos y el péptido pueden formularse en la vacuna como formas neutras o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con grupos amino libres del péptido) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o tales ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico y maleico. Sales formadas con los grupos carboxilo libres también

pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina y procaína.

La composición de vacuna puede comprender opcionalmente adyuvantes adicionales tales como aceites vegetales o emulsiones de los mismos, sustancias tensioactivas, por ejemplo, hexadecilamina, ésteres de aminoácidos de octadecilo, octadecilamina, lisolecitina, bromuro de dimetil-dioctadecilamonio, N,N-dioctadecil-N'-N'-bis(2-hidroxiethylpropanodiamina), metoxihexadecilglicerol y polioles plurónicos; poliaminas, por ejemplo, pirano, sulfato de dextrano, poli IC, carbopol; péptidos, por ejemplo, muramildipéptido, dimetilglicina, tuftsina; complejos inmunoestimulantes; emulsiones de aceite (que incluyen, pero no se limitan a, emulsiones de aceite en agua que tienen gotitas de aceite en el intervalo submicrométrico tal como las desvelados por las patentes de EE.UU. nº 5.961.970, 4.073.943 y 4.168.308); liposacáridos tales como MPL[®] y geles minerales. Los antígenos de la presente invención también pueden incorporarse en liposomas, cocleatos, polímeros biodegradables tales como poli-lactida, poli-glicolida y poli-lactida-co-glicolidas, o ISCOMS (complejos inmunoestimulantes) y también pueden emplearse principios activos complementarios. Los antígenos de proteína y péptido pueden acoplarse a albúmina o a otra molécula vehículo con el fin de modular o potenciar la respuesta inmunitaria, ya que todas son muy conocidas para aquellos expertos habituales en la técnica de las vacunas.

Las vacunas pueden administrarse a un humano o animal mediante una variedad de vías que incluyen, pero no se limitan a, vías de administración parenteral, intradérmica, transdérmica (tal como por el uso de polímeros de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral y intranasal, según protocolos muy conocidos en la técnica. La dosificación particular del antígeno conjugado dependerá de la edad, peso y afección médica del sujeto que va a tratarse, además de la identidad del antígeno y el procedimiento de administración. Dosis adecuadas serán fácilmente determinadas por el experto. Una dosis preferida para vacunación intramuscular, subcutánea y oral humana es entre aproximadamente 6 µg y aproximadamente 70 mg por kg de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 5 µg y aproximadamente 28 mg por kg de peso corporal, y más preferentemente entre aproximadamente 40 µg y aproximadamente 7 mg por kg de peso corporal. El ajuste y la manipulación de intervalos de dosificación establecidos usado con antígenos portadores tradicionales para la adaptación a la presente vacuna está perfectamente dentro de la capacidad de aquellos expertos en la materia.

Las composiciones de vacuna de la invención pueden usarse en combinación con otros tratamientos y medicamentos, por ejemplo, fármacos antivíricos. Por ejemplo, un conjugado que comprende un epítipo de CTL derivado de la proteína IE-1 del HCMV y un vehículo de péptido de la invención puede administrarse a sujetos infectados por HCMV en combinación con terapia con ganciclovir. Las pautas de dosis y administración de ganciclovir se conocen en la técnica.

La presente invención puede referirse al uso de un conjugado de la invención para la preparación de una composición de vacuna útil para conferir inmunidad antivírica.

En otro aspecto más, la invención proporciona procedimientos para aumentar la inmunogenicidad de un antígeno vírico que comprende ligar el antígeno a un vehículo de péptido sintético de la invención.

Pueden proporcionarse procedimientos para inmunizar un sujeto en necesidad de los mismos contra una infección vírica, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición de vacuna que comprende un conjugado y un vehículo, adyuvante, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La composición de vacuna puede administrarse a dicho sujeto antes de la exposición de dicho sujeto al virus o después de exposición de dicho sujeto a dicho virus.

En otro aspecto, la invención puede proporcionar procedimientos que comprenden:

- (a) aislar un antígeno vírico que comprende al menos un epítipo seleccionado de: un epítipo de CTL, un epítipo de linfocitos B y un epítipo limitado a MHC II;
- (b) conjugar dicho antígeno vírico con un vehículo de péptido sintético de la invención; y
- (c) administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición de vacuna que comprende un conjugado de la invención y un vehículo, adyuvante, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Kits de diagnóstico y procedimientos de los mismos

Se desvelan composiciones de diagnóstico y los kits y usos de los mismos para el diagnóstico de infección por flavivirus.

Puede proporcionarse un procedimiento para diagnosticar la presencia de, o exposición a, un flavivirus en un paciente que comprende probar dicho paciente para la presencia de anticuerpos anti-flavivirus o de linfocitos T que inmunorreaccionan con epítopes de flavivirus usando un péptido según la Tabla 1 o análogos, derivados y sales de los mismos como antígeno.

El procedimiento puede comprender las etapas de:

- (a) poner en contacto un espécimen biológico adecuado con un antígeno vírico que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 11-12, 21 y 25-44 y análogos, homólogos, derivados y sales del mismo en condiciones tales que pueda producirse una reacción inmunitaria;
- (b) cuantificar la reacción inmunitaria entre el antígeno de péptido y el espécimen biológico,

en el que una reacción inmunitaria significativamente superior a una reacción inmunitaria obtenida para una muestra obtenida de un sujeto no infectado es indicativa de exposición a, o, en otras realizaciones, infección del sujeto con un flavivirus.

Un espécimen o muestra biológica que puede ensayarse para infección por flavivirus puede incluir, por ejemplo, fluidos corporales de mamíferos (por ejemplo, suero, extractos de tejido, líquidos de tejido, secreciones mucosas), sobrenadantes de cultivo celular *in vitro*, lisados celulares y células o tejido del sujeto que se han cultivado en cultivo celular (por ejemplo, muestras de leucocitos tales como células mononucleares de sangre periférica). Los procedimientos de obtención de una muestra biológica adecuada de un sujeto son conocidos para aquellos expertos en la materia.

Pueden usarse péptidos y composiciones de péptidos para detectar anticuerpos anti-flavivirus y diagnosticar infección por flavivirus usándolos como reactivo de prueba en un ensaimunoanálisis de adsorción (ELISA), un ensayo enzimático de inmunotransferencia puntual, un ensayo de hemaglutinación pasiva (por ejemplo, prueba de PHA), un ensayo de tipo sándwich de anticuerpo-péptido-anticuerpo, un ensayo de tipo sándwich de péptido-anticuerpo-péptido, u otros inmunoensayos muy conocidos. Cualquier inmunoensayo adecuado puede usarse con los péptidos objeto. Tales técnicas son muy conocidas para el experto en la materia y se han descrito en muchos manuales y textos de inmunología convencionales. En una realización particular, el inmunoensayo es un ELISA usando una fase sólida recubierta con las composiciones de péptido de la presente invención. Por ejemplo, un kit tal para determinar la presencia de anticuerpos anti-flavivirus pueden contener un péptido inmovilizado en fase sólida de la invención y un anticuerpo marcado que puede reconocer la región no variable del anticuerpo anti-flavivirus que va a detectarse, tal como Fab anti-humano marcado. El kit también puede contener instrucciones para usar el kit y recipientes para contener los materiales del kit. Puede usarse cualquier marca convencional, tal como un radioisótopo, una enzima, un cromóforo o un fluoróforo. Un radioisótopo típico es yodo-125 o azufre-35. Enzimas típicas para este fin incluyen peroxidasa de rábano picante, galactosidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina.

La presencia de linfocitos T inmunorreactivos con epítopes de flavivirus puede determinarse, por ejemplo, determinando la proliferación de linfocitos T o la secreción de citocinas inducida por los novedosos epítopes de péptidos víricos de la invención, usando procedimientos muy conocidos en la técnica. Varios ejemplos no limitantes de determinación de la reactividad de linfocitos T con antígenos de péptido se presentan en los ejemplos en el presente documento. Por ejemplo, un kit para diagnosticar la exposición a o infección por flavivirus probando la presencia de un linfocito T que inmunorreacciona con epítopes flavivíricos puede comprender: un antígeno seleccionado de los péptidos de la invención; un medio adecuado para el cultivo de linfocitos (linfocitos T); y tanto un nucleótido marcado para la prueba de proliferación de linfocitos T como una citocina, por ejemplo, interferón-gamma, kit de ensayo, para la prueba de citocinas.

El procedimiento puede comprender las etapas de:

- (a) poner en contacto una muestra biológica adecuada con un antígeno vírico que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 11-12, 21 y 25-44 y análogos, homólogos, derivados y sales del mismo en condiciones tales que pueda producirse una reacción inmunitaria;
- (b) determinar si el antígeno de péptido se une específicamente a la muestra biológica.

El término "se une específicamente a la muestra biológica" como se usa en el presente documento se refiere a la manifestación de una reacción inmunitaria entre un componente del espécimen biológico o muestra (por ejemplo anticuerpos y linfocitos T) y el antígeno de péptido vírico que tiene mayor afinidad o grado que por otro antígeno. Por ejemplo, la unión específica puede medirse determinando el grado de formación de complejos antígeno-anticuerpo, proliferación de linfocitos T o secreción de citocinas. Por tanto, por ejemplo, la etapa (b) puede incluir determinar el grado de formación de complejos antígeno-anticuerpo, en el que un nivel de formación de complejos antígeno-anticuerpo significativamente superior al nivel obtenido para una muestra obtenida de un sujeto no previamente expuesto a o infectado por un flavivirus es indicativo de la exposición del sujeto al flavivirus.

Los kits y procedimientos pueden usarse para el diagnóstico diferencial de una infección por flavivirus, permitiendo la identificación de la cepa de flavivirus particular que infecta al sujeto o a la que se expuso el sujeto. Por ejemplo, un espécimen biológico puede ensayarse para la presencia de anticuerpos anti-dengue usando los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 30-33 para determinar la cepa de virus del dengue que infecta el sujeto (por ejemplo, para distinguir entre infección por dengue 1, 2, 3 ó 4).

Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente algunas realizaciones de la invención. Sin embargo, de ninguna forma deben interpretarse como limitantes del amplio alcance de la invención.

Ejemplos

A. VACUNACIÓN CONTRA EL CMV

Materiales y procedimientos

Ratones

Se compraron ratones hembra BALB/c de Harlan Olac (Bicester, RU). Los ratones se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos específicas y se dejó que se ajustaran al animalario durante 1 semana antes de realizar cualquier experimento. Para los experimentos de patogénesis se usaron ratones de 6 a 8 semanas de edad y para los experimentos de inmunización se usaron ratones de 3 semanas de edad. Los experimentos con ratones fueron autorizados y realizados según las pautas de la Universidad Ben Gurion, Facultad de Ciencias de la salud, Comité de seguridad animal.

MCMV

La cepa Smith del MCMV se obtuvo de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC) (Rockville, MD). Se prepararon caldos del MCMV sometidos a pases a través de la glándula salival altamente virulentos como un homogeneizado del 10% (peso/vol) de glándula salival de BALB/c infectados en el día 14 en DMEM-10% de SBF. Los homogeneizados se clarificaron por centrifugación a baja velocidad, se añadió DMSO a una concentración final del 10% y los caldos de virus se almacenaron en alícuotas a -70°C hasta uso (Palmon y col., 1996).

Los títulos de MCMV en estos caldos en suspensión de glándula salival (SGS) se determinaron por un ensayo en placa cuantitativo (Rager Zisman y col., 1973). Brevemente, se prepararon monocapas confluentes de fibroblastos de embrión de ratón (MEF) secundarios en placas de 24 pocillos. Se prepararon diluciones 10 veces seriadas de SGS que contenía el MCMV en DMEM complementado con 2% de SBF. Se aspiró el medio de crecimiento de cada pocillo en placas de MEF, y los pocillos por duplicado se inocularon con 0,2 ml de SGS diluida. Después de un periodo de adsorción de 1 hora a 37°C, las monocapas se recubrieron con 0,8 ml de medio de crecimiento que contenía 0,75% de carboximetilcelulosa (CMC), se incubaron durante 5 días a 37°C en una estufa de incubación con 5% de CO₂ humidificada, se fijaron en PBS-10% de formaldehído y se tiñeron con violeta cristal para visualizar las placas de virus. Los títulos se expresaron como log₁₀ ufc/0,1 g de tejido. En todo este estudio se usaron caldos de virus que contenían 1,75 x 10⁶ ufc/0,1 g de tejido.

Infección por MCMV y títulos de virus en órganos diana

Para estudiar la evolución de la infección por MCMV en ratones BALB/c sin tratamiento previo o inmunizados, los ratones se inocularon intraperitonealmente (i.p.) con 5 x 10⁴ ufc de virus de partida en 0,2 ml de PBS. Los ratones se sacrificaron en diferentes momentos de tiempo, se extirparon los bazo y la glándulas salivales (se reunieron 3 ratones por grupo en cada momento de tiempo) y se prepararon homogeneizados al 10% (peso/vol) como se describe previamente (Palmon y col., 1996). Las muestras se almacenaron a -70°C hasta que se realizaron las valoraciones de virus infecciosos en cultivos primarios de MEF.

Preparación de ADN y amplificación por PCR

Se extrajo ADN de bazo y glándula salival sin tratamiento previo e infectados usando el kit QiAmp Tissue (QIAGEN Inc. Chatsworth, CA, EE.UU.) según protocolos de QiAmp apropiados. Se sintetizaron cebadores de oligonucleótidos de ADN según la secuencia publicada del gen gB del MCMV (Rapp y col., 1992). La secuencia del cebador de la cadena codificante de gB se basó en la secuencia de ADNc nº 2416-2443 (5'-AAG-CAG-CAC-ATC-CGC-ACC-CTG-AGC-GCC-3' SEC ID Nº: 17) y la no codificante nº 2745-2772 (5'-CCA-GGC-GCT-CCC-GGC-GGC-CCG-CTC-TCG-3' SEC ID Nº: 18). Se encontró que este par de cebadores del gen gB que amplificaba un segmento de 356 pb era el más sensible en los estudios previos (Palmon y col., 1996). Para la amplificación génica, 1 µg de muestra de ADN se añadió a la mezcla de reacción que contenía 200 µM de cada dNTP, 100 pmoles de cada cebador, MgSO₄ 1,0 mM, KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8,8), 0,1% de Triton X-100 y 2 U de polimerasa vent (Biolabs) en un volumen de reacción total de 50 µl cada uno. Las muestras se amplificaron durante 30 ciclos en un ciclador térmico automatizado (Perkin Elmer Cetus, EE.UU.). Cada ciclo implicó desnaturalización a 94°C durante 60 s, hibridación a 68°C durante 90 s y extensión del cebador a 72°C durante 120 s. Los productos de PCR se separaron electroforéticamente sobre 1,5% de gel de agarosa, se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron. El límite inferior de detección para este procedimiento bajo las condiciones experimentales fue 5 femtogramos de ADN vírico correspondiente a aproximadamente 20 copias del genoma del MCMV (Palmon y col., 1996).

Péptidos

Los péptidos se prepararon en el Instituto de ciencias Weizmann (Rehovot, Israel) y en el Colegio de medicina Albert Einstein (Nueva York, EE.UU.). La pureza de los péptidos se determinó por HPLC analítica en fase inversa y análisis de aminoácidos (aa). Las secuencias de los seis péptidos sintetizados son: 89pep (epítipo CTL de IE1 de pp89 del MCMV, Reddehase y col., 1989)-YPHFHPTNL (SEC ID N°: 5); p458 (el péptido activo derivado de HSP60 de ratón, Konen Waisman y col., 1999)-NEDQKIGIEIKRALKI (SEC ID N°: 2); p458-89pep (combinado)-NEDQKIGIEIKRALKIYPHFHPTNL (SEC ID N°: 6); control negativo para p458 (el péptido p431 de la HSP60 micobacteriana, delecionado en 442val)-EGDEATGANIKVALEA (SEC ID N°: 7); control-89pep (combinado)-EGDEATGANIKVALEAYPHFHPTNL (SEC ID N°: 8); y TTP30-89pep (combinado)-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLEYPHFMPTNL (SEC ID N°: 9). El p30 de TT (aa 947-967) (Panina-Bordignon y col., 1989) (SEC ID N°: 10) está siendo ahora usado como péptido vehículo en diversas vacunas (Brander y col., 1996; Keitel y col., 1999). El péptido p431 micobacteriano (delecionado en 442val) se usó como péptido de control negativo ya que es homólogo en secuencia a p458 de mamífero, pero no provocó una respuesta inmunitaria dependiente de CD4⁺ contra sigo mismo o p458.

15 Inmunización y exposición de ratones al MCMV

La dosis de inmunización de cada péptido fue equimolar a 15 µg de p458 (Konen Waisman y col., 1999). Todos los péptidos se emulsionaron en adyuvante incompleto de Freund (IFA), y los volúmenes para las inyecciones intra-almohadilla plantar (i.a.p.) y subcutáneas (s.c.) fueron 50 µl y 100 µl, respectivamente. Se usaron dos protocolos diferentes. Para estudiar la respuesta inmunitaria de ratones al péptido quimérico (p458-89pep), grupos de ratones de 6 semanas de edad a 8 semanas de edad se inmunizaron una vez en la almohadilla plantar trasera con péptidos emulsionados en IFA. Diez días después se sacrificaron varios ratones, y se recogieron órganos para ensayos de IFN γ y IL-4. Para estudiar la eficacia protectora del péptido combinado, grupos de ratones de 3 semanas de edad se inmunizaron y se reforzaron según el siguiente protocolo: los ratones se inmunizaron i.a.p., en el día (-24), y se reforzaron s.c. dos semanas después en el día (-10). Diez días después (día 0), los ratones se expusieron IP a 5 x 10⁴ ufc de MCMV. Los ratones se sacrificaron en los días 14, 21 y 28 después de la exposición, y los órganos se recogieron para valoraciones de virus, PCR, ensayos de linfocitos T citotóxicos y de citocinas.

30 Preparación de cultivos de células mononucleares del bazo y la glándula salival

Se extruyó pulpa del bazo de la cápsula en una placa de Petri de cultivo de no tejido en medio RPMI 1640 complementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, glutamina 2 mM, HEPES 10 mM y 5% de SBF (RPMI de base). Las suspensiones de células del bazo se pasaron a través de un filtro celular, se lavaron una vez, se trataron 2 min con tampón de lisis ACK (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 0,01; 2 ml/bazo) para la eliminación de eritrocitos y se lavaron dos veces en medio de base. Los esplenocitos se resuspendieron en medio RPMI 1640 complementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, β -mercaptoetanol 5 x 10⁻⁵ M y 10% de SBF (RPMI completo) en una concentración final de 5 x 10⁶ células/ml.

Se prepararon suspensiones de células de la glándula salival cortando inicialmente las glándulas salivales en pequeños fragmentos (<2 mm) en una placa de Petri de cultivo de no tejido. Los fragmentos se trataron con medio de base que contenía 1 mg de collagenasa-dispasa (Roche Diagnostics, Alemania)/ml y 50 µg de ADNsa I (Boehringer Mannheim, Alemania)/ml. Después de 1 h de incubación a 37°C, las células se resuspendieron en 45% de Percoll (Sigma Chemical Co., Israel), se recubrieron sobre 66% de Percoll y se centrifugaron a 800 g durante 25 min. Las células mononucleares se recogieron en la interfase, se contaron y se resuspendieron en RPMI completo a una concentración final de 5 x 10⁶ células/ml.

Ensayos de ELISA para IFN γ y IL-4

Se prepararon cultivos de células mononucleares de bazo y glándula salival como se ha descrito anteriormente. Las suspensiones de células se dividieron en placas de 24 pocillos (5 x 10⁶ células/pocillo) y se estimularon *in vitro* con tanto 10 µg/ml de 89pep o p458 como con 5 µg/ml de concanavalina-A (Con-A). Las células se incubaron durante 72 h (con o sin estimulación) a 37°C en una estufa de incubación con 5% de CO₂ humidificada. Después de la incubación se recogieron los sobrenadantes y se midieron los niveles de IFN γ y IL-4 usando ELISA indirecto según el protocolo de ELISA para citocinas de Pharmingen (Pharmingen, San Diego, CA).

55 Análisis de FACS de fenotipos de células e IFN γ intracelular

Para el análisis fenotípico, células mononucleares del bazo y de glándula salival de ratones infectados por MCMV y sin tratamiento previo se cultivaron como se ha descrito anteriormente y se tiñeron para CD8 y CD4, IFN γ e IL-5 usando anticuerpos directamente marcados (PharMingen, San Diego, CA). La tinción intracelular de células (ICCS) para IFN γ , IL-4 e IL-5 se realizó usando el kit PharMingen's Cytofix/Cytoperm Plus con GolgiPlug (que contenía brefeldina A) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadió GolgiPlug a los cultivos de células inmunitarias incubados 8 h (establecidos como se ha descrito anteriormente, con o sin estimulación de péptido). Después de las 6 h adicionales de incubación en la estufa de incubación, las células (mínimo de 10⁶ por muestra) se recogieron, se lavaron en PBS complementado con 2% de SBF y 0,09% de azida de sodio y se incubaron en 50 µl de bloqueante FC,

marcado con marcadores de superficie anti-CD4 y anti-CD8. Entonces, las células se fijaron, se permeabilizaron y se trataron con anticuerpos anti-IFN γ , anti-IL-4 o anti-IL-5 para la detección intracelular de citocinas. Las células teñidas se analizaron inmediatamente sobre un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Mansfield, MA) y se adquirieron 50.000 a 100.000 eventos/muestra y se analizaron con el software CellQuest.

Ensayo de linfocitos T citotóxicos

La actividad citotóxica contra 89pep del MCMV se evaluó en un ensayo citotóxico de 4 h usando el kit basado en colorimetría no radiactivo CytoTox 96 (Promega, Madison, WI), según instrucciones del fabricante. Este ensayo se basa en la medición cuantitativa de lactato deshidrogenasa, una enzima citosólica estable que es liberada tras la lisis celular. Se re-estimularon suspensiones de células del bazo de ratones inmunizados, preparadas como se ha descrito anteriormente, *in vitro* durante 6 días con 89pep (10 μ g/ml) y rIL-2 (25 UI/ml) a partir del día 2. Las células diana para el ensayo de lisis fueron células P815 (mastocitoma, H-2^d). P815 fueron tanto no pulsadas como pulsadas con 89pep (1 μ g/ml) durante 2 h y luego se lavaron antes de la incubación con células efectoras. En todos los experimentos mostrados, la liberación espontánea fue inferior al 25% de la liberación máxima. Cada punto en un ensayo de lisis representa el promedio de valores por triplicado. El intervalo de los triplicados estuvo dentro del 5% de su media.

Ejemplo 1. Historia natural de la diseminación de MCMV en bazo y glándula salival.

La infección por MCMV se caracteriza por diferentes cinéticas y cargas víricas en diferentes órganos (Mercer y Spector, 1986). Ratones BALB/c, 6-8 semanas de edad, se inyectaron i.p. con 5×10^4 ufc de MCMV. Los ratones se sacrificaron en los días 1, 3, 7, 14 y 28 después de la infección, y los bazos y glándulas salivales se ensayaron para virus infeccioso y ADN del MCMV. La Figura 1 muestra un patrón típico de replicación del MCMV en bazo (diamantes blancos) y glándula salival (cuadrados negros). La replicación del virus alcanzó el pico en el bazo en el día 3 después de la infección, y disminuyó lentamente después (Fig. 1A). En el día 14 no pudo recuperarse virus infeccioso de este órgano. Para detectar ADN de MCMV en órganos infectados los inventores usaron una PCR sensible usando un par de cebadores del gen gB que amplifica un segmento de 356 pb (Palmon y col., 1996). El ADN vírico ya se detectó en el bazo 1 día después de la infección, alcanzó el pico en el día 3 y en el día 14 no pudo detectarse ADN (Fig. 1B).

En la glándula salival el virus apareció en el día 7. La replicación del virus en este órgano aumentó regularmente, alcanzando el máximo en el día 14 (3×10^5 ufc/0,1 g de tejido, Fig. 1A). Siguió una disminución moderada en títulos del virus, y en el día 28 todavía pudieron recuperarse $1,5 \times 10^6$ ufc/0,1 g de tejido de la glándula salival. No pudo detectarse virus infeccioso en la GS (y en ningún otro órgano) en el día 42 después de la exposición (datos no mostrados y Keitel y col., 1999). La detección de ADN vírico se asoció a la presencia de virus infeccioso. El ADN aumentó del día 7 a 14. Todavía pudieron detectarse grandes cantidades de ADN vírico en el día 28 después de la infección (Fig. 1B). En este contexto de diseminación vírica, replicación, eliminación esplénica y persistencia de glándula salival, los inventores evaluaron la eficacia de la inmunización con el péptido quimérico p458-89pep. Los inventores también estudiaron la carga de MCMV en pulmones después de la exposición de ratones de 6-8 semanas de edad sin tratamiento previo; la carga de MCMV (ufc) fue máxima en el día 7 y desapareció en el día 14 (datos no mostrados). Por tanto, en el modelo de los inventores, los inventores se concentraron en la glándula salival debido a que se considera el principal sitio para persistencia vírica del MCMV en ratones (Fig. 1 y Ho, 1991; Koszinowski y col., 1990; Kirchner, 1983; Mercer y Spector, 1986).

Ejemplo 2. La inmunización con p458-89pep suprime la persistencia del MCMV en la glándula salival.

89pep es el epítipo YPHFMPTNL limitado a H-2L^d de MCMV-pp89 (Reddehase y col., 1989). Los inventores sintetizaron p458-89pep quimérico y compararon su eficacia protectora contra MCMV con la inducida por 89pep solo o por control negativo-89pep. p458 es un péptido limitado a la clase II de MHC derivado de HSP60 murina (aa 458-474) y que puede inducir respuestas de CD4⁺ T en ratones BALB/c (Amir-Kroll y col., 2003). El péptido de 431-447 aa de HSP60 micobacteriana (con una delección de val en la posición 442) no provocó una respuesta inmunitaria a sí mismo o a p458 y, por tanto, sirvió de péptido de control negativo para la inmunización; control-89pep

Para investigar si la inmunización con los diferentes péptidos disminuiría la replicación de MCMV en glándulas salivales, ratones BALB/c de 3 semanas de edad se inmunizaron dos veces con IFA solo, 89pep, p458-89pep o control-89pep (Fig. 2). Ratones BALB/c hembra de tres semanas de edad se inmunizaron (i.a.p.) con diversos péptidos, y se reforzaron (s.c.). Dos semanas después, los ratones se expusieron (i.p.) a 5×10^4 ufc de MCMV, día 0. Tres ratones de cada grupo se sacrificaron en los días 14, 21 y 28 después de la exposición.

Los péptidos para la vacunación se emulsionaron en IFA. Diez días después de la última inmunización, los ratones se expusieron i.p. a 5×10^4 ufc de MCMV (día 0). Los ratones se sacrificaron en los días 14, 21 y 28 después de la exposición, y se midieron títulos de virus infecciosos y MCMV-ADN por ensayos en placa y de PCR en las glándulas salivales. Como se muestra en la Figura 2B, no pudo demostrarse ningún efecto de inmunización con ninguno de los péptidos en los días 14 y 21 después de la exposición al virus; en el día 14, los títulos de virus oscilaron de 8,1 a 8,8 log₁₀ ufc / 0,1 g, y en el día 21 oscilaron de 7,1 a 8,0 log₁₀ ufc / 0,1 g.

Sin embargo, en el día 28, el MCMV no fue detectable en las glándulas salivales de los ratones inmunizados con p458-89pep ($< 2 \log_{10}$ ufc / 0,1 g). La inmunización con 89pep solo mostró una ventaja marginal en comparación con ratones inmunizados con IFA (Fig. 2B); la carga vírica fue 4,5 y 5,1 $\log_{10}$ ufc / 0,1 g, respectivamente. La inmunización con control-89pep no afectó la carga vírica. Se realizaron otros experimentos con el mismo diseño experimental en los que se usó TTP30-89pep; la inmunización con TTP30-89pep no afectó la carga vírica en los días 14 y 21, redujo la carga vírica en el día 28 dos veces, en promedio, pero fracasó en eliminar virus infecciosos en el día 28. Para evaluar adicionalmente la supresión del virus inducida por la inmunización con p458-89pep, los inventores usaron una PCR de gB vírica sensible para detectar ADN vírico. Los inventores mostraron previamente que 1 ufc es el equivalente de aproximadamente 1500 genomas víricos (Palmon y col., 2000). Todavía, en el día 28, incluso este ensayo fracasó en revelar cualquier producto de PCR de gB en glándulas salivales de ratones inmunizados con p458-89pep (Fig. 2C, carril d). Por tanto, sólo la inmunización con p458-89pep condujo a la eliminación del MCMV detectable de la glándula salival, en el día 28.

Ejemplo 3. Secreción de IFN γ por linfocitos T específicos para 89pep tras la infección y vacunación.

Está muy establecido que la eliminación del MCMV durante la infección aguda depende principalmente de la secreción de Th1 IFN γ y respuestas de CTL protectoras (Mercer y Spector, 1986; Reddehase y col., 1989). Los inventores probaron si la secreción de IFN γ se estimuló por 89pep de cultivos celulares de bazo (Fig. 3A) y glándulas salivales (Fig. 3B) de ratones expuestos al MCMV. Se prepararon cultivos celulares en los días 1, 3, 7, 14, 21 y 28 después de la infección, se sembraron durante 3 d con o sin 89pep y se midió la secreción de IFN γ . En ausencia de estimulación con 89pep, la secreción de IFN γ se detectó sólo en cultivos de bazo de los días 1 y 3 después de la infección. Este resultado refleja probablemente actividad de NK en las fases tempranas de la infección. Cuando 89pep se añadió a los cultivos, la secreción de IFN γ en bazo y glándulas salivales guardó relación con la cinética de replicación vírica en estos órganos (Fig. 1A y 3). Es de notar que no se detectó secreción de IL-4 significativa en los sobrenadantes de cultivo; sin embargo, las células pudieron secretar IL-4 junto con otras citocinas en respuesta a la estimulación con Con-A (datos no mostrados).

Los inventores investigaron si la inmunización con p458-89pep indujo secreción de IFN γ específica para 89pep. Los ratones recibieron una única inmunización con los siguientes péptidos: p458-89pep, 89pep, p458, control-89pep o TTP30-89pep. TTP30 es un péptido limitado a la clase II de MHC que puede inducir respuestas de CD4 $^{+}$ T vigorosas y producción de IFN γ en ratones BALB/c y usarse como adyuvante universal (Panina-Bordignon y col., 1989, Amir-Kroll y col., 2003). Además, un grupo no vacunado se infectó con MCMV. Diez días después de la inmunización con los diferentes péptidos o infección, los ratones se sacrificaron, y se prepararon cultivos de células del bazo y glándulas salivales y se estimularon *in vitro* durante 3 d con 89pep o p458. La Figura 4 muestra que las células del bazo derivadas de ratones inmunizados con p458-89pep y re-estimuladas *in vitro* con 89pep secretaron niveles significativamente mayores ($p < 0,05$) de IFN γ en comparación con ratones inmunizados con 89pep, p458, control-89pep o IFA solo. Los esplenocitos re-estimulados con 89pep de ratones inmunizados con p458-89pep secretaron niveles significativamente mayores ($p < 0,05$) de IFN γ en comparación con los mismos esplenocitos, pero no re-estimulados (Fig. 4). Por tanto, la inmunización con p458-89pep indujo secreción de IFN γ específica y significativamente potenciada. En estos experimentos, los inventores también probaron TTP30-89pep. La inmunización con TTP30-89pep seguida de re-estimulación con 89pep indujo niveles de IFN γ similares a aquellos de ratones inmunizados con p458-89pep (Fig. 4). Los mayores niveles de secreción de IFN γ específica para 89pep se obtuvieron en cultivos de células del bazo de ratones infectados por virus (Fig. 4). Esta alta secreción de IFN γ por células del bazo de ratones infectados por MCMV, después de la estimulación *in vitro* con 89pep, indica la dominancia de este epítipo en la respuesta a MCMV. No se detectó IFN γ específico para 89pep en cultivos de células de las glándulas salivales después de la inmunización con los diferentes péptidos (datos no mostrados). Por tanto, la infección de la glándula salival con MCMV pareció ser necesaria para el reclutamiento al órgano de células productoras de IFN γ específico para 89pep (Fig. 1A y 3).

La respuesta de cultivos de células del bazo a la estimulación con p458 indujo altos niveles de IFN γ en ratones inmunizados con p458 o p458-89pep, pero no en otros grupos; esto indica que las respuestas fueron inmunológicamente específicas (Fig. 4). No se detectó secreción de IL-4 significativa después de cualquier inmunización; sin embargo, las células pudieron secretar IL-4 después de la estimulación con Con-A. Los niveles de IL-4 medidos después de la estimulación con Con-A *in vitro* fueron 242 pg/ml, 146 pg/ml, 184 pg/ml y 317 pg/ml para IFA solo, 89pep, p458 y p458-89pep, respectivamente. Tomados conjuntamente, estos resultados implican que la protección inducida por p458-89pep se asoció a la elevación en la producción de IFN γ específica para MCMV.

Ejemplo 4. La inmunización con p458-89pep induce linfocitos T IFN γ^{+} CD8 $^{+}$ específicos para 89pep y actividad de CTL.

Los inventores caracterizaron la naturaleza de células que secretaban IFN γ por citometría de flujo. Se inmunizaron ratones una vez con los diferentes péptidos y un grupo adicional se infectó con MCMV. Siete días después, los bazos se extirparon y las suspensiones de células se cultivaron durante 5 días con o sin 89pep. La inmunización con

p458-89pep seguida de 5 días de re-estimulación con 89pep indujo linfocitos T $\text{IFN}\gamma^+\text{CD8}^+$ y no linfocitos T $\text{IFN}\gamma^+\text{CD4}^+$ (Fig. 5); se detectaron muy pocos linfocitos T $\text{IFN}\gamma^+\text{CD8}^+$ después de la inmunización y re-estimulación con 89pep solo (Fig. 5B). La infección con MCMV y re-estimulación con 89pep indujo el mayor porcentaje de linfocitos T $\text{IFN}\gamma^+\text{CD8}^+$ (Fig. 5B). La tinción fue específica para $\text{IFN}\gamma$, ya que no se observaron células $\text{CD8}^+\text{IL-4}^+$ o $\text{CD8}^+\text{IL-5}^+$.

Los inventores también investigaron si las células $\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^+$ inducidas por p458-89pep pudieron lisar o no específicamente células diana cargadas con 89pep. Los ratones se inmunizaron una vez y 7 d después se recogieron los bazo y se re-estimularon con 89pep. Seis días después se ensayó la actividad lítica en P815 (H-2^d) cargadas con 89pep. No se observó actividad lítica de los cultivos de ratones inmunizados con 89pep, pero la CTL inducida por p458-89pep lisó las células diana (Fig. 6). Similar a los resultados de los inventores con la producción de $\text{IFN}\gamma$ por linfocitos T CD8^+ , la actividad lítica específica para 89pep inducida por infección por MCMV fue superior a la inducida por inmunización con p458-89pep.

Ejemplo 5. Respuesta específica para glándulas salivales después de la inmunización y la exposición al virus.

Los inventores encontraron, arriba, que la secreción de $\text{IFN}\gamma$ en la glándula salival fue específica para virus y dependió de la infección por MCMV (Fig. 1 y 3). En el presente experimento, los inventores monitorizaron la producción de $\text{IFN}\gamma$ en ratones inmunizados 28 días después de la exposición al virus. La tinción de células mononucleares para la producción de $\text{IFN}\gamma$ se realizó inmediatamente después de la escisión de la glándula salival, y estimulación con 89pep durante 8 h. Las glándulas salivales de ratones inmunizados con IFA, 89pep o TTP30-89pep y expuestos al virus contuvieron virus infecciosos en el día 28 después de la exposición (Fig. 2). Asimismo, se observaron células $\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^+$ en estas glándulas salivales infectadas en el día 28. A diferencia, los ratones inmunizados con p458-89pep no mostraron MCMV infeccioso en la glándula salival 28 días después de la infección (Fig. 2). Sin embargo, el número de células $\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^+$ fue mayor que el de los otros grupos (Fig. 7). Esto indica que la vacunación con p458-89pep indujo un mayor depósito de linfocitos T CD8^+ específicos para 89pep junto con la terminación de la infección de la glándula salival.

Ejemplo 6. p458-89pen reduce la carga vírica de ratones infectados por MCMV

Ratones BALB/c de 3 semanas de edad se expusieron i.p. a 5×10^4 ufc de MCMV (día 0). En el día 6, los ratones se inmunizaron una vez con IFA solo, 89pep o p458-89pep emulsionado en IFA, como se ha descrito anteriormente. Los ratones se trataron con 100 μg de la medicación anti-vírica ganciclovir (GCV, Roche, Basilea, Suiza) i.p. en los días 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10 y 11 después de la exposición. Los ratones se sacrificaron en el día 30 después de la exposición y se midió el ADN de MCMV por un ensayo de PCR en las glándulas salivales, como se ha especificado anteriormente (Figura 14A).

Como puede apreciarse en la Figura 14B, la inmunización con p458-89pep pudo suprimir la carga del CMV en la glándula salival incluso cuando se aplicó después de la exposición al CMV y en combinación con GCV. El tratamiento con GCV solo no fue suficiente para terapia; es decir, el tratamiento con GCV combinado con una inmunización con 89pep no conjugado no afectó la carga de CMV. Solo el tratamiento de GCV combinado con una inmunización de p458-89pep redujo la carga vírica a niveles indetectables.

B. VACUNACIÓN CON VNO

Materiales y procedimientos

Ratones

Se compraron ratones hembra BALB/c de Harlan Olac (Jerusalén, IL) a la edad de 14 días (10-12 g de peso corporal). Los ratones se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos específicas y se dejó que se ajustaran al animalario durante 1 semana antes de realizar los experimentos. Se usaron ratones a la edad de 3-6 semanas, a menos que se estableciera de otro modo. Como controles se usaron animales de la misma edad y sexo. Los ratones se mantuvieron en jaulas de aislamiento y se alimentaron y bebieron agua a voluntad. Los experimentos con ratones fueron autorizados y realizados según las pautas de la Universidad Ben Gurion, Facultad de Ciencias de la salud, Comité de seguridad animal.

Cultivos celulares

La línea celular Vero se derivó del mono verde africano (número ATCC®: CCL-81). Las células se cultivaron en DMEM complementado con 10% de SBF, 1% de aminoácidos no esenciales y antibióticos. Las células se mantuvieron en una atmósfera humidificada a 37°C en 5% de CO_2 y se usaron para el cultivo de caldos de virus, valoración de virus y ensayos de neutralización.

Virus, valoraciones de virus y antígeno de VNO

La cepa de virus del Nilo occidental (VNO) se aisló de un caso humano de infección por VNO (Goldblum y col., 1954). Los motivos de aminoácidos distintivos indican que esta cepa pertenece al linaje I. Los ensayos en placa del virus se realizaron en monocapas de células Vero en placas de 24 pocillos como se describe previamente (Ben-Nathan y col., 1996). Los títulos del caldo de virus se expresaron como unidades formadoras de placa (ufc) por ml. Se preparó un único caldo de virus que contenía 5×10^7 ufc / ml en células Vero, se guardó en alícuotas a -70°C y se usó durante todo este estudio. El antígeno de VNO (Ag de VNO) se preparó como se describe previamente (Ben-Nathan y col., 2003).

Péptidos

Los péptidos se sintetizaron en Sigma-Aldrich (Rehovot, Israel). La pureza de los péptidos se determinó por HPLC de fase inversa analítica y análisis de aminoácidos (aa) y se evaluó en $>95\%$ de pureza. Las secuencias de los seis péptidos sintetizados son: Ep15 (derivado del dominio E3 de VNO)-LVTVPFVSVATANS, SEC ID N°: 11; p458 (el péptido activo derivado de HSP60 de ratón)-NEDQKIGIEIKRALKI, SEC ID N°: 2; p32 (p458-Ep15 combinado)-NEDQKIGIEIKRALKILVTVPFVSVATANS, SEC ID N°: 13; pvacío, un control negativo para p458 (el péptido p431 de la HSP60 micobacteriana, deleciónado en 442val)-EGDEATGANIKVALEA, SEC ID N°: 7; p458-89pep (p458 y 89pep combinados, 89pep es un nonapéptido, YPHFHPTNL SEC ID N°: 5, que consiste en un epítipo CTL de IE1 de pp89 del MCMV)-NEDQKIGIEIKRALKIYPHFHPTNL, SEC ID N°: 6. El péptido p431 micobacteriano (deleciónado en 442val) se usó como péptido de control negativo ya que es homólogo en secuencia a p458 de mamífero, pero no provocó una respuesta inmunitaria dependiente de CD4^+ o anticuerpos contra sí mismo o p458.

Anticuerpos y sueros

Inmunoglobulina intravenosa humana-IL (IVIG-IL): la preparación de IgG de donantes israelíes (IVIG-IL; OMRIGAM 5% de IgG intravenosa) que contiene 50 mg/ml de IgG (proteína total 5% en peso/volumen) fue una donación de Omrix Biopharmaceuticals Ltd, Israel. Este producto tiene un título de anticuerpos anti-VNO de 1:1600 por ELISA y de $>1:80$ por la prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT) (Ben-Nathan y col., 2003). El antisero para VNO de ratón se preparó por inyección intraperitoneal (IP) de ratones BALB/c de 5 semanas de edad con 1×10^4 ufc de VNO por ratón. Dos semanas después, los ratones supervivientes se reforzaron con 1×10^4 ufc y se sangraron 7 días después. La sangre se centrifugó (4000 rpm durante 7 min) y el suero se recogió y se guardó a -20°C . El título de anticuerpos, medido por ELISA, fue 1:2400. El suero de ratones sin tratamiento previo inyectados con vacío se usó como control negativo.

Reconocimiento de Ag de VNO y péptidos por IVIG y sueros de ratón

Se realizaron pruebas de ELISA según el procedimiento descrito por Martin y col. (Martin y col., 2000) con ligeras modificaciones. Brevemente, placas de microtitulación se recubrieron y se incubaron durante la noche a 4°C con 100 μl de los diferentes péptidos (1 μg /pocillo) o antígeno de VNO diluido 1:700 en tampón de recubrimiento (NaHCO_3 , pH=9,6). Después de la incubación, el tampón de recubrimiento se decantó y las placas se lavaron dos veces en PBS que contenía 0,05% de Tween 20 y 0,2% de azida de sodio (tampón de lavado). Después de bloquear durante 1 h con 200 μl /pocillo de PBS que contenía 0,05% de Tween 20 y 2,5% de leche desnatada en polvo, las placas se lavaron 4 veces en tampón de lavado y se añadieron 100 μl de IVIG-IL o sueros de ratón a dilución 1:40 a cada pocillo (2-4 pocillos por muestra). Los controles negativos y positivos de sueros humanos o de ratón se probaron en cada placa. Después de la incubación durante 1 h a 37°C en una atmósfera humidificada, las placas se lavaron 5 veces, y a cada pocillo se añadieron 100 μl de IgG antihumana conjugada con HRP-estreptavidina diluida 1:1400 (Sigma-Aldrich) o IgG antiratón conjugada con HRP-estreptavidina diluida 1:1000 (SouthernBiotech, Birmingham, Alabama), respectivamente. Después de la incubación a 37°C durante 1 h, las placas se lavaron 5 veces y se añadieron 100 μl de sustrato TMB (DAKO Carpintería, CA) a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. La intensidad de color se midió por lector de ELISA (Dynatec MR 5000) a la absorbancia de 405 nm.

Ensayo de proliferación de linfocitos

Esplenocitos de ratones inmunizados o sin tratamiento previo se prepararon como se ha descrito anteriormente, se resuspendieron en RPMI completo en una concentración final de 2×10^5 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se estimularon *in vitro* con tanto 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de diferentes péptidos, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Ag de VNO como 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de concanavalina-A (Con-A). Los cultivos celulares se incubaron a 37°C en 5% de CO_2 durante 5 días. Al final de la incubación se añadió 1 μCi de ^3H -timidina (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra) a cada pocillo durante 12 h. El recuento radiactivo se realizó en un contador β (WALLAC 1409).

Inmunización de ratones con péptidos y exposición a VNO

La dosis de inmunización de cada péptido fue equimolar a 15 μg de p458 (Konen Waisman y col., 1999). Todos los péptidos se emulsionaron en adyuvante incompleto de Freund (IFA) y se inyectaron a 50 μl /ratón intra-almohadilla plantar (i.a.p.). Los ratones se inmunizaron con los diferentes péptidos 2-3 veces según el protocolo experimental. Una semana después de la última inmunización, los ratones se sangraron y se sacrificaron. Se recogieron los bazo,

se prepararon cultivos de esplenocitos y se probaron para la proliferación de linfocitos T y secreción de citocinas. Se centrifugaron las muestras de sangre (4000 rpm durante 7 min) y luego se recogieron los sueros y se probaron para anticuerpos anti-VNO por ensayos de ELISA y de neutralización.

Para estudiar la inmunogenicidad y eficacia protectora de los péptidos, grupos de ratones de 3 semanas de edad se inmunizaron y se reforzaron según el siguiente protocolo: los ratones se inmunizaron i.a.p. y se reforzaron una vez o dos veces, separados 1 semana. Una semana después del último refuerzo, los ratones se expusieron IP a 1×10^6 ufc de VNO. La mortalidad se registró durante los siguientes 21 días. Para estudios de virología, ratones supervivientes y moribundos se sacrificaron en el día 7 después de la exposición, y los órganos se recogieron para valoraciones de virus y RT-PCR.

Carga de virus en tejido de cerebro de ratones infectados

Se extirparon tejidos de cerebro de ratones infectados o inmunizados y expuestos y se prepararon homogeneizados de 10% (peso/volumen) en DMEM-10% de DMSO. Entonces, los homogeneizados se tomaron en alícuotas y se guardaron a -70°C hasta el posterior análisis. Los niveles de virus se determinaron por valoración de placas sobre monocapas de células Vero como se ha descrito previamente (Ben-Nathan y col., 1996), y se expresaron como ufc / 0,1 g de tejido de cerebro.

Extracción de ARN y RT-PCR

El ARN se extrajo de tejidos de cerebro de ratones usando el kit RNEasy Midi (QIAGEN, Hilden, Alemania) y se realizó RT-PCR en extractos de ARN usando transcriptasa inversa libre de endo (Ambion, Huntingdon, RU) y Biomix-Red (Bioline, Londres, RU). Los cebadores de proteína E para VNO (5'-ACGAAGTGGCCATTTTGTGTC-3', SEC ID N°: 81 / 5'-TTGATGCAGAGCTCCCTCTT-3', SEC ID N°: 82) se eligieron usando el programa Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research). Los productos de PCR se separaron electroforéticamente sobre 1,5% de gel de agarosa, se tiñeron con bromuro de etidio y se obtuvieron imágenes usando una cámara CCD (Imagechem 5500).

Preparación de cultivos de células del bazo y análisis de citocinas

Se recogieron bazos de ratones inmunizados y la pulpa del bazo se extruyó de la cápsula en medio RPMI 1640 complementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, glutamina 2 mM, HEPES 10 mM y 5% de SBF (RPMI de base). Las suspensiones de células del bazo se pasaron a través de un filtro celular, se lavaron, se trataron durante 2 min con tampón de lisis ACK (NH_4Cl 0,15 M, KHCO_3 0,01) para la eliminación de eritrocitos y se lavaron dos veces en medio de base. Los esplenocitos se resuspendieron en medio RPMI 1640 complementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, β -mercaptoetanol 5×10^{-5} M y 10% de SBF (RPMI completo) en una concentración final de 5×10^6 células/ml en una placa de 24 pocillos. Las suspensiones de células se estimularon *in vitro* con tanto 10 µg/ml de diferentes péptidos, 10 µl/ml de Ag de VNO como 5 µg/ml de Con-A. Entonces, las células se incubaron a 37°C en 5% de CO_2 durante 72 h. Los sobrenadantes se recogieron, se diluyeron por 2 y se midieron las concentraciones de $\text{IFN}\gamma$ e IL-4 por procedimiento de ELISA indirecto usando kits comerciales (PharMingen, San Diego, CA) según instrucciones del fabricante.

Prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT) de virus

El título de anticuerpos neutralizantes se determinó usando una prueba por reducción de placas (PRNT) modificada. Brevemente, las diluciones de 2 veces seriadas (1:4 a 1:512) de sueros de ratón se prepararon en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos y se añadieron 10^4 ufc de VNO en volúmenes iguales a pocillos duplicados de cada dilución. Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente se añadieron 5×10^4 células Vero a cada pocillo de las mezclas de sueros-virus. Las placas se incubaron durante 72 h en una atmósfera humidificada a 37°C y 5% de CO_2 y se contaron las placas. Los títulos de anticuerpos neutralizantes por reducción de placas se expresaron como el recíproco de la mayor dilución que dio el 50% de la reducción de placas (PRNT_{50}).

Isotipos de anticuerpos anti-VNO

Las placas se recubrieron con el Ag de VNO diluido 1:700 en tampón de recubrimiento. Después de la incubación durante la noche a 4°C , bloqueo y lavado se añadieron diversas diluciones de sueros de ratón por triplicado. Los controles negativos y positivos de sueros de ratón se probaron en cada placa. La evaluación de IgG total se realizó usando IgG antiratón conjugada con HRP-estreptavidina (SouthernBiotech). Para la identificación de isotipos de anticuerpos, la incubación con anticuerpos anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM de ratón conjugada con biotina (PharMingen, San Diego, CA) fue seguida por incubación con HRP-estreptavidina diluida 1:1000 (Jackson Laboratories, West Grove, Pensilvania). Después de la adición de sustrato, la intensidad de color se midió por lector de ELISA a 405 nm.

Ejemplo 7: Identificación de un epítipo de VNO.

Basándose en el procedimiento de propensión antigénica (Kolaskar y col., 1990), calculado usando un programa de epítopes de linfocitos B gratuito (servidor BcePred, <http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/index.html>) y basándose en un programa de epítopes de MHC gratuito (servidor ProPred, <http://www.imtech.res.in/raghavalpropred>), los inventores han identificado un péptido p15 de diferentes proteínas E del VNO (del dominio E3 inmunogénico, aa LVTVPFVSVATANS o aa LVTVPFVSVATANA; SEC ID N°: 11 y 12, respectivamente) como un epítipo continuo de linfocitos B candidatos y epítipo limitado a MHC-II del VNO (reconocido por diferentes moléculas de MHC-II humanas y murinas).

A continuación se examinó si el epítipo candidato era reconocido por un conjunto de inmunoglobulinas del suero tomadas de donantes israelíes (IVIG-IL) que contenían Ab anti-VNO. Los pocillos se recubrieron con los diferentes péptidos (1 µg/pocillo) o con el Ag de VNO (dilución 1:700). Después de bloquear y lavar, la IVIG-IL se añadió a dilución 1:40 y la unión se detectó. Los resultados demuestran por primera vez que el péptido p15 es reconocido por IVIG-IL (Figura 8). Posteriormente, ratones se expusieron IP a una dosis subletal de VNO (10^4 ufc) y 14 días después los ratones supervivientes se re-infectaron con la misma dosis de VNO. Los sueros se recogieron 7 días después de la segunda exposición, y se realizaron ensayos de ELISA. Como puede apreciarse en la Figura 9, el suero de ratones infectados por VNO reconoció específicamente p15, y, a un mayor grado, el conjugado de p15 p32. Además, los linfocitos T de estos ratones proliferaron en respuesta a estimulación *in vitro* con el conjugado de p15 p32 (Figura 10). Por tanto, por este documento se demostró el fenotipo de p15 como epítipo de linfocitos B del VNO y péptido limitado a VNO-MHC II.

Ejemplo 8: La inmunización con p458-p15 provoca protección contra el VNO.

Los inventores mostraron que HSP60-p458 (NEDQKIGIEIIKRALKI SEC ID N°: 2) usado como péptido de vehículo para un epítipo de MHC-1 del CMV potenció la respuesta inmunitaria al CMV y la inmunización con el péptido quimérico, epítipo de p458-CMV, eliminó MCMV de glándulas salivales de ratones expuestos al virus. En consecuencia, los inventores probaron la eficacia protectora del VNO del péptido quimérico p458-p15 (NEDQKIGIEIIKRALKILVTVPFVSVATANS) (llamado p32, SEC ID N°: 13). La Tabla 2 resume 5 experimentos diferentes; la inmunización con p15 solo mostró una ligera eficacia protectora, mientras que la inmunización con una mezcla de p15 y p458 no protegió ratones. Sin embargo, cuando los ratones se inmunizaron con p32, el péptido p458-p15 quimérico, se logró un alto grado de protección contra una exposición mortal al VNO virulento.

Tabla 2. Eficacia protectora *in vivo* de la inmunización con p32 contra la exposición a VNO

	Tratamiento - Muertes / Total (% de muertes)				
	Sin tratamiento	p15 (x3)	p32 (x3)	p458 (x3)	p15 + p458 (x3)
Mortalidad	22/32	8/15	2/21	4/7	5/7
(muertes del total)	(69%)	(53%)	(10%)	(57%)	(71%)

Los ratones se inmunizaron 3 veces con los diferentes péptidos o una mezcla de péptidos a intervalos de 7 días. Siete días después de la 3ª inmunización, los ratones se expusieron a 10^6 ufc de VNO y se monitorizó la supervivencia durante 21 días después de la exposición. Los resultados son el resumen de 5 experimentos diferentes, realizados en las mismas condiciones.

Para investigar si la inmunización con p32 produjo la eliminación de VNO o no se examinaron los niveles de virus en el cerebro, que es el principal órgano diana de este virus neurotrópico.

Los ratones se inmunizaron 3 veces con p32 a intervalos de 7 días. Siete días después de la última inmunización, los ratones inmunizados y no inmunizados se expusieron IP a 10^6 ufc de VNO. Siete días después de la exposición, los ratones se sacrificaron y se extrajeron diferentes órganos (cerebro, pulmones, corazón, hígado y bazo). También se tomaron los órganos de ratones sin tratamiento previo de control (ratones iguales no inmunizados y no infectados). Las cargas víricas se determinaron por RT-PCR para el genoma vírico y el ensayo en placas para títulos de virus infecciosos (ufc / 0,1 g de tejido). Los resultados de RT-PCR son representativos de un ratón experimental, mientras que los virus infecciosos son el promedio de todos los grupos experimentales. * El nivel de detección del ensayo en placas es $<10^1$.

Se determinaron los niveles de virus en el cerebro por RT-PCR y el ensayo en placas en el día 7 después de la exposición (Figura 15). Los títulos de virus fueron hasta 4×10^5 ufc/ml en los ratones no inmunizados y expuestos, mientras que en el grupo sin tratamiento previo y en el inmunizado y expuesto no se detectó virus (Figura 15). Estos hallazgos confirman que la vacunación de ratones con el péptido p32 los protege contra una infección por VNO de otro modo mortal.

Ejemplo 9: La inmunización con p458-p15 induce Ab neutralizantes para VNO.

Los inventores investigaron a continuación las respuestas inmunitarias provocadas tras la inmunización con p32. La inmunización con p32 indujo un alto título de Ab específicos para VNO con respecto a la inmunización con p15 solo (Figura 11A). El Ab generado tras la inmunización con p32 proporcionó capacidad neutralizante para VNO, esencial para el efecto protector de la vacuna de p32 (Tabla 3).

Tabla 3. Títulos de Ab neutralizantes anti-VNO en los sueros de ratones inmunizados con p32 o infectados por VNO en el día 7 después de tratamiento

	Tratamiento - Muertes / Total (% de muertes)				
	Sin tratamiento	p15 (x3)	p32 (x3)	p458 (x3)	p15 + p458 (x3)
Mortalidad (muertes del total)	22/32 (69%)	8/15 (53%)	2/21 (10%)	4/7 (57%)	5/7 (71%)

Los ratones fueron tanto inmunizados 3 veces con p32 como expuestos a VNO. Siete días después de la 3ª inmunización o exposición al VNO, respectivamente, los ratones se sangraron y se probaron los títulos de Ab neutralizantes para VNO en sueros (PRNT₅₀). Los resultados son el promedio de 4 experimentos de ELISA independientes.

A continuación se examinó si la inmunización con p32 y la infección subletal por VNO inducen isotipos similares de anticuerpos anti-VNO o no. El Ag de VNO se usó como antígeno en las placas de ELISA. La Figura 1B muestra que niveles de isotipos IgG1 y IgG2a anti-VNO fueron similarmente altos en sueros de ratones inmunizados con p32 e infectados por el VNO. Los niveles de IgG2b específica para VNO fueron mayores en sueros de ratones infectados por el VNO, mientras que las IgM específicas para VNO fueron mayores en ratones inmunizados con p32. No se detectaron ni IgA ni IgG3 específica para VNO en ambos tipos de sueros (Fig. 11B).

Ejemplo 10: La inmunización con p458-p15 induce respuesta de linfocitos T específicos para VNO y secreción de IFN-γ.

Las respuestas de linfocitos T específicos para VNO se examinaron del siguiente modo: ratones BALB/c de seis semanas de edad se infectaron con una dosis subletal de VNO ($0,66 \times 10^2$ ufc), y los bazo se recogieron 6 días después. Se prepararon suspensiones de células del bazo, se cultivaron en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 3 días con 10 µg/ml de EP15, p32, p458 o Con-A (5 µg/ml) durante 3 días. La proliferación celular se midió por el procedimiento de WST-1 y los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes. Como se muestra en la Figura 12, los esplenocitos de ratones inmunizados con p32 proliferaron en respuesta a estimulación *in vitro* con antígeno de VNO. Esta estimulación también indujo la secreción de altos niveles de IFN γ , esencial para la respuesta de TH1 que caracteriza respuestas inmunitarias protectoras para virus (Figura 13).

Ejemplo 11: Inmunización con conjugados de p458 y Ec27 con antígenos víricos.

Los conjugados de p458 y Ec27 con los novedosos antígenos víricos que tienen secuencias de aminoácidos como se exponen en SEC ID N°: 13-14, 23, 56-75 y 77-79 (véase la Tabla 4 a continuación) se sintetizan como se ha descrito anteriormente.

Virus	P458 conjugado (SEC ID N°):	Conjugado de Ec27 (SEC ID N°):
VNO	NEDQKIGIEIIRKALKILVTNPFVSVATANS (13) NEDQKIGIEIIRKALKILVTNPFVSVATANA (14) NEDQKIGIEIIRKALKIYIVVGRGEQQINHHWK (23) NEDQKIGIEIIRKALKIGRLVTNPFVSVATANS (65) NEDQKIGIEIIRKALKIGRLVTNPFVSVATANA (66)	KKARVEDALHATRAAVEE GVGRLVTNPFISTGGAN NKVM (77) KKARVEDALHATRAAVEE GVLVTNPFVSVATANA (78) KKARVEDALHATRAAVEE GVYIVVGRGEQQINHHW K (79)
Virus de la fiebre amarilla	NEDQKIGIEIIRKALKIGILVTNPIASTNDDEVLE (56)	KKARVEDALHATRAAVEE GVGILVTNPIASTNDDEVLE (67)
Virus de la encefalitis de san Luis	NEDQKIGIEIIRKALKIGRLVTNPFISTGGANNKVM (57)	KKARVEDALHATRAAVEE GVGRLVTNPFISTGGAN NKVM (68)
Virus de la encefalitis del valle de Murray	NEDQKIGIEIIRKALKIGRMVTANPYVASSTANAKVL (58)	KKARVEDALHATRAAVEE GVGRMVTANPYVASSTAN AKVL (69)

	Virus	P458 conjugado (SEC ID N°):	Conjugado de Ec27 (SEC ID N°):
5	Virus de Kunjin	NEDQKIGIEIIKRALKIGRLVTNPFVZSTANAKVL (59)	KKARVEDALHATRAAVEE GVGRLVTNPFVSVSTAN AKVL (70)
10	Virus de la encefalitis japonesa	NEDQKIGIEIIKRALKIGRLVTNPFVATSSANSKVL (60)	KKARVEDALHATRAAVEE GVGRLVTNPFVATSSAN SKVL (71)
15	Virus del dengue tipo 1	NEDQKIGIEIIKRALKIGRLITANPIVTDKEKPNIE (61)	KKARVEDALHATRAAVEE GVGRLITANPIVTDKEKPNIE (72)
20	Virus del dengue tipo 2	NEDQKIGIEIIKRALKIGRLITVNPIVTEKDSPVNIE (62)	KKARVEDALHATRAAVEE GVGRLITVNPIVTEKDSP VNIE (73)
	Virus del dengue tipo 3	NEDQKIGIEIIKRALKIGRLITANPWTKEEPVNIE (63)	KKARVEDALHATRAAVEE GVGRLITANPWTKEEP VNIE (74)
	Virus del dengue tipo 4	NEDQKIGIEIIKRALKIGRIISSTPLAENTNSVTNIE (64)	KKARVEDALHATRAAVEE GVGRIISSTPLAENTNSV TNIE (75)

Se inmunizan ratones 3 veces con los diferentes péptidos o con péptidos de control (antígenos víricos no conjugados correspondientes y con los péptidos vehículo solos) a intervalos de 7 días, como se ha descrito anteriormente. Siete días después de la 3ª inmunización, los ratones se exponen a 10^6 ufc del flavivirus correspondiente y la supervivencia se monitoriza durante 21 días después de la exposición.

En otros experimentos, la inmunogenicidad de los conjugados se determina por los siguientes ensayos: en algunos experimentos, los ratones se inmunizan y ensayan para títulos del suero de anticuerpos específicos para virus y específicos para péptidos víricos por ensayos de ELISA, como se ha descrito anteriormente. En otros experimentos, LNC de ratones inmunizados se examinan en presencia del antígeno vírico correspondiente en ensayos de proliferación y ensayos de secreción de IFN- γ , como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 12: Uso de conjugados de Ec27-antígeno para aumentar la inmunogenicidad de un antígeno vírico.

Se inmunizaron ratones con los siguientes péptidos, como se describe en el Ejemplo 8 usando los siguientes péptidos: p15 (SEC ID N°: 11), p32 (SEC ID N°: 13), Ec27-p15 (KKARVEDALHATRAAVEEGVLVTNPFVSVATANS, SEC ID N°: 77) y vacío-p15 5 (EGDEATGANIKVALEALVTNPFVSVATANS, SEC ID N°: 80 - el péptido p431 fusionado con p15).

Los bazo se recogieron 10 días después de la inmunización y los esplenocitos se cultivaron con p15 (25 μ g/ml) durante 3 días. Se midieron la proliferación celular y los niveles de IFN γ en los sobrenadantes de cultivos de células del bazo. Los resultados son el promedio de 3 experimentos de proliferación independientes. Ec27-Ep15* y Ec27-Ep15** son dos grupos idénticos, pero independientes, en el mismo experimento.

Como se muestra en la Figura 16, p458 y Ec27 pudieron ambos aumentar la inmunogenicidad de p15. La vacunación con conjugados que comprenden tanto p458 como Ec27 fusionados con el extremo N de p15 produjo la potenciada proliferación y secreción de IFN- γ de células del bazo en presencia de p15, en comparación con aquellas de células del bazo derivadas de animales vacunados con p15 conjugado con el control péptido. Las células del bazo de ratones inmunizados con IFA solo o Ec27 sin conjugar no indujeron proliferación significativa y secreción de IFN- γ cuando se incubaron con p15.

Ejemplo 13. Reconocimiento específico de los péptidos de VNO por sueros derivados de sujetos expuestos al VNO.

Se ensayaron sueros de sujetos humanos expuestos al VNO y no expuestos para anticuerpos que reconocen los novedosos antígenos de péptido del VNO, p15 (SEC ID N°: 11) y p17 (SEC ID N°: 21). La Figura 17 presenta los resultados de una prueba de ELISA en la que p15 y p17 sirvieron de antígeno, se usaron sueros humanos como anticuerpo primario y se usaron Ab antihumanos conjugados con HRP como anticuerpo secundario. URL son las unidades relativas de luminiscencia producidas por la actividad de HRP sobre el sustrato luminal.

Los sueros S2 y S6 son de humano que no se infectaron por VNO, mientras que los sueros S1, S3-S5 y S7 son de humano que tenía una historia de infección por VNO. IVIG es el conjunto de plasmas de ciudadanos israelíes que se mostró que contenía anticuerpos contra VNO.

Como puede observarse, tanto p15 como p17 fueron específicamente reconocidos por sueros expuestos al VNO y no por sueros de sujetos sin exponer. Los sueros humanos de seres humanos infectados por el dengue tampoco reconocieron p15 (datos no mostrados). Por tanto, p15 y p17 son péptidos de diagnóstico adecuados útiles para determinar la exposición a o infección por VNO.

Ejemplo 14. Identificación de Ec27, un péptido inmunodominante derivado de GroEL de *E. coli*.

Para encontrar epítopes de linfocitos T colaboradores dominantes de la secuencia de la variante de *E. coli* de HSP60 (GroEL), ratones BALB/c se inocularon con bacterias *E. coli* inactivadas por calor y se analizaron las respuestas proliferativas de drenar LNC para un conjunto de péptidos GroEL solapantes (Tabla 5), y la molécula de GroEL completa (comprada de Sigma).

Tabla 5 Péptidos solapantes de la molécula HSP60 de *E. coli* (GroEL); la designación de aminoácidos es correspondiente al número de acceso gi:45686198 sin el primer residuo de metionina, SEC ID N°: 83.

Número de péptidos	Posición
1	1-20
2	16-35
3	31-50
4	46-65
5	61-80
6	76-95
7	91-110
8	106-125
9	121-140
10	136-155
11	151-170
12	166-185
13	181-200
14	196-215
15	211-230
16	226-245
17	241-260
18	256-275
19	271-290
20	286-305
21	301-320
22	316-335
23	331-350
24	346-365
25	361-380
26	376-395
27 (Ec27)	391-410
28	406-425
29	421-440
30	436-455
31	451-470
32	466-485

Número de péptidos	Posición
32	466-485
33	481-500
34	496-515
35	511-530
36	526-545
37	526-547

Se inmunizaron ratones BALB/c s.c. con 10^7 bacterias de *E. coli* atenuadas con glutaraldehído (Figura 18A) en PBS, o con 30 µg de GroEL en PBS (Figura 18B). Diez días después las células del ganglio linfático (2×10^5 células por pocillo) se evaluaron para la proliferación específica para los péptidos GroEL solapantes indicados (20 µg/ml). Después de 96 horas de incubación, la incorporación de ^3H -timidina se evaluó como una medida de la proliferación. Los resultados se muestran como cpm medias de pocillos por cuadruplicado. Se indican las desviaciones estándar.

Los ensayos de proliferación de linfocitos T se realizaron del siguiente modo: células del ganglio linfático (LNC) drenante de ratones inmunizados se cultivaron (2×10^5 /pocillo) en 200 µl de medio RPMI 1640 complementado con glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (BioLab, Jerusalén, Israel), β -mercaptoetanol 5×10^{-5} M (Fluka AG, Buchs, Suiza), tampón HEPES 10 mM (Sigma) y 1% de suero de ratón normal singénico. Después de cuatro días de incubación se añadió [^3H]-timidina (0,5 µCi de 5 Ci/mmol, Nuclear Research Center, Negev, Israel) durante dieciséis horas adicionales, y se midió la incorporación de timidina. Los resultados se expresan como cpm medias, o el índice de estimulación (IE), es decir, cpm medias de cultivos de prueba (con antígeno) divididas entre cpm medias de cultivos de control (sin antígeno).

Como puede observarse en la Figura 18A, un péptido correspondiente a los residuos de aminoácidos 391-410 de GroEL fue altamente inmunogénico. La inmunización de ratones BALB/c con la molécula GroEL en lugar de las bacterias de *E. coli* completas condujo a una respuesta proliferativa similar de LNC drenantes (Figura 18B) a los mismos péptidos GroEL y la molécula GroEL completa como se usa para la Figura 18A: ambos inmunógenos dieron lugar a una respuesta inmunitaria a la molécula GroEL y, predominantemente, al péptido Ec27 de GroEL.

También se probó si el propio péptido Ec27 era inmunogénico por la inmunización de ratones BALB/c con 20 µg del péptido Ec27 en IFA.

Se inmunizaron ratones BALB/c s.c. con 20 µg del péptido Ec27 emulsionado en IFA. Diez días después se tomaron células del ganglio linfático y se evaluaron para la proliferación específica de 2×10^5 células en presencia del péptido Ec27, el péptido 259-271 del receptor de acetilcolina (AcR 259-271, VIVELIPSTSSAV SEC ID N°: 84), o GroEL a las concentraciones 10 µg/ml, 2 µg/ml, o sin antígeno (BG). Los resultados se muestran como cpm medias de pocillos cuadruplicados. Se indican las desviaciones estándar.

La Figura 19 muestra que las células del ganglio linfático de ratones inmunizados respondieron al péptido Ec27 y a la molécula GroEL completa, pero no al péptido de control AcR 259-271.

Para aprender si la inmunogenicidad del péptido Ec27 está limitada a un haplotipo de MHC, los inventores compararon cuatro cepas de ratones con diferentes haplotipos de MHC en su respuesta al péptido Ec27. Los ratones inmunizados fueron de la cepa BALB/c (H-2^d), BALB/k (H-2^k), BALB/b (H-2^b) o SJL (H-2^s). Como puede apreciarse en la Figura 20, las cuatro cepas de ratón diferentes respondieron específicamente al péptido de inmunógeno Ec27. Por tanto, el péptido Ec27 podría sustituir GroEL, o la bacteria completa, en la sensibilización para una respuesta inmunitaria específica para GroEL, debido a su inmuno-dominancia.

Ejemplo 15: Uso del péptido Ec27 como adyuvante para respuestas de anticuerpos

Debido a que se encontró que el péptido Ec27 era un péptido inmunodominante de la molécula GroEL, que es el principal inmunógeno de bacterias, fue interesante aprender si el péptido Ec27 podía usarse como adyuvante, como pueden las bacterias. Por tanto, ratones BALB/c y C57BL/6 se inmunizaron subcutáneamente con 20 µg del anticuerpo anti-p53 monoclonal PAb-246 (descrito en Yewdell y col., 1986) en diferentes composiciones inmunogénicas: el anticuerpo fue tanto emulsionado en adyuvante completo de Freund (246 en CFA), en adyuvante incompleto de Freund (246 en IFA) como junto con 50 µg del péptido Ec27 (como una mezcla) en IFA (246 en Ec27). Tres semanas después, todos los ratones recibieron un refuerzo del anticuerpo PAb-246 subcutáneamente en IFA. Diez días después del refuerzo, los ratones se sangraron y sus respuestas de anticuerpos al inmunógeno PAb-246 se compararon por ELISA (Figura 21A). La inmunización del anticuerpo PAb-246 en IFA solo no produjo una respuesta significativa de anticuerpos. A diferencia, la inmunización con el anticuerpo en IFA mezclado con el péptido Ec27 produjo una respuesta de anticuerpos eficaz en ambas cepas. El efecto adyuvante del péptido Ec27 fue comparable al efecto de CFA, que es uno de los materiales adyuvantes más potentes conocidos. La Figura 21B muestra la

inducción de anticuerpos anti-p53 en los ratones inmunizados por medio de una red idiotípica, es decir, estos anticuerpos anti-p53 son anti-idiotípicos para los anticuerpos anti-PAb-246. De nuevo, el uso del péptido Ec27 como adyuvante fue al menos tan eficaz como el uso de CFA.

5 Los puntos representan sueros individuales, las barras indican la mediana de cada grupo.

Ejemplo 16: Uso del péptido Ec27 como adyuvante para conjugados de p458-polisacárido

10 Se obtuvo polisacárido capsular del serotipo 4 de *S. pneumoniae* (PnTy4) de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC; Rockville, Md, EE.UU.). PnTy4 se acopló a péptidos vehículo usando clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (CDI; Aldrich, WI, EE.UU.) usando procedimiento convencional.

Los vehículos de péptido usados en este ejemplo son: p458 (SEC ID N°: 2), p458s (SEC ID N°: 87, EGDITGVNIVLKALTA), MOG (SEC ID N°: 85, MEVGWYRSPFSRWHLRNGK).

15 Se inmunizaron ratones BALB/c con el conjugado de péptido-polisacárido indicado en IFA o IFA mezclado con 50 µg de Ec27 como se ha descrito anteriormente, en el ejemplo de vacunación con VNO. Se recogieron LNC y se ensayaron para la producción y proliferación de óxido nítrico (NO).

20 La Tabla 6 muestra los niveles de producción (nM) de óxido nítrico (NO) en células del ganglio linfático (LNC) derivadas de ratones inmunizados con conjugados de péptido-azúcar en IFA o en IFA + Ec27. Las células se cultivaron durante 72 h con tanto concanavalina A (Con A) como el inmunogén del péptido-azúcar en presencia o ausencia de una línea celular de macrófagos (J774). La producción de NO se ensayó usando un ensayo colorimétrico de nitrato/nitrilo según las instrucciones del fabricante.

25

	LNC			LNC + J774		
Inmunogén	VNI	Con A	P458-Ty4	VNI	Con A	P458-Ty4
P458-Ty4 / IFA	0,13	4,73	0,21	0,55	6,24	10,29
P458-Ty4 / Ec27	0,18	3,32	2,36	0,66	4,33	34,97
	LNC			LNC + J774		
Inmunogén	VNI	Con A	P458s-Ty4	VNI	Con A	P458s-Ty4
P458 _s -Ty4 / IFA	0,13	9,91	0,55	0,93	6,35	0,66
P458 _s -Ty4 / Ec27	0,18	8,53	2,41	0,45	5,23	27,73

30

35

40 La proliferación de células del ganglio linfático en respuesta a inmunogén se realizó como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 14).

45 La Tabla 7 muestra la proliferación de LNC derivadas de ratones inmunizados con conjugados de péptido-azúcar en IFA o en IFA + Ec27. Las células se cultivaron durante 72 h con concanavalina A (Con A), el inmunogén de péptido-azúcar (Ty4), el inmunogén de péptido sin el azúcar, o el azúcar conjugado con un péptido de control (MOG-Ty4). La respuesta proliferativa se facilita como el índice de estimulación (IE).

50 Tabla 7 Proliferación de LNC derivadas de ratones inmunizados con conjugados de péptido-azúcar en IFA o en IFA + Ec27.

	Inmunogén	VNI	Con A	P458-Ty4	P458	MOG-Ty4
	P458-Ty4 / IFA	1,0	2,3	4,7	2,9	2,7
	P458-Ty4 / Ec27	1,0	6,5	15,4	3,1	4,0
	Inmunogén	VNI	Con A	P458 _s -Ty4	P458 _s	MOG-Ty4
	P458 _s -Ty4 / IFA	1,0	12,8	2,9	2,2	1,3
	P458 _s -Ty4 / Ec27	1,0	15,3	8,7	2,1	6,5

65 En las tablas, VNI se refiere a valores del nivel inicial; ConA se refiere a concanavalina A; P458-Ty4 es un conjugado entre el péptido p458 y el polisacárido capsular del serotipo 4 de *S. pneumoniae*; P458s-Ty4 es un conjugado entre el péptido p458s y el polisacárido capsular del serotipo 4 de *S. pneumoniae*.

Referencias

1. Mercer, JA, Spector, DH. J Virol 1986, 57(2), 497-504.
2. Reddehase y col., Nature 1989, 337(6208), 651-653.
3. Zajac y col., Curr Opin Immunol 1998, 10(4), 444-449.
4. Matloubian y col., J Virol 1994, 68(12), 8056-8063.
5. Konen Waisman y col., J Infect Dis 1999, 179(2), 403-413.
6. Jindal y col., Mol Cell Biol 1989, 9(5), 2279-2283.
7. Konen Waisman y col., 1995, 154(11), 5977-5985.
8. Cohen, Immunol Today 1992, 13(12), 490-494.
9. Anderton y col., Eur J Immunol 1993, 23(1), 33-38.
10. Hermann y col., Eur J Immunol 1991, 21 (9), 2139-2143.
11. Koga y col., Science 1989, 245(4922), 1112-111 S.
12. Palmon y col., Antiviral Res 1996, 33(1), 55-64.
13. Rager Zisman y col., Proc Soc Exp Biol Med 1973, 142(4), 1174-1179.
14. Rapp y col., J Virol 1992, 66(7), 4399-4406.
15. Panina-Bordignon y col., Eur J Immunol 1989, 19(12), 2237-2242.
16. Brander y col., Clin Exp Immunol 1996, 105(1), 18-25.
17. Keitel y col., Vaccine 1999, 18(5-6), 531-539.
18. Palmon y col., J Virol Methods 2000, 86(2), 107-114.
19. Amir-Kroll y col., J Immunol 2003, 170(12), 6165-6171.
20. Lussow y col., Immunol. Letters 25:255-264 (1990)
21. Lussow y col., Eur. J. Immunol. 21:2297-2302 (1991).
22. Barrios y col., Eur S of Immunol 22:1365 (1992)
23. Stewart, J. M. y Young, J. D. (1963), "Solid Phase Peptide Synthesis" W. H. Freeman Co. (San Francisco).
24. Meienhofer, J (1973). "Hormonal Proteins and Peptides", vol. 2, pág. 46, Academic Press (New York).
25. Schroder, G. y Lupke, K. (1965). The Peptides, vol. 1, Academic Press (New York).
26. Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989, 1992.
27. Peyman y Ulmann, Chemical Reviews, 90:1543-584 (1990).
28. Monath, Ann N Y Acad Sci 2001, 951, 1-12.
29. Pletnev y col., Virology 2003, 314(1), 190-195.
30. Tesh y col., Emerg Infect Dis 2002, 8(12), 1392-1397.
31. Hall y col., Proc Natl Acad Sci U S A 2003, 100(18), 10460-10464.
32. Casadevall, Nat Biotechnol 2002, 20(2), 114.
33. Goldblum y col., Am J Hyg 1954, 59(1), 89-103.
34. Ben-Nathan y col., Arch Virol 1996, 141 (3-4), 459-469.
35. Ben-Nathan y col., J Infect Dis 2003, 188(1), 5-12.
36. Martin y col., J Clin Microbiol 2000, 38(5), 1823-1826.
37. Yewdell y col., J Virol 59:444-452.
38. Kolaskar y col., FEBS, 276:172, 1990.
39. Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. 1989.

Listado de secuencias

- <110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD. at the WEIZMANN
INSTITUTE OF SCIENCE
B.G. Negev Technologies and Applications Ltd.
COHEN, Irun
RAGER-ZISMAN, Bracha
- PORGADOR, Angel
HERKEL, Johannes
- <120> COMPOSICIONES DE PÉPTIDOS HSP60 Y ANTÍGENOS VÍRICOS PARA VACUNACIÓN Y
DIAGNÓSTICO
- <130> YEDA/055 PCT
- <140> PCT/IL2005
<141> 21-02-2006
- <150> US 60/661.017
<151> 14-03-2005
- <160> 87
- <170> PatentIn versión 3.3

5 <210> 1
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

 10 <400> 1
 Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Thr Leu Lys
 1 5 10 15

 15 Ile

 20 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

 25 <400> 2
 Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Ala Leu Lys
 1 5 10 15

 30 Ile

 35 <210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 40 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

 <400> 3
 Glu Gly Asp Glu Ala Thr Gly Ala Asn Ile Val Lys Val Ala Leu Glu
 1 5 10 15

 45 Ala

 50 <210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 55 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

 <400> 4
 Asn Glu Asp Gln Asn Val Gly Ile Lys Val Ala Leu Arg Ala Met Glu
 1 5 10 15

 60 Ala

 65 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 5
 <400> 5
 Tyr Pro His Phe His Pro Thr Asn Leu
 1 5
 10
 <210> 6
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 15
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 6
 20 Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Ala Leu Lys
 1 5 10 15
 Ile Tyr Pro His Phe His Pro Thr Asn Leu
 20 25
 25
 <210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 30
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 7
 35 Glu Gly Asp Glu Ala Thr Gly Ala Asn Ile Lys Val Ala Leu Glu Ala
 1 5 10 15
 40
 <210> 8
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 45
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 8
 50 Glu Gly Asp Glu Ala Thr Gly Ala Asn Ile Lys Val Ala Leu Glu Ala
 1 5 10 15
 Tyr Pro His Phe His Pro Thr Asn Leu
 20 25
 55
 <210> 9
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 60
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 9

1 Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 5
 10 Ala Ser His Leu Glu Tyr Pro His Phe Met Pro Thr Asn Leu
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

<210> 10
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 10

1 Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

<210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 11

1 Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ser
 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

<210> 12
 <211> 15
 <217> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 12

1 Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ala
 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

<210> 13
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 13

1 Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Ala Leu Lys
 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

1 Ile Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ser
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

<210> 14
<211> 32
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 14

Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Ala Leu Lys
1 5 10 15

Ile Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ala
20 25 30

<210> 15
<211> 32
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 15

Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Thr Leu Lys

1 5 10 15

Ile Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ser
20 25 30

<210> 16
<211> 32
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 16

Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Thr Leu Lys
1 5 10 15

Ile Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ala
20 25 30

<210> 17
<211> 27
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 17

aagcagcaca tccgcaccct gagcgcc

27

<210> 18
<211> 27
<212> ADN

<213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 5
 <400> 18
 ccaggcgctc ccggcggccc gctctcg 27
 <210> 19
 10 <211> 45
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 15 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 19
 ctggtgaccg tgaatccatt tgtgtctgtg gccacagcca actcg 45
 20 <210> 20
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 25 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 20
 30
 Thr Thr Gly Gly Thr Cys Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Ala Cys Cys
 1 5 10 15
 35 Cys Thr Thr Thr Thr Gly Thr Thr Thr Cys Ala Gly Thr Gly Gly Cys
 20 25 30
 40 Cys Ala Cys Gly Gly Cys Cys Ala Ala Cys Gly Cys Thr
 35 40 45
 <210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 45 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 50 <400> 21
 Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His
 1 5 10 15
 55 Lys
 <210> 22
 <211> 51
 60 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 65 <400> 22

tatattgtgg tgggccgcgg cgaacagcag attaaccatc attggcataa a

51

<210> 23
<211> 34
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 23

Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Ala Leu Lys
1 5 10 15

Ile Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp
20 25 30

His Lys

<210> 24
<211> 34
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 24

Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Thr Leu Lys
1 5 10 15

Ile Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp
20 25 30

His Lys

<210> 25
<211> 18
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 25

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

Ile Glu

<210> 26
<211> 18
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 26

Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Ile Ser Thr Gly Gly Ala Asn Asn Lys
 1 5 10 15
 5 Val Met
 <210> 27
 <211> 18
 10 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 15
 <400> 27
 Met Val Thr Ala Asn Pro Tyr Val Ala Ser Ser Thr Ala Asn Ala Lys
 20 1 5 10 15
 25 Val Leu
 <210> 28
 <211> 18
 <21 7> PRT
 30 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 35 <400> 28
 Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ser Thr Ala Asn Ala Lys
 1 5 10 15
 40 Val Leu
 <210> 29
 <211> 18
 <212> PRT
 45 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 50 <400> 29
 Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ala Thr Ser Ser Ala Asn Ser Lys
 1 5 10 15
 55 Val Leu
 <210> 30
 <211> 18
 60 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 65 <400> 30

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

5 Ile Glu

<210> 31
<211> 18
<212> PRT
10 <213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

15 <400> 31

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

20 Ile Glu

<210> 32
<211> 18
25 <212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

30 <400> 32

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

35 Ile Glu

<210> 33
40 <211> 18
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
45 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 33

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

55 Ile Glu

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
60 <213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 34

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

5 Ser

<210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

15 <400> 35

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

20 Ala

<210> 36
 <211> 20
 25 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

30 <400> 36

Gly Ile Leu Val Thr Val Asn Pro Ile Ala Ser Thr Asn Asp Asp Glu
 1 5 10 15

35 Val Leu Ile Glu
20

40 <210> 37
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

45 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 37

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

55 Asn Lys Val Met
20

<210> 38
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

60 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 38

1 Gly Arg Met Val Thr Ala Asn Pro Tyr Val Ala Ser Ser Thr Ala Asn
 5 Ala Lys Val Leu
 20
 <210> 39
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 39
 1 Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ser Thr Ala Asn
 5 Ala Lys Val Leu
 20
 <210> 40
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 40
 1 Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ala Thr Ser Ser Ala Asn
 5 Ser Lys Val Leu
 20
 <210> 41
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 41
 1 Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro
 5 Val Asn Ile Glu
 20
 <210> 42
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 42

1 Gly Arg Leu Ile Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro
 5 Val Asn Ile Glu
 10 <210> 43
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 15 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 43
 20 Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Val Thr Lys Lys Glu Glu Pro
 1 5 10 15
 Val Asn Ile Glu
 20
 25 <210> 44
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 30 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 44
 35 Gly Arg Ile Ile Ser Ser Thr Pro Leu Ala Glu Asn Thr Asn Ser Val
 1 5 10 15
 Thr Asn Ile Glu
 20
 45 <210> 45
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 50 <400> 45
 ggcatctgg tgaccgtgaa cccgattgag agcaccaacg atgatgaagt gctgattgaa 60
 55 <210> 46
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL
 60 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 46
 ggccgcctgg tgaccgtgaa cccgtttatt agcaccggcg gcgcgaacaa caaagtgatg 60
 65 <210> 47
 <211> 60

	<212> ADN	
	<213> ARTIFICIAL	
5	<220> <223> PÉPTIDO SINTÉTICO	
	<400> 47 ggccgcatgg tgaccgcgaa cccgtatgtg gcgagcagca ccgcaacgc gaaagtgtg	60
10	<210> 48 <211> 60 <212> ADN <213> ARTIFICIAL	
15	<220> <223> PÉPTIDO SINTÉTICO	
	<400> 48 ggccgcctgg tgaccgtgaa cccgtttgtg agcgtgagca ccgcaacgc gaaagtgtg	60
20	<210> 49 <211> 60 <212> ADN <213> ARTIFICIAL	
25	<220> <223> PÉPTIDO SINTÉTICO	
30	<400> 49 ggccgcctgg tgaccgtgaa cccgtttgtg gcgaccagca gcgcaacag caaagtgtg	60
35	<210> 50 <211> 60 <212> ADN <213> ARTIFICIAL	
40	<220> <223> PÉPTIDO SINTÉTICO	
	<400> 50 ggccgcctga ttaccgcgaa cccgattgtg accgataaag aaaaaccggt gaacattgaa	60
45	<210> 51 <211> 60 <212> ADN <213> ARTIFICIAL	
50	<220> <223> PÉPTIDO SINTÉTICO	
	<400> 51 ggccgcctga ttaccgtgaa cccgattgtg accgaaaaag atagcccgtt gaacattgaa	60
55	<210> 52 <211> 60 <212> ADN <213> ARTIFICIAL	
60	<220> <223> PÉPTIDO SINTÉTICO	
	<400> 52 ggccgcctga ttaccgcgaa cccggtgtg accaaaaaag aagaaccggt gaacattgaa	60
65	<210> 53 <211> 60	

<212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

 5 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

 <400> 53
 ggccgcatta ttagcagcac cccgctggcg gaaaacacca acagcgtgac caacattgaa 60

 10 <210> 54
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

 15 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

 <400> 54
 ggagactgg tgaccgtgaa tccattgtg tctgtggcca cagccaactc g 51
 20
 <210> 55
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL
 25
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

 <400> 55
 30 ggagattgg tcactgtcaa ccctttgtt tcagtggcca cggccaacgc t 51

 <210> 56
 <211> 37
 <212> PRT
 35 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

 40 <400> 56

 Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Ala Leu Lys
 1 5 10 15

 45 Ile Gly Ile Leu Val Thr Val Asn Pro Ile Ala Ser Thr Asn Asp Asp
 20 25 30

 50 Glu Val Leu Ile Glu
 35

 <210> 57
 <211> 37
 55 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 60
 <400> 57

Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Ala Leu Lys
 1 5 10 15
 5 Ile Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Ile Ser Thr Gly Gly Ala
 20 25 30
 Asn Asn Lys Val Met
 35
 10
 <210> 58
 <211> 37
 <212> PRT
 15 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 20 <400> 58
 Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Ala Leu Lys
 1 5 10 15
 25 Ile Gly Arg Met Val Thr Ala Asn Pro Tyr Val Ala Ser Ser Thr Ala
 20 25 30
 Asn Ala Lys Val Leu
 35
 30
 <210> 59
 <211> 37
 <212> PRT
 35 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 40 <400> 59
 Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Ala Leu Lys
 1 5 10 15
 45 Ile Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Asn Ala Lys Val Leu
 35
 50
 <210> 60
 <211> 37
 <212> PRT
 55 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 60 <400> 60

Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Ala Leu Lys
1 5 10 15
5
Ile Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ala Thr Ser Ser Ala
20 25 30
10
Asn Ser Lys Val Leu
35
15
<210> 61
<211> 37
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
20
<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO
<400> 61
25
Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Ala Leu Lys
1 5 10 15
Ile Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys
20 25 30
30
Pro Val Asn Ile Glu
35
35
<210> 62
<211> 37
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
40
<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO
<400> 62
45
Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Ala Leu Lys
1 5 10 15
Ile Gly Arg Leu Ile Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser
20 25 30
50
Pro Val Asn Ile Glu
35
55
<210> 63
<211> 37
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
60
<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO
<400> 63

1 Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Ala Leu Lys
 5 Ile Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Val Thr Lys Lys Glu Glu
 10 Pro Val Asn Ile Glu
 <210> 64
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 64
 1 Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Ala Leu Lys
 5 Ile Gly Arg Ile Ile Ser Ser Thr Pro Leu Ala Glu Asn Thr Asn Ser
 10 Val Thr Asn Ile Glu
 <210> 65
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 65
 1 Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Ala Leu Lys
 5 Ile Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala
 10 Asn Ser
 <210> 66
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 66

Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Ala Leu Lys
 1 5 10 15
 5 Ile Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala
 20 25 30
 10 Asn Ala
 <210> 67
 <211> 40
 15 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 20 <400> 67
 Lys Lys Ala Arg Val Glu Asp Ala Leu His Ala Thr Arg Ala Ala Val
 1 5 10 15
 25 Glu Glu Gly Val Gly Ile Leu Val Thr Val Asn Pro Ile Ala Ser Thr
 20 25 30
 30 Asn Asp Asp Glu Val Leu Ile Glu
 35 40
 35 <210> 68
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 40 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 68
 Lys Lys Ala Arg Val Glu Asp Ala Leu His Ala Thr Arg Ala Ala Val
 1 5 10 15
 45 Glu Glu Gly Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Ile Ser Thr
 20 25 30
 50 Gly Gly Ala Asn Asn Lys Val Met
 35 40
 55 <210> 69
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 60 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 69

1 Lys Lys Ala Arg Val Glu Asp Ala Leu His Ala Thr Arg Ala Ala Val
 5 Glu Glu Gly Val Gly Arg Met Val Thr Ala Asn Pro Tyr Val Ala Ser
 10 Ser Thr Ala Asn Ala Lys Val Leu
 <210> 70
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 70
 20 Lys Lys Ala Arg Val Glu Asp Ala Leu His Ala Thr Arg Ala Ala Val
 25 Glu Glu Gly Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val
 30 Ser Thr Ala Asn Ala Lys Val Leu
 <210> 71
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 71
 45 Lys Lys Ala Arg Val Glu Asp Ala Leu His Ala Thr Arg Ala Ala Val
 50 Glu Glu Gly Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ala Thr
 55 Ser Ser Ala Asn Ser Lys Val Leu
 <210> 72
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 72

1 Lys Lys Ala Arg Val Glu Asp Ala Leu His Ala Thr Arg Ala Ala Val
 5 5 10 15
 5 Glu Glu Gly Val Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp
 20 25 30
 10 Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu
 35 40
 15 <210> 73
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 20 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 73
 25 Lys Lys Ala Arg Val Glu Asp Ala Leu His Ala Thr Arg Ala Ala Val
 1 5 10 15
 30 Glu Glu Gly Val Gly Arg Leu Ile Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu
 20 25 30
 Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu
 35 40
 35 <210> 74
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 40 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 74
 45 Lys Lys Ala Arg Val Glu Asp Ala Leu His Ala Thr Arg Ala Ala Val
 1 5 10 15
 50 Glu Glu Gly Val Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Val Thr Lys
 20 25 30
 55 Lys Glu Glu Pro Val Asn Ile Glu
 35 40
 60 <210> 75
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 65 <400> 75

Lys Lys Ala Arg Val Glu Asp Ala Leu His Ala Thr Arg Ala Ala Val
 1 5 10 15
 5
 Glu Glu Gly Val Gly Arg Ile Ile Ser Ser Thr Pro Leu Ala Glu Asn
 20 25 30
 10
 Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu
 35 40
 <210> 76
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 15
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 20
 <400> 76
 Lys Lys Ala Arg Val Glu Asp Ala Leu His Ala Thr Arg Ala Ala Val
 1 5 10 15
 25
 Glu Glu Gly Val
 20
 <210> 77
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 30
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 35
 <400> 77
 40
 Lys Lys Ala Arg Val Glu Asp Ala Leu His Ala Thr Arg Ala Ala Val
 1 5 10 15
 45
 Glu Glu Gly Val Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr
 20 25 30
 50
 Ala Asn Ser
 35
 55
 <210> 78
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 78

1 Lys Lys Ala Arg Val Glu Asp Ala Leu His Ala Thr Arg Ala Ala Val
 5 5 10 15
 5 Glu Glu Gly Val Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr
 20 25 30
 10 Ala Asn Ala
 35
 <210> 79
 <211> 37
 <212> PRT
 15 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 20 <400> 79
 1 Lys Lys Ala Arg Val Glu Asp Ala Leu His Ala Thr Arg Ala Ala Val
 5 10 15
 25 Glu Glu Gly Val Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn
 20 25 30
 30 His His Trp His Lys
 35
 <210> 80
 <211> 31
 35 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 40 <400> 80
 1 Glu Gly Asp Glu Ala Thr Gly Ala Asn Ile Lys Val Ala Leu Glu Ala
 5 10 15
 45 Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ser
 20 25 30
 50 <210> 81
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 55 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 81
 60 Ala Cys Gly Ala Ala Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Thr Thr Thr
 1 5 10 15
 65 Thr Gly Thr Cys
 20

ES 2 389 849 T3

<210> 82
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 5
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 82
 10
 Thr Thr Gly Ala Thr Gly Cys Ala Gly Ala Gly Cys Thr Cys Cys Cys
 1 5 10 15
 15 Thr Cys Thr Thr
 20
 20
 <210> 83
 <211> 547
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 25
 <400> 83

1 Ala Ala Lys Asp Val 5 Lys Phe Gly Asn Asp 10 Ala Arg Val Lys 15 Met Leu
 5 Arg Gly Val 20 Asn Val Leu Ala Asp 25 Val Lys Val Thr 30 Leu Gly Pro
 10 Lys Gly Arg 35 Asn Val Val Leu Asp 40 Lys Ser Phe Gly 45 Ala Pro Thr Ile
 15 Thr Lys 50 Asp Gly Val Ser 55 Val Ala Arg Glu Ile 60 Glu Leu Glu Asp Lys
 20 Phe Glu 65 Asn Met Gly 70 Ala Gln Met Val Lys 75 Glu Val Ala Ser Lys 80 Ala
 25 Asn Asp Ala Ala 85 Gly Asp Gly Thr Thr 90 Thr Ala Thr Val Leu 95 Ala Gln
 30 Ala Ile Ile 100 Thr Glu Gly Leu Lys 105 Ala Val Ala Ala Gly Met 110 Asn Pro
 35 Met Asp 115 Leu Lys Arg Gly Ile Asp 120 Lys Ala Val Thr 125 Val Ala Val Glu
 40 Glu Leu 130 Lys Ala Leu Ser Val 135 Pro Cys Ser Asp 140 Ser Lys Ala Ile Ala
 45 Gln Val Gly Thr Ile 150 Ser Ala Asn Ser Asp 155 Glu Thr Val Gly Lys 160 Leu
 50 Ile Ala Glu Ala 165 Met Asp Lys Val Gly Lys 170 Glu Gly Val Ile Thr 175 Val
 55 Glu Asp Gly Thr 180 Gly Leu Gln Asp 185 Glu Leu Asp Val Val 190 Glu Gly Met
 200 Gln Phe 195 Asp Arg Gly Tyr Leu Ser 200 Pro Tyr Phe Ile 205 Asn Lys Pro Glu
 210 Thr Gly Ala Val Glu Leu 215 Glu Ser Pro Phe Ile 220 Leu Leu Ala Asp Lys
 225 Lys Ile Ser Asn Ile 230 Arg Glu Met Leu Pro Val 235 Leu Glu Ala Val 240 Ala

Lys Ala Gly Lys Pro Leu Leu Ile Ile Ala Glu Asp Val Glu Gly Glu
 245 250 255
 5
 Ala Leu Ala Thr Leu Val Val Asn Thr Met Arg Gly Ile Val Lys Val
 260 265 270
 10
 Ala Ala Val Lys Ala Pro Gly Phe Gly Asp Arg Arg Lys Ala Met Leu
 275 280 285
 15
 Gln Asp Ile Ala Thr Leu Thr Gly Gly Thr Val Ile Ser Glu Glu Ile
 290 295 300
 20
 Gly Met Glu Leu Glu Lys Ala Thr Leu Glu Asp Leu Gly Gln Ala Lys
 305 310 315 320
 25
 Arg Val Val Ile Asn Lys Asp Thr Thr Thr Ile Ile Asp Gly Val Gly
 325 330 335
 30
 Glu Glu Ala Ala Ile Gln Gly Arg Val Ala Gln Ile Arg Gln Gln Ile
 340 345 350
 35
 Glu Glu Ala Thr Ser Asp Tyr Asp Arg Glu Lys Leu Gln Glu Arg Val
 355 360 365
 40
 Ala Lys Leu Ala Gly Gly Val Ala Val Ile Lys Val Gly Ala Ala Thr
 370 375 380
 45
 Glu Val Glu Met Lys Glu Lys Lys Ala Arg Val Glu Asp Ala Leu His
 385 390 395 400
 50
 Ala Thr Arg Ala Ala Val Glu Glu Gly Val Val Ala Gly Gly Gly Val
 405 410 415
 55
 Ala Leu Ile Arg Val Ala Ser Lys Leu Ala Asp Leu Arg Gly Gln Asn
 420 425 430
 Glu Asp Gln Asn Val Gly Ile Lys Val Ala Leu Arg Ala Met Glu Ala
 435 440 445
 Pro Leu Arg Gln Ile Val Leu Asn Cys Gly Glu Glu Pro Ser Val Val
 450 455 460
 Ala Asn Thr Val Lys Gly Gly Asp Gly Asn Tyr Gly Tyr Asn Ala Ala
 465 470 475 480

Met Ile Thr Thr Glu Cys Met Val Thr Asp Leu Pro Lys Asn Asp Ala
515 520 525

5 Ala Asp Leu Gly Ala Ala Gly Gly Met Gly Gly Met Gly Gly Met Gly
530 535 540

10 Gly Met Met
545

<210> 84
<211> 13
<212> PRT
15 <213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

20 <400> 84

Val Ile Val Glu Leu Ile Pro Ser Thr Ser Ser Ala Val
1 5 10

25 <210> 85
<211> 21
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

30 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

35 <400> 85

Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu
1 5 10 15

40 Tyr Arg Asn Gly Lys
20

45 <210> 86
<211> 20
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

50 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 86

Lys Lys Asp Arg Val Thr Asp Ala Leu Asn Ala Thr Arg Ala Ala Val
1 5 10 15

55 Glu Glu Gly Ile
20

60 <210> 87
<211> 17
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

65 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 87

5 Glu Gly Asp Ile Glu Thr Gly Val Asn Ile Val Leu Lys Ala Leu Thr
 1 5 10 15
 Ala

REIVINDICACIONES

1. Composición de vacuna que comprende un antígeno y un adyuvante de péptido sintético KKARVEDALHATRAAVEEGV (Ec27; SEC ID N°: 76).
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, en la que el antígeno está seleccionado del grupo que consiste en: un péptido, un derivado de péptido, una proteína, un polisacárido y un anticuerpo.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que el antígeno es un antígeno vírico.
- 10 4. La composición de la reivindicación 1, en la que el antígeno está covalentemente unido a dicho adyuvante de péptido sintético.
5. La composición de la reivindicación 1 que comprende una mezcla del antígeno y dicho adyuvante de péptido sintético.
- 15 6. La composición de la reivindicación 3, en la que dicho antígeno vírico tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 11-12, 21 y 25-44 y análogos, homólogos, derivados y sales del mismo.
- 20 7. Un procedimiento de potenciación de la inmunogenicidad de un antígeno que comprende conjugar covalentemente el antígeno con un vehículo de péptido sintético de SEC ID N°: 76.

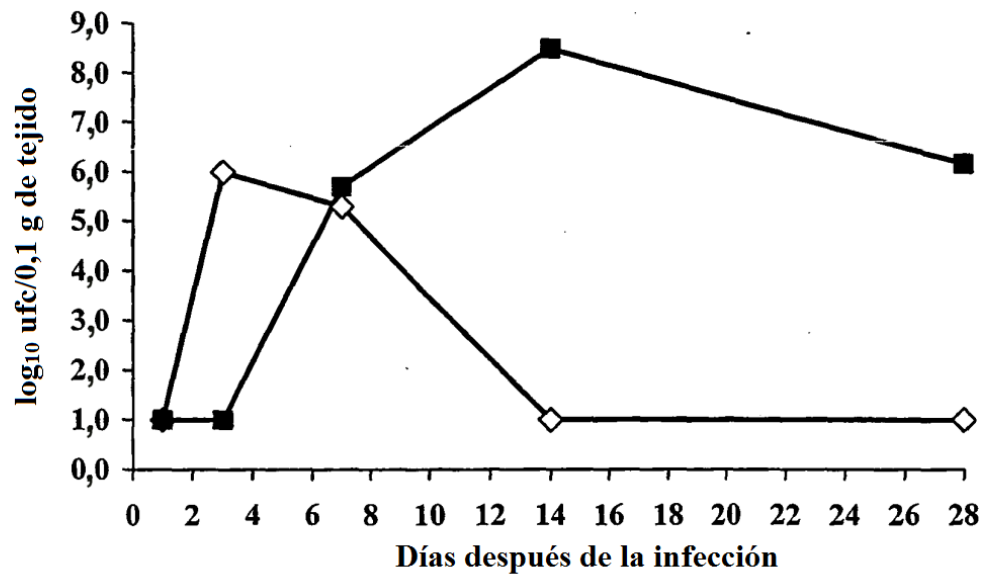


Figura 1A

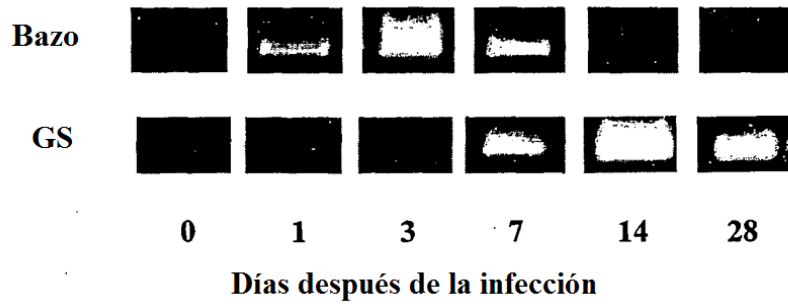


Figura 1B

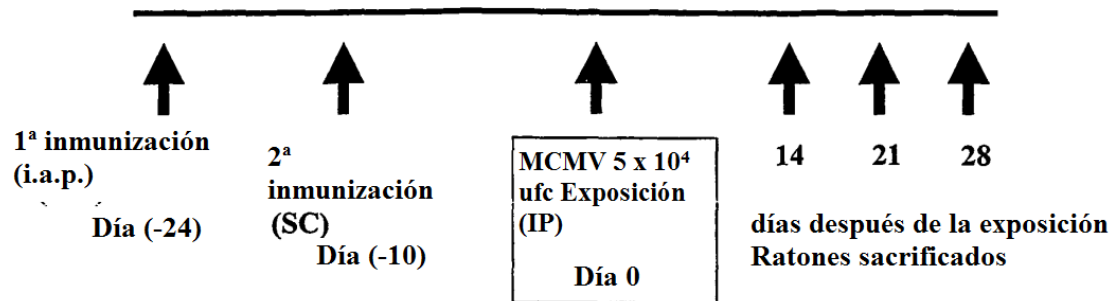


Figura 2A

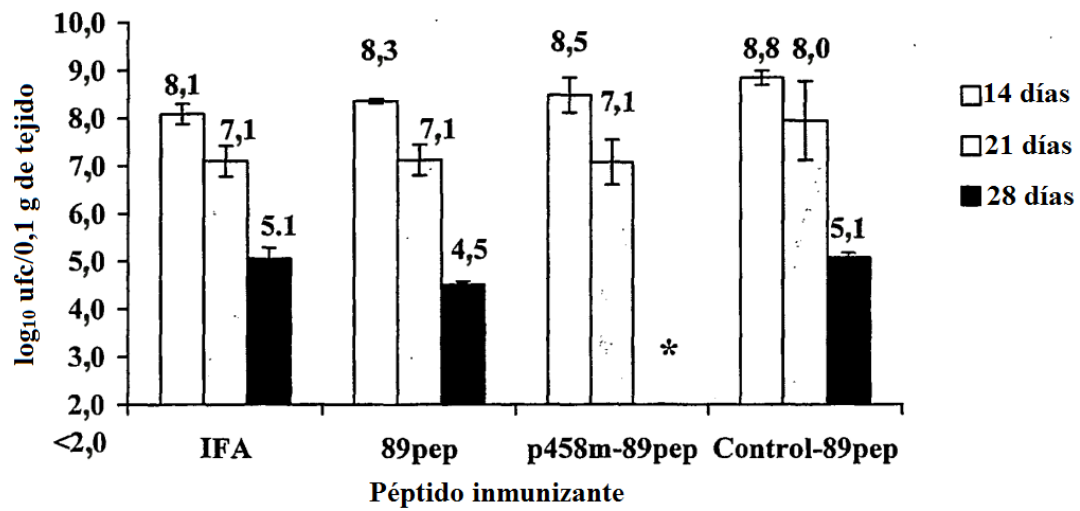


Figura 2B

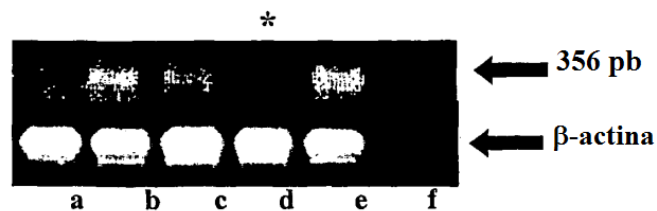


Figura 2C

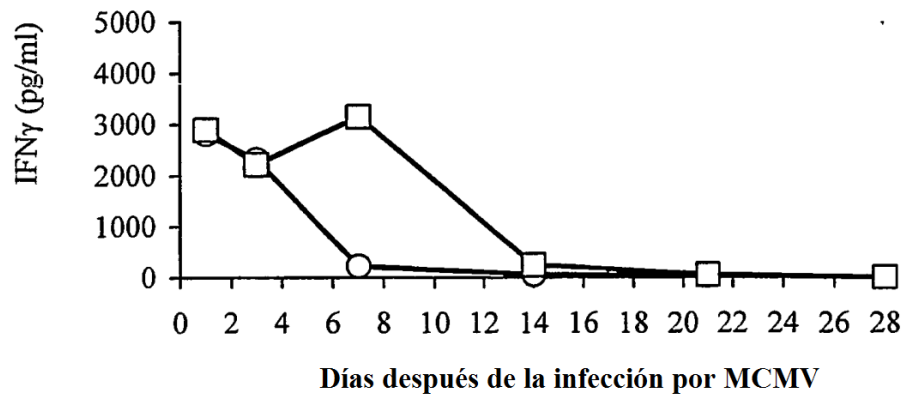


Figura 3A

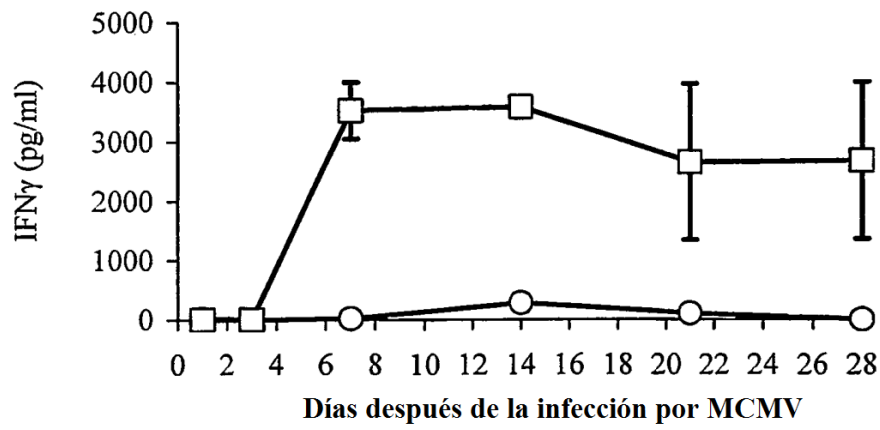


Figura 3B

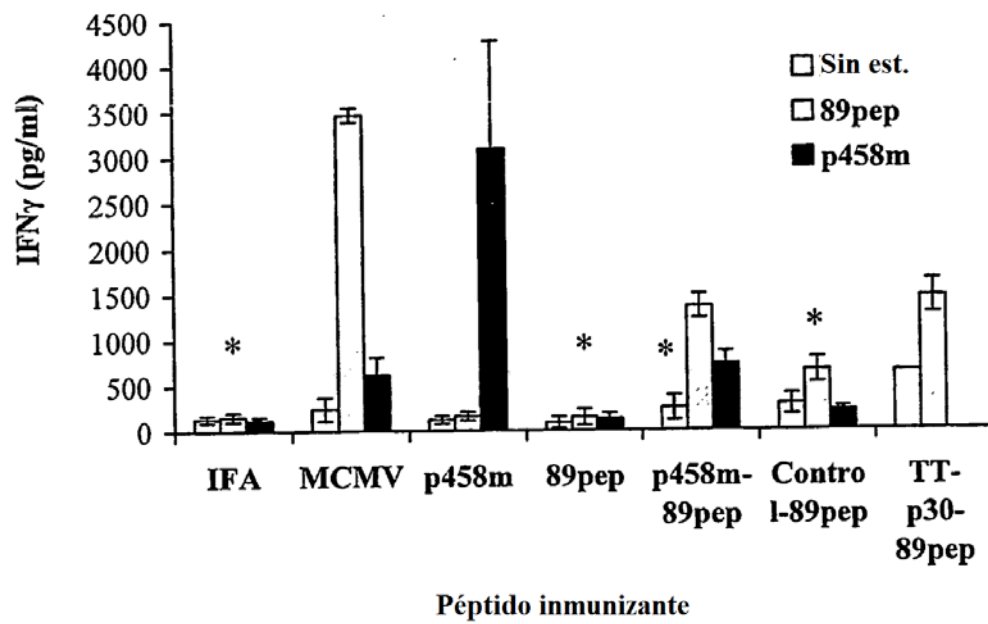


Figura 4

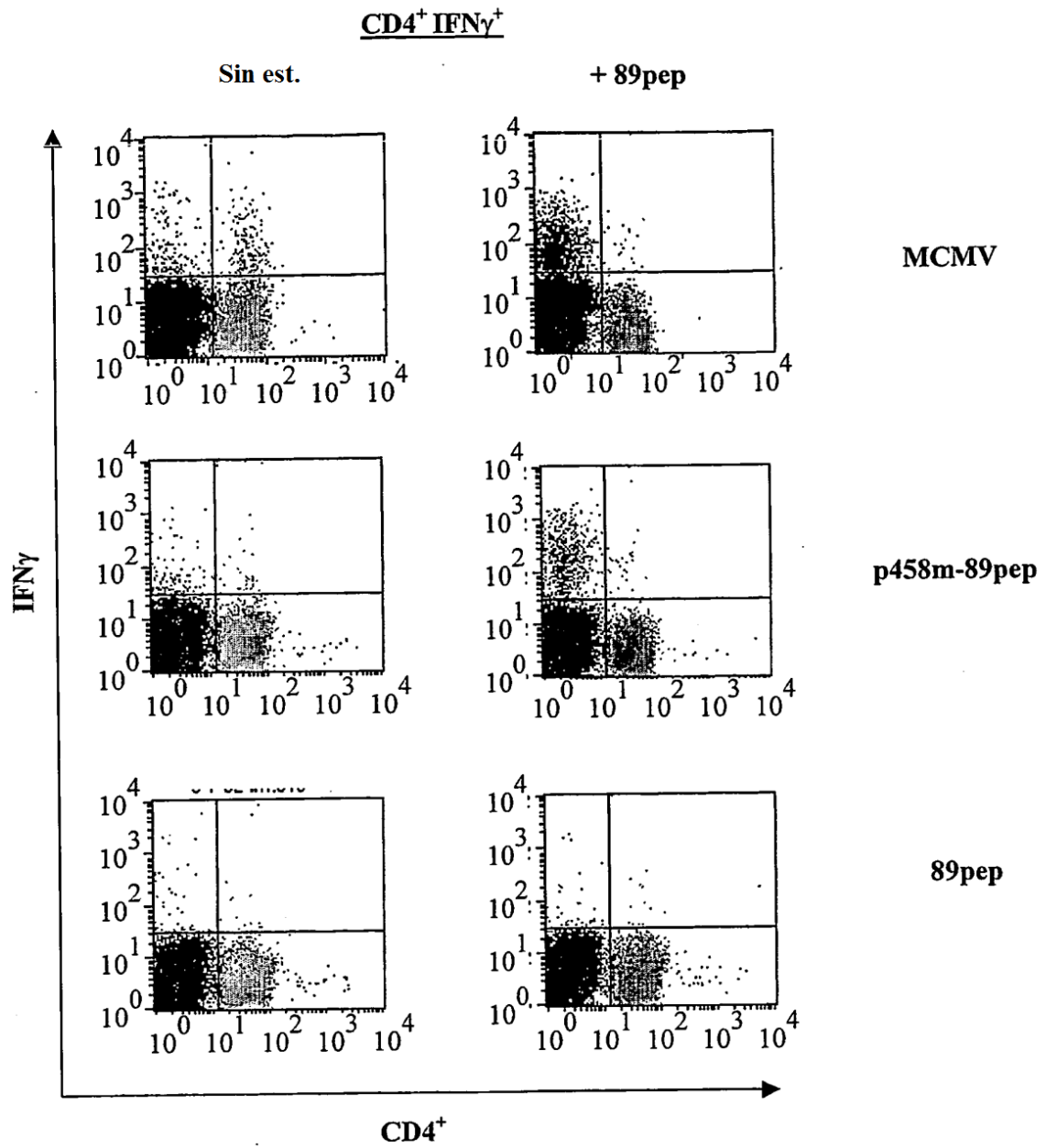


Figura 5A

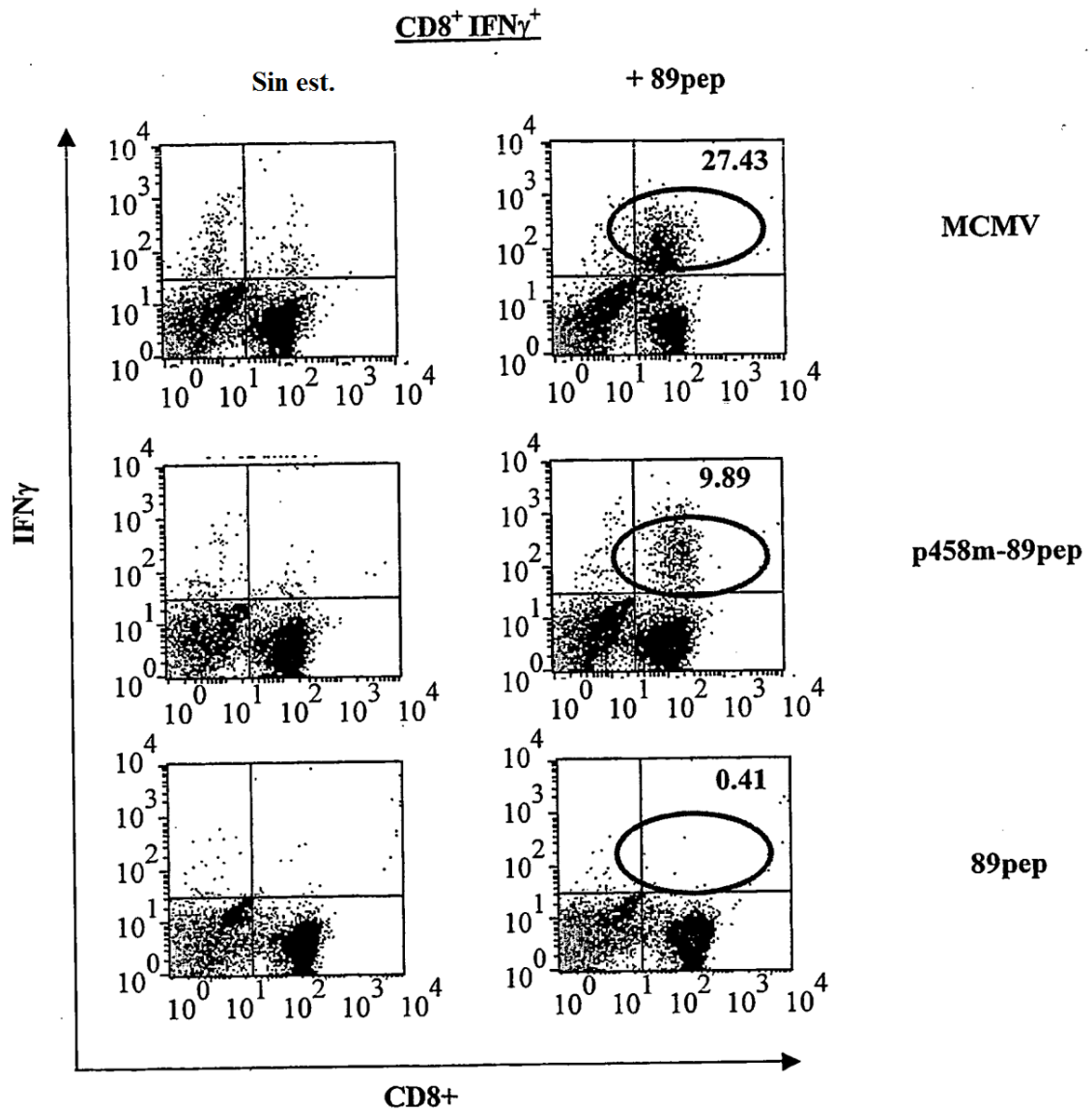


Figura 5B

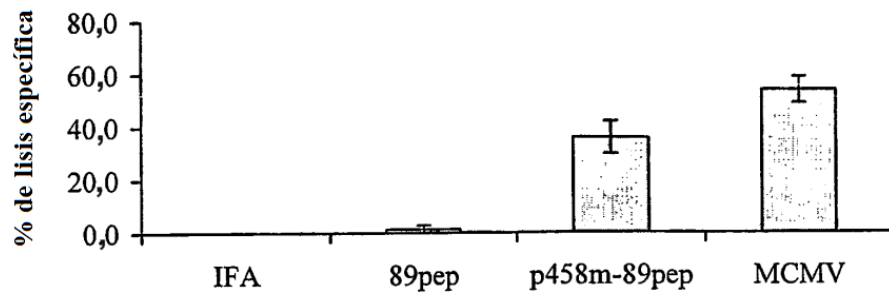


Figura 6

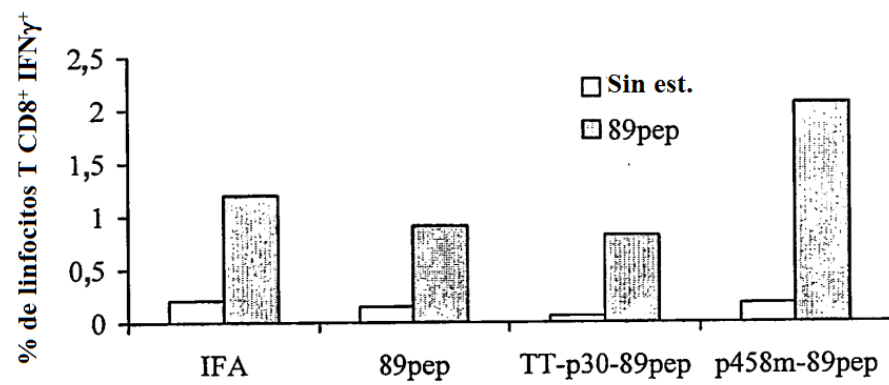


Figura 7

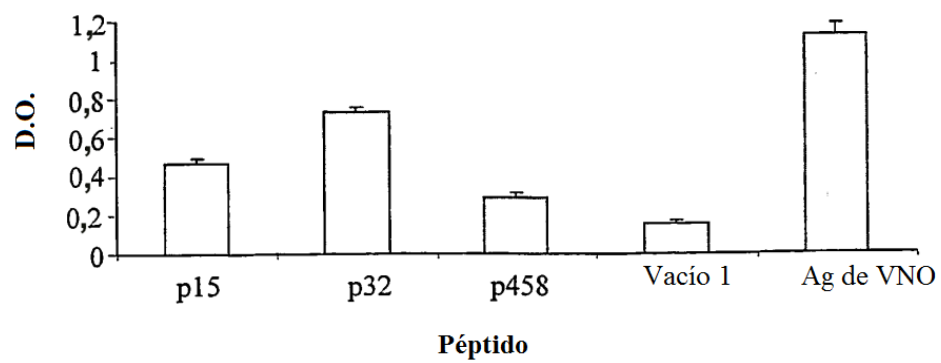


Figura 8

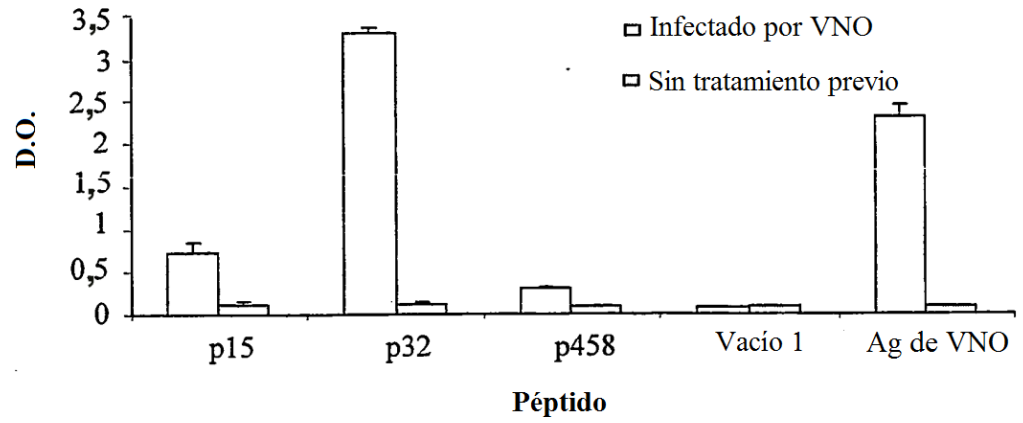


Figura 9

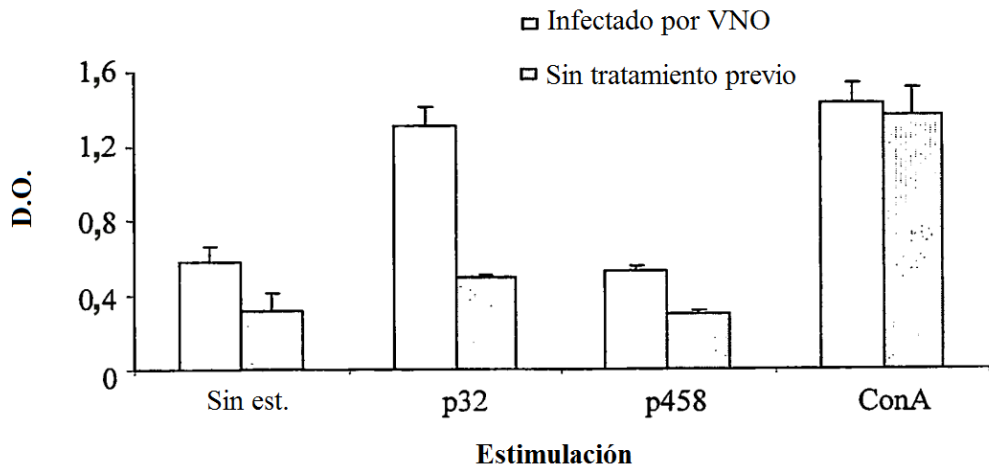


Figura 10

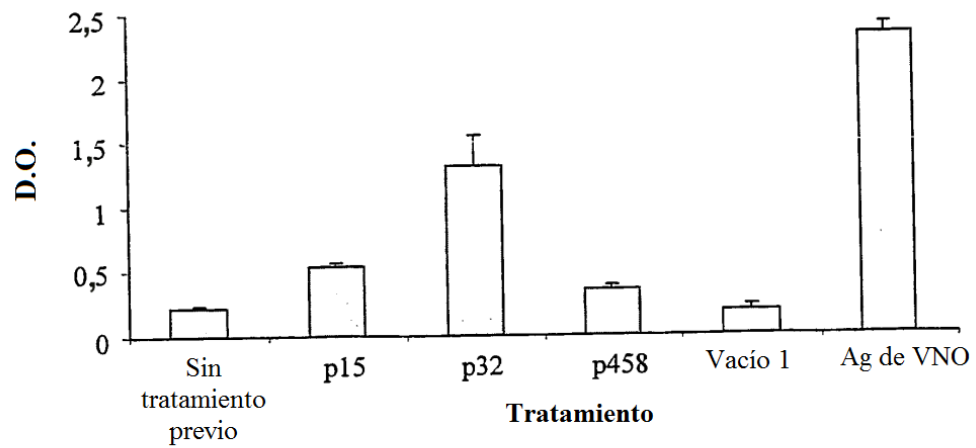


Figura 11A

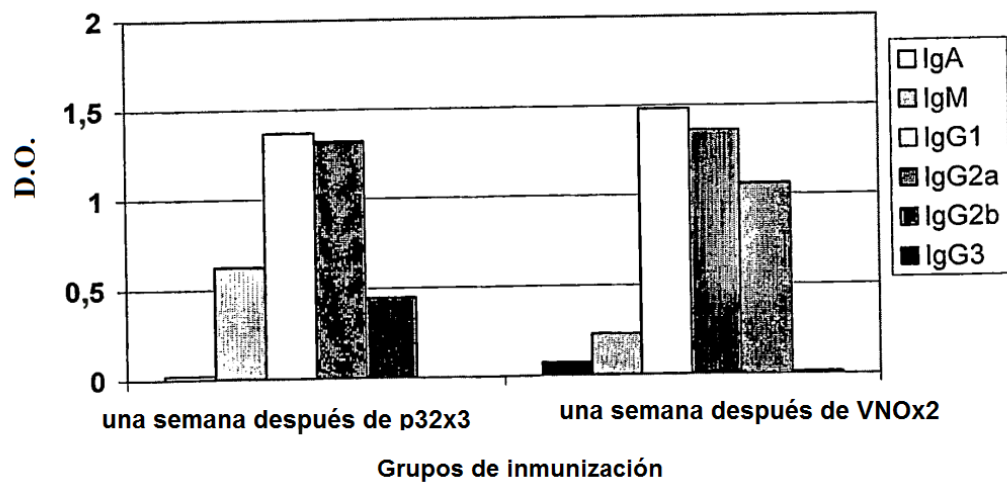


Figura 11B

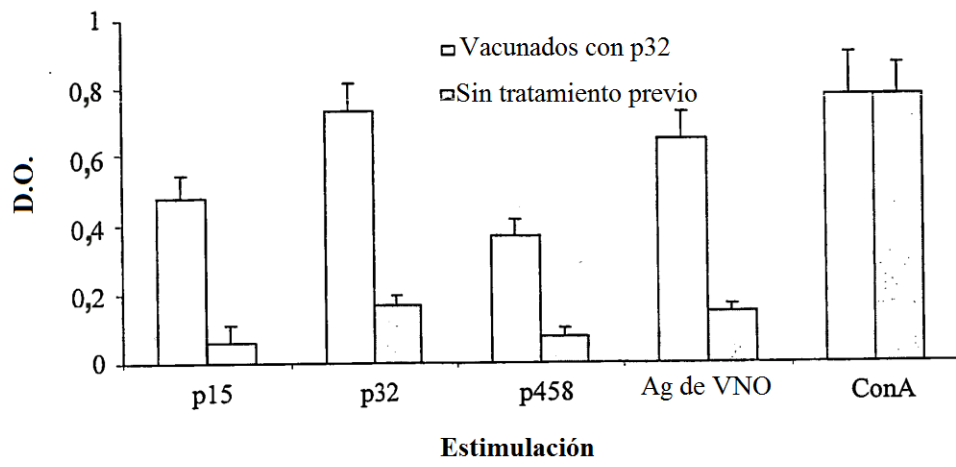


Figura 12

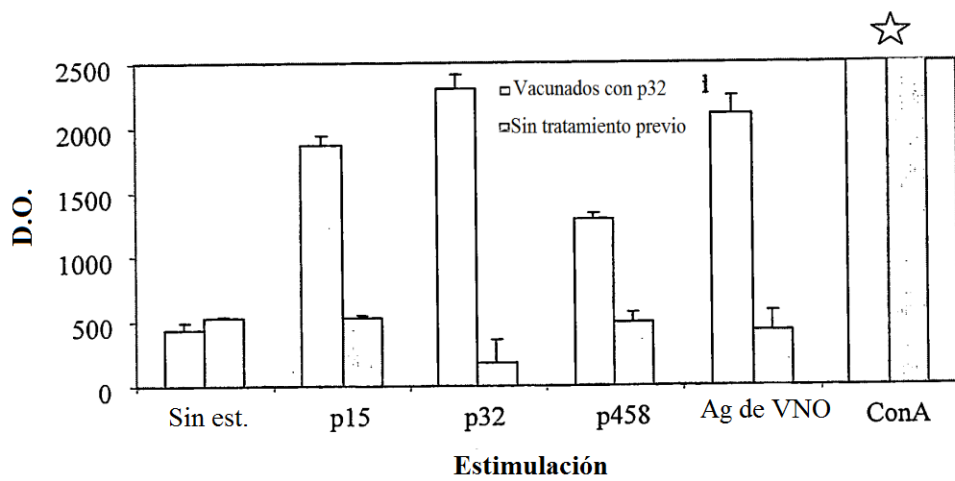


Figura 13

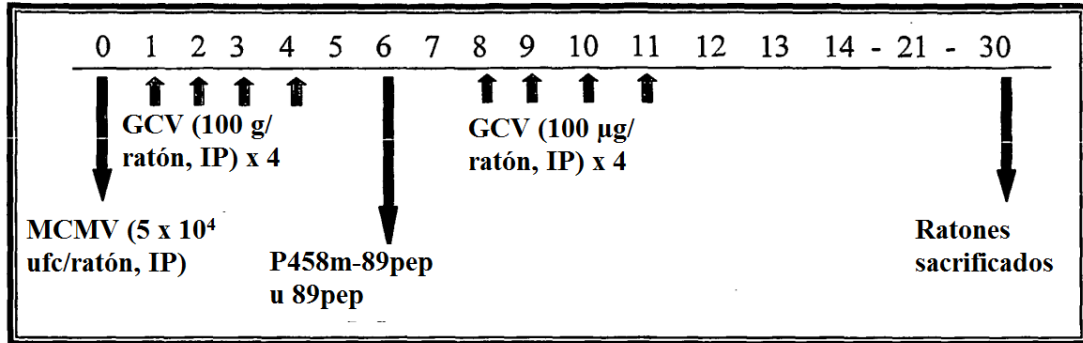


Figura 14A

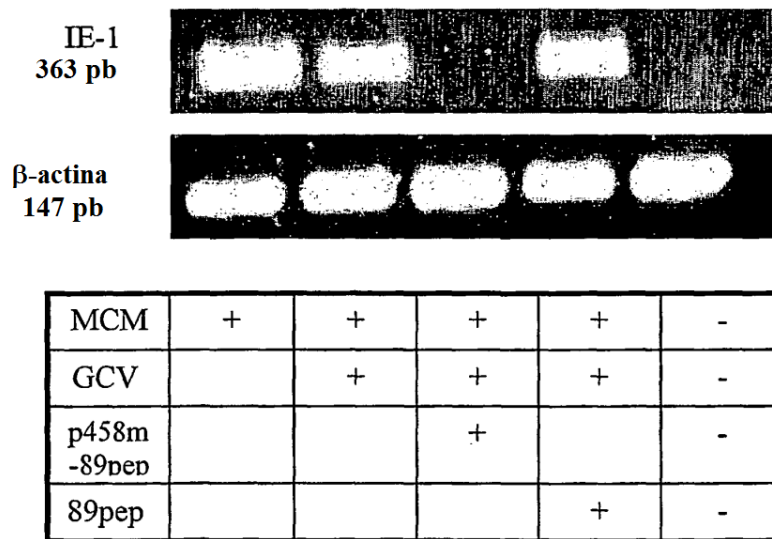


Figura 14B

Tratamiento	Títulos de virus (ufc/ml)	RT-PCR Ep de VNO	RT-PCR β -actina
Virus solo	4×10^8		
Inmunización con p32	$<10^1$ *		
Sin tratamiento previo	$<10^1$		

Figura 15

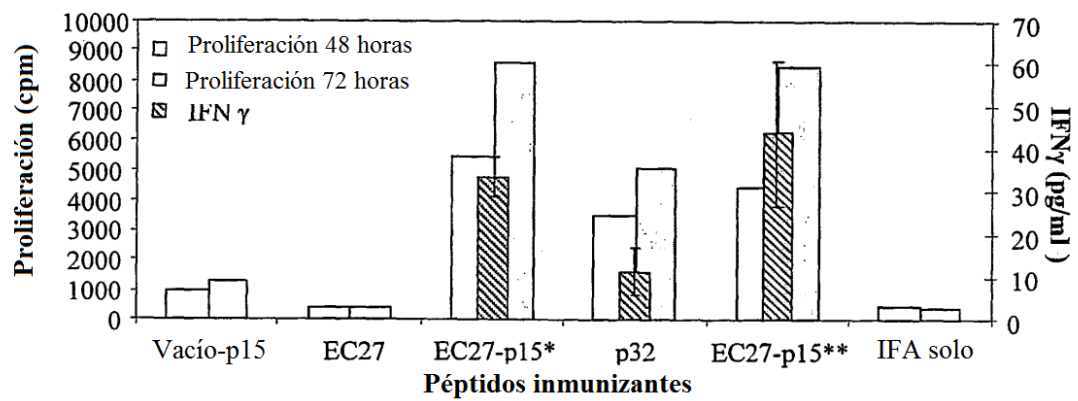


Figura 16

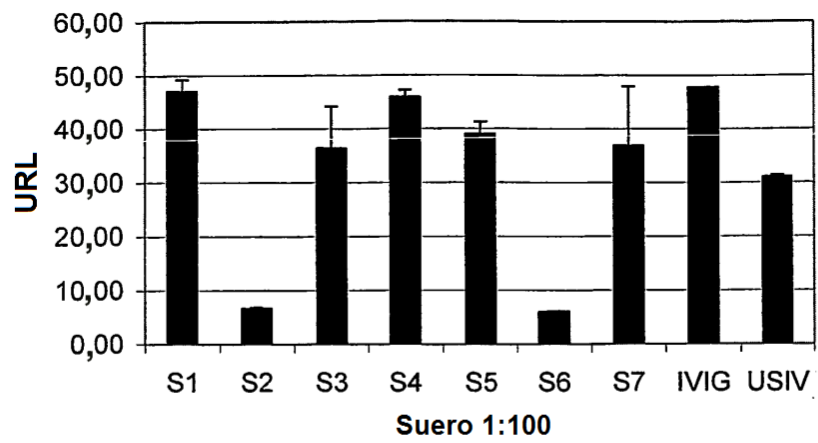


Figura 17A

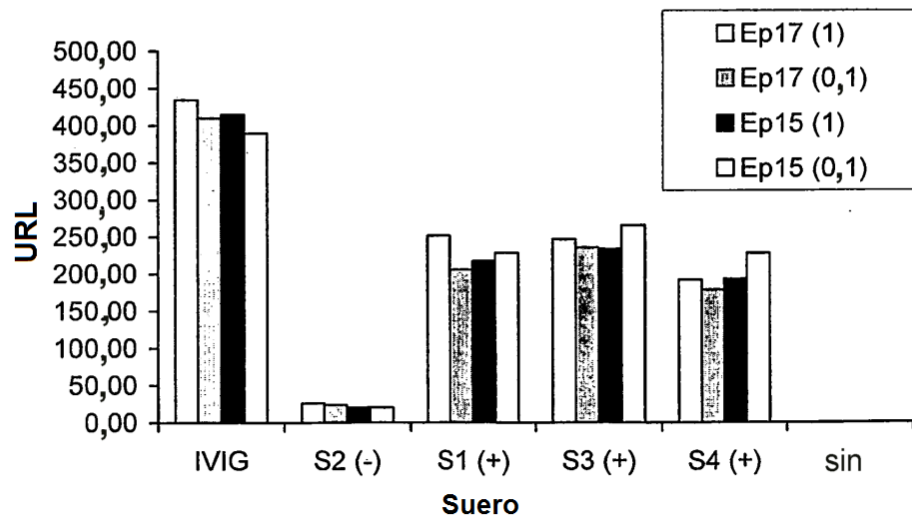


Figura 17B

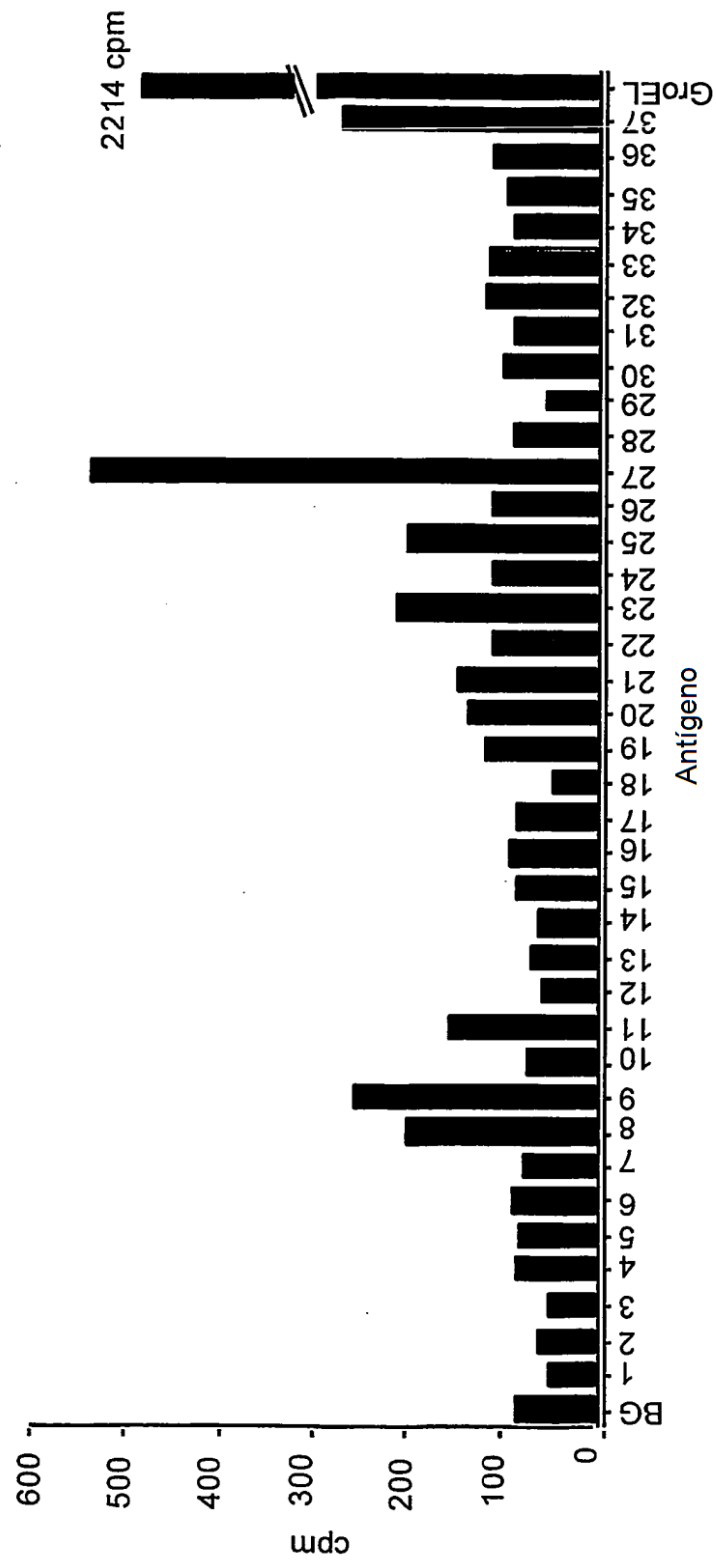


Figura 18A

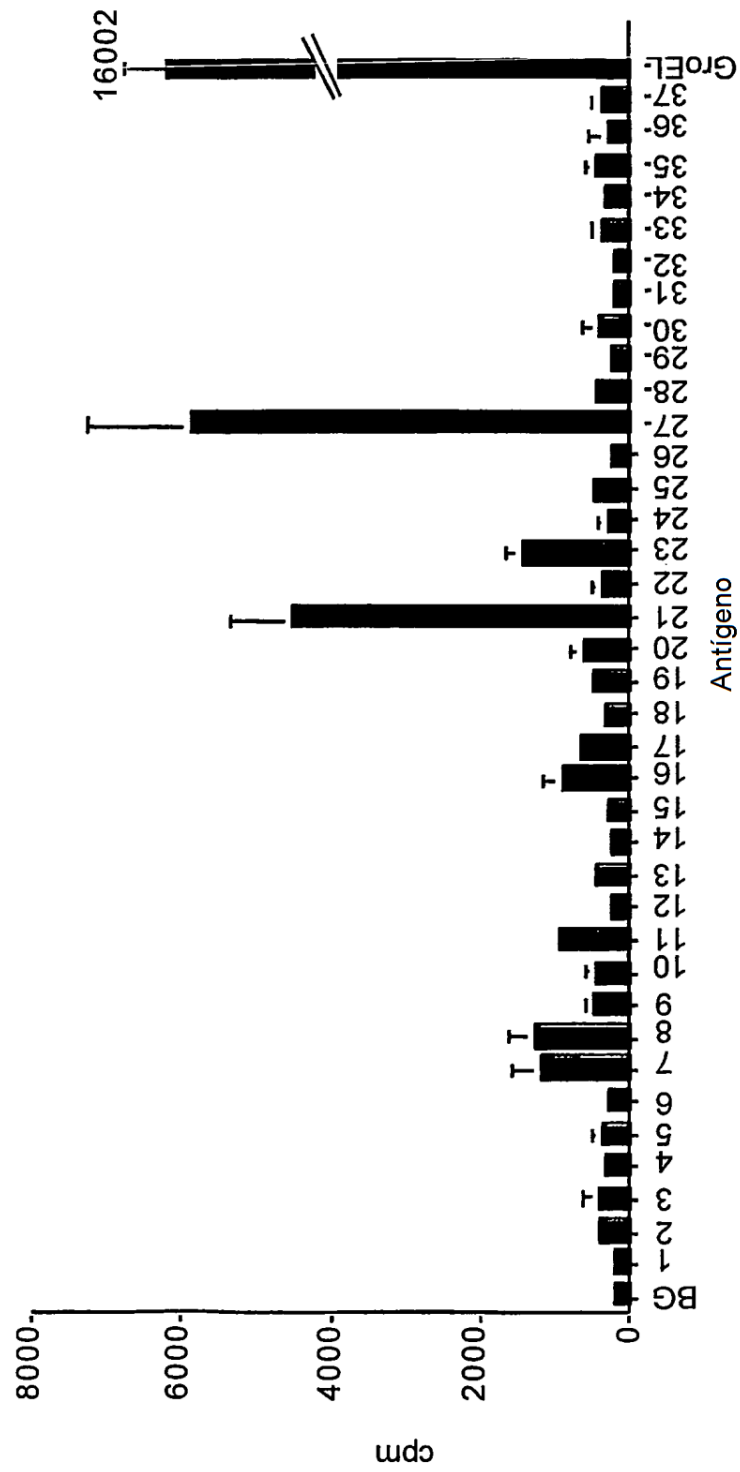


Figura 18B

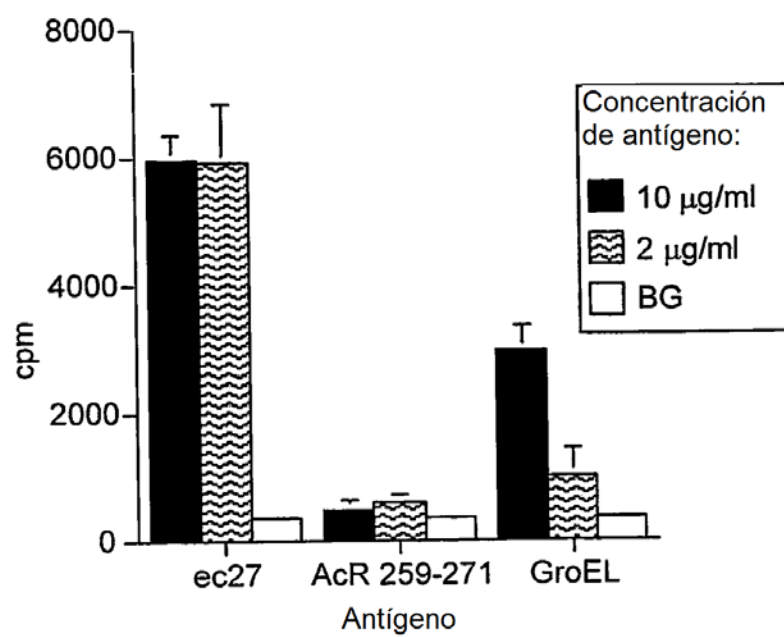


Figura 19

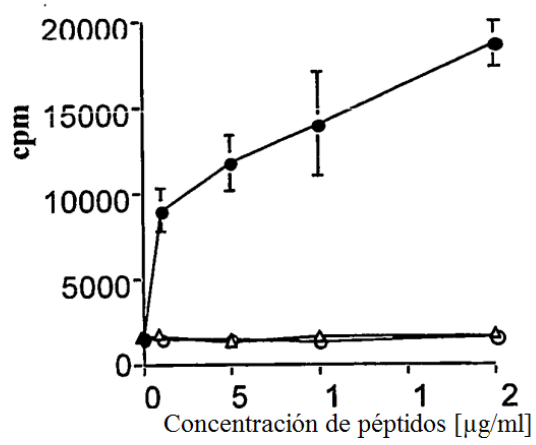


Figura 20A

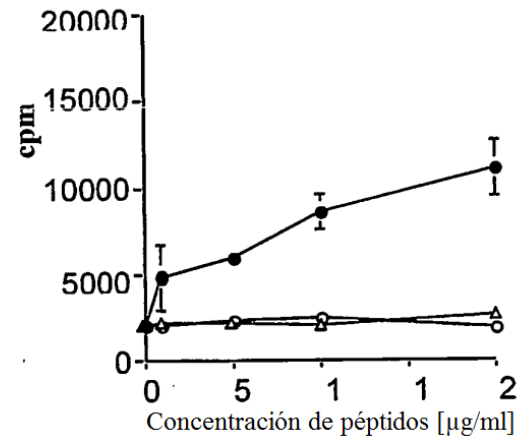


Figura 20B

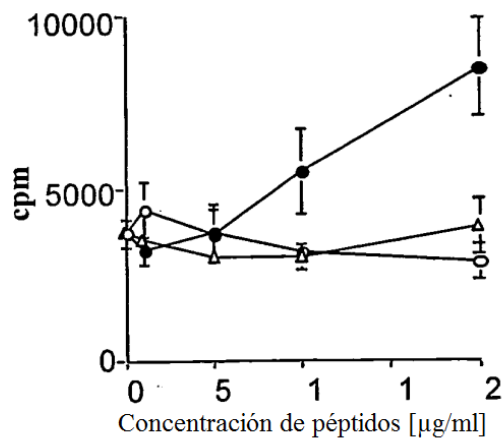


Figura 20C

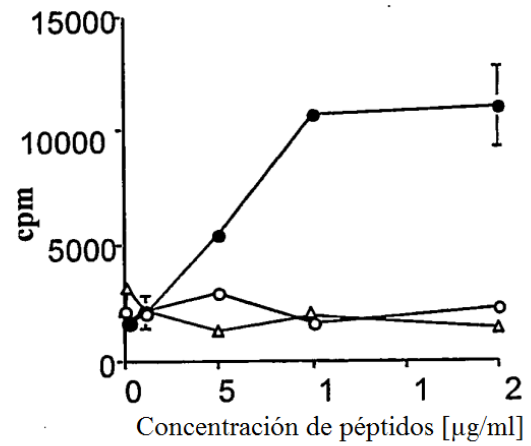


Figura 20D

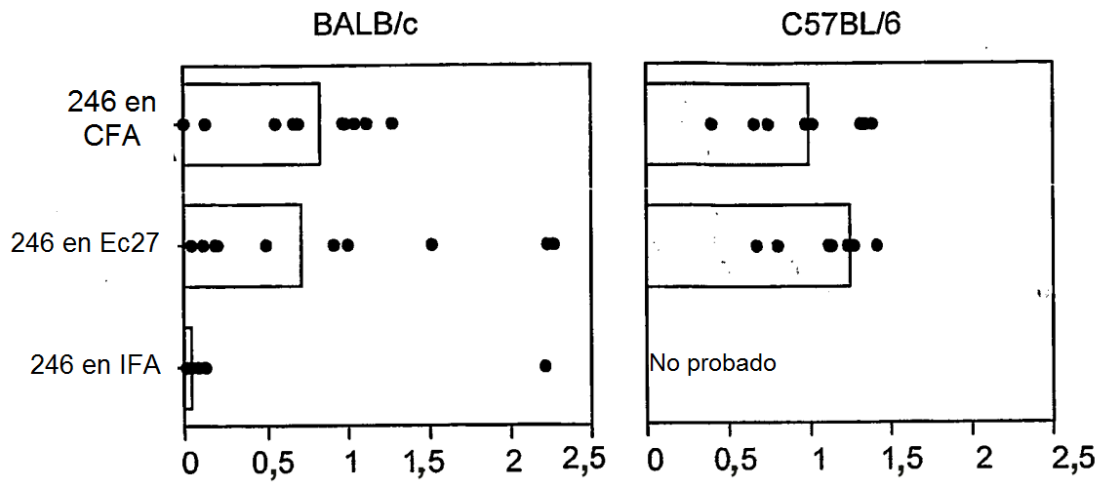


Figura 21A

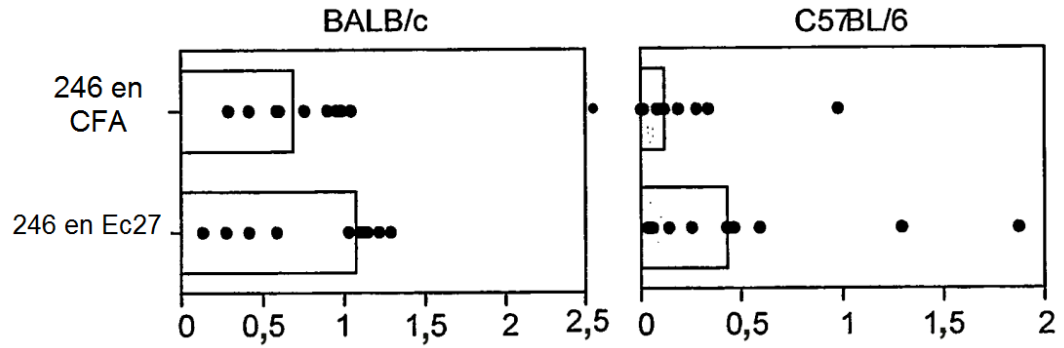


Figura 21B