

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 080**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07856406 .9**

96 Fecha de presentación: **06.12.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2121732**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.11.2009**

54 Título: **Haces de hélices superenrolladas de lipopéptido y partículas pseudovíricas sintéticas**

30 Prioridad:

09.12.2006 EP 06025497

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

04.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

04.12.2012

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT ZÜRICH PROREKTORAT
FORSCHUNG (100.0%)
RÄMISTRASSE 71
8006 ZÜRICH, CH**

72 Inventor/es:

**BOATO, FRANCESCA;
FREUND, ANNABELLE;
GHASPARIAN, ARIN;
MÖHLE, KERSTIN;
ROBINSON, JOHN A. y
THOMAS, RICHARD M.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 392 080 T3

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

DESCRIPCIÓN

Haces de hélices superenrolladas de lipopéptido y partículas pseudovíricas sintéticas

5 Campo de la invención

La invención se refiere a bloques constructivos de lipopéptido que comprenden un dominio superenrollado y opcionalmente un antígeno, los cuales se agregan formando haces de lipopéptidos helicoidales y partículas pseudovíricas sintéticas. Las partículas pseudovíricas sintéticas que portan antígenos resultan útiles como vacunas.

10

Antecedentes de la invención

15

Es bien conocido que los péptidos y proteínas de pequeño tamaño habitualmente sólo son pobremente inmunogénicos. Los adyuvantes tóxicos, tales como el bien conocido adyuvante completo de Freund, han sido ampliamente utilizados para inducir respuestas inmunológicas contra vacunas de subunidades en animales, aunque muchas no pueden utilizarse en el ser humano debido a sus efectos secundarios tóxicos. La situación ideal sería evitar por completo la utilización de adyuvantes externos, pero esto típicamente resulta en respuestas inmunológicas pobres. Sin embargo, el sistema inmunológico (humano) genera respuestas inmunológicas robustas contra patógenos que expresan estructuras antigénicas repetidas sobre una superficie, por ejemplo las superficies de un virus [Zinkernagel R., Science 171:173-178, 1996].

20

25

Los liposomas han sido intensamente investigados durante los últimos 30 años como portadores para productos farmacéuticos, entre ellos fármacos, ácidos nucleicos y biofármacos, y son bien conocidas las aplicaciones de los mismos, por ejemplo los vehículos de administración para antígenos, ácidos nucleicos y fármacos. Las propiedades de los liposomas pueden alterarse mediante el acoplamiento de péptidos o proteínas a la superficie de los mismos con el fin de reconocer receptores específicos, creando sistemas conocidos como proteoliposomas. También se han incorporado péptidos y proteínas en liposomas con el fin de generar respuestas inmunológicas [Leserman L., J. Liposome Res. 14:175-189, 2004; Frisch B. *et al.*, Methods Enzymol. 373:51-73, 2003]. El conjugado de péptidos con lípidos facilita su inserción en los liposomas, con el lípido anclado en la membrana bicapa, permitiendo de esta manera el reconocimiento del péptido por parte de anticuerpos en la superficie del liposoma. Una de las desventajas de los liposomas como vehículo general de administración es su inestabilidad *in vivo*, debido a su rápida eliminación de la sangre y la captura por parte de las células del sistema reticuloendotelial [Torchilin V.P., Nat. Rev. Drug Discov. 4:145-160, 2005].

30

35

40

Las potenciales ventajas de la utilización de partículas pseudovíricas, compuestas de virus naturales o modificados genéticamente y las quimeras, incluyendo fagos o componentes víricos naturales o modificados genéticamente, tales como las proteínas de cápside, las proteínas de superficie y las glucoproteínas, o fragmentos de los mismos, en el diseño de las vacunas, han sido reconocidas desde hace ya cierto tiempo [Felnerova D. *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 15:518-529, 2004; Garcea R.L. *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 15:513-517, 2004; Doan L.X. *et al.*, Rev. Med. Virol. 15:75-88, 2005]. La producción de dichas partículas pseudovíricas utiliza los procesos víricos naturales de autoensamblaje. Pueden aprovecharse las estructuras nucleares autoensamblantes naturales de muchos virus utilizando tecnología de ADN recombinante para expresar uno o más antígenos sobre la superficie de dichas partículas. Estas partículas pseudovíricas no son accesibles mediante síntesis química debido a su gran tamaño y complejidad estructural. Las solicitudes de patente WO n° 98/014564 y n° 00/035479 se refieren a "partículas pseudovíricas sintéticas", aunque las partículas a las que se hace referencia en ellas se basan en partículas víricas naturales o modificadas genéticamente, o a componentes de las mismas, construidas mediante métodos de ADN recombinante y basados en células, no materiales producidos mediante síntesis química. La patente WO n° 00/32227 describe la utilización de partículas nucleares de origen natural o no natural a la que se unen antígenos de modo ordenado y repetitivo, ejemplificadas por la utilización del virus recombinante Sindbis.

45

50

55

También se han realizado esfuerzos considerables para diseñar péptidos y proteínas autoensamblantes para aplicaciones nanotecnológicas. Se han producido morfologías a escala nanométrica basadas en péptidos anfífilos de diseño [Löwik D.W.P.M. *et al.*, Chem. Soc. Rev. 33:234-245, 2004], incluyendo las presentan estructuras secundarias de cadenas β , láminas β y hélices α [Rajagopal K. *et al.*, Curr. Opin. Struct. Biol. 14:480-486, 2004; Tu R.S. *et al.*, Adv. Drug Deliv. Revs. 56:1537-1563, 2004]. Pueden encontrarse ejemplos adicionales de la utilización de lipopéptidos para preparar materiales compuestos nanoestructurados en el trabajo de Stupp y colaboradores [Behanna H.A. *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 127:1193-1200, 2005]. Anteriormente se ha demostrado el autoensamblaje de un péptido anfífilo en nanofibras [Hartgerink J.D. *et al.*, Science 294:1684-1688, 2001].

60

65

Uno de los problemas principales durante el diseño de vacunas efectivas basadas en antígenos sintéticos ha sido su baja inmunogenicidad. Las moléculas sintéticas relativamente pequeñas tienden a ser poco inmunogénicas. Un enfoque para superar dicha baja inmunogenicidad es conjugar covalentemente el antígeno sintético con un portador, tal como una proteína como la toxina tetánica o la hemocianina de lapa americana (KLH) [Herrington D.A. *et al.*, Nature 328:257-259, 1987]. Sin embargo, el conjugado todavía debe administrarse en el animal conjuntamente con un adyuvante (por ejemplo alum o adyuvante de Freund) para inducir una respuesta inmunológica fuerte. Se han

descrito otros métodos para producir constructos multiepitopo que incorporan epítopos de células B y de células T (revisados en [Jackson D.C. *et al.*, Vaccine 18:355-361, 1999].

Los análogos sintéticos de lipopéptidos bacterianos han recibido mucha atención en la investigación sobre vacunas, por sus efectos adyuvantes y como portadores para péptidos antigénicos [Ghielmetti M. *et al.*, Immunobiology 210:211-215, 2005]. Es conocido que los lípidos y lipopéptidos pueden actuar como adyuvantes de inmunógenos peptídicos que de otra manera serían débiles [Jung G. *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. 10:872, 1985; Martinon F. *et al.*, J. Immunol. 149:3416, 1992]. Se ha informado de muchos constructos lipopéptidos, en los que un lípido con efectos adyuvantes conocidos se acopla con un péptido para generar candidatos a vacunas autoadyuvantes. Han sido particularmente bien estudiados la tripalmitoil-S-gliceril-cisteína (N-palmitoil-S-(2,3-bis-(O-palmitoiloxi)-propil)-cisteinilo o Pam3Cys) y la dipalmitoil-S-gliceril-cisteína (2,3-bis-(O-palmitoiloxi)-propil)-cisteinilo o Pam2Cys) [Ghielmetti M. *et al.*, Immunobiology 210:211-215, 2005]. Dichas fracciones lipídicas se encuentran en componentes lipoproteína de las membranas interna y externa de las bacterias Gram-negativas. Los lipopéptidos sintéticos que portan dichos u otros residuos S-gliceril-cisteína diacilados o triacilados en el extremo N-terminal se ha demostrado que son ligandos específicos de receptores de tipo Toll [Reutter F. *et al.*, J. Pept. Res. 65:375-383, 2005; Buwitt-Beckmann U. *et al.*, Eur. J. Immunol. 35:1-8, 2005]. Además, la conjugación de péptidos antigénicos con Pam3Cys o Pam2Cys se ha aplicado al diseño de candidatos a vacuna sintética autoadyuvante [Bessler W.G. *et al.*, Int. J. Immunopharmac. 19:547-550, 1998; Loleit M. *et al.*, Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 371:967-975, 1990; Muller C.P. *et al.*, Clin. Exp. Immunol. 78:499-504, 1989]. La solicitud de patente WO n° 98/07752 describe la utilización para el direccionamiento de fármacos, de lipopéptidos en los que la parte péptido puede ser una secuencia de tipo colágeno capaz de inducir la formación de estructuras de triple hélice.

Recientemente han aparecido varias revisiones sobre el diseño de hélices superenrolladas [Woolfson D.N., Adv. Prot. Chem. 70:79-112, 2005], incluyendo un volumen de Advances in Protein Chemistry dedicado a las hélices superenrolladas, el colágeno y los elastómeros [Parry D.A.D. *et al.*, Advances in Protein Chemistry 70, 2005]. Muchos virus y microbios naturales contienen secuencias peptídicas con estructura de hélice superenrollada dentro de sus propias proteínas de superficie (por ejemplo la hemaglutinina del virus Influenza o gp41 del virus 1 de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) o la glucoproteína F del virus sincitial respiratorio (VSR)).

Descripción resumida de la invención

La invención se refiere a bloques constructivos de lipopéptido (BLC) que consisten de una cadena peptídica (CP) que comprende un dominio de hélice superenrollada, unido covalentemente a una fracción lípido (FL) que comprende dos o tres cadenas hidrocarbilo largas y opcionalmente unido a un antígeno (A); haces de hélices de lipopéptido (HHL) que comprenden dos, tres, cuatro o cinco bloques constructivos de lipopéptido (LBB), estando determinado el número de bloques constructivos por las propiedades del dominio de hélice superenrollada en la cadena peptídica de los bloques constructivos lipopépticos (LBB) y partículas pseudovíricas sintéticas (SVLP) que comprenden un gran número de haces de lipopéptidos helicoidales (HLB) y que presentan una estructura esférica o esferoide con un núcleo lipídico y una superficie externa peptídica.

La invención se refiere además a procedimientos de producción de bloques constructivos de lipopéptido (LBB), haces de lipopéptidos helicoidales (HLB) y partículas pseudovíricas sintéticas (SVLP); a la utilización de bloques constructivos de lipopéptido (LBB) y a partículas pseudovíricas sintéticas (SVLP) que portan antígenos, en la preparación de vacunas; y a métodos de vacunación que utilizan dichas vacunas. De manera similar, la invención se refiere a preparaciones farmacéuticas que contiene partículas pseudovíricas que portan antígenos.

Las diversas composiciones de la invención resultan útiles para inducir respuestas inmunológicas para la prevención o tratamiento de enfermedades, trastornos o condiciones, incluyendo enfermedades infecciosas, alergias, cáncer, adicción a fármacos, envenenamiento y generalmente para inducir eficientemente las respuestas inmunológicas específicas de antígeno.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Representación esquemática de los componentes y ensamblaje de una CP de SVLP, comprendiendo la cadena peptídica un dominio superenrollado; FL, fracción lípido; A, antígeno; LBB, bloque constructivo de lipopéptido; HLB, haz de lipopéptido helicoidal (se muestra un trímero); SVLP, partícula pseudovírica sintética (con antígenos).

Figura 2: Representación esquemática de motivos héptadas presentes en péptidos superenrollados

A: Héptada. a, b, c, d, e, f, g: residuos α -aminoácidos (todos (L) o todos (D)). a y d (mostrados con una flecha) son α -aminoácidos hidrofóbicos. 3 a 8 motivos héptada representan un típico péptido superenrollado.
B: Ensamblaje en un trímero que muestra las interacciones de los residuos hidrofóbicos a y d.

Figura 3: Perfil representativo del equilibrio de sedimentación de agregados de lipopéptido 4. Panel inferior: A^{231} , absorbancia en 231 nm. Puntos de datos para 5.000, 7.500 y 10.000 rpm. La concentración de lipopéptido era de

24 μM en fosfato sódico 0,01 M, pH 7,4, que contenía cloruro sódico 0,09 M (PBS). Panel superior: ΔDO , diferencia de densidades ópticas. Residuales del ajuste global de 18 datos a 24 y 48 μM y con 3 velocidades de rotor.

5 Figura 4: Experimentos de velocidad de sedimentación para agregados de lipopéptido 4 a diferentes concentraciones

c(s): distribución del coeficiente de sedimentación aparente. Todas las distribuciones (para 10, 30, 50, 75, 100 y 150 μM) se encontraban centradas entre 9,5 y 10 S.

10 Figura 5: Modelo informático de SVLP

SVLP formado a partir de lipoproteína 4 compuesta de 24 subunidades (HLB). Cada HLB (mostrados a la derecha) está formado de tres copias del lipopéptido 4, proporcionando una superhélice trimérica.

15 Figura 6: Espectros de CD de agregados de lipopéptido 4 y péptido 5 λ , longitud de onda en nm; Θ , elipticidad por residuo medio, en $\text{grados.cm}^2/\text{dmol}$. lipopéptido 4 (20 μM) and peptide 5 (50 μM) en PBS a pH 7,4

20 Figura 7: Espectros de emisión de pireno-3-carboxialdehído (PYCHO) de agregados de lipopéptido 4
 λ , longitud de onda, en nm; I_{437} , intensidad de fluorescencia a 437 nm (unidades arbitrarias). Las diferentes curvas corresponden a tampón (PBS) y las concentraciones de lipopéptido 4: 80, 100, 200, 400, 600, 800 y 1.000 nM.

25 Figura 8: Concentraciones micelares críticas de agregados de lipopéptido 4.
 Los datos de fluorescencia se analizaron para determinar las concentraciones micelares críticas (CMC). Los datos se expresan como I_{437} / I_{466} frente a la concentración de lipopéptido 4 (nM). La inserción muestra cómo se determinaría la CMC bajo condiciones ideales.

30 Figura 9: Análisis de distribución NICOMP ponderado por número de las mediciones de DLS para agregados de lipopéptido 4.
 Solución 1,1 mM de lipopéptido 4 en tampón TRIS a pH 7,4 y 20°C. El diámetro medio de las partículas formadas era de aproximadamente 17 nm.

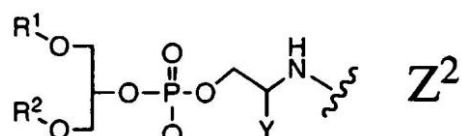
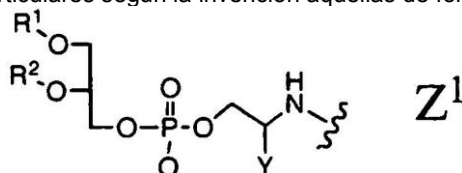
35 Figura 10: Micrografías electrónicas de tinción negativa de agregados de lipopéptido 4.
 SVLP formadas por el lipopéptido 4 en tampón TRIS, pH 7,4. Barra de escala a la izquierda, 20 nm; barra de escala a la derecha, 50 nm (ampliación). Pueden apreciarse claramente la forma de estrella de las partículas de 15 a 20 nm y la elevada homogeneidad de la muestra.

Descripción detallada de la invención

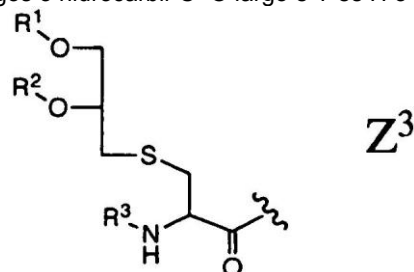
- La invención comprende bloques constructivos de lipopéptido (LBB) que consisten de:
- 40 - una cadena peptídica (PC) que comprende un dominio superenrollado, unido covalentemente a:
 - una fracción lípido (FL) que comprende tres, o preferentemente dos, cadenas hidrocarbilo largas, y opcionalmente unido a:
 - un antígeno (A).
- 45 La cadena peptídica (CP) comprende dominios superenrollados. Dichos dominios superenrollados se asocian en un haz helicoidal definido, por ejemplo en un haz dimérico, trimérico, tetramérico, pentamérico, hexamérico o heptamérico. El péptido puede contener entre 12 y 120 residuos aminoácidos, preferentemente entre 21 y 80 residuos aminoácidos. Los dominios superenrollados contienen múltiples motivos repetidos en tándem, que, como péptidos autónomos carentes de lípidos, presentan la propiedad de autoensamblarse en un haz helicoidal superenrollado paralelo. La cadena peptídica (CP) debe multimerizarse para formar un haz helicoidal superenrollado paralelo de estado de oligomerización definido (por ejemplo dímero, trímero, tetramero, pentámero, hexámero o heptámero, en particular dímero, trímero, tetramero o pentámero). Las secuencias peptídicas preferentes son secuencias no humanas, para evitar el riesgo de trastornos autoinmunológicos al aplicarse en la vacunación de seres humanos.
- 50 La cadena peptídica puede comprender además un motivo de secuencia de aminoácidos que incluye uno o más epítopos de células T ayudantes y/o filas de residuos polares que estimulan la solubilidad del bloque constructivo de lipopéptido (LBB) en agua.
- 55 La fracción lípido (FL) contiene un anclaje lipídico con dos o tres, preferentemente dos, cadenas hidrocarbilo largas y una estructura que combina dichas cadenas hidrocarbilo y la conecta a la cadena peptídica (CP), directamente o mediante un conector. Son fracciones lípido preferentes los fosfolípidos que contienen dos o tres, preferentemente dos, cadenas hidrocarbilo extendidas.
- 60 La expresión "hidrocarbilo largo" se refiere a un grupo alquilo o alquenilo lineal de por lo menos 7 átomos de carbono, por ejemplo alquilo o alquenilo lineal que consiste de entre 8 y 50 átomos de C, preferentemente de entre 8

y 25 átomos de C. Los alquénilo preferentemente presentan uno, dos o tres dobles enlaces en la cadena, cada uno con una geometría E o Z, tal como se encuentra habitualmente en los ácidos grasos y alcoholes grasos naturales. También se encuentran incluidos en la definición de "hidrocarbilo largo" los alquilos o alquénilos ramificados, por ejemplo alquilos que portan un sustituyente metilo o etilo en el segundo o tercer átomo de carbono contado desde el final de la cadena, tal como, por ejemplo, 2-etil-hexilo.

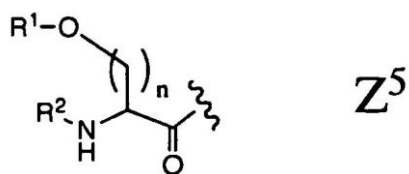
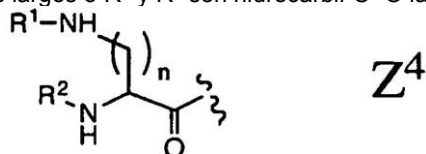
Son fracciones lípido preferentes particulares según la invención aquéllas de fórmula Z¹ a Z⁸.



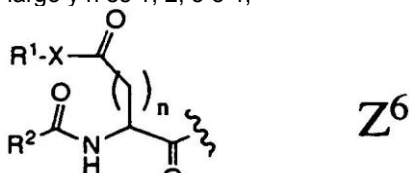
en la que R¹ y R² son hidrocarbilos largos o hidrocarbilo-C=O largo e Y es H o COOH.



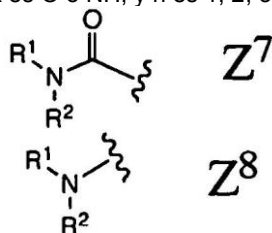
en la que R¹, R² y R³ son hidrocarbilos largos o R¹ y R² son hidrocarbilo-C=O largo y R³ es H o acetilo,



en las que R¹ y R² son hidrocarbilo-C=O largo y n es 1, 2, 3 ó 4,



en las que R¹ y R² son hidrocarbilos largos, X es O o NH, y n es 1, 2, 3 ó 4, o

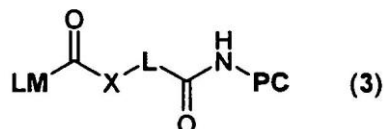
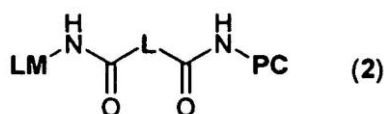


en las que R¹ y R² son hidrocarbilos largos.

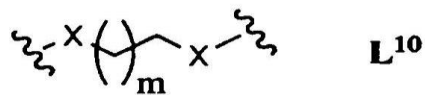
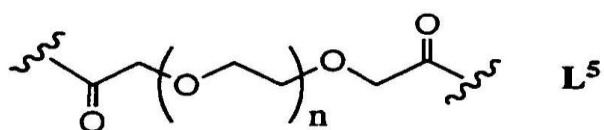
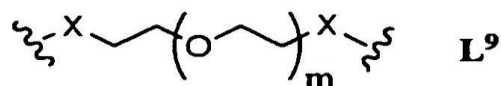
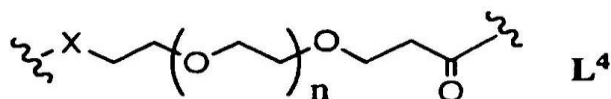
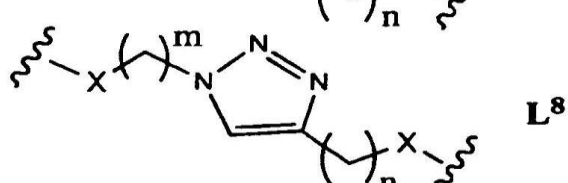
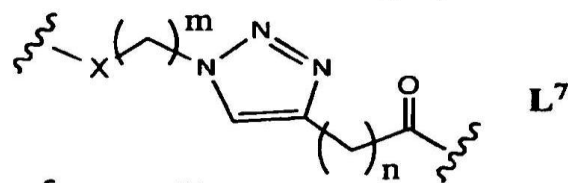
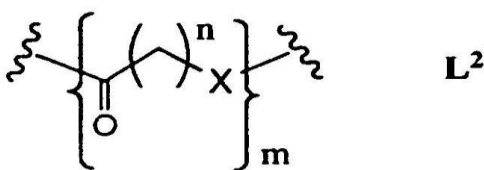
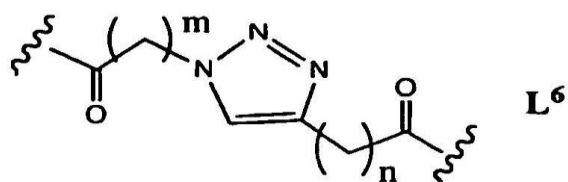
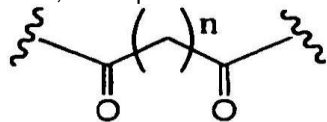
La fracción lípido contiene por lo menos dos cadenas hidrocarbilo largos, tales como las que se encuentran en los

ácidos grasos, por ejemplo tal como en Z^1 a Z^8 . Una fracción lípido preferente es un fosfolípido de entre diversos tipos, por ejemplo de fórmula Z^1 o Z^2 , que presenta cadenas alquilo o alquenilo unidas mediante éster o éter, tales como un enantiómero de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina o análogos aquirales, tales como 1,3-dipalmitoil-glicero-2-fosfoetanolamina. Una fracción lípido preferente es un residuo tripalmitoil-S-glicerilcisteinilo o dipalmitoil-S-glicerilcisteinilo (tipo Z^3) o fracciones lípidos de los tipos Z^4 a Z^8 . Resultan más preferentes las fracciones lípido indicadas en los Ejemplos.

La cadena peptídica (CP) se encuentra unida covalentemente a la fracción lípido (FL) en un extremo o en una posición próxima a un extremo, es decir, el extremo N-terminal o el extremo C-terminal, preferentemente el extremo N-terminal. La fracción lípido puede unirse directamente (1) o mediante un conector (2 ó 3), en la que L se refiere a un conector y X es O o NH.



Resultará evidente para el experto en la materia, que existe una gran diversidad de conectores y estrategias de acoplamiento adecuados, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, los conectores basados en derivados de ácido dicarboxílico, conectores que contienen una o múltiples unidades de etilenglicol, residuos aminoácidos (incluyendo α -aminoácidos, β -aminoácidos, γ -aminoácidos y δ -aminoácidos, etc.) o unidades sacáridas (de carbohidrato), o que contienen anillos herocíclicos. Son conectores particulares los conectores L^1 a L^{10} , en los que n se encuentra comprendido entre 1 y 20 y m se encuentra comprendido entre 1 y 20, mostrados con el grupo funcional conector C=O o X, en el que X es O o NH:



Resultan más preferentes los conectores indicados en los Ejemplos.

La expresión "próximo a un extremo" tal como se interpreta en el presente contexto se refiere a que la fracción lípido se encuentra unida al primer, segundo, tercer, cuarto o quinto aminoácido contado desde el extremo N-terminal o C-terminal, respectivamente, del péptido. La fracción lípido puede unirse al esqueleto de la estructura peptídica o a la cadena lateral de uno de dichos aminoácidos próximos al extremo.

"Antígenos" tal como se define en la presente invención son moléculas capaces de ser ligadas por un anticuerpo. El antígeno puede comprender un péptido, una proteína o un mimético de epítipo que presenta uno o más epítopos de célula B que deben utilizarse para inducir una respuesta inmunológica humoral específica de antígeno en un animal. Alternativamente, el antígeno puede comprender un hapteno o un carbohidrato. Los antígenos peptídicos y proteicos adecuados comprenden hasta 150 aminoácidos y entre ellos se incluyen los glucopéptidos y las glucoproteínas. Las secuencias peptídicas y proteicas pueden seleccionarse para inducir una respuesta inmunológica, por ejemplo contra una o más variedades de agente infeccioso. Dichos antígenos son bien conocidos de la técnica. Un mimético de epítipo es una molécula que imita un epítipo peptídico o carbohidrato natural, incluyendo compuestos peptídicos que contienen uno o más aminoácidos no naturales, por ejemplo D-aminoácidos, β -aminoácidos, γ -aminoácidos, δ -aminoácidos o ϵ -aminoácidos, y otros conocidos en la técnica de los miméticos de epítipo. Resultan preferentes los peptidomiméticos restringidos conformacionalmente, que se encuentran fijos en una conformación de tipo proteico. "Haptenos" se refiere a compuestos orgánicos con un peso molecular inferior a 3.000, que no inducen respuestas inmunológicas humorales por sí mismos, pero que inducen una respuesta inmunológica tras su unión a un portador. Entre los haptenos ejemplares se incluyen los fármacos, hormonas, toxinas y carbohidratos.

Resultan preferentes los antígenos indicados en los Ejemplos.

El antígeno se encuentra unido covalentemente en el otro extremo, o en una posición próxima al mismo, de la cadena peptídica, en donde "otro" se refiere al extremo del péptido que no porta la fracción lípido. En el caso de que la fracción lípido se encuentra conectada al extremo N-terminal del péptido o en una posición próxima al extremo, el antígeno se encuentra unido al extremo C-terminal o en una posición próxima al extremo. En el caso de que la fracción lípido se encuentra conectada al extremo C-terminal del péptido, el antígeno se encuentra unido al extremo N-terminal o en una posición próxima al extremo.

Pueden conjugarse uno o más antígenos al dominio superenrollado de la cadena peptídica (CP), por ejemplo mediante una o más de las cadenas laterales de aminoácidos en el péptido superenrollado (por ejemplo lisina o cisteína) o al extremo de la cadena peptídica. El antígeno porta un grupo funcional adecuado para la conjugación con un grupo funcional en una de las cadenas laterales o en el extremo de la cadena peptídica. Resultan preferentes los antígenos reconocidos por un receptor de célula B, o por un hapteno, para inducir respuestas inmunológicas basadas en anticuerpos y específicas de antígeno.

Los "dominios superenrollados" se diseñan mediante cuidadosa selección de las secuencias de aminoácidos apropiadas que forman un haz paralelo α -helicoidal termodinámicamente estable de hélices mediante autoasociación espontánea.

Un dominio superenrollado incluye péptidos basados en repeticiones en tándem de secuencias héptadas canónicas formando α -hélices anfipáticas dextrógiras, que después se ensamblan formando haces helicoidales con superhélices levógiras. También se encuentran incluidos los péptidos contruidos a partir de repeticiones no canónicas y no basadas en héptadas, que forman hélices superenrolladas que no son necesariamente levógiras o ni siquiera superhélices normales.

Las hélices superenrolladas canónicas se encuentran ampliamente presentes en péptidos y proteínas biológicamente activos naturales, y también han sido diseñadas *de novo*. Se ha determinado un conjunto de reglas para el diseño de péptidos helicoidales superenrollados que adoptan haces helicoidales con un estado de oligomerización, topología y estabilidad definidos (por ejemplo dímero, trímero, tetrámero, pentámero, hexámero o heptámero). Estas reglas permiten a los diseñadores construir una secuencia peptídica compatible con una estructura diana dada. Resulta más importante que las secuencias de los péptidos helicoidales superenrollados canónicos contengan un motivo de siete residuos característico que típicamente se repite 3 a 10 veces. Las posiciones dentro de un motivo héptada tradicionalmente se expresan como abcdefg, encontrándose mayoritariamente (aunque no exclusivamente) residuos hidrofóbicos en los sitios a y d, y generalmente residuos polares favorecedores de hélices en otros sitios. Los motivos héptada en tándem a lo largo de una cadena peptídica presentan una separación media entre los residuos a y d que les permite encontrarse situados en una cara de la α -hélice. En el caso de que dos o más hélices se empaqueten conjuntamente en un haz superenrollado, las caras hidrofóbicas de las hélices se asocian y envuelven entre sí con el fin maximizar los contactos entre las superficies hidrofóbicas (figura 2). El tipo de residuo que puede encontrarse en cada posición dentro de una repetición de héptada influirá sobre la estabilidad y estado de oligomerización del haz helicoidal. En general, en los sitios a y d mayoritariamente se utilizan residuos hidrofóbicos (Ala, Ile, Leu, Met y Val) o cadenas laterales hidrofóbicas aromáticas (Phe, Trp y Tyr). Los sitios restantes, b, c, e, f y g, tienden a ser más permisivos que los sitios a y d, aunque resultan favorecidos los residuos polares y favorecedores de hélice (Ala, Glu, Lys y Gln). La elección de residuos en los sitios a y d puede influir sobre el estado de oligomerización de la hélice superenrollada (es decir, dímero frente a trímero). De esta manera, los dímeros resultan favorecidos en el caso de que se encuentren residuos no de ramificación β (por ejemplo Leu) en las posiciones d; en estos sitios, los residuos con ramificación β (Val

e Ile) resultan desfavorables a la formación de dímeros. Por otra parte, en los dímeros, resultan preferentes los residuos con ramificación β (Ile y Val) en los sitios a. Otra regla es que $a=d$ =Ile o Leu favorece la formación de trímeros, lo que resulta útil para diseñar hélices superenrolladas que forman específicamente trímeros paralelos. Dichas reglas y otras reglas de diseño se comentan en mayor detalle en [Woolfson D.N., Adv. Prot. Chem. 70:79-112, 2005].

El motivo héptada codifica α -hélices anfipáticas que se oligomerizan a partir de sus caras hidrofóbicas (figura 2). El dominio superenrollado incluye por lo menos tres motivos repetidos héptadas en tándem. El número superior de repeticiones héptadas en cada cadena influirá sobre la estabilidad del haz helicoidal. Se encuentra limitado principalmente por la viabilidad de la síntesis química de péptidos largos, aunque resultan preferentes las secuencias que contienen más de tres repeticiones héptadas (por ejemplo cuatro, cinco, seis, siete u ocho repeticiones héptadas). Los Ejemplos, comentados posteriormente, forman hélices superenrolladas α -helicoidales triméricas (ver también la figura 1), aunque la invención se refiere de manera similar a dominios superenrollados diméricos, tetraméricos, pentaméricos, hexaméricos y heptaméricos.

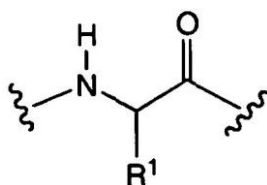
Los dominios superenrollados según la invención pueden presentar unidades repetidas más largas, por ejemplo repeticiones de 11 residuos y repeticiones de 15 residuos, tales como las presentes en las hélices superenrolladas naturales. De esta manera, los haces helicoidales requeridos para la formación de estructuras de agregados también aparecer al utilizar motivos superenrollados con periodicidades diferentes de siete. Las hélices superenrolladas con periodicidades no habituales también resultan posibles. En muchas hélices superenrolladas naturales, el patrón ininterrumpido de repeticiones de héptadas puede contener diversas discontinuidades. Dos discontinuidades habituales son inserciones de un residuo en el patrón de héptadas, así como las inserciones de tres o cuatro residuos. Por ejemplo, se observa la inserción de un residuo en la hélice superenrollada trimérica de la hemaglutinina del virus Influenza. Otras hélices superenrolladas naturales muestran una periodicidad diferente de siete, por ejemplo la periodicidad regular de 11 residuos (denominada endécadas) observada en la proteína de capa superficial tetrabrachion de *Staphylothermus marinus*.

Otros ejemplos de secuencias peptídicas superenrolladas presentes naturalmente en las proteínas de cubierta vírica son los motivos superenrollados que forman haces helicoidales triméricos en la proteína de cubierta gp41 de VIH-1 y la glucoproteína F del VSR. Estos dominios superenrollados se encuentran incluidos en la definición de dominio superenrollado según la invención.

Los péptidos helicoidales superenrollados preferentes deben contener entre 3 y 8 motivos héptadas unidos en tándem. Los motivos héptadas dentro de la hélice superenrollada pueden presentar secuencias idénticas (tal como en el lipopéptido 8) o cada una de ellas puede presentar una secuencia diferente (tal como en los lipopéptidos 6 y 7). En todos los casos, las siete posiciones de los siete residuos aminoácidos dentro de un motivo héptada se designan con las letras: a, b, c, d, e, f y g. Por lo tanto, el péptido helicoidal superenrollado comprende una secuencia de aminoácidos que presenta las posiciones (abcdefg)₃₋₈.

Resultan preferentes las secuencias peptídicas helicoidales superenrolladas que contienen entre 3 y 8 motivos héptadas unidos en tándem, en las que las posiciones a y d en cada motivo héptada (abcdefg) contienen α -aminoácidos pertenecientes al Grupo 1 y/o al Grupo 2 tal como se define posteriormente en la presente memoria. Además, no pueden resultar ocupadas más de dos de todas las posiciones a y d por cualquier residuo aminoácido perteneciente al Grupo 3, y no puede resultar ocupada más de una de entre la totalidad de posiciones a y d por cualquier residuo aminoácido perteneciente al Grupo 4 ó al Grupo 5 ó por glicina. Además, en las posiciones b, c, e, f y g, los α -aminoácidos pertenecientes a los Grupos 3, 4 y 5 resultan preferentes, aunque están permitidos los aminoácidos pertenecientes a los Grupos 1 y 2, con la adición de que no más de una de dichas posiciones dentro de un motivo héptada cualquiera puede ser glicina y ninguno puede ser prolina.

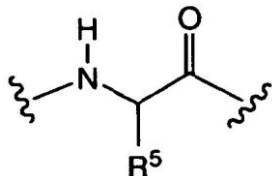
El Grupo 1 comprende los residuos α -aminoácido con cadenas laterales hidrofóbicas R^1 de tamaño pequeño a medio.



Un residuo hidrofóbico R^1 se refiere a una cadena lateral de aminoácidos que no presenta carga a pH fisiológico y que resulta repelido por una solución acuosa. Estas cadenas laterales generalmente no contienen grupos donantes de enlaces de hidrógeno, tales como amidas primarias y secundarias, aminas primarias y secundarias y las sales protonadas correspondientes de las mismas, tioles, alcoholes, ureas o tioureas. Sin embargo, pueden contener grupos aceptores de enlaces de hidrógeno, tales como éteres, tioéteres, ésteres, amidas terciarias o aminas terciarias. Entre los aminoácidos codificados genéticamente en dicho grupo se incluyen alanina, isoleucina, leucina, metionina y valina.

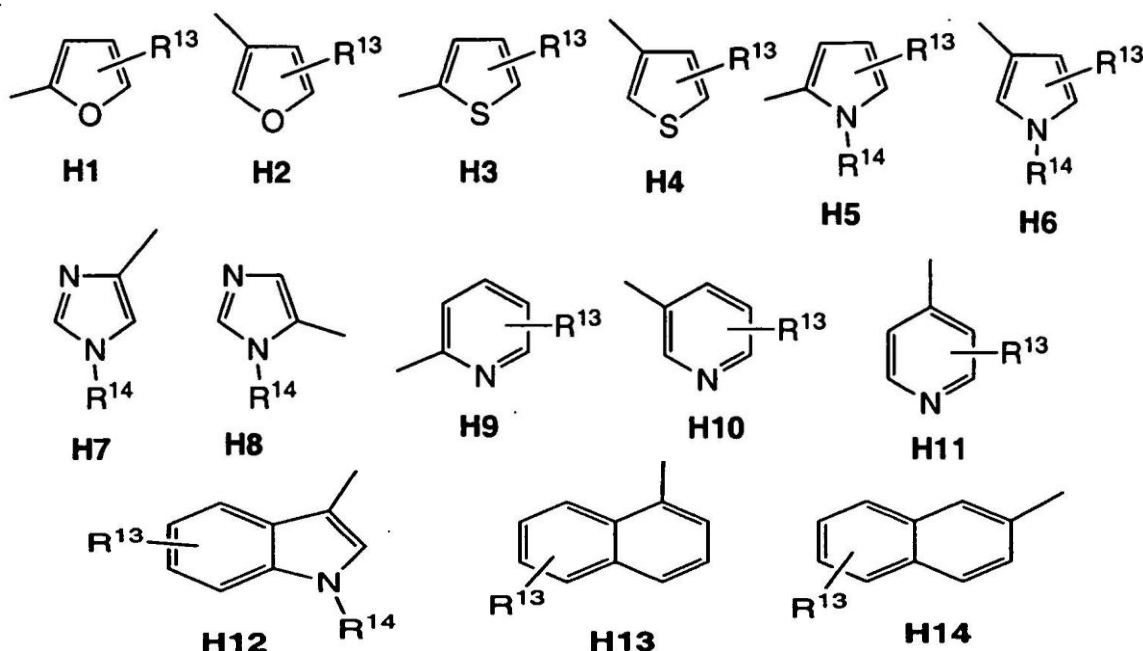
Son residuos hidrofóbicos R^1 particulares, alquilo inferior, alqueno inferior, $-(CH_2)_a(CHR^2)_bOR^3$, $-(CH_2)_a(CHR^2)_bSR^3$, $-(CHR^2)OR^3$, $-(CH_2)_aSR^3$, $-(CH_2)_aR^4$, o $-CH(CF_3)_2$; en los que R^2 es alquilo inferior, R^3 es alquilo inferior, R^4 es ciclohexilo, ciclopentilo o ciclobutilo, a es 1 a 4, y b es 0 ó 1.

- 5 El Grupo 2 comprende residuos aminoácidos con cadenas laterales aromáticas o heteroaromáticas R^5 .



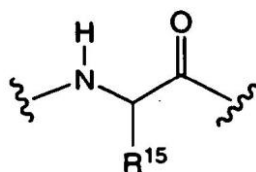
- 10 Un residuo aminoácido aromático se refiere a un aminoácido hidrofóbico que presenta una cadena lateral R^5 que contiene por lo menos un anillo que presenta un sistema de electrones $\pi(\pi)$ aromático conjugado. Además, puede contener grupos hidrofóbicos adicionales, tales como alquilo inferior, arilo o halógeno, grupos donantes de enlaces de hidrógeno, tales como aminas primarias y secundarias, y las sales protonadas correspondientes de las mismas, amidas primarias y secundarias, alcoholes y grupos aceptores de enlaces de hidrógeno, tales como éteres, tioéteres, ésteres, amidas terciarias o aminas terciarias. Entre los aminoácidos aromáticos codificados genéticamente se incluyen fenilalanina y tirosina. Un residuo aminoácido heteroaromático se refiere a un aminoácido hidrofóbico que presenta una cadena lateral R^5 que contiene por lo menos un anillo que presenta un sistema π aromático conjugado que incorpora por lo menos un heteroátomo, tal como O, S y N. Además, dichos residuos pueden contener grupos donantes de enlaces de hidrógeno, tales como amidas primarias y secundarias, aminas primarias y secundarias, y las sales protonadas correspondientes de las mismas, alcoholes y grupos aceptores de enlaces de hidrógeno, tales como éteres, tioéteres, ésteres, amidas terciarias o aminas terciarias. Entre los aminoácidos heteroaromáticos codificados genéticamente se incluyen triptófano e histidina.

- 25 Son cadenas laterales aromáticas o heteroaromáticas R^5 particulares, $-(CH_2)_aR^6$, $-(CH_2)_cO(CH_2)_dR^6$, $-(CH_2)_cS(CH_2)_dR^6$, o $-(CH_2)_cNR^7(CH_2)_dR^6$; en las que R^7 es H, alquilo inferior, arilo o aril-alquilo inferior, R^6 es fenilo opcionalmente sustituido de fórmula $-C_6R^8R^9R^{10}R^{11}R^{12}$ o un grupo arilo o heteroarilo de una de las fórmulas H1 a H14.



- 30 en las que cada uno de R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} y R^{12} es, independientemente, H, F, Br, Cl, I, NO_2 , CF_3 , NR^7R^{14} , N^7COR^{14} , alquilo inferior, arilo o OR^7 ; R^{13} es H, Cl, Br, I, NO_2 , alquilo inferior o arilo; R^{14} es H, alquilo inferior o arilo; a es 1 a 4; c es 1 ó 2; y d es 0 a 4

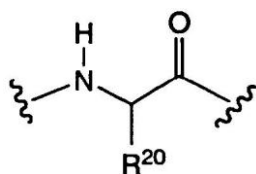
El Grupo 3 comprende aminoácidos que contienen cadenas laterales con residuos polares no cargados R^{15} .



Un residuo polar no cargado R^{15} se refiere a una cadena lateral hidrofílica que no presenta carga a pH fisiológico y que no resulta repelido por soluciones acuosas. Dichas cadenas laterales típicamente contienen grupos donantes de enlaces de hidrógeno, tales como amidas primarias y secundarias, aminas primarias y secundarias, tioles y alcoholes. Estos grupos pueden formar redes de enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua. Además, también pueden contener grupos aceptores de enlaces de hidrógeno, tales como éteres, tioéteres, ésteres, amidas terciarias o aminas terciarias. Entre los aminoácidos no cargados polares genéticamente codificados se incluyen asparagina, cisteína, glutamina, serina y treonina.

Son residuos no cargados polares particulares, $-(CH_2)_d(CHR^{16})_bOR^{17}$, $-(CH_2)_d(CHR^{16})_bSR^{17}$, $-(CH_2)_aCONR^{17}R^{18}$ o $-(CH_2)_aCOOR^{19}$, en los que R^{16} es alquilo inferior, arilo, arilo-alquilo inferior, $-(CH_2)_aOR^{17}$, $-(CH_2)_aNR^{17}R^{18}$, $-(CH_2)_aNR^{17}R^{18}$, o $-(CH_2)_aCOOR^{19}$; R^{17} y R^{18} son, independientemente, H, alquilo inferior, arilo o arilo-alquilo inferior, o R^{17} y R^{18} conjuntamente son $-(CH_2)_e-$, $-(CH_2)_2O-(CH_2)_2-$, o $-(CH_2)_2NR^{17}-(CH_2)_2-$; R^{19} es alquilo inferior, arilo o arilo-alquilo inferior, y en los que a, b y d presentan los significados indicados anteriormente y e es 2 a 6.

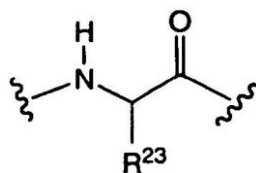
El Grupo 4 comprende aminoácidos que contienen cadenas laterales con residuos catiónicos polares y derivados acilados de los mismos, tales como residuos derivados de acilamino y residuos derivados de urea R^{20} .



Las cadenas laterales catiónicas polares R^{20} se refieren a una cadena lateral básica, que se encuentra protonada a pH fisiológico. Entre los aminoácidos catiónicos polares codificados genéticamente se incluyen arginina, lisina e histidina. La citrulina es un ejemplo de un residuo aminoácido derivado de urea.

Son residuos catiónicos polares particulares y derivados acilados de los mismos R^{20} , $-(CH_2)_aNR^{17}R^{18}$, $-(CH_2)_aN=C(NR^{21}R^{22})NR^{17}R^{18}$, $-(CH_2)_aNR^{21}C(=NR^{22})NR^{17}R^{18}$, $-(CH_2)_aNR^{21}COR^{19}$, o $-(CH_2)_aNR^{21}CONR^{17}R^{18}$; en los que R^{21} es H o alquilo inferior y R^{22} es H o alquilo inferior; y R^{17} , R^{18} y R^{19} presentan los significados indicados anteriormente y a es 1 a 4.

El Grupo 5 comprende aminoácidos que contienen cadenas laterales con residuos aniónicos polares R^{23} .



"Polar aniónico" se refiere a una cadena lateral ácida R^{23} , que se encuentra desprotonada a pH fisiológico. Entre los aminoácidos aniónicos polares codificados genéticamente se incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico. Un residuo catiónico polar particular R^{23} es $-(CH_2)_aCOOH$, en el que a es 1 a 4.

El alquilo inferior es alquilo C_{1-7} , preferentemente alquilo C_{1-4} , en particular metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo o isobutilo. El arilo presenta 5 a 10 átomos de carbono y preferentemente es fenilo o naftilo.

Resultan más preferentes las secuencias peptídicas superenrolladas que contienen entre 3 y 8 motivos héptadas unidos en tándem, en las que cada motivo héptada (abcdefg) puede presentar una de las secuencias siguientes:

1xx1xxx(referida respectivamente a las posiciones abcdefg);
1xx2xxx(referida respectivamente a las posiciones abcdefg);
2xx1xxx(referida respectivamente a las posiciones abcdefg); o
2xx2xxx(referida respectivamente a las posiciones abcdefg);

en las que '1' es un aminoácido codificado genéticamente del Grupo 1, '2' es un aminoácido codificado genéticamente del Grupo 2, y en las que x es un aminoácido codificado genéticamente de los Grupos 1, 2, 3, 4 ó 5 ó glicina.

Resultan todavía más preferentes las secuencias peptídicas superenrolladas identificadas en los péptidos y proteínas naturales, aunque excluyendo las de origen humano. Éstas son, por ejemplo, hélices superenrolladas identificadas en proteínas víricas y bacterianas, incluyendo las siguientes:

- 10 de la hemaglutinina del virus Influenza (SEC ID nº 5):
GSTQAAIDQINGKLNRIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKCG ;
- del virus de la inmunodeficiencia humana (SEC ID nº 6):
SGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLGDCG ;
- del virus de la inmunodeficiencia bovina (SEC ID nº 7):
15 GGERVVQNVSYIAQTQDQFTHLFRNINNRLNVLHHRVSYLEYVEEIRQKQVFFGCG ;
- del virus de la inmunodeficiencia felina (SEC ID nº 8):
GGATHQETIEKVTEALKINNRLVLTLEHQVLVIGLKVEAMEKFLYTAFAMQELGCG ;
- del virus de la anemia infecciosa equina (SEC ID nº 9):
GGNHTFEVENSTLNGMDLIERQIKILYAMILQTHARVQLKERQQVEETFNLIGCG ;
- 20 del virus de la inmunodeficiencia del simio (SEC ID nº 10):
GGAQSRTLLAGIVQQQQQLLDVVKQQELLRLTVWGTKNLQTRVTAIEKYLKDQAGCG ;
- del virus de la encefalitis y artritis caprina (SEC ID nº 11):
GGSYTKAAVQTLANATAAQDVLATYAMVQHVAKGVRILEARVARVEAGCG ;
- del virus Visna (SEC ID nº 12):
25 GGSLANATAAQNVLEATYAMVQHVAKGIRILEARVARVEAIDRMMVYQELDCG ;
- del virus parainfluenza tipo 3 humano (SEC ID nº 13):
GGEAKQARSDIEKLKEAIRDTNKAVQSVQSSIGNLIVAIKSVQDYVNKEIVGCG ;
- del virus para influenza tipo 1 humano (SEC ID nº 14):
GGEAREARKDIALIKDSIIKTHNSVELIQRGIGEQIHALKTLQDFVNNEIRGCG ;
- 30 del virus parainfluenza tipo 2 humano (SEC ID nº 15):
GGKANANAAAINNLAASSIQSTNKAVSDVITASRTIATAVQAIQDHINGAIVNGCG ;
- del virus parainfluenza tipo 4a humano (SEC ID nº 16):
GGKAQENAKLILTLKKAATETNEAVRDLANSNKIVVKMISAIQNQINTIIGCG ;
- del virus parainfluenza tipo 4b humano (SEC ID nº 17):
35 GGKAQENAKLILTLKKAETNDVAVRDLTKSNKIVARMISAIQNQINTIIGCG ;
- del virus del sarampión (SEC ID nº 18):
GGSMNLNSQAIDNLRASLETTNQAIEAIRQSGQEMILAVQGVQDYINNELIGCG ;
- del virus de la parotiditis (SEC ID nº 19):
GGAQTNARAIAAMKNSIQATNRAVFEVKEGTQQLAIAVQAIQDHINTIMNTQLNNMSCG ;
- 40 del virus sincitial respiratorio bovino (SEC ID nº 20):
GGAVSKVLHLEGEVKNIKNALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKEGCG ;
- del virus ébola (SEC ID nº 21):
GGANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGCG ;
- del virus Marburg (SEC ID nº 22):
45 GGANQTAKSLELLLRVTTEERTFSLINRHAIIDFLLTRVVGCTCKVLGCG ;
- del virus del sarcoma de Rous (SEC ID nº 23):
GGANLTTSLLGDLLDDVTSIRHAVLQNRAAIDFLLAHGHGCG ;
- de *Staphylothermus marinus* (SEC ID nº 24):
GSIINETADDIVYRLTVIIDRYESLKNLITLRADRLEMIINDNVSTILASIGCG ;
- 50 del coronavirus SARS (SEC ID nº 25):
GGNVLYENQKQIANQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDWNQNAQALNTLVKQLSSNFG CG;
- del dominio DUF16 de MPN010 de *Mycoplasma pneumoniae* (SEC ID nº 26):
GGTKTEFKEFOTVVMESFAVQNNIDAQGEQIKELQVEQKAQGKTLQLILEALQGINKRL DNLESCG ;
- una hélice superenrollada heptamérica (SEC ID nº 27):
55 GGVKQKLADAVEELASANYHLANAVARLAKAVGERGCG ;
- una hélice superenrollada trimérica (SEC ID nº 28):
GGIEKKIEAIEKKIEAIEKKIEAIEKKIEAKMEKASSVFNNVNSKKKC ; o
- una hélice superenrollada tetramérica (SEC ID nº 29):
60 KLKQIEDKLEEILSKLYHIENELAKIEKKLAKMEKASSVFNVVKKC.

Resultan más preferentes las secuencias de péptido superenrollado indicadas en los Ejemplos.

En el diseño del bloque constructivo de lipopéptido, opcionalmente pueden añadirse residuos adicionales, no incluyendo dichas repeticiones héptadas, en cualquiera de los dos extremos, N-terminal y C-terminal, o en ambos extremos de la cadena peptídica superenrollada. Estos residuos adicionales pueden actuar, por ejemplo, como conector entre la región (superenrollada) de repetición héptada y la fracción lípido y/o el antígeno opcionalmente

unido. Estos residuos adicionales también pueden incluir secuencias de aminoácidos que comprenden epítomos de células T ayudantes.

La síntesis de los bloques constructivos de lipopéptido (LBB) puede utilizar métodos de síntesis peptídica y procedimientos de acoplamiento, los cuales son bien conocidos en el presente campo de la química sintética. Típicamente se utilizó la síntesis peptídica en fase sólida para ensamblar la cadena peptídica. La fracción lípido puede acoplarse a un conector, proporcionando un intermediario conector de lípido. El conector de lípido seguidamente puede añadirse mediante métodos estándares de acoplamiento a, por ejemplo, el extremo N-terminal libre del péptido todavía unido a la resina. Finalmente, el tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) corta el lipopéptido totalmente ensamblado de la resina y elimina todos los grupos protectores de cadena lateral estándares.

Puede acoplarse directamente una fracción dipalmitoil-S-glicerilcisteinilo (Z^3) al extremo N-terminal de la cadena peptídica sin un conector. En el caso de las fracciones lípido de tipo Z^4 , un aminoácido convenientemente protegido con Fmoc, tal como ácido bis-Fmoc-2,4-diaminobutírico, puede añadirse al extremo N-terminal de la cadena en la etapa final de ensamblaje. Tras la eliminación de los grupos protectores (Fmoc), los dos grupos amino libres pueden acilarse con un derivado de ácido graso apropiado. El producto lipopéptido se forma tras el corte de la resina con TFA. Pueden utilizarse similares estrategias sintéticas bien establecidas para preparar bloques constructivos de lipopéptido que contienen otras fracciones lípido.

Puede utilizarse una diversidad de procedimientos de acoplamiento o conjugación para unir antígenos a la cadena peptídica, que son bien conocidos por el experto en la materia. De esta manera, pueden acoplarse grupos amino libres en las cadenas laterales de aminoácidos en la cadena peptídica de los LBB con ésteres reactivos en el antígeno (por ejemplo ésteres de N-hidroxisuccinimida preparados a partir de ácidos carboxílicos); los tioles en la cadena peptídica pueden acoplarse a grupos maleimida en el antígeno; pueden incorporarse azidas en las cadenas laterales de los residuos aminoácidos en la cadena peptídica y acoplarse con antígenos que contienen grupos acetileno utilizando reacciones de cicloadición catalizadas por cobre, y pueden acoplarse otros nucleófilos (por ejemplo los grupos hidrazino, hidroxilamino y vic-aminotiol) en el péptido con electrófilos (por ejemplo aldehídos, cetonas y ésteres activos) en el antígeno. Resultará evidente que resulta posible, en principio, invertir las posiciones de los dos grupos reactivos en cadena peptídica y antígeno con el fin de conseguir el acoplamiento selectivo.

Se describen posteriormente ejemplos de síntesis de lipopéptidos que ilustran dichos métodos.

Los bloques constructivos de lipopéptido (LBB) tal como se definen en la presente memoria se autoensamblan formando haces de lipopéptido helicoidales (HLB) y finalmente partículas pseudovíricas sintéticas (SVLP). El proceso de autoensamblaje en solución acuosa incluye la rápida oligomerización de los dominios superenrollados en el LBB, formando un haz superenrollado paralelo de α -hélices de estado de oligomerización definido, denominado haz de lipopéptidos helicoidales (HLB). En consecuencia, las fracciones lípido unidas a las cadenas peptídicas dentro de cada HLB también se agregan en un extremo del haz. Además, de esta manera se presentan múltiples copias del antígeno sobre la superficie del HLB, es decir, el otro extremo, no lipofílico, del HLB. El proceso de autoensamblaje puede continuar, resultando en la formación de partículas pseudovíricas sintéticas (SVLP) (ver la figura 1). El proceso está controlado por la autoasociación de las colas lipídicas unidas a cada bloque constructivo, que seguidamente ocupan el núcleo lipídico central de la SVLP. De esta manera, las cadenas peptídicas en cada haz helicoidal se encuentran orientadas hacia el exterior, hacia el solvente. El tamaño y composición del bloque constructivo de lipopéptido determina de esta manera el tamaño y forma finales de los ensamblajes (SVLP), los diámetros de los cuales típicamente son del orden de los nanómetros (10 a 30 nm). Las SVLP representan una nueva plataforma de nanopartículas para la exposición multivalente de antígenos y para su transporte a células inmunocompetentes y receptores.

Las partículas pseudovíricas sintéticas (SVLP) según la invención están compuestas de componentes proteicos y lipídicos, tal como los virus reales, que presentan dimensiones físicas similares a las de algunos virus de tamaño pequeño, presentan un núcleo lipídico y una superficie externa basada en proteínas/péptidos, aunque son totalmente de origen sintético, es decir, se producen mediante síntesis química partiendo de bloques constructivos de lipopéptido (LBB) sin utilizar métodos basados en células. No son virus reales debido a que no presentan ningún componente ácido nucleico y de esta manera no pueden replicarse.

En el caso de que se unan antígenos a los bloques constructivos de lipopéptido (LBB), la elevada densidad superficial resultante de antígenos sobre los HLB y SVLP, y también su estructura molecular, hace que estos materiales sintéticos resulten atractivos para aplicaciones en el campo de la administración de vacunas. La presencia de múltiples copias del antígeno sobre la superficie de la SVLP incrementa la afinidad de los receptores de células B para el antígeno a través de un efecto de avidéz, y facilita la incorporación y presentación de la partícula o de sus componentes por parte de células inmunocompetentes. Las HLB y SVLP pueden considerarse, por lo tanto, portadores macromoleculares, o vehículos de administración, para los antígenos, para el propósito de generar respuestas inmunológicas eficientes contra el antígeno en un animal. Resulta de especial importancia que la utilización de HLB y SVLP como vehículos de administración para los antígenos permite la generación de respuestas inmunológicas (de anticuerpos) eficientes en un animal sin utilizar (coinyectar) adyuvantes potencialmente dañinos.

Una combinación única de propiedades hace que dichos HLB y SVLP resulten ideales para inducir respuestas inmunológicas eficientes en un animal y por lo tanto para aplicaciones en el descubrimiento de vacunas. Las respuestas de células B son iniciadas por la interacción de receptores de célula B específicos sobre las células B diana con antígenos, y en particular por la agregación de múltiples receptores de células B sobre la superficie de las células B mediante la unión de antígenos multivalentes. La presencia de múltiples copias del antígeno sobre la superficie de una partícula ensamblada resulta importante para incrementar la afinidad de los receptores mediante un efecto de avidéz, y para crear agregados de receptores de células B unidos a antígenos sobre la superficie celular. La capacidad del péptido superenrollado de formar haces helicoidales de estado de oligomerización definido se aprovecha para permitir la exposición multivalente del antígeno unido covalentemente. Puede conjugarse con los LBB monoméricos un antígeno diseñado para interactuar con receptores de célula B específicos sobre las células B diana, tales como haptenos, péptidos, proteínas u otros miméticos de epítipo. Tras el autoensamblaje en un HLB y una SVLP, los antígenos se presentan en múltiples copias sobre la superficie del ensamblaje oligomérico (ver la figura 1).

Las secuencias superenrolladas víricas y microbianas pueden contener epítopos de células T ayudantes. Éstas pueden aprovecharse también en la presente invención, ya que el péptido portador superenrollado, al ser un componente del LBB, puede derivarse de secuencias naturales que contienen epítopos de células T ayudantes. Alternativamente, pueden incorporarse o unirse epítopos de células T a secuencias superenrolladas de diseño o naturales.

El LBB monomérico contiene una fracción lípido. Otro propósito del lípido es facilitar la presentación del epítipo a las células B, ya que es conocido que los antígenos asociados a membranas resultan particularmente efectivos en la activación de las células B y en la inducción de la activación de las células T controlada por las células B. La elevada concentración local de fracciones lípido presente en el interior de los HLB y SVLP facilita la interacción del ensamblaje con las membranas e induce la presentación de los antígenos a las células B. La parte lípido del LBB puede derivarse de fracciones lipídicas de origen bacteriano, tales como los bien conocidos lipopéptidos ligandos de receptores de tipo Toll. Una característica de los lipopéptidos autoensamblantes incorporados en los LBB es que pueden comprender componentes que incrementan la activación de las células B, así como un mecanismo para la exposición multivalente del antígeno. Ciertamente los HLB y SVLP son capaces de inducir fuertes respuestas inmunológicas basadas en anticuerpos, y ello comporta la ventaja adicional de que puede evitarse la utilización de adyuvantes tóxicos durante las inmunizaciones.

Es una característica general de las moléculas surfactantes de tipo detergente que presentan un grupo de cabeza polar y una cola lipídica hidrofóbica no polar, que forman agregados termodinámicamente estables tales como micelas y vesículas en solución acuosa, con las regiones hidrofóbicas extendidas agrupadas en el núcleo micelar, secuestradas lejos del contacto con el agua, mientras que los grupos de cabeza polares interactúan con el solvente. Sin embargo, los HLB y las SVLP de la presente invención no son simplemente micelas. Su estructura molecular se mantiene mediante una exclusiva combinación de fuerzas no covalentes, es decir, las fuerzas que controlan el ensamblaje del dominio peptídico superenrollado en un haz helicoidal, conjuntamente con las fuerzas hidrofóbicas que controlan el secuestro de las colas lipídicas en el interior de la partícula.

Las concentraciones a las que empiezan a formar micelas, correspondientes a la concentración máxima a la que existe monómero libre en solución, es la concentración micelar crítica, o más generalmente, la concentración crítica de agregación. La concentración micelar crítica proporciona una medida de la estabilidad termodinámica de las micelas. El valor de la concentración micelar crítica depende de la estructura de las partes hidrofóbica e hidrofílica de la molécula anfífilica y de factores externos como la temperatura y la composición del solvente. Una concentración micelar crítica baja indica una micela estable a una concentración de surfactante baja, lo que resulta importante en aplicaciones biológicas, en las que la actividad deseada (por ejemplo el direccionamiento y transporte a células) depende de la conservación de la estructura de tipo micelar incluso después de una dilución total elevada. Las SVLP según la invención siguen siendo termodinámicamente estables en la región nanomolar baja, indicando que resultan ideales para los fines de la administración de vacunas. La elevada estabilidad resulta de la estructura molecular única de las SVLP. Además, pueden generarse SVLP con distribución de tamaños y formas relativamente homogéneas.

Las SVLP según la invención no son como los liposomas, que presentan una estructura de membrana bicapa que circunda a una solución acuosa en el núcleo. Las SVLP son más estables *in vivo* que los liposomas, ya que no exponen grandes áreas de membrana lipídica al exterior acuoso.

En contraste con las partículas pseudovíricas de la técnica anterior, las HLB y SVLP de la invención son artificiales y todos sus componentes se producen mediante síntesis química, evitando de esta manera la utilización de materiales que deben fabricarse mediante métodos biológicos. Aunque las partículas pseudovíricas se denominan "sintéticas", estas partículas se basan en partículas víricas naturales o modificadas genéticamente, o componentes de las mismas, construidas mediante métodos de ADN recombinante y basados en células, no materiales producidos mediante síntesis química. El diseño y composición de las SVLP de la invención también es bastante diferente de los de otros ensamblajes de nanopartículas, por ejemplo los basados en agregados de oro, puntos cuánticos, dendrímeros, proteínas recombinantes y liposomas.

- Los LBB de la invención se diseñan de manera que el dominio superenrollado en el lipopéptido se asocie en un haz helicoidal definido (por ejemplo haces diméricos, triméricos, tetraméricos, pentaméricos, hexaméricos o heptaméricos de hélices). Esta asociación conduce a la formación de los HLB. Los haces de lipopéptidos helicoidales (HLB) resultantes (por ejemplo se muestra un trímero en la figura 1) se autoensamblan formando una partícula pseudovírica sintética (SVLP) (ensamblaje macromolecular) con dimensiones en la escala nanométrica. En el caso de que se unan antígenos (en forma de péptidos, proteínas, peptidomiméticos, carbohidratos o haptenos) al LBB, se presentan múltiples copias sobre la superficie del HLB y la SVLP.
- Las secuencias peptídicas basadas en autoproteínas (es decir, proteínas humanas) no resultan adecuadas, ya que pueden producirse enfermedades autoinmunitarias crónicas debido a reacciones inmunológicas contra las (auto)proteínas humanas (por ejemplo el síndrome de Goodpasture, una enfermedad autoinmunitaria humana causada por el desarrollo de anticuerpos contra el colágeno).
- La invención se refiere además a una preparación farmacéutica que comprende una partícula pseudovírica sintética que porta antígenos tal como se describe en la presente memoria. Se consideran preparaciones farmacéuticas para la administración entérica, tales como la administración nasal, bucal, rectal u oral, y para la administración parenteral, tales como la administración intravenosa, intramuscular o subcutánea, en animales de sangre caliente, especialmente el ser humano. Resultan particularmente preferentes las preparaciones para la administración parenteral. Las preparaciones comprenden la partícula pseudovírica sintética que porta antígenos solos o, preferentemente, conjuntamente con un portador farmacéuticamente aceptable. La dosis del ingrediente activo depende de la vacunación pretendida y de la especie, edad, peso y condición individual, de los datos farmacocinéticos individuales y del modo de administración.
- Las preparaciones farmacéuticas comprenden entre aproximadamente 1% y aproximadamente 10% de ingrediente activo. Las formas de dosificación unitaria para la administración parenteral son, por ejemplo, ampollas o viales, por ejemplo viales que contienen entre aproximadamente 0,01 mg y aproximadamente 1,0 g de partículas pseudovíricas sintéticas portadoras de antígenos.
- Resulta preferente la utilización de soluciones de partículas pseudovíricas sintéticas portadoras de antígenos y también suspensiones o dispersiones, especialmente soluciones, dispersiones o suspensiones acuosas isotónicas, que, por ejemplo en el caso de composiciones liofilizadas que comprenden el ingrediente activo solo o conjuntamente con un portador, por ejemplo manitol, pueden prepararse antes de su utilización. Las preparaciones farmacéuticas pueden esterilizarse y/o pueden comprender excipientes, por ejemplo conservantes, estabilizadores, agentes humectantes y/o emulsionantes, solubilizadores, sales para regular la presión osmótica y/o tampones, y se preparan de una manera conocida per se, por ejemplo mediante procesos convencionales de disolución y liofilización. Dichas soluciones o suspensiones pueden comprender agentes reguladores de la viscosidad.
- Para la administración parenteral, las soluciones acuosas de la partícula pseudovírica sintética portadora de antígenos o las suspensiones acuosas para inyección que contienen sustancias reguladoras de la viscosidad y, si se desea, estabilizadores, resultan especialmente adecuadas. Las partículas pseudovíricas sintéticas portadoras de antígenos, opcionalmente con excipientes, también pueden encontrarse en forma de un liofilizado y pueden prepararse en una solución antes de la administración parenteral mediante la adición de solventes adecuados.
- La invención se refiere además a la utilización de una partícula pseudovírica sintética portadora de antígenos tal como se describe en la presente memoria a modo de vacuna. Estas vacunas resultan útiles para inducir respuestas inmunológicas para la prevención o tratamiento de enfermedades, trastornos o condiciones, incluyendo enfermedades infecciosas, alergias, cáncer, adicción a fármacos, envenenamiento y generalmente para inducir eficientemente respuestas inmunológicas específicas de antígeno.
- La invención se refiere además a un método de vacunación en el que se administra una cantidad inmunogénicamente efectiva de una partícula pseudovírica sintética portadora de antígenos tal como se describe en la presente memoria, en un paciente que lo necesita.

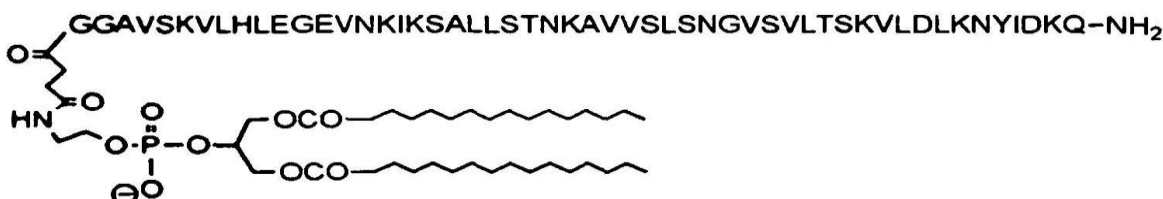
55 Ejemplos

Abreviaturas:

- DCM, diclorometano (CH_2Cl_2);
 DIEA, diisopropiletilamina;
 Boc, t-butoxicarbonilo;
 DMF, N,N-dimetilformamida;
 EDT, etanoditiol;
 Fmoc, 9-fluorenilmetoxycarbonilo;
 HATU, hexafluorofosfato de 2-(1H-9-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio;
 HBTU, hexafluorofosfato de 2-[1H-benzotriazol-1-il]-1,1,3,3-tetrametiluronio;

HOBt, N-hidroxibenzotriazol; Pbf, 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurán-5-sulfonilo;
 NMP, N-metilpirrolidona;
 MBHA, metilbenzohidrilamina
 PyBOP, hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)-tripirrolidinofosfonio;
 t.a., temperatura ambiente;
 TIS, triisopropilsilano ($i\text{Pr}_3\text{SiH}$);
 Trt, tritilo;
 TFA, ácido trifluoroacético;
 t_R , tiempo de retención.

Ejemplo 1: lipopéptido 4



La secuencia primaria de SEC ID nº 1 del péptido superenrollado 5 en este lipopéptido se deriva mayoritariamente de la glucoproteína F del VSR [Lawless-Delmedico M.K. *et al.*, Biochemistry 39:11684-11695, 2000]. Este péptido superenrollado contiene cinco repeticiones héptadas. Se han añadido residuos Gly adicionales en el extremo N-terminal a modo de espaciador, conjuntamente con un conector derivado de ácido succínico para unir el extremo N-terminal del péptido a un fosfolípido, proporcionando de esta manera el lipopéptido 4.

La síntesis de la cadena peptídica se llevó a cabo sobre una resina MBHA-amida de Rink utilizando una reacción estándar de Fmoc. Tras completar el ensamblaje de la cadena, se unió la unidad de fosfolípido-conector (1,3-dipalmitoil-glicero-2-fosfoetanolamido-succinato (PE-succ-OH)) al extremo N-terminal libre del péptido sobre la resina. A continuación, se cortó el fosfolípido de la resina y se eliminaron los grupos protectores de cadena lateral mediante tratamiento con TFA/triisopropilsilano/ H_2O . Tras la purificación mediante HPLC de fase inversa, el producto se caracterizó mediante HPLC analítica de fase inversa y EM por electropulverización (m calc.: 6238,4; m/z obs. 1560,8 para $(\text{M}+4\text{H})^{4+}$).

El 1,3-dipalmitoil-glicero-2-fosfoetanolamido-succinato (PE-succ-OH) puede prepararse fácilmente mediante reacción de 1,3-dipalmitoil-glicero-2-fosfoetanolamina (Bachem) con anhídrido succínico en presencia de una base, tal como trietilamina.

a) Péptido 5. Se sintetizó la cadena peptídica sobre resina de amida de Rin-MBHA (Novabiochem) en un sintetizador de péptidos ABI 433A utilizando la reacción de Fmoc. Los aminoácidos utilizados fueron Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Asn (Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-His(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH y Fmoc-Val-OH. Se cargó la resina (500 mg, 0,4 mmoles/g) con Fmoc-Gln(Trt)-OH utilizando HBTU (3 eq.), HOBt (3 eq.) y DIEA (8 eq.) en DMF (5 ml). Las aminas libres no reaccionadas se acetilaron utilizando solución de adición de caperuza de Ac_2O (Ac_2O (0,5 M), DIEA (0,125 M) y HOBt (0,015 M) en NMP; 2x15 ml durante 30 minutos). Las uniones se llevaron a cabo utilizando un exceso de 5 veces (1 mmol) de cada aminoácido. Tras completar el ensamblaje de la cadena peptídica, ésta se cortó de la resina y se desprotegió con TFA/ $i\text{Pr}_3\text{SiH}$ / H_2O (95:2,5:2,5) (9 ml) durante 3 horas a t.a. Tras la filtración y concentración al vacío, el péptido se precipitó con Et_2O frío (20 ml), se centrifugó y se decantó (se repitió 3 veces). La purificación del producto crudo mediante HPLC analítica (columna C_{18} : Vydac 218TP54; 10 μm , 300 Å, 4,6 x 250 mm; gradiente: 5% a 100% de acetonitrilo en agua + TFA al 0,1%, en 20 minutos a 1 ml/min; $t_R=16$ min) proporcionó el péptido 5 (rendimiento del 10%) en forma de polvos blancos. RP-HPLC analítica (columna C_{18} : Vydac 218TP54; 10 μm , 300 Å, 4,6 x 250 mm; gradiente: 10% a 60% de acetonitrilo en agua + TFA al 0,1%, en 35 minutos a 1 ml/min; $t_R = 26$ min). EM-ESI (MeOH/ H_2O (1:1) + HCOOH al 0,1%; modo de iones positivos; m/z): 1822,8 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 1367,3 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 1094,2 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, 911,9 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ (PM calc. : 5465,4 g/mol).

b) Lipopéptido 4. El ensamblaje de la cadena peptídica lineal sobre la resina se llevó a cabo tal como se ha descrito anteriormente para el péptido 5. Tras completar el ensamblaje de la cadena peptídica, se unió el succinato de 1,3-dipalmitoil-glicero-2-fosfoetanolamido (PE-succ-OH) al extremo N-terminal sobre la resina. Se añadió a la resina peptídica (80 μmoles) una solución de PE-succ-OH (190 mg, 240 μmoles , 3 eq.), HATU (92 mg, 240 μmoles , 3 eq.), HOAt (33 mg, 240 μmoles , 3 eq.) y DIEA (110 μl , 640 μmoles , 8 eq.) en DMF (5 ml), previamente preparada. La mezcla de reacción se hizo girar durante la noche a t.a. Se realizó un seguimiento del progreso de la unión mediante la prueba de Kaiser. Tras completar la unión, la resina se filtró y se lavó con DMF (3x5 ml), DCM (3x5 ml) y MeOH (3x5 ml). A continuación, se cortó el lipopéptido de la resina y se desprotegió con TFA/TIS/ H_2O (95:2,5:2,5) (27 ml) durante 3 horas a t.a. Tras la filtración y concentración al vacío, el péptido

se precipitó con Et₂O frío (20 ml), se centrifugó y se decantó (se repitió 3 veces). La purificación del producto crudo mediante HPLC semipreparativa (columna C₄: Vydac 214TP1010; 10 µm. 300 Å, 10 x 250 mm; gradiente de acetonitrilo al 30-100% en agua + TFA al 0,1%, en 15 min a 5 ml/min; t_R = 14,4 min) proporcionó el lipopéptido 4 en forma de polvos blancos. HPLC analítica (columna C₄: Vydac 214TP104; 10 µm, 300 Å, 4,6 x 250 mm; gradiente: 10% a 100% de acetonitrilo en agua + TFA al 0,1%, en 30 minutos a 1 ml/min): t_R = 23,3 min. EM-ESI (MeOH/H₂O (1:1) + HCOOH al 0,1%; modo de iones positivos; m/z): 2081,4 [M+3H]³⁺, 1560,8 [M+4H]⁴⁺, 1248,9 [M+5H]⁵⁺, 1040,9 [M+6H]⁶⁺ (PM calc. 6238,4 g/mol). ε₂₇₆ = 1511 M⁻¹cm⁻¹.

c) Estudios biofísicos sobre el lipopéptido 4. Una característica clave de la presente invención es que el lipopéptido, que resulta accesible mediante síntesis, puede ensamblarse espontáneamente en un ensamblaje macromolecular de estructura definida y con el tamaño de una nanopartícula pseudovírica. El lipopéptido 4 puede disolverse en solución acuosa tamponada bajo agitación y seguidamente pueden investigarse las propiedades de la solución de SVLP. Para demostrar que dichos lipopéptidos pueden formar las SVLP, las partículas surgidas del lipopéptido 4 se han caracterizado mediante diversas técnicas biofísicas y se describen en la presente memoria a fin de ilustrar el principio. Los experimentos de ultracentrifugación en el equilibrio de sedimentación con el lipopéptido 4 indicaron que las partículas presentaban una masa aparente en el intervalo de 400 kD (figura 3). Se recogieron datos por triplicado a tres velocidades del rotor, 5.000, 7.500 y 10.000 rpm, y a tres concentraciones, 24, 48 y 240 µM, para el análisis. Los datos a las dos concentraciones más bajas de lipopéptido se ajustaban bien a un modelo que suponía la presencia de una única especie ideal con una masa molar aparente de 451.820 ± 9.670 g·mol⁻¹. La inclusión de los datos a la concentración más alta (240 µM) resultó en una masa aparente de 431.170 ± 14.160 g·mol⁻¹, aunque la calidad del ajuste se deterioró, particularmente en proximidad a la base de la celda de centrifugación. La desviación del ajuste respecto de los datos experimentales, sin embargo, no presentaba la forma que típicamente se produce con la aparición de material agregado, aunque podría representar la falta de un ajuste ideal a la concentración más alta. También se llevaron a cabo experimentos de velocidad de sedimentación y se analizaron en términos de las distribuciones de los coeficientes aparentes de sedimentación, g(s*) [Stafford W.F., Anal. Biochem. 203:295-301, 1992], ls-g*(s) y c(s) [Schuck, P., Biophys. J. 78:1606-1619, 2000]. A pesar de los diferentes enfoques, todos los métodos proporcionaron distribuciones relativamente anchas centradas en ~10 S. En intento de reconciliar los datos de equilibrio y velocidad y de investigar la distribución de tamaños en mayor detalle, se utilizó el modelaje con la ecuación de Lamm, según la implementación realizada por el software Sedfit [Schuck P., Biophys. J. 78:1606-1619, 2000]; se muestran los perfiles de c(s) típicos en la figura 4. Todas las distribuciones se encuentran centradas entre 9,5 y 10 S, aunque aparentemente existe una leve cola en el lado de bajos valores de S a concentración baja, posiblemente debida a artefactos. No se observó ninguna mejora estadísticamente significativa al someter a ensayo otros modelos que incluían especies discretas no interactuantes. La inspección de los valores individuales de s no mostró ninguna dependencia aparente de la concentración y el ajuste global de los datos, seguido de una simulación de Montecarlo proporcionó un valor de s_{20,w} = 9,837 ± 4,4·10⁻³ S. La naturaleza química del fosfolípido y el número aparente de monómeros incluidos en el estado asociado principal (~72) sugiere que, dentro del intervalo de concentraciones analizado, el lipopéptido forma estructuras de tipo micelar y se propone un modelo en el que aproximadamente 24 subunidades, compuestas cada una de un lipopéptido superenrollado trimérico, interactúan formando un núcleo lipídico compacto decorado por cadenas peptídicas superenrolladas. El tamaño resultante de partícula concuerda con los datos de ultracentrifugación. También se propone que los péptidos se encuentran óptimamente distribuidos en el espacio. Con el fin de visualizar esta partícula esférica, se generó un modelo informático, que se muestra en la figura 5. Muestra que las colas hidrofóbicas se aglomeran en el centro y las hélices superenrolladas triméricas se extiende como espigas hacia la solución, en el exterior. Aunque podrían ser posibles otras geometrías aparte de una esfera perfecta, el modelo aparentemente refleja bien el comportamiento del material en solución diluida bajo condiciones estándares. Con el fin de investigar la conformación del péptido mediante dicroísmo circular (DC), se analizó el péptido 5, que presenta la misma secuencia peptídica que el lipopéptido 4 pero que no presenta el fosfolípido ni el conector. Tal como se esperaba en este tipo de sistema, el péptido mostraba un espectro de DC que dependía tanto de la temperatura como de la concentración. Era altamente α-helicoidal a 1°C y la transición de desnaturalización térmica mostraba un punto medio de ~40°C a una concentración de péptido de 35 µM. Se ha demostrado anteriormente que un péptido con una secuencia similar a la del péptido 5 forma una superhélice trimérica en equilibrio con el monómero en solución acuosa diluida [Lawless-Delmedico M.K. et al., Biochemistry 39:11684-11695, 2000]. El péptido 5 difiere de dicho péptido en que presenta dos residuos adicionales de glicina N-terminal y un extremo N-terminal libre. Sin embargo, el espectro de DC del UV lejano (figura 6) a temperatura ambiente era similar para ambos péptidos. Cualesquiera diferencias menores probablemente se deben a la simple adición de una estructura aperiódica contiguamente a los residuos adicionales de glicina y/o cualquier perturbación estructural adicional potencialmente inducida por los mismos. El espectro es característico de un equilibrio hélice aleatoria/α-hélice y el análisis espectral utilizando el programa CONTIN [Provencher S.W., Comp. Phys. Comm. 27:229-242, 1982] proporciona valores de 33%, 25% y 42% para una α-hélice, una lámina β y una estructura aperiódica, respectivamente. La adición de una fracción fosfolípido al péptido 5, formando el lipopéptido 4, provoca cambios marcados en el espectro de DC (figura 6) y el contenido de hélices se eleva a ~100%, según el ajuste realizado por CONTIN. Las contribuciones directas de la fracción fosfolípido al espectro se ignoraron y probablemente son reducidas. El incremento del contenido de hélices indica que la situación del equilibrio observada en el péptido solo se ha desplazado hacia el estado más estructurado, que se ha producido una reorganización hacia un estado diferente aunque altamente estructurado, o una combinación de los dos. A la luz de los resultados hidrodinámicos, informados anteriormente, aparentemente resulta probable que se dé este último caso, ya que explicaría la presencia de especies relativamente pequeñas coexistentes con agregados de mucho

mayor tamaño y probablemente formando un nuevo sistema en equilibrio. La concentración micelar crítica (CMC) se investigó utilizando la sonda fluorescente pireno-3-carboxialdehído (PYCHO). Las propiedades fluorescentes de la sonda son sensibles a la polaridad del solvente, y de esta manera la sonda muestra un comportamiento fluorescente diferente en un medio micelar hidrofóbico en comparación con su comportamiento en un medio acuoso. El pigmento se disuelve preferentemente en el interior hidrofóbico de la micela, y su intensidad de fluorescencia es más alta y el máximo de emisión se encuentra desplazado a una longitud de onda más larga en comparación con un ambiente acuoso. Los espectros de emisión del pigmento en presencia del lipopéptido 4 mostraron un pico principal a 466 nm y un pico menor a 437 nm, mientras que se observó el comportamiento inverso en ausencia de micelas (figura 7). Se investigó la CMC mediante la medición de la dependencia de la concentración de los cambios de fluorescencia [Wilhelm M. *et al.*, Macromol. 24:1033-1040, 1991; Astafieva I. *et al.*, Macromol. 26:7339-7352, 1993], y se encontró que era < 20 nM. Sin embargo, la sensibilidad y fiabilidad del método era muy buena para sistemas micelares con valores de CMC elevados, pero aparentemente era insatisfactoria para determinar con precisión los valores de CMC inferiores a 20 nM. De esta manera, las características de los espectros de fluorescencia de PYCHO en este sistema mostraron únicamente pequeños desplazamientos de pico a concentraciones bajas (figura 7). Se midieron los espectros de emisión a 12 diluciones del lipopéptido en el intervalo de 1 μ M a 3 nM y los datos se graficaron como la proporción entre las intensidades de emisión, I_{437}/I_{466} , frente a la concentración. A partir de los resultados (figura 8), resulta evidente que no se alcanza la región de meseta esperada a concentraciones de péptido inferiores a la CMC. A concentraciones más altas (400 nM a 1 μ M), se observa el inicio de la meseta, en donde el incremento de la concentración de monómero simplemente conduce a la formación de nuevos oligómeros. Por lo tanto, los cambios en los espectros de fluorescencia de PYCHO indican que se forma un oligómero y que la CMC es muy baja (< 20 nM). Se calculó el diámetro medio de las SVLP derivadas de este lipopéptido a partir de las mediciones de dispersión luminica dinámica (DLS) utilizando un análisis de la distribución ponderado según el número basado en un modelo matemático para partículas esféricas. Los datos son consistentes con un diámetro medio de aproximadamente 17 nm (figura 9). También se midió el tamaño de partícula mediante DLS a 40°C, en el que la distribución de tamaños de partícula se hizo ligeramente más estrecha, indicando posiblemente una distribución de tamaños más homogénea a temperaturas fisiológicas (datos no mostrados). Se utilizó la microscopía electrónica para visualizar las SVLP de lipopéptido. La tinción negativa de una solución 3 μ M del lipopéptido 4 en tampón TRIS a pH 7,4 se utilizó para registrar las micrografías electrónicas de transmisión. Las partículas presentan una apariencia circular y con forma de estrella (figura 10). No resulta posible determinar si lo anterior refleja una forma global subyacente esférica o de tipo discoidal a partir de las micrografías electrónicas, pero cualquiera de las dos estructuras sería indicativa de un sistema de tipo micelar. Las partículas presentaban un diámetro medio de 17 nm, con una distribución de tamaños de aproximadamente ± 5 nm en torno a la población principal, dependiendo del método utilizado para evaluar las micrografías. La elevada homogeneidad de tanto el tamaño como la forma de la muestra era notable. También pudo observarse en las micrografías un número reducido de ensamblajes de mayor tamaño, con diámetros de entre 25 y 40 nm. Lo anterior podría ser un artefacto de la técnica utilizada, ya que las partículas podrían haberse adsorbido al soporte en múltiples capas. Sin embargo, la microscopía electrónica muestra inequívocamente la formación de partículas estrelladas estables a escala nanométrica de forma y dimensiones regulares. La forma estrellada de las partículas sugiere una organización de los monómeros de lipopéptido con las cadenas de fosfolípido apuntando al centro de la partícula (formando un núcleo hidrofóbico) y las cadenas peptídicas hidrofílicas apuntando hacia el exterior, tal como se ilustra en la figura 5.

d) Sección experimental: estudios biofísicos sobre el lipopéptido 4.

Determinación del fosfato

El ensayo se adaptó a partir de [Ames B.N., Methods Enzymol. 8:115-118, 1966] y se utilizó para determinar la concentración de las soluciones de lipopéptido utilizadas en los experimentos siguientes mediante estimación del fosfato total presente en la fracción fosfolípido. Materiales utilizados: Bloque calefactor capaz de calentamiento a 250°C (por ejemplo el controlador programable 630 de Tecon); probetas de vidrio borosilicato resistentes a la temperatura para el análisis elemental ($\varnothing$ 60 x 7 mm) y un baño de agua a 45°C.

Se preparó con exactitud una solución de fosfato 1 mM a partir de KH_2PO_4 (solución estándar, 1 μ l=1 nmol de fosfato). Se añadieron alícuotas (habitualmente de 10 a 80 μ l, dependiendo del contenido estimado de fosfato en la muestra) de la solución estándar a una serie de tubos limpios con el fin de construir una curva de calibración. Las muestras y los estándares de calibración se secaron en el bloque calefactor (100°C a 120°C) y, ya secos, se añadieron 70 μ l de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HClO}_4$ (1:1) a cada tubo y los tubos se calentaron a una temperatura de entre 230°C y 250°C durante 15 a 30 minutos.

Se preparó una solución de ácido ascórbico al 0,835%/molibdato amónico al 0,2% de la manera siguiente: se prepararon soluciones de ácido ascórbico (al 10% p/v) y molibdato amónico (al 2,5% p/v) en H_2O doblemente destilada. Inmediatamente antes de la utilización se mezclaron entre sí 1,67 ml y 1,60 ml de las soluciones de ácido ascórbico y molibdato amónico, respectivamente, y se ajustó el volumen a 20 ml (suficiente para 12 muestras).

Tras 15 a 30 minutos a una temperatura de entre 230°C y 250°C, las muestras se enfriaron hasta la t.a., se añadieron 1,6 ml de la solución de ensayo bajo agitación y seguidamente las muestras se incubaron durante 30

minutos a 45°C. Un tubo sin muestra o con fosfato estándar se trató idénticamente en todo el procedimiento con el fin de proporcionar un blanco. Inmediatamente después de la incubación, se midió la absorbancia a 820 nm de cada muestra en una celda de 1 cm. Se interpoló la concentración de la muestra a partir de la curva estándar.

5 Ultracentrifugación analítica

Se llevaron a cabo experimentos convencionales de equilibrio de sedimentación y velocidad de sedimentación utilizando una ultracentrífuga analítica Beckman XL-A dotada de un rotor AN60Ti. Se utilizaron tanto celdas de doble sector y de 6 canales rellenas de carbón Epon y fluorocarbono FC-43 para proporcionar un falso fondo, según resulte apropiado. Se configuró una diversidad de velocidades del rotor, adecuadas para el experimento particular, y todas las mediciones se llevaron a cabo a 20°C. Los experimentos se llevaron a cabo a varias concentraciones de lipopéptido y se utilizaron en todo el procedimiento tampones de Tris 10 mM, pH 7,4, que contenía cloruro sódico 90 mM o de fosfato sódico 10 mM, pH 7,4, que contenía cloruro sódico 90 mM. En los análisis del equilibrio de sedimentación se recogieron datos radiales a un espaciado de 0,001 cm y se promediaron por lo menos 10 barridos para cada dato. Se captaron tres de dichos datos para cada velocidad y concentración. Se confirmó el equilibrio mediante superposición de los datos recogidos a intervalos de tiempo adecuados. Los datos de velocidad de sedimentación se captaron a un espaciado radial de 0,005 cm con un intervalo entre barridos de entre 2 y 4 minutos. Se utilizó el principio de aditividad para calcular separadamente el volumen específico parcial aparente de las fracciones lípido ($v_{20}=0,934 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$) y péptido ($v_{20}=0,726 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$) a partir de sus contribuciones de grupo [Cohn E.J. *et al.*, en: Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions, Hafner publishers, New York, 1943, páginas 370 a 381; Hoeiland H., Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology, Springer-Verlag, Berlin, 1986, páginas 17 a 44; Traube I., Ann. Chem. Liebigs 265:27, 1891; Laue T.M., Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science, Royal Society of Chemistry publishers, Cambridge, 1992]. Se aproximó el volumen específico parcial del lipopéptido 4 ($v_{20}=0,781 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$) como el promedio ponderado según la masa de los valores de los dos componentes. Se calcularon las densidades de tampón a partir de las tablas estándares [Laue T.M., Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science, Royal Society of Chemistry publishers, Cambridge, 1992]. Se utilizaron los paquetes informáticos Sedfit y Sedphat [Schuck P., Biophys. J. 78:1606-1619, 2000] para el análisis de los datos de velocidad, mientras que se utilizó el programa Ultrascan para analizar los datos de equilibrio de sedimentación [Demeler B., UltraScan 5.0, 2001].

Espectroscopía de dicroísmo circular

Se midieron los espectros de dicroísmos circular (DC) del ultravioleta lejano a t.a. utilizando un espectropolarímetro Jasco J-715 y una cubeta de cuarzo de 0,1 cm de camino óptico. Se prepararon solución de péptido 5 (50 μM) y solución de lipopéptido 4 (35,7 μM) en tampón TRIS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 90 mM, pH 7,4) y se determinaron las concentraciones mediante análisis de fosfatos o de aminoácidos, según resultase apropiado. Se utilizaron velocidades de barrido de entre 10 y 100 nm/min, tiempos de respuesta de 1 a 2 segundos y un ancho de banda espectral de 1 nm y los espectros se recogieron a una resolución mínima de 0,5 nm. Tras restar el blanco, se expresaron los valores espectrales como elipticidad residual media [$\text{grad. cm}^2/\text{dmol}$] y se ignoró la fracción lípido en el cálculo del peso molecular medio de residuo.

Se midieron los espectros de DC de las muestras de baja concentración de lipopéptido 4 (2 a 40 μM) a 20°C con un espectropolarímetro Jasco J810 utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Se prepararon soluciones de lipopéptido en PBS (Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 90 mM, pH 7,4) y se determinaron las concentraciones mediante análisis de fosfatos. Se utilizaron velocidades de barrido de 10 nm/min, tiempos de respuesta de 4 segundos y un ancho de banda espectral de 2 nm y los espectros se recogieron a una resolución mínima de 0,5 nm. Se elaboraron los datos tal como se ha indicado anteriormente.

Fluorescencia: concentración micelar crítica (CMC)

Se utilizó la sonda fluorescente pireno-3-carboxialdehído (PYCHO) para la determinación de la concentración micelar crítica (CMC) [Turro N.J., Macromolecules 17:2123-2126, 1984; Ananthapadmanabhan K.P. *et al.*, Langmuir 1:352-355, 1985]. Se obtuvieron los espectros de fluorescencia en un espectrómetro de luminiscencia LS55 de Perkin Elmer. Los espectros de emisión del pireno-3-carboxialdehído se midieron entre 400 y 550 nm a 20°C. Se obtuvieron mediante excitación de las muestras a 380 nm con una velocidad de barrido de 300 nm/min, anchura de rendija de excitación de 4 nm y anchura de rendija de emisión de 9 nm, se acumuló cada barrido cuatro veces y se calculó el promedio. Se prepararon soluciones de lipopéptido 4 utilizando HBS, pH 7,4 (Hepes 10 mM, NaCl 90 mM) previamente saturadas con PYCHO (concentración de la solución $<10^{-6}$ M). Se midieron los espectros de fluorescencia a 12 concentraciones de péptido, de entre 1 μM y 5 nM, y se determinaron las concentraciones de las muestras utilizando el ensayo de fosfatos. Se prepararon concentraciones de lipopéptido en el intervalo bajo de nM (50 nM a 3 nM) utilizando una dilución 1/10 de la solución saturada de PYCHO en tampón HBS. Los datos se analizaron con software Origin (v7.0) y se graficó la proporción relativa de intensidades I_{437}/I_{466} de los espectros de emisión frente a la concentración de muestra con el fin de extrapolar el valor de CMC.

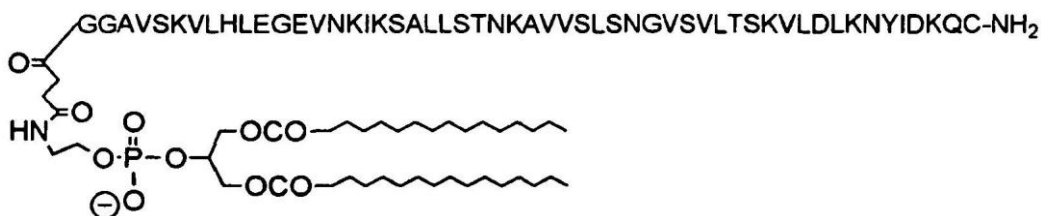
65 Dispersión lumínica dinámica (DLS)

Se llevaron a cabo mediciones de dispersión lumínica en un clasificador de tamaños submicrométricos NICOMP (modelo 370). Se prepararon soluciones de lipopéptido 4 en tampón TRIS (10 mM, NaCl 90 mM, pH 7,4) y se determinaron las concentraciones de las muestras mediante análisis de fosfatos. Se filtró una solución 1,1 mM de lipopéptido 4 a través de un filtro Millipore de 0,45 μm , que rindió una muestra de 1,05 mM. Se llevaron a cabo mediciones de dispersión lumínica con dicha solución a 20°C, 30°C y 37°C. Las mediciones a 20°C se llevaron a cabo en los tiempos $t=0$, 20 y 90 minutos, a 30°C y a 37°C en los tiempos $t=0$ y 90 minutos. La elaboración de los datos se llevó a cabo utilizando un modelo de ajuste multicomponente NICOMP bajo la suposición de la presencia de partículas esféricas ideales.

10 Microscopía electrónica

Se utilizaron rejillas de cobre de malla 400 recubiertas de carbono, convertidas en hidrofílicas en plasma de oxígeno, para un análisis estructural preliminar mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Se aplicó una gota pequeña de solución de lipopéptido 4 (4 μM en tampón TRIS, pH 7,4) al soporte de C hidrofílico y tras 20 segundos se eliminó la mayor parte de la solución de manera que sólo quedase una capa muy fina sobre la rejilla. A continuación se lavó la rejilla tocando la superficie con una gota de agua. Se eliminó el exceso de agua con un filtro y la rejilla se tiñó inmediatamente tocando la superficie con una gota de acetato de uranilo acuoso al 2%. Tras eliminar la solución de tinción la rejilla se dejó secar. Se registraron micrografías en un microscopio electrónico Zeiss EM 912 (Zeiss AG, Oberkochen, BRD) utilizando una cámara CCD de barrido lento 1 k x 1 k (Proscan, Munich, BRD).

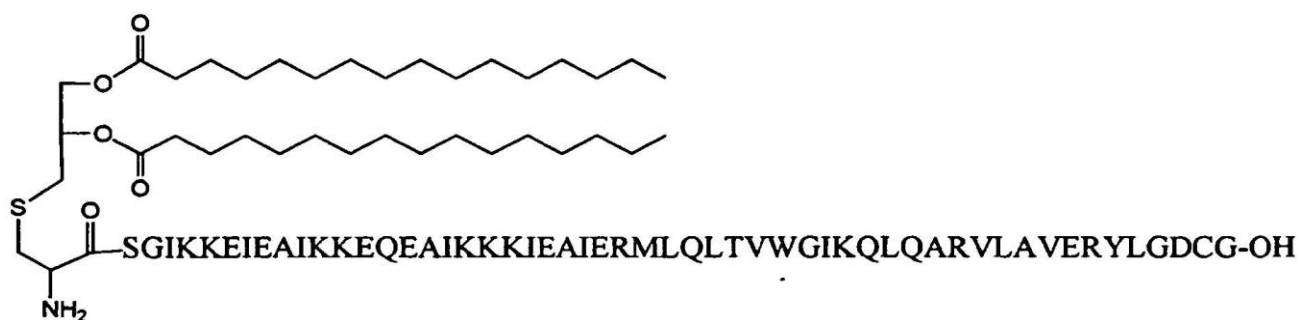
Ejemplo 2: lipopéptido 6



El lipopéptido 6 es idéntico al 4 excepto en que se ha añadido una Cys adicional en el extremo C-terminal de SEC ID nº 1. La cadena lateral de esta Cys puede utilizarse para conjugar el lipopéptido a un antígeno.

Se sintetizó el péptido 53-mero en una resina de amida de Rink-MBHA utilizando la reacción del Fmoc, tal como anteriormente para el péptido 5, también con Fmoc-Cys(Trt)-OH. Tras completarse la síntesis, se trató una muestra de la resina con TFA. A continuación se analizó el producto mediante HPLC de fase inversa en una columna C18 (Zorbax Eclipse XDB-C18; 4,6 mm x 250 mm, 5 μm , 80 Å) utilizando un gradiente de 5% a 50% de acetonitrilo en agua (+TFA al 0,1%) durante 18 minutos y después hasta 100% de acetonitrilo en agua (+TFA al 0,1%) durante 4 minutos. Tiempo de retención=19,6 minutos. EM-ESI: (m/z): 1393,2 $[M+4H]^{4+}$; 1115,0 $[M+5H]^{5+}$; 929,1 $[M+6H]^{6+}$; 796,8 $[M+7H]^{7+}$ ($M_{\text{meas}}=5569,6 \pm 0,01\%$; $M_{\text{calc}}=5569,6$). Debido a que el péptido lineal correcto se encontraba presente sobre la resina, se unió el fosfolípido 1,3-dipalmitoil-glicerol-2-fosfoetanolamido-succinato (PE-succ-OH) al extremo N-terminal del péptido unido a resina restante utilizando PyBOP (3 eq.) y DIEA (8 eq.) en DMF:CH₂Cl₂ (2:1) a t.a. durante 16 horas. Se confirmó que se había completado la unión por una prueba de Kaiser negativa. El conjugado resultante unido a resina finalmente se cortó de la misma y se desprotegió utilizando TFA/H₂O/TIS/EDT 92,5:2,5:2,5:2,5 durante 3 horas. Se concentró la fase TFA al vacío y después el lipopéptido desprotegido crudo se precipitó mediante la adición de iPr₂O frío. Tras la centrifugación, el pellet se lavó dos veces con iPr₂O y se secó bajo alto vacío. El producto se disolvió en H₂O/MeCN/DMF 4:4:2 y se purificó mediante HPLC de fase inversa en una columna semipreparativa C₄ (InterchromUP5WC4-25M; 10 mm x 250 mm, 10 μm , 300 Å) utilizando un gradiente de 50% a 100% de acetonitrilo en agua (+TFA al 0,1%) durante 15 minutos. Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron, proporcionando el conjugado 6. El conjugado 6 se analizó mediante HPLC de fase inversa en una columna analítica C₄ (Interchrom UP5WC4-25QS; 4,6 mm x 250 mm, 10 μm , 300 Å) utilizando un gradiente de 50% a 100% de acetonitrilo en agua (+TFA al 0,1%) durante 20 minutos: pureza > 98%. $t_R = 17,2$ min. EM-ESI (modo positivo) (m/z): 1587,7 $[M+4H]^{4+}$; 1269,6 $[M+5H]^{5+}$; 1058,3 $[M+6H]^{6+}$; 907,0 $[M+7H]^{7+}$ ($M_{\text{meas}}=6342,9 \pm 0,01\%$; $M_{\text{calc}}=6342,6$).

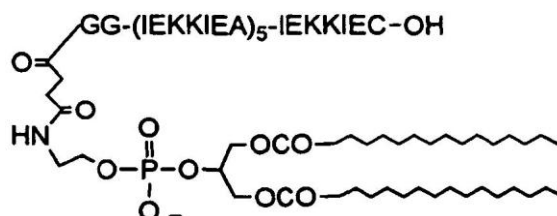
Ejemplo 3: lipopéptido 7



La parte péptido (SEC ID nº 2) de esta molécula contiene una secuencia repetición héptada superenrollada de diseño fusionada con una secuencia superenrollada natural obtenida de la proteína gp41 del VIH-1 cepa JR-FL. Por lo tanto, la secuencia superenrollada es en parte natural y en parte de diseño. Además, se ha añadido el dipéptido -SG- al extremo N-terminal para que actúe como espaciador corto antes del lípido, y al extremo C-terminal se ha unido el dipéptido -CG- de manera que el grupo tiol en el residuo Cys pueda utilizarse para la conjugación con un antígeno.

El péptido se ensambló utilizando HBTU/HOBt/DIEA para la activación y resina de cloruro de 2-clorotritilo (0,34 mmoles/g, 500 mg) cargada con Fmoc-Gly. Los aminoácidos utilizados fueron Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-His(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH y Fmoc-Val-OH. Se utilizó un exceso de seis veces de aminoácidos Fmoc y 8 equivalentes de DIEA. Tras cada ciclo de unión, se añadió una caperuza a los grupos amino libres restantes con Ac₂O/HOBt/DIEA. Tras el ensamblaje y la eliminación del grupo Fmoc terminal, la resina se lavó con DMF (5x6 ml), i-PrOH (5x6 ml) y n-hexano (4x6 ml) y se secó. Para la unión de la fracción lípido, la resina (957 mg) se hinchó durante 30 minutos en CH₂Cl₂. Se añadió una solución de Fmoc-Cys((RS)-2,3-di(palmitoiloxi)-propil)-OH (Fmoc-Pam₂Cys-OH, 174 mg), PyBOP (101 mg) y HOBt (26 mg) en CH₂Cl₂/DMF 2:1 (3,5 ml), seguido de DIEA (1,6 equiv.). La mezcla se agitó suavemente durante 18 horas en un agitador a t.a. La resina se lavó con CH₂Cl₂ (5x6 ml) y DMF (5x6 ml). Se eliminó el grupo protector Fmoc mediante tratamiento con piperidina al 20% (v/v) en DMF (6x2 ml durante 2 minutos). Se realizó un seguimiento de la desprotección mediante absorción de UV a 301 nm. La resina se lavó con DMF (5x10 ml), i-PrOH (5x6 ml) y n-hexano (4x6 ml) y CH₂Cl₂ (2x6 ml). La resina peptídica se trató con TFA al 0,6% en CH₂Cl₂ (4x4,5 ml durante 2 minutos), seguido de un lavado con CH₂Cl₂. Se agruparon los filtrados y se evaporaron bajo presión reducida. A continuación, se eliminaron los grupos protectores de cadena lateral mediante tratamiento con TFA/EDT/tioanisol/fenol/H₂O/TIS 69:10:10:5:3,5:1 (9,85 ml) bajo agitación suave durante 2 horas a t.a. El péptido desprotegido se precipitó en iPr₂O preenfriado a -20°C y se lavó 3x con iPr₂O (15 ml). Se dejó que el precipitado se secase al aire durante la noche y el lipopéptido superenrollado se purificó mediante RP-HPLC en una columna preparativa C4 (Interchrom) utilizando un gradiente de 30% a 100% de MeCN en H₂O (+TFA al 0,1%) durante 28 minutos. Rendimiento: 45 mg. RP-HPLC (columna C4 Interchrom, 50% a 100% de MeCN en H₂O (TFA al 0,1%) durante 12,5 minutos): pureza > 97 %, t_R = 11,92 min. EM-CL: columna C₈, 30% a 100% de MeCN en H₂O (+HCOOH al 0,1%) durante 10 minutos: t_R = 5,47 minutos; m/z = 1342,5 [M+5H]⁵⁺, 1118,9 [M+6H]⁶⁺, 959,3 [M+7H]⁷⁺, 893,4 [M+8H]⁸⁺, 746,6 [M+9H]⁹⁺. MALDI-TOF: m/z calculado para C₃₀₈H₅₃₂N₇₆O₈₂S₃: 6704,9; m/z observado: 6704,7 [M]⁺.

Ejemplo 4: lipopéptido 8

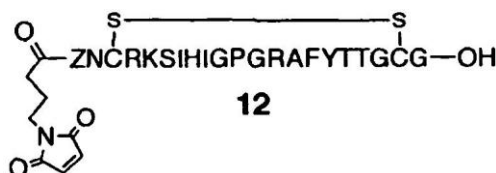


El lipopéptido 8 contiene una hélice superenrollada de diseño (SEC ID nº 3) unida mediante un conector corto en el extremo N-terminal a un fosfolípido.

El péptido (SEC ID nº 3) se ensambló utilizando una reacción de Fmoc y HBTU/HOBt/DIEA para la activación y resina de cloruro de 2-clorotritilo (0,42 mmoles/g, 595 mg, a escala de 0,25 mmoles). Los aminoácidos utilizados fueron Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH y Fmoc-Cys(Trt)-OH. Se utilizó un exceso de cuatro veces de aminoácidos protegidos con Fmoc y 6 equivalentes de DIEA. Tras cada ciclo de unión, se añadió una caperuza a los grupos amino libres restantes con Ac₂O/HOBt/DIEA. Tras el ensamblaje de la cadena peptídica y la eliminación del grupo Fmoc terminal, la resina se lavó con DMF (5x6 ml), i-PrOH (5x6 ml) y n-hexano (4x6 ml) y se secó al vacío. Para unir la fracción lípido, la resina (250 mg) se hinchó durante 30 minutos en DCM. Se añadió una solución de PE-succ-OH (113 mg), PyBOP (66 mg) y HOBt (17 mg) en DCM/DMF 1:2 (4,5 ml), seguido de DIEA (31 µl, 300 µmoles, 6,0 equiv.). La mezcla se agitó suavemente durante 16 horas en un agitador a t.a. La

resina se lavó con DMF (5x6 ml) y DCM (2x6 ml). La resina peptídica se trató con TFA al 0,6% en DCM (4x4,5 ml durante 2 minutos), seguido de un lavado con DCM. Se agruparon los filtrados y se evaporaron bajo presión reducida. A continuación, se eliminaron los grupos protectores de cadena lateral mediante tratamiento con TFA/EDT/tioanisol/H₂O/TIS 75:10:10:4:1 (10 ml) bajo agitación suave durante 2 horas a t.a. El péptido desprotegido se precipitó con iPr₂O preenfriado a -20°C y se lavó 3x con iPr₂O. Se purificó el lipopéptido 8 mediante HPLC de fase inversa en una columna preparativa C4 (Interchrom) utilizando un gradiente de 30% a 100% de MeCN en H₂O (+TFA al 0,1%) durante 28 minutos. Rendimiento: 15 mg. RP-HPLC (columna C4 Interchrom, 50% a 100% de MeCN en H₂O (TFA al 0,1%) durante 12,5 minutos): pureza > 96 %, t_R = 12,54 min. EM-CL: m/z calculado para C₂₆₇H₄₇₄N₅₇O₇₉PS: 5810,0; m/z observado: 1453,3 [M+4H]⁴⁺, 1162,5 [M+5H]⁵⁺.

Ejemplo 5: antígeno V3SS que porta un grupo 4-maleimidobutiril-hidrazinoglicinilo, 12



El péptido con puente disulfuro denominado V3SS se obtiene en gran parte del denominado bucle V3 de la glucoproteína gp120 del VIH-1. Esta secuencia (SEC ID nº 4) representa el denominado determinante neutralizador principal de gp120, y ha sido investigado extensamente como un candidato potencial a vacuna para el VIH-1 [Huang C.-C. *et al.*, Science 310:1025-1028, 310; Pantophlet R. *et al.*, Annu. Rev. Immuno. 24:739-769, 2006]. El péptido con puente disulfuro V3WW es, por lo tanto, un mimético de epítipo del bucle V3 en gp120.

En el extremo N-terminal de V3SS (SEC ID nº 4) se ha añadido un residuo hidrazinoglicina (Z), de manera que puede utilizarse el grupo hidrazino nucleofílico para unir el péptido al LBB. La cadena peptídica se ensambló en resina de cloruro de 2-clorotritilo utilizando métodos de fase sólida estándares y la reacción de Fmoc. Se añadió al extremo N-terminal un residuo hidrazinoglicina protegido con tri-Boc. Tras el corte de la resina y la desprotección completa, se introdujo el enlace disulfuro mediante oxidación al aire. Finalmente, se hizo reaccionar regioespecíficamente el conector N-hidroxisuccinimidil-4-maleimidobutirato (HMB) con el grupo hidrazino en el extremo N-terminal, proporcionando el producto 12.

Se sintetizó el péptido lineal Z-NCRKSIHIGPGRAFYTTCG (Z añadido a SEC ID nº 4), en el que Z se refiere a -NHNHCH₂CO- en un sintetizador de péptidos ABI 433A de Applied Biosystems utilizando la reacción de Fmoc estándar y resina de cloruro de 2-clorotritilo. Tras la carga con Fmoc-Gly-OH, para la síntesis se utilizaron los aminoácidos con protección de las cadenas laterales siguientes: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH y Fmoc-Tyr(tBu)-OH. Como residuo N-terminal se unió hidrazinoglicina protegida con Boc mediante tratamiento de la resina con una solución de tri-Boc-ácido hidrazinoacético (3 eq.), PyBOP (3 eq.) y DIEA (8 eq.) en DMF (5 ml) durante 3 horas. A continuación se filtró la resina y se lavó con DMF (5x) y después con CH₂Cl₂ (5x). Se cortó el péptido de la resina y se desprotegió mediante tratamiento de la resina con TFA/H₂O/iPr₃SiH/etanoditiol 92,5:2,5:2,5:2,5 (15 ml) durante 2,5 horas. Se eliminó la resina mediante filtración y tras la concentración del filtrado al vacío, el péptido lineal desprotegido crudo se precipitó mediante adición de iPr₂O frío. Tras la centrifugación, el pellet se lavó dos veces con iPr₂O y se secó bajo alto vacío, proporcionando un sólido blanco. El producto se purificó mediante HPLC de fase inversa en una columna C₁₈ (Zorbax Eclipse XDB-C18; 21,2 mm x 250 mm, 7 µm, 80 Å) utilizando un gradiente de 10% a 50% de acetonitrilo en agua (+TFA al 0,1%) durante 16 minutos, proporcionando el péptido lineal puro en la forma ditiol reducida. Este péptido se analizó mediante HPLC de fase inversa (columna analítica C₁₈ ZorbaxEclipse XDB-C18, 4,6 mm x 250 mm, 5 µm, 80 Å) utilizando un gradiente de 5% a 50% de acetonitrilo en agua (+TFA al 0,1%) durante 20 minutos: pureza > 98%. t_R = 14,2 min. MALDI-TOF (m/z): 2211,2 [M+1 H]¹⁺ (M_{meas.} = 2210,2 ± 0,01%; M_{calc.} = 2210,4).

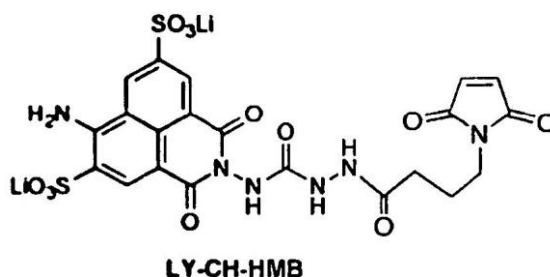
Para la oxidación (formación de puentes disulfuro), se agitó una solución de péptido lineal (20 mg) en H₂O (20 ml) al aire a t.a. durante 48 horas. El péptido con puentes disulfuro correspondiente se purificó directamente mediante HPLC de fase inversa en una columna preparativa C₁₈ (ZorbaxEclipse XDB-C18, 21,2 mm x 250 mm, 7 µm, 80 Å) utilizando un gradiente de 12% a 40% de acetonitrilo en agua (+TFA al 0,1%) durante 16 minutos, proporcionando 15 mg de péptido oxidado. El péptido oxidado (con puente disulfuro) se analizó mediante HPLC de fase inversa (columna analítica C₁₈ ZorbaxEclipse XDB-C18, 4,6 mm x 250 mm, 5 µm, 80 Å) utilizando un gradiente de 5% a 50% de acetonitrilo en agua (+TFA al 0,1%) durante 20 minutos: pureza > 98%. t_R = 14,2 min. MALDI-TOF (m/z): 2209,0 [M+1H]¹⁺ (M_{meas.} = 2208,0 ± 0,01%; M_{calc.} = 2208,4).

El péptido con puente disulfuro (30 mg) en H₂O (30 ml) se disolvió en H₂O (3 ml) y se ajustó el pH a 6 utilizando NaOH (0,2 N). A lo anterior se añadió una solución de N-hidroxi-succinimidil-4-maleimidobutirato (HMB) (3 eq., 11 mg) en THF (450 µl) y la mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 2 horas. A continuación, la solución se diluyó con H₂O/TFA al 0,1% (2 ml) y el producto se purificó mediante HPLC de fase inversa en una columna preparativa C₁₈ (Zorbax XDB-C18, 21,2 mm x 250 mm, 7 µm, 80 Å) utilizando un gradiente de 10% a 50% de MeCN en agua (+TFA

al 0,1%) durante 16 minutos, proporcionando 21 mg de péptido 12. El péptido 12 se analizó mediante HPLC de fase inversa en una columna C₁₈ (Zorbax Eclipse XDB-C18, 4,6 mm x 250 mm, 5 µm, 80 Å) utilizando un gradiente de 5% a 50% de acetonitrilo en agua (+TFA al 0,1%) durante 20 minutos. pureza > 98%. t_R = 14,7 min. MALDI-TOF (m/z): 2374,3 [M+1H]¹⁺ (M_{meas.} = 2373,3 ± 0,01%; M_{calc.} = 2373,4).

5

Ejemplo 6: antígeno LY-CH portador de un grupo 4-maleimidobutirilo, LY-CH-HMB



10 Tal como en el Ejemplo 5, se unió el conector HMB a una molécula orgánica pequeña hapteno: el pigmento amarillo denominado amarillo Lucifer-CH (LY-CH), proporcionando el conjugado LY-CH-HMB.

Se disolvió amarillo Lucifer-CH (LY-CH) (Fluka, Buchs, Suiza, 12,5 mg) en H₂O/CH₃CN (1 ml, 4:1) y se ajustó el pH de la solución a 6,5 con NaOH 0,2 N. A esta solución se añadió una solución de N-hidroxisuccinimidil-4-maleimidobutirato (HMB) (15 mg, 2 eq.) en THF (400 µl) y la mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 6 horas. Tras la dilución con H₂O/TFA al 0,1% (2 ml), el producto se purificó directamente mediante HPLC de fase inversa en una columna preparativa C₁₈ (Zorbax, 21 mm x 250 mm, 10 µm, 120 Å) utilizando un gradiente de 5% a 50% de acetonitrilo en agua (+TFA al 0,1%) durante 15 minutos, proporcionando 9,6 mg de LY-CH-HMB en forma de sólido amarillo. EM-ESI (m/z): 608,0 [M-H]⁻, 630,9 [M+Na-2H]⁻ (modo de iones negativos).

20

Ejemplo 7: conjugado LBB6-12.

Se disolvió el péptido 12 (Ejemplo 5, 5,9 mg) en H₂O/CH₃OH 4:1 (750 µl) y se ajustó el pH de la solución a 6,5 con NaOH (0,2 N). A lo anterior se añadió una solución de lipopéptido 6 (Ejemplo 2, 6,6 mg) en H₂O/CH₃OH 1:1 (800 µl) y la mezcla de reacción se agitó bajo una atmósfera inerte a t.a. durante 2 horas. Tras diluir con H₂O/TFA al 0,1% (2 ml), el producto se purificó directamente mediante HPLC de fase inversa en una columna semipreparativa C₄ (Interchrom UP5WC4-25M, 10mm x 250 mm, 10 µm, 300 Å) utilizando un gradiente de 50% a 100% de MeCN en agua (+TFA al 0,1%) durante 15 minutos, proporcionando 4 mg de LBB6-12. El conjugado se analizó mediante HPLC de fase inversa en una columna analítica C₄ (Interchrom UP5WC4-25QS, 4,6 mm x 250 mm, 10 µm, 300 Å) utilizando un gradiente de 50% a 100% de acetonitrilo en agua (+TFA al 0,1%) durante 20 minutos. pureza > 98%. t_R = 15,4 min. MALDI-TOF (m/z): 8717,4 [M+1H]¹⁺ (M_{meas.} = 8716,4 ± 0,01%; M_{calc.} = 8716,3).

Ejemplo 8: conjugado LBB6-LY-CH

35 A una solución bajo agitación de lipopéptido 6 (Ejemplo 2, 1,1 mg, 177 nmoles) en H₂O/MeCN/TFE 1:4:1 (600 µl) se añadió gota a gota una solución de LY-CH-HMB (Ejemplo 6, 440 µg) en H₂O/MeCN 1:1 (400 µl). Se ajustó cuidadosamente el pH a 6,3 con NaOH 0,01 N y la mezcla se agitó vigorosamente a t.a. durante 2 horas. Debido a que el lipopéptido 6 y el conjugado de amarillo Lucifer presentan igual tiempo de retención en columnas de RP-HPLC C₄ y C₈ para una diversidad de gradientes de H₂O/MeCN, se realizó un seguimiento de la reacción a partir de la desaparición del lipopéptido 6 mediante EM-ESI. Tras completarse la reacción, la suspensión se diluyó mediante la adición de TFA al 0,1% (500 µl) y el aducto se separó del exceso de LY-CH-HMB mediante HPLC de fase inversa semipreparativa en una columna C₄ (Interchrom UP5WC4-25M, 10 mm x 250 mm, 10 µm, tamaño de poro de 300 Å, A=H₂O + TFA al 0,1%, B=MeCN + TFA al 0,1%, 50% a 100% de B en 16,5 minutos). El conjugado LBB6-LY-CH eluyó como un pico estrecho con t_R=13,38 minutos. Rendimiento: 1,0 mg (82%). El producto se analizó mediante HPLC de fase inversa en una columna analítica C₄ (Interchrom, 4,6 mm x 250 mm, 10 µm, 300 Å) y mediante CL-EM (Zorbax C8, fuente de iones, detector). RP-HPLC analítica (columna C₄, A=H₂O+TFA al 0,1%, B=MeCN+TFA al 0,1%, 50% a 100% de B en 13 minutos): Pureza: > 95%. t_R = 13,0 minutos. CL-EM (columna C₈, A = H₂O + HCOOH, B MeCN + HCOOH, 30% a 100% de B en 10 minutos): tiempo de retención=7,73 minutos. m/z: 1392,4 [M+5H]⁵⁺, 1160,3 [M+6H]⁶⁺, 994,3 [M + 7 H]⁷⁺ (m/z calculado para C₃₀₇H₅₁₄N₇₄, O₉₉PS₃Li: 1392,2 [M+5H]⁵⁺, 1160,3 [M+6H]⁶⁺, 994,7 [M + 7 H]⁷⁺).

50

Ejemplo 9: conjugado LBB7-12

55 A una solución bajo agitación de lipopéptido 7 (Ejemplo 3, 3,5 mg) en MeCN/H₂O/TFE 4:1:1 (1,2 ml) se añadió una solución de 12 (Ejemplo 5, 3,7 mg) en MeCN/H₂O 1:1 (400 µl). Se ajustó cuidadosamente el pH a 6,0 con NaOH 0,1 N. La mezcla se agitó durante 2 horas a t.a. Tras completar la reacción (detectado mediante CL-EM utilizando una columna C₈), el conjugado LBB7-12 se purificó directamente mediante RP-HPLC semipreparativa en una columna C₄ (Interchrom) utilizando un gradiente de 30% a 100% de MeCN en H₂O (+TFA al 0,1%) durante 17 minutos.

Rendimiento: 4,1 mg (87%). RP-HPLC (columna C₄, 50% a 100% de MeCN e H₂O (TFA al 0,1%) durante 12,5 minutos): pureza > 97%, tiempo de retención = 10,72 min. CL-EM (columna C₈, 30% a 100% de MeCN en H₂O (+HCOOH al 0,1%) durante 10 minutos): t_R = 5,53 minutos; m/z = 1010,4 [M+9H]⁹⁺, 909,8 [M+10H]¹⁰⁺, 827,2 [M+11H]¹¹⁺, 758,3 [M+12H]¹²⁺, 700,0 [M+13H]¹³⁺. MALDI-TOF: m/z calculado para C₄₀₉H₆₈₅N₁₀₉O₁₁₂S₅: 9082,0; m/z observado: 9082,8 [M], 2+4542,1 [M].

Ejemplo 10: conjugado LBB7-LY-CH

La síntesis y purificación de LBB7-LY-CH se llevaron a cabo tal como se ha descrito para LBB7-12 en el Ejemplo 9, utilizando el lipopéptido 7 (3,0 mg) y LY-CH-HMB (Ejemplo 6, 1,1 mg). Rendimiento: 2,8 mg (86 %). RP-HPLC (Interchrom columna C₄, 50% a 100% de MeCN e H₂O (TFA al 0,1%) durante 12,5 minutos): pureza > 96%, t_R = 11,91 min. EM-CL: columna C₈, 66% a 100% de MeCN en H₂O (+HCOOH al 0,1%) durante 5 minutos: t_R = 2,7 minutos, m/z = 1464,9 [M+5H]⁵⁺, 1220,7 [M+6H]⁶⁺, 1046,5 [M+7H], 915,9 [M+8H]⁸⁺. MALDI-TOF: m/z calculado para C₃₂₉H₅₄₉N₈₂O₉₄S₅Li: 7324,8; m/z observado: 7336,6 [M-Li+Na]⁺, 7320,4 2+[M]⁺, 3660,0 [M].

Ejemplo 11: inmunizaciones

Una importante aplicación de los HLB y SVLP es la administración de componentes de vacuna en el sistema inmunológico para elevar las respuestas inmunológicas. Con la inmunización de los animales con HLB o SVLP cargados con antígeno, deben inducirse respuestas inmunológicas eficientes específicas de antígeno. Para demostrar que lo anterior resulta posible, se inmunizaron conejos con LBB6-12, LBB6-LY-CH, LBB7-12 y LBB7-LY-CH. Además, se sometieron a ensayo los primeros tres conjugados con y sin adyuvante completo/incompleto de Freund. Los estudios de DLS indican que cada conjugado formó HLB o SVLP mediante autoensamblaje espontáneo en solución acuosa.

Se inmunizaron los conejos (en grupos de dos) con 150 µg cada uno de un conjugado reconstituido y equilibrado, durante por lo menos 1 hora a t.a. en 400 µl de PBS (fosfato sódico 10 mM, NaCl 154 mM, pH 7,2) o con adyuvante de Freund (adyuvante completo de Freund (FA) para las inmunizaciones primarias y con adyuvante incompleto de Freund (FIA) para las inmunizaciones de refuerzo). Las inmunizaciones se llevaron a cabo los días 0, 28 y 56. Se recogieron sueros los días 14, 38 y 66. Los sueros se analizaron mediante ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) con el fin de detectar los anticuerpos que se unían a los conjugados utilizados para las inmunizaciones. Se muestran los resultados en la Tabla 1.

Tabla 1. Inmunogenicidad de los conjugados.

Se muestran los títulos log10(punto de valoración) alcanzados tras una (1°) dos (2°) y tres (3°) inmunizaciones con cada conjugado, cada una en dos conejos (a y b). Las muestras de suero preinmunes no mostraban reactividad significativa con el inmunógeno correspondiente. Por Ejemplo, un título log10(punto de valoración) de 5,00 corresponde a un título de 100.000.					
Conjugado utilizado ^{a)}	log10 (títulos de punto de valoración) ^{b)}				
	Conejo	1°	2°	3°	
LBB6-12 + FA(FIA)	1a	3,51	4,41	5,01	
LBB6-12 + FA(FIA)	1b	< 1,70	4,51	5,41	
LBB6-12	2a	3,51	5,01	5,01	
LBB6-12	2b	2,00	3,81	4,71	
LBB6-LY-CH + FA(FIA)	3a	4,11	5,11	5,71	
LBB6-LY-CH + FA(FIA)	3b	3,51	4,41	5,31	
LBB6-LY-CH	4a	3,90	5,11	5,71	
LBB6-LY-CH	4b	4,20	5,11	5,40	
LBB7-12 + FA(FIA)	5a	2,30	3,20	3,51	
LBB7-12 + FA(FIA)	5b	2,90	3,81	4,11	
LBB7-12	6a	3,81	4,41	4,41	
LBB7-12	6b	3,51	4,11	4,11	
LBB7-LY-CH	7a	2,90	4,41	4,41	
LBB7-LY-CH	7b	<1,70	3,51	4,11	

^{a)}+ FA(FIA), con adyuvante completo de Freund (primario) y adyuvante incompleto de Freund (refuerzos)

^{b)} Los títulos de punto de valoración de las inmunizaciones primaria (1°), primer refuerzo (2°) y segundo refuerzo (3°) se definen como la última dilución recíproca para la que la absorbancia de UV era superior a dos veces el valor correspondiente al suero preinmune.

Tal como puede observarse en la Tabla 1, todos los conjugados indujeron niveles elevados de anticuerpos tras la segunda inmunización de refuerzo. Ya era detectable una respuesta en la mayoría de antisueros primarios (títulos comprendidos entre 1:100 y 1:15.000) y el incremento más acusado de títulos de anticuerpo se observó tras la segunda inmunización, mientras que se observó un menor incremento entre la segunda y tercera inmunizaciones. También resultó evidente que los títulos de anticuerpo alcanzados sin utilización de adyuvantes eran tan altos, o más altos, que los alcanzados utilizando adyuvante de Freund. Lo anterior demuestra que pueden conseguirse buenas respuestas inmunológicas sin utilizar un adyuvante.

También se analizó mediante ELISA la especificidad de cada respuesta inmunológica específica de hapteno (Tabla 2). En este análisis se midió la capacidad de los anticuerpos inducidos por cada conjugado de reaccionar cruzadamente con el mismo antígeno unido a un LBB diferente. Los resultados demostraron que una parte significativa de la respuesta inmunológica se dirigía contra el antígeno unido a cada LBB.

Tabla 2. Especificidad de las respuestas inmunológicas específicas de hapteno. Se sometieron a ensayo los anticuerpos generados contra cada inmunógeno para la reacción cruzada con cada antígeno mediante ELISA. Se muestran los títulos $\log_{10}$ (punto de valoración) alcanzados tras una (1°), dos (2°) y tres (3°) inmunizaciones con cada conjugado, cada una en dos conejos (a y b).

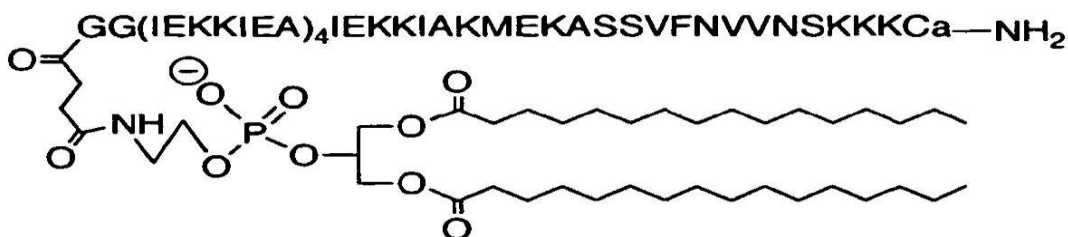
Inmunógeno ^{a)}	Conejo	Antígeno	Títulos de punto de valoración($\log_{10}$) ^{b)}		
			1°	2°	3°
LBB6-12+ FA (FIA)	1a	LBB7-12	3,20	4,71	4,71
LBB6-12+ FA (FIA)	1b	LBB7-12	<1,70	5,11	5,41
LBB6-12	2a	LBB7-12	3,60	5,11	5,41
LBB6-12	2b	LBB7-12	<1,70	3,81	4,11
LBB7-12+ FA (FIA)	5a	LBB6-12	<1,70	2,30	2,30
LBB7-12+ FA (FIA)	5b	LBB6-12	<1,70	3,51	3,81
LBB7-12	6a	LBB6-12	<1,70	2,30	4,41
LBB7-12	6b	LBB6-12	<1,70	<1,70	<1,70
LBB6-LY-CH+FA(FIA)	3a	LBB7-LY-CH	3,20	4,71	5,01
LBB6-LY-CH+FA(FIA)	3b	LBB7-LY-CH	2,90	3,81	4,41
LBB6-LY-CH	4a	LBB7-LY-CH	4,51	5,11	5,41
LBB6-LY-CH	4b	LBB7-LY-CH	4,20	5,71	5,71
LBB7-LY-CH	7a	LBB6-LY-CH	2,90	5,01	5,01
LBB7-LY-CH	7b	LBB6-LY-CH	<1,70	4,71	5,01

^{a)} FA(FIA), con adyuvante completo de Freund (primario) y adyuvante incompleto de Freund (refuerzos)

^{b)} Los títulos de punto de valoración de las inmunizaciones primaria (1°), primer refuerzo (2°) y segundo refuerzo (3°) se definen como la última dilución recíproca para la que la absorbancia de UV era superior a dos veces el valor correspondiente a la dilución de suero preinmune.

Se recubrieron durante la noche placas de microtitulación ELISA (Nunc Immunoplates Polysorb F96) con una solución 5 µg/ml de cada antígeno en PBS. A continuación, los pocillos se lavaron con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (PBST) y se bloquearon con PBS que contenía leche desnatada en polvo al 5% durante 1 hora a t.a. Tras el bloqueo, los pocillos se lavaron tres veces con PBST y se incubaron con diluciones en serie de suero de conejo en PBS que contenía Tween 20 al 0,05% y leche desnatada en polvo al 5% (MPBST) durante 2,5 horas a t.a., seguido de tres lavados con PBST. A continuación, las placas se incubaron con anticuerpo IgG de ratón anticonejo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma), diluido 1:20.000 en MPBST, durante 1 hora a t.a., se lavaron nuevamente tres veces con PBST y se incubaron en la oscuridad con una solución 1 mg/ml de fosfato de p-nitrofenilo (Sigma) en tampón de sustrato (tampón de carbonato sódico 50 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 9,6) a t.a. Se leyó la absorbancia tras un tiempo apropiado a 405 nm utilizando un lector de microplacas Bio-Rad modelo 3550.

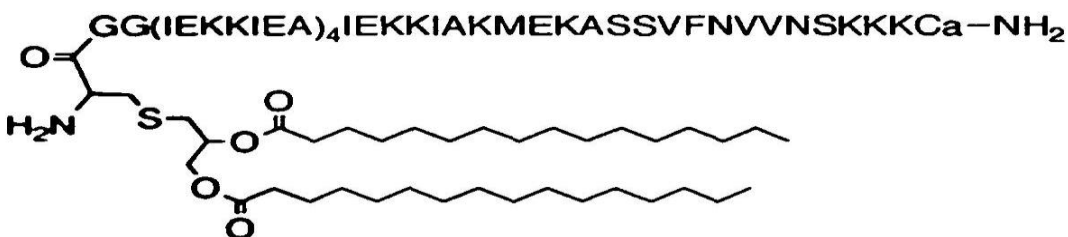
Ejemplo 12: lipopéptido 9



El presente ejemplo se basa en el motivo repetición héptada IEKKIEA del lipopéptido 8 del Ejemplo 4, aunque incluye además un epítipo de célula T ayudante universal correctamente fusionado [descrito en: Sinigaglia, F. *et al.*, Nature 336:778-780, 1988], así como residuos adicionales en el extremo C-terminal para mejorar la solubilidad y la estabilidad, y para permitir la conjugación de un antígeno.

Se sintetizó el péptido lineal GGIEKKIEAIEKKIEAIEKKIEAIEKKIEAIEKKIAKMEKASSVFNVVNSKKKCa-NH₂ (SEC ID n° 28, en el que se ha añadido una D-alanina-amida indicada como "a-NH₂" en el extremo C-terminal) en un sintetizador de péptidos ABI 433A de Applied Biosystems utilizando una reacción estándar de Fmoc y resina de amida de Rink-MBHA. Tras cargar la resina en primer lugar con Fmoc-D-alanina utilizando HBTU, HOBT y DIEA para la activación, el péptido se ensambló utilizando, en la secuencia correcta, los aminoácidos protegidos siguientes: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Glu (tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH y Fmoc-Val-OH. Tras cada ciclo de unión, los grupos amino libres restantes se acetilaron utilizando Ac₂O/HOBT/DIEA. Tras completar el ensamblaje de la cadena y la eliminación del grupo protector Fmoc terminal, la resina se lavó con DMF (5x6 ml), CH₂Cl₂ (5x6 ml) y MeOH (5x6 ml) y se secó al vacío sobre pellets de KOH. Para la unión de la fracción lípido, la resina (325 mg) se hinchó en CH₂Cl₂ (6 ml) durante 45 minutos. Se añadió una solución de PE-Succ-OH (120 mg, 150 µmoles), PyBOP (78 mg, 150 µmoles), HOBT (20 mg, 150 mmoles) y DIEA (100 µl, 0,6 mmoles) en CH₂Cl₂/DMF 1:2 (4,5 ml). Se agitó la mezcla durante 20 horas. La resina se filtró y se lavó con DMF (5x6 ml), CH₂Cl₂ (5x6 ml) y MeOH (5x6 ml) y se secó al vacío sobre pellets de KOH. Para el corte y eliminación de los grupos protectores de cadenas laterales, la resina se trató con TFA/tioanisol/EDT/H₂O/TIS 75:10:10:4:1 (10 ml) bajo agitación durante 2,5 horas. Se filtró la resina y el péptido se precipitó con iPr₂O (preenfriado a -20°C) y se lavó con iPr₂O (3x25 ml). Se dejó que el precipitado se secase al aire durante la noche y el lipopéptido se purificó mediante RP-HPLC de fase inversa en una columna preparativa C₄ (Interchrom) utilizando un gradiente de 30% a 100% de MeCN en H₂O (+TFA al 0,1%) durante 28 minutos. Rendimiento: 37 mg. HPLC de fase inversa analítica (Interchrom columna C₄, 25% a 100% de MeCN en H₂O (TFA al 0,1%) durante 25 minutos): pureza > 96%, t_R = 22,10 min. CL-EM (columna Zorbax C₈, 30% a 100% de MeCN en H₂O (+HCOOH al 0,1%) durante 10 minutos): t_R = 5,32 minutos; EM-ESI m/z = 990,3 [M+7H]⁷⁺, 866,6 [M+8H]⁸⁺, 770,2 [M+9H]⁹⁺, 693,3 [M+10H]¹⁰⁺. MALDI-TOF: m/z calculado para C₃₁₅H₅₅₇N₇₄O₉₀PS₂: 6916,3; m/z observado: 6916,8 [M+H]⁺.

Ejemplo 13: lipopéptido 10



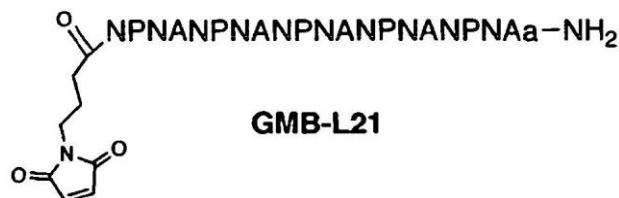
El presente ejemplo utiliza la misma secuencia peptídica que el Ejemplo 12, aunque contiene un grupo de cabeza lípido basado en Pam₂-cisteína (Cys((RS)-2,3-di(palmitoiloxi)-propil)) en lugar de uno basado en un fosfolípido.

Se sintetizó el péptido lineal en un sintetizador de péptidos ABI 433A de Applied Biosystems utilizando una reacción estándar de Fmoc y resina de amida de Rink-MBHA tal como se ha indicado anteriormente para el lipopéptido 9. Para la unión de la fracción lípido al extremo N-terminal de la cadena peptídica, la resina (280 mg) se hinchó en CH₂Cl₂ (6 ml) durante 30 minutos. Se añadió una solución de Fmoc-Cys((RS)-2,3-di(palmitoiloxi)-propil)-OH (134 mg, 150 µmoles), PyBOP (78 mg, 150 µmoles), HOBT (20 mg, 150 µmoles) y DIEA (100 µl, 0,6 mmoles) en CH₂Cl₂/DMF 2:1 (4,5 ml). La mezcla se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró y se lavó con DMF (5x6 ml) y CH₂Cl₂ (5x6 ml). Para eliminar el grupo protector Fmoc, la resina se trató con piperidina al 20% (v/v) en DMF (5x4,5 ml durante 2 minutos). Tras la completa eliminación del grupo protector Fmoc, la resina se lavó con DMF (5x6 ml), CH₂Cl₂ (5x6 ml) y MeOH (5x6 ml) y se secó al vacío sobre pellets de KOH. Para el corte y eliminación de los grupos protectores de cadenas laterales, la resina se trató con TFA/tioanisol/EDT/H₂O/TIS 75:10:10:4:1 (10 ml) bajo agitación durante 2,5 horas. El lipopéptido se precipitó y se purificó tal como se ha indicado para el lipopéptido 9. Rendimiento: 45 mg. HPLC de fase inversa analítica (Interchrom columna C₄, 25% a 100% de

MeCN en H₂O (TFA al 0,1%) durante 25 minutos): pureza > 96%, t_R = 22,71 min. CL-EM (columna Zorbax C₈, 30% a 100% de MeCN en H₂O (+HCOOH al 0,1%) durante 10 minutos): t_R = 4,87 min.; EM-ESI m/z = 851,1 [M+8H]⁸⁺; 756,9 [M+9H]⁹⁺; 681,3 [M+10H]¹⁰⁺; 618,1 [M+11H]¹¹⁺. MALDI-TOF: m/z calculado para C₃₁₅H₅₅₇N₇₄O₉₀PS₂: 6796,4; m/z observado: 6798,2 [M+H]⁺.

5

Ejemplo 14: antígeno portador de un grupo γ-maleimidobutirilo, GMB-L21



La secuencia peptídica se obtuvo principalmente de la región de repetición NPNA de la proteína circunsporozoíto (CS) del parásito del paludismo *Plasmodium falciparum*, que ha sido extensamente investigado por su potencial como candidato para vacuna contra el paludismo [Herrington D.A. *et al.*, Nature 328:257-259, 1987]. Se añadió una D-alanina-amida adicional (indicada "a-NH₂") en el extremo C-terminal para mejorar la estabilidad. Se añadió el grupo γ-maleimidobutirilo (GMB) para permitir la conjugación con un residuo de cisteína en el lipopéptido 9 ó en el lipopéptido 10.

Se sintetizó el péptido lineal NPNANPNANPNANPNANPNAA-NH₂ (SEC ID n° 30 con una D-alanina-amida adicional añadida en el extremo C-terminal) en un sintetizador de péptidos ABI 433A de Applied Biosystems utilizando una reacción estándar de Fmoc y resina de amida de Rink-MBHA (carga: 0,69 mmoles/g, 362 mg) y HBTU/HOBt/DIEA para la activación. Los aminoácidos utilizados fueron Fmoc-Ala-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Fmoc-Asn(Mtt)-OH y Fmoc-Pro-OH. Tras completar el ensamblaje de la cadena y la eliminación del grupo protector Fmoc terminal, la resina se lavó con DMF (5x6 ml), DCM (5x6 ml) y MeOH (5x6 ml) y se secó al vacío sobre pellets de KOH. Se cortó el péptido y se eliminaron los grupos protectores de las cadenas laterales mediante tratamiento con TFA/TIS/H₂O 95:2,5:2,5 (10 ml) durante 4 horas. El péptido se precipitó con iPr₂O preenfriado a -20°C y se lavó con iPr₂O (3x25 ml). El precipitado se secó al vacío y se purificó el péptido mediante HPLC de fase inversa en una columna preparativa C18 (Zorbax) utilizando un gradiente de 10% a 30% de MeCN en H₂O (+TFA al 0,1%) durante 28 minutos. Rendimiento: 162 mg. HPLC de fase inversa analítica (Interchrom columna C₄, 5% a 30% de MeCN en H₂O (TFA al 0,1 %) durante 21 minutos): pureza > 95%, t_R = 8,77 min. CL-EM (columna Zorbax C₈, 5% a 100% de MeCN en H₂O (+HCOOH al 0,1%) durante 10 minutos): t_R = 3,61 min.; EM-ESI m/z = 691,6 [M+3H]³⁺. MALDI-TOF: m/z calculado para C₈₃H₁₂₇N₃₁O₃₂: 2071,1; m/z observado: 2069,9 [M+H]⁺.

Para unir el conector GMB al péptido, se añadió gota a gota una solución de éster de 4-maleimidobutiril-N-hidroxisuccinimida (N-succinimidil-4-maleimido-butirato, 14,0 mg, 49,2 μmoles, 6 equiv.) en THF (0,5 ml) a una solución bajo agitación de péptido (17,0 mg, 8,2 μmoles) en NH₄OAc 5 mM, pH 6,5 (0,5 ml). La mezcla se sometió a agitación durante 2 horas a 4°C, se liofilizó y el producto GMB-L21 se purificó mediante HPLC de fase inversa en una columna preparativa C18 (Zorbax) utilizando un gradiente de 10% a 40% de MeCN en H₂O (+TFA al 0,1%) durante 20 minutos. Rendimiento: 10,4 mg. HPLC de fase inversa analítica (Zorbax columna C₁₈, 5% a 30% de MeCN en H₂O (TFA al 0,1%) durante 25 minutos): pureza > 95%, t_R = 13,02 min. CL-EM (columna Zorbax C₁₈, 5% a 100% de MeCN en H₂O (+HCOOH al 0,1%) durante 10 minutos): t_R = 3,15 min.; EM-ESI m/z = 746,5 [M+3H]³⁺.

40

Ejemplo 15: antígeno portador de un grupo 3-maleimido-propionilo y un grupo espaciador polietilenglicol, PEO8-L21



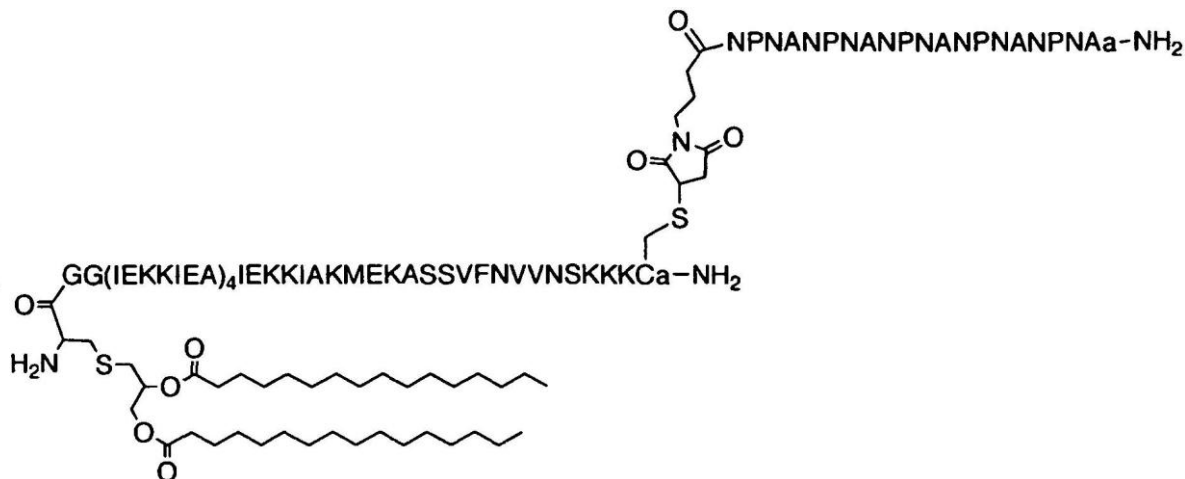
Se unió el mismo antígeno que en el Ejemplo 14 basado en la región de repetición NPNA de la proteína CS a un grupo 3-maleimido-propionilo y un grupo espaciador basado en un polietilenglicol [O-(2-aminoetil)-O'-(2-carboxietil)heptaetilenglicol]. El grupo maleimido permite la conjugación con un residuo cisteína en los bloques constructivos de lipopéptido.

Se sintetizó el mismo péptido lineal que en el Ejemplo 14 tal como se ha indicado anteriormente. Para unir el conector maleimido, se añadió una solución del péptido (10,0 mg, 4,8 μmoles) en NH₄OAc 5 mM, pH 6,5 (0,5 ml) a O-[N-(3-maleimidopropionil)-2-aminoetil]-O'-[3-(N-succinimidiloxi)-3-oxopropil]-heptaetilenglicol (5,0 mg, 7,2 μmoles, 1,5 equiv.) en THF (0,5 ml). Rendimiento: 7,2 mg. HPLC de fase inversa analítica (Interchrom columna C₄, 5% a 30% de MeCN en H₂O (TFA al 0,1%) durante 21 minutos): pureza > 98%, t_R = 14,27 min. CL-EM (columna Zorbax C₁₈, 5% a 100% de MeCN en H₂O (+HCOOH al 0,1%) durante 10 minutos): t_R = 4,31 min.; EM-ESI m/z = 882,9 [M+3H]³⁺.

55

con un diámetro de aproximadamente 24 nm, que son estables bajo condiciones fisiológicas. Las partículas también eran estables a temperaturas más altas (por ejemplo 37°C).

Ejemplo 18: conjugado LBB10-GMB-L21



El presente ejemplo ilustra cómo puede unirse un péptido u otro mimético de epítipo al bloque constructivo de lipopéptido (LBB) 10. A modo de péptido (mimético de epítipo) se utilizó la molécula GMB-L21, que se unió al residuo Cys en el lipopéptido 10.

La unión y purificación se llevaron a cabo tal como se ha indicado anteriormente para LBB9-GMB-L21 utilizando el lipopéptido 10 (6,8 mg, 1,0 μ mol) y GMB-L21 (2,7 mg, 1,2 μ moles, 1,2 equiv.). Rendimiento: 7,4 mg. HPLC de fase inversa analítica (Interchrom columna C₄, 25% a 100% de MeCN en H₂O (TFA al 0,1%) durante 25 minutos): pureza > 97%, t_R = 19,64 min. CL-EM (columna Zorbax C₈, 5% a 100% de MeCN en H₂O (+HCOOH al 0,1%) durante 10 minutos): t_R =4,81 minutos; EM-ESI m/z = 1130,9 [M+8H]⁸⁺; 1005,7 [M+9H]⁹⁺; 905,3 [M+10H]¹⁰⁺; 822,7 [M+11H]¹¹⁺; 754,4 [M+12H]¹²⁺. MALDI-TOF: m/z calculado para C₄₀₃H₆₈₆N₁₀₆O₁₂₀S₃: 9032,6; m/z observado: 9032,2 [M+H]⁺.

Se analizaron las propiedades de autoensamblaje de dicho conjugado de lipopéptido mediante dispersión lumínica dinámica (DLS), que mostró que las SVLP se formaban nuevamente en solución acuosa tamponada. La distribución de tamaños de partícula era monomodal y altamente monodispersa, lo que sugiere partículas altamente ordenadas con un diámetro de aproximadamente 20 nm, que son estables bajo condiciones fisiológicas. Las partículas también eran estables a temperaturas más altas (por ejemplo 37°C).

Ejemplo 19: inmunizaciones con LBB9-GMB-L21, LBB9-PE08-L21 y LBB10-GMB-L21

El presente ejemplo demuestra que los conjugados indicados anteriormente son altamente inmunogénicos al inyectarlos en animales, e inducen fuertes respuestas inmunológicas humores. Las inmunizaciones se llevaron a cabo tal como se ha indicado en el Ejemplo 11.

De esta manera, tal como anteriormente, se inmunizaron s.c. conejos New Zealand White (grupos de dos) con 150 μ g de lipopéptido (LBB9-PE08-L21 ó LBB10-GMB-L21) formulados en PBS, pH 7,4 (400 μ l). Las inmunizaciones se llevaron a cabo los días 0, 28 y 56. Se llevaron a cabo extracciones de sangre los días 0, 14, 38 y 66. Los sueros se analizaron mediante ELISA para las respuestas de IgG. La Tabla 3 resume los títulos de punto de valoración alcanzados. No se utilizaron adyuvantes en estas inmunizaciones.

Además, se ha demostrado mediante ensayos de inmunofluorescencia que los sueros de los animales inmunizados contienen un título elevado (>10.000) de anticuerpos que se unen a la proteína CS en esporozoítos de *Plasmodium falciparum*, mostrando de esta manera que una parte importante de la respuesta inmunológica frente a estos constructos se dirige al péptido antigénico que contiene los motivos de repetición NPNA.

Tabla 3. Inmunogenicidad de los conjugados.

Se muestran los títulos $\log_{10}$ (punto de valoración) alcanzados tras una (1°), dos (2°) y tres (3°) inmunizaciones con cada conjugado, cada una en dos conejos (a y b). Las muestras de suero preinmune no mostraron reactividad significativa frente al inmunógeno correspondiente. Por ejemplo, un título $\log_{10}$ (punto de valoración) de 5,00 corresponde a un título de 100.000.

5

Conjugado utilizado ^{a)}	Conejo	log10 (títulos de punto de valoración) ^{b)}		
		1°	2°	3°
LBB9-PEO8-L21	1a	3,13	3,82	4,82
LBB9-PEO8-L21	1b	4,44	5,11	5,05
LBB10-GMB-L21	3a	1,70	4,55	4,88
LBB10-GMB-L21	3b	3,59	3,76	4,39

^{a)} no se utilizaron adyuvantes

^{b)} Los títulos de punto de valoración de las inmunizaciones primaria (1°), primer refuerzo (2°) y segundo refuerzo (3°) se definen como la última dilución recíproca para la que la absorbancia de UV era superior a dos veces el valor correspondiente al suero preinmune.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Zürich

5 <120> Haces de hélices superenrolladas de lipopéptido y partículas pseudovíricas sintéticas

<130> P

<150> EP06025497

10 <151> 2006-12-09

<160> 30

<170> PatentIn versión 3.4

15 <210> 1

<211> 52

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> derivado de la glucoproteína F del VSR

<400> 1

25

Gly Gly Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys

1 5 10 15

Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser

20 25 30

Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr

35 40 45

Ile Asp Lys Gln

50

<210> 2

<211> 53

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> repeticiones héptadas y proteína derivada de gp41 del VIH-1 JR-FL

35 <400> 2

Ser Gly Ile Lys Lys Glu Ile Glu Ala Ile Lys Lys Glu Gln Glu Ala
1 5 10 15

Ile Lys Lys Lys Ile Glu Ala Ile Glu Arg Met Leu Gln Leu Thr Val
20 25 30

Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr
35 40 45

Leu Gly Asp Cys Gly
50

<210> 3
<211> 44
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélice superenrollada de diseño *de novo*

<400> 3

Gly Gly Ile Glu Lys Lys Ile Glu Ala Ile Glu Lys Lys Ile Glu Ala
1 5 10 15

Ile Glu Lys Lys Ile Glu Ala Ile Glu Lys Lys Ile Glu Ala Ile Glu
20 25 30

Lys Lys Ile Glu Ala Ile Glu Lys Lys Ile Glu Cys
35 40

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> derivada del bucle V3 de la glucoproteína gp120 del VIH-1

<400> 4

Asn Cys Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr
1 5 10 15

Thr Gly Cys Gly
20

<210> 5
<211> 52
<212> PRT
<213> virus Influenza

<400> 5

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

Val Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe
20 25 30

Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp
35 40 45

Thr Lys Cys Gly
50

<210> 6
<211> 46
<212> PRT
<213> virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 6
Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Arg Ala Ile Glu Ala
1 5 10 15

Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln
20 25 30

Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Gly Asp Cys Gly
35 40 45

<210> 7
<211> 56
<212> PRT
<213> virus de la inmunodeficiencia bovina

<400> 7

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

Asp Gln Phe Thr His Leu Phe Arg Asn Ile Asn Asn Arg Leu Asn Val
20 25 30

Leu His His Arg Val Ser Tyr Leu Glu Tyr Val Glu Glu Ile Arg Gln
35 40 45
Lys Gln Val Phe Phe Gly Cys Gly
50 55

<210> 8
<211> 56
<212> PRT
<213> virus de la inmunodeficiencia felina

<400> 8

Gly Gly Ala Thr His Gln Glu Thr Ile Glu Lys Val Thr Glu Ala Leu
1 5 10 15

Lys Ile Asn Asn Leu Arg Leu Val Thr Leu Glu His Gln Val Leu Val
20 25 30

Ile Gly Leu Lys Val Glu Ala Met Glu Lys Phe Leu Tyr Thr Ala Phe
35 40 45

Ala Met Gln Glu Leu Gly Cys Gly
50 55

<210> 9

<211> 56

5 <212> PRT

<213> virus de la anemia infecciosa equina

<400> 9

Gly Gly Asn His Thr Phe Glu Val Glu Asn Ser Thr Leu Asn Gly Met
1 5 10 15

Asp Leu Ile Glu Arg Gln Ile Lys Ile Leu Tyr Ala Met Ile Leu Gln
20 25 30

Thr His Ala Arg Val Gln Leu Leu Lys Glu Arg Gln Gln Val Glu Glu
35 40 45

Thr Phe Asn Leu Ile Gly Cys Gly
50 55

10

<210> 10

<211> 58

<212> PRT

15 <213> virus de la inmunodeficiencia del simio

<400> 10

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

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

Thr Val Trp Gly Thr Lys Asn Leu Gln Thr Arg Val Thr Ala Ile Glu
35 40 45

Lys Tyr Leu Lys Asp Gln Ala Gly Cys Gly
50 55

20

<210> 11

<211> 52

<212> PRT

<213> virus de la encefalitis-artritis caprina

<400> 114

Gly Gly Ser Tyr Thr Lys Ala Ala Val Gln Thr Leu Ala Asn Ala Thr
1 5 10 15

Ala Ala Gln Gln Asp Val Leu Glu Ala Thr Tyr Ala Met Val Gln His
20 25 30

Val Ala Lys Gly Val Arg Ile Leu Glu Ala Arg Val Ala Arg Val Glu
35 40 45

Ala Gly Cys Gly
50

5

<210> 12

<211> 55

<212> PRT

10 <213> virus Visna

<400> 12

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

Ala Thr Tyr Ala Met Val Gln His Val Ala Lys Gly Ile Arg Ile Leu
20 25 30

15

Glu Ala Arg Val Ala Arg Val Glu Ala Ile Ile Asp Arg Met Met Val
35 40 45

Tyr Gln Glu Leu Asp Cys Gly
50 55

<210> 13

<211> 54

<212> PRT

<213> virus parainfluenza tipo 3 humano

<400> 13

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

Ala Ile Arg Asp Thr Asn Lys Ala Val Gln Ser Val Gln Ser Ser Ile
20 25 30

Gly Asn Leu Ile Val Ala Ile Lys Ser Val Gln Asp Tyr Val Asn Lys
35 40 45

Glu Ile Val Gly Cys Gly
50

20

<210> 14
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> virus parainfluenza tipo 1 humano

5

<400> 14

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

Ser Ile Ile Lys Thr His Asn Ser Val Glu Leu Ile Gln Arg Gly Ile
 20 25 30

Gly Glu Gln Ile Ile Ala Leu Lys Thr Leu Gln Asp Phe Val Asn Asn
 35 40 45

Glu Ile Arg Gly Cys Gly
 50

10

<210> 15
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> virus parainfluenza tipo 2 humano

15

<400> 15

Gly Gly Lys Ala Asn Ala Asn Ala Ala Ile Asn Asn Leu Ala Ser
 1 5 10 15

Ser Ile Gln Ser Thr Asn Lys Ala Val Ser Asp Val Ile Thr Ala Ser
 20 25 30

Arg Thr Ile Ala Thr Ala Val Gln Ala Ile Gln Asp His Ile Asn Gly
 35 40 45

Ala Ile Val Asn Gly Cys Gly
 50 55

20

<210> 16
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> virus parainfluenza tipo 4a humano

25

<400> 16

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

Ala Ala Thr Glu Thr Asn Glu Ala Val Arg Asp Leu Ala Asn Ser Asn
 20 25 30

Lys Ile Val Val Lys Met Ile Ser Ala Ile Gln Asn Gln Ile Asn Thr
 35 40 45

Ile Ile Gln Gly Cys Gly
 50

<210> 17
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> virus parainfluenza tipo 4b humano

5

<400> 17

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

Ala Ala Lys Glu Thr Asn Asp Ala Val Arg Asp Leu Thr Lys Ser Asn
 20 25 30

Lys Ile Val Ala Arg Met Ile Ser Ala Ile Gln Asn Gln Ile Asn Thr
 35 40 45

Ile Ile Gln Gly Cys Gly
 50

10

<210> 18
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> virus del sarampión

15

<400> 18

Gly Gly Ser Met Leu Asn Ser Gln Ala Ile Asp Asn Leu Arg Ala Ser
 1 5 10 15

Leu Glu Thr Thr Asn Gln Ala Ile Glu Ala Ile Arg Gln Ser Gly Gln
 20 25 30

Glu Met Ile Leu Ala Val Gln Gly Val Gln Asp Tyr Ile Asn Asn Glu
 35 40 45

Leu Ile Gly Cys Gly
 50

20

<210> 19
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> virus de la parotiditis

25

<400> 19

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

Ile Gln Ala Thr Asn Arg Ala Val Phe Glu Val Lys Glu Gly Thr Gln
20 25 30

Gln Leu Ala Ile Ala Val Gln Ala Ile Gln Asp His Ile Asn Thr Ile
35 40 45

Met Asn Thr Gln Leu Asn Asn Met Ser Cys Gly
50 55

<210> 20

<211> 55

<212> PRT

<213> virus sincitial respiratorio bovino

<400> 20

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

Ile Lys Asn Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser
20 25 30

Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr
35 40 45

Ile Asp Lys Glu Gly Cys Gly
50 55

<210> 21

<211> 48

<212> PRT

<213> virus ébola

<400> 21

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

Thr Thr Glu Leu Arg Thr Phe Ser Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp
20 25 30

Phe Leu Leu Gln Arg Trp Gly Gly Thr Cys His Ile Leu Gly Cys Gly
35 40 45

<210> 22

<211> 48

<212> PRT

<213> virus Marburg

<400> 22

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

Thr Thr Glu Glu Arg Thr Phe Ser Leu Ile Asn Arg His Ala Ile Asp
20 25 30

Phe Leu Leu Thr Arg Trp Gly Gly Thr Cys Lys Val Leu Gly Cys Gly
35 40 45

<210> 23
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> virus del sarcoma de Rous

5 <400> 23
 Gly Gly Ala Asn Leu Thr Thr Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Asp Asp
 1 5 10 15
 Val Thr Ser Ile Arg His Ala Val Leu Gln Asn Arg Ala Ala Ile Asp
 20 25 30
 Phe Leu Leu Leu Ala His Gly His Gly Cys Gly
 35 40

10 <210> 24
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> *Staphylothermus marinus*

15 <400> 24
 Gly Ser Ile Ile Asn Glu Thr Ala Asp Asp Ile Val Tyr Arg Leu Thr
 1 5 10 15
 Val Ile Ile Asp Asp Arg Tyr Glu Ser Leu Lys Asn Leu Ile Thr Leu
 20 25 30
 Arg Ala Asp Arg Leu Glu Met Ile Ile Asn Asp Asn Val Ser Thr Ile
 35 40 45
 Leu Ala Ser Ile Gly Cys Gly
 50 55

<210> 25
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> coronavirus SARS

<400> 25
 Gly Gly Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Gln Ile Ala Asn Gln Phe
 1 5 10 15
 Asn Lys Ala Ile Ser Gln Ile Gln Glu Ser Leu Thr Thr Thr Ser Thr
 20 25 30
 Ala Leu Gly Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu
 35 40 45
 Asn Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Cys Gly
 50 55 60

20 <210> 26
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> *Mycoplasma pneumoniae*

<400> 26

Gly Gly Thr Lys Thr Glu Phe Lys Glu Phe Gln Thr Val Val Met Glu
1 5 10 15

Ser Phe Ala Val Gln Asn Gln Asn Ile Asp Ala Gln Gly Glu Gln Ile
20 25 30

Lys Glu Leu Gln Val Glu Gln Lys Ala Gln Gly Lys Thr Leu Gln Leu
35 40 45

Ile Leu Glu Ala Leu Gln Gly Ile Asn Lys Arg Leu Asp Asn Leu Glu
50 55 60

Ser Cys Gly
65

5

<210> 27
<211> 38
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> hélice superenrollada heptamérica

<400> 27

15

Gly Gly Lys Val Lys Gln Leu Ala Asp Ala Val Glu Glu Leu Ala Ser
1 5 10 15
Ala Asn Tyr His Leu Ala Asn Ala Val Ala Arg Leu Ala Lys Ala Val
20 25 30

Gly Glu Arg Gly Cys Gly
35

<210> 28
<211> 54
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hélice superenrollada trimérica

<400> 28

Gly Gly Ile Glu Lys Lys Ile Glu Ala Ile Glu Lys Lys Ile Glu Ala
1 5 10 15

Ile Glu Lys Lys Ile Glu Ala Ile Glu Lys Lys Ile Glu Ala Ile Glu
20 25 30

Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Val
35 40 45

Asn Ser Lys Lys Lys Cys
50

<210> 29
<211> 46
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hélice superenrollada tetramérica

<400> 29

Lys Leu Lys Gln Ile Glu Asp Lys Leu Glu Glu Ile Leu Ser Lys Leu
1 5 10 15

Tyr His Ile Glu Asn Glu Leu Ala Lys Ile Glu Lys Lys Leu Ala Lys
20 25 30

Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Val Lys Lys Cys
35 40 45

<210> 30

5 <211> 20

<212> PRT

<213> *Plasmodium falciparum*

<400> 30

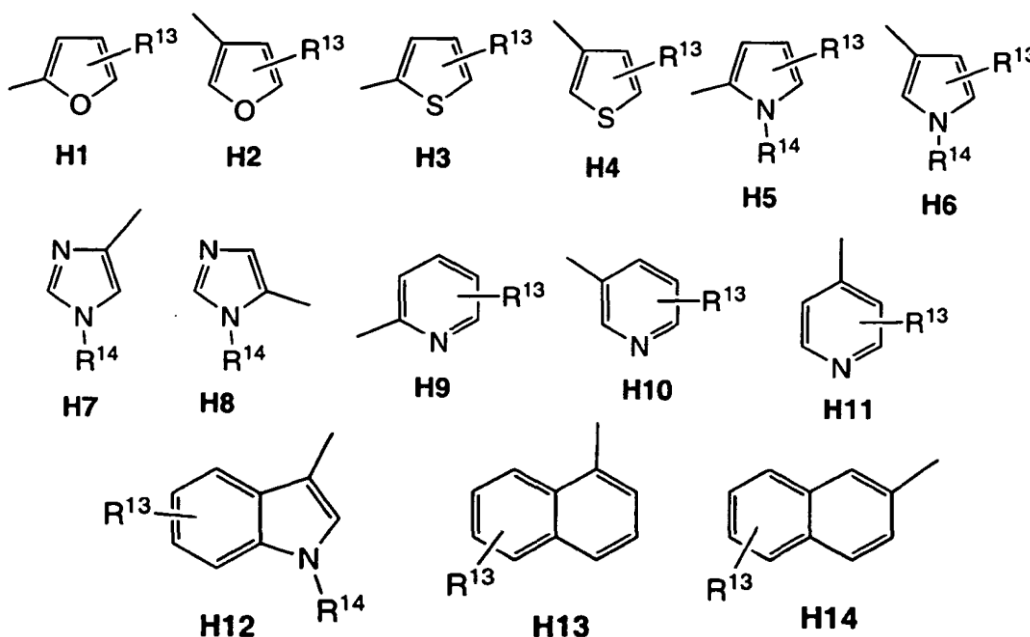
Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
1 5 10 15

Asn Pro Asn Ala
20

10

REIVINDICACIONES

1. Bloque constructivo de lipopéptido que consiste de una cadena peptídica de entre 21 y 80 residuos aminoácidos, que comprende un dominio superenrollado unido covalentemente a una fracción lípido que comprende dos o tres cadenas hidrocarbilo largas y opcionalmente unido a un antígeno.
2. Bloque constructivo de lipopéptido según la reivindicación 1, en el que la cadena peptídica comprende un dominio superenrollado que consiste de tres a ocho motivos héptadas.
3. Bloque constructivo de lipopéptido según la reivindicación 1, en el que la cadena peptídica comprende un dominio superenrollado que forma dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros o heptámeros.
4. Bloque constructivo de lipopéptido según la reivindicación 2, en el que, en el dominio superenrollado las posiciones a y d en cada motivo héptada (abcdefg) comprenden α -aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas de tamaño pequeño a intermedio y/o cadenas laterales aromáticas o heteroaromáticas; en cero, una o dos de todas las posiciones a y d, un aminoácido con un residuo no cargado polar y en cero o una de todas las posiciones a y d un aminoácido con un residuo catiónico polar o un derivado acilado del mismo, o con un residuo aniónico polar, o glicina.
5. Bloque constructivo de lipopéptido según la reivindicación 4, en el que la cadena lateral hidrofóbica de tamaño pequeño a intermedio es R^1 , en la que R^1 es alquilo inferior, alquenilo inferior, $-(CH_2)_a(CHR^2)_bOR^3$, $-(CH_2)_a(CHR^2)_bSR^3$, $-(CHR^2)OR^3$, $-(CH_2)_aSR^3$, $-(CH_2)_aR^4$ o $-CH(CF_3)_2$; en el que R^2 es alquilo inferior, R^3 es alquilo inferior, R^4 es ciclohexilo, ciclopentilo o ciclobutilo, a es 1 a 4, y b es 0 ó 1, la cadena lateral aromática o heteroaromática es R^5 , en la que R^5 es $-(CH_2)_aR^6$, $-(CH_2)_cO(CH_2)_dR^6$, $-(CH_2)_cS(CH_2)_dR^6$, o $-(CH_2)_cNR^7(CH_2)_dR^6$; en las que R^7 es H, alquilo inferior, arilo o aril-alquilo inferior, R^6 es fenilo opcionalmente sustituido de fórmula $-C_6R^8R^9R^{10}R^{11}R^{12}$ o un grupo arilo o heteroarilo de una de las fórmulas H1 a H14,



en la que cada uno de R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} y R^{12} es, independientemente, H, F, Br, Cl, I, NO_2 , CF_3 , NR^7R^{14} , N^7COR^{14} , alquilo inferior, arilo o OR^7 ; R^{13} es H, Cl, Br, I, NO_2 , alquilo inferior o arilo; R^{14} es H, alquilo inferior o arilo; a es 1 a 4; c es 1 ó 2; y d es 0 a 4; el residuo no cargado polar es R^{15} , en el que R^{15} es $-(CH_2)_d(CHR^{16})_bOR^{17}$, $-(CH_2)_d(CHR^{16})_bSR^{17}$, $-(CH_2)_aCONR^{17}R^{18}$ o $-(CH_2)_aCOOR^{19}$; en el que R^{16} es alquilo inferior, arilo, arilo-alquilo inferior, $-(CH_2)_aOR^{17}$, $-(CH_2)_aNR^{17}R^{18}$, $-(CH_2)_aNR^{17}R^{18}$ o $-(CH_2)_aCOOR^{19}$; R^{17} y R^{18} son, independientemente, H, alquilo inferior, arilo, o arilo-alquilo inferior, o R^{17} y R^{18} conjuntamente son $-(CH_2)_e$, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ o $-(CH_2)_2-NR^{17}-(CH_2)_2-$; R^{19} es alquilo inferior, arilo, arilo-alquilo inferior; y en el que a, b y d presentan los significados definidos anteriormente y e es 2 a 6; el residuo catiónico polar o un derivado acilado del mismo es R^{20} , en el que R^{20} es $-(CH_2)_aNR^{17}R^{18}$, $-(CH_2)_aNR^{17}R^{18}$, $-(CH_2)_aNR^{17}R^{18}$, $-(CH_2)_aNR^{17}R^{18}$, $-(CH_2)_aNR^{17}R^{18}$ o $-(CH_2)_aNR^{17}R^{18}$; en el que R^{21} es H o alquilo inferior y R^{22} es H o alquilo inferior; y R^{17} , R^{18} y R^{19} presentan los mismos significados que los definidos anteriormente y a es 1 a 4; y el residuo aniónico polar es R^{23} , en el que R^{23} es $-(CH_2)_aCOOH$, en el que a es 1 a 4.

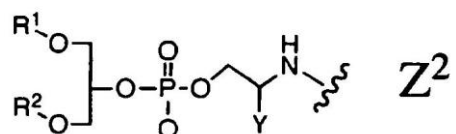
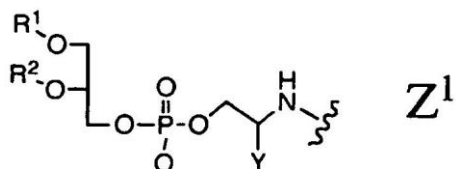
6. Bloque constructivo de lipopéptido según la reivindicación 4, en el que: los α -aminoácidos con cadena lateral hidrofóbica de tamaño pequeño a intermedio son la alanina, la isoleucina, la leucina, la metionina y la valina, los α -aminoácidos con cadena lateral aromática o heteroaromática son la fenilalanina, la tirosina, el triptófano y la histidina, los α -aminoácidos con un residuo no cargado polar son la asparagina, la cisteína, la glutamina, la serina y la

treonina,

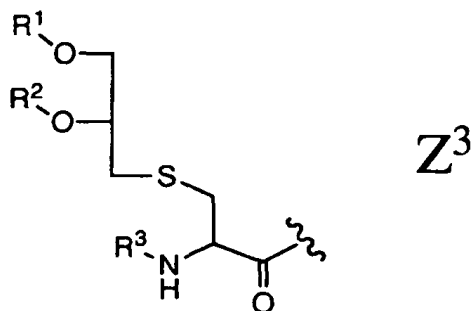
los α -aminoácidos con residuo catiónico polar son la arginina, la lisina y la histidina, y los α -aminoácidos con un residuo aniónico polar son el ácido aspártico y el ácido glutámico.

7. Bloque constructivo de lipopéptido según la reivindicación 1, en el que la cadena peptídica comprende un péptido de SEC ID nº 1 a nº 29.

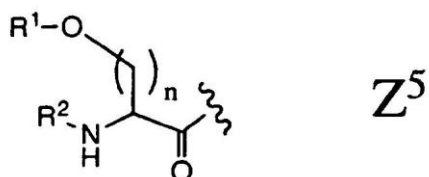
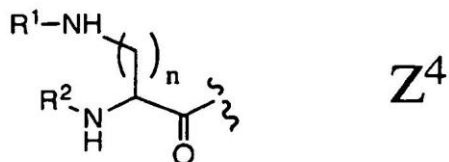
8. Bloque constructivo de lipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la fracción lípido es una de entre los tipos Z^1 a Z^8 ,



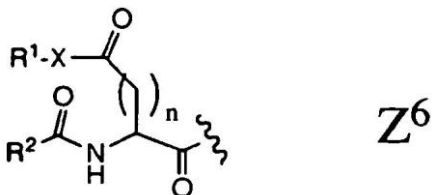
en el que R^1 y R^2 son hidrocarbilos largos o hidrocarbilo- $C=O$ largo e Y es H o $COOH$.



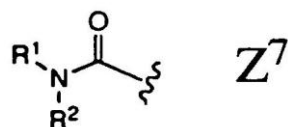
en el que R^1 , R^2 y R^3 son hidrocarbilos largos o R^1 y R^2 son hidrocarbilo- $C=O$ largo y R^3 es H o acetilo,



en el que R^1 y R^2 son hidrocarbilo- $C=O$ largo y n es 1, 2, 3 ó 4,

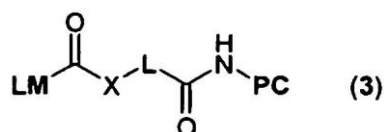
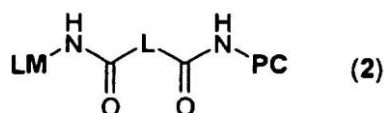


en el que R^1 y R^2 son hidrocarbilos largos, X es O o NH, y n es 1, 2, 3 ó 4, o

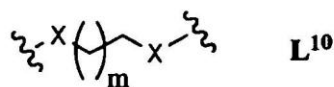
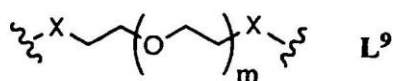
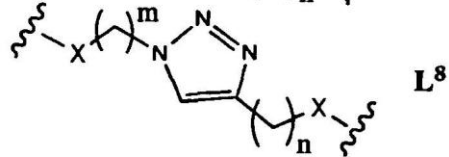
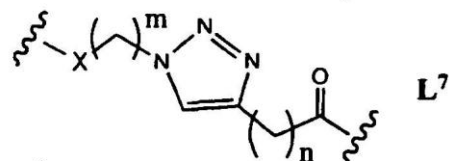
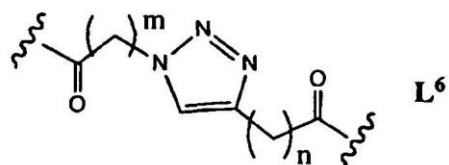
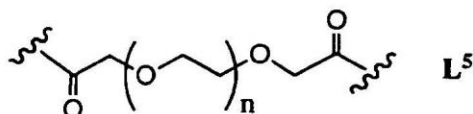
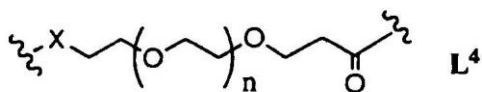
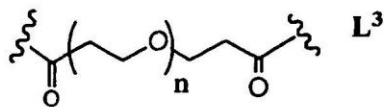
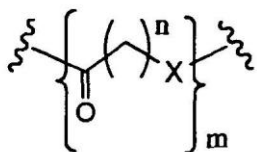
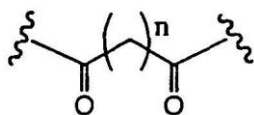


en el que R^1 y R^2 son hidrocarbilos largos, y en el que el hidrocarbilo largo es alquilo o alqueno lineal o ramificado que consiste de entre 8 y 25 átomos de carbono y opcionalmente uno, dos o tres dobles enlaces en la cadena.

- 5 9. Bloque constructivo de lipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la cadena peptídica CP se encuentra unida covalentemente a la fracción lípido FL en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal o en una posición próxima a cualquiera de los mismos.
- 10 10. Bloque constructivo de lipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la cadena peptídica CP se encuentra unida covalentemente a la fracción lípido FL en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal o mediante un conector tal como en la fórmula (2) o (3),



en el que L es un conector L^1 a L^{10} ,



en el que X es O o NH, m está comprendido entre 1 y 20 y n está comprendido entre 1 y 20.

- 15 11. Bloque constructivo de lipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que un antígeno seleccionado de entre un péptido, una proteína, un mimético de epítipo, un carbohidrato o un hapteno se une covalentemente en el otro extremo de la cadena peptídica o en una posición próxima al mismo.
- 20 12. Haces de lipopéptido helicoidal que comprenden dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete bloques constructivos de

- lipopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Partículas pseudovíricas sintéticas que consiste de haces de lipopéptido helicoidal según la reivindicación 12.
 14. Preparación farmacéutica que comprende un haz de lipopéptidos helicoidales y/o una partícula pseudovírica sintética según las reivindicaciones 12 y 13 portadores de antígenos.
 - 5 15. Preparación farmacéutica según la reivindicación 14, en la que el antígeno se deriva de la proteína circunsporozoíto (CS) del parásito del paludismo *Plasmodium falciparum*.
 16. Utilización de un haz de lipopéptidos helicoidales y/o una partícula pseudovírica sintética según la reivindicación 13 portador de antígenos a modo de vacuna.

Fig. 1

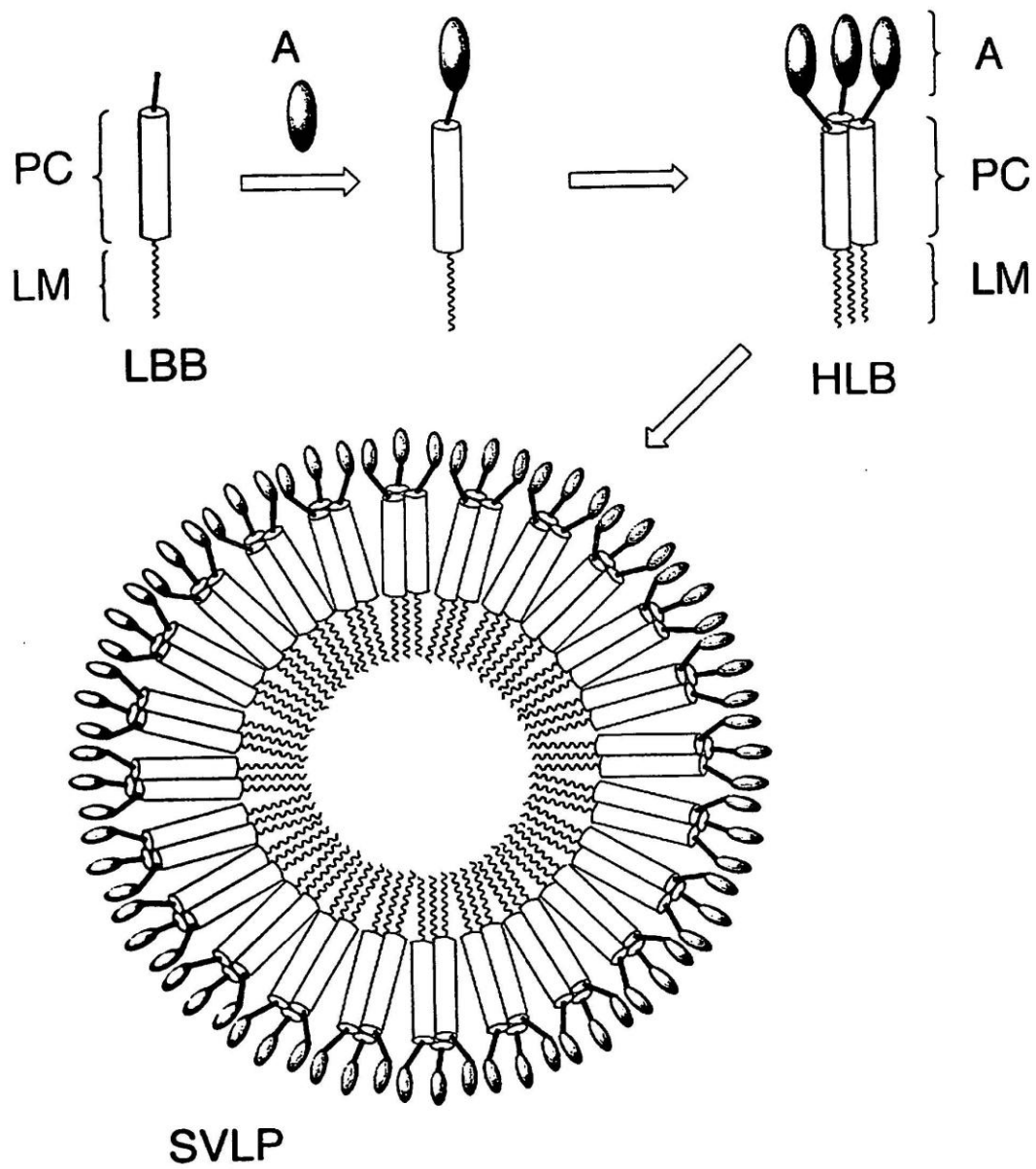


Fig. 2

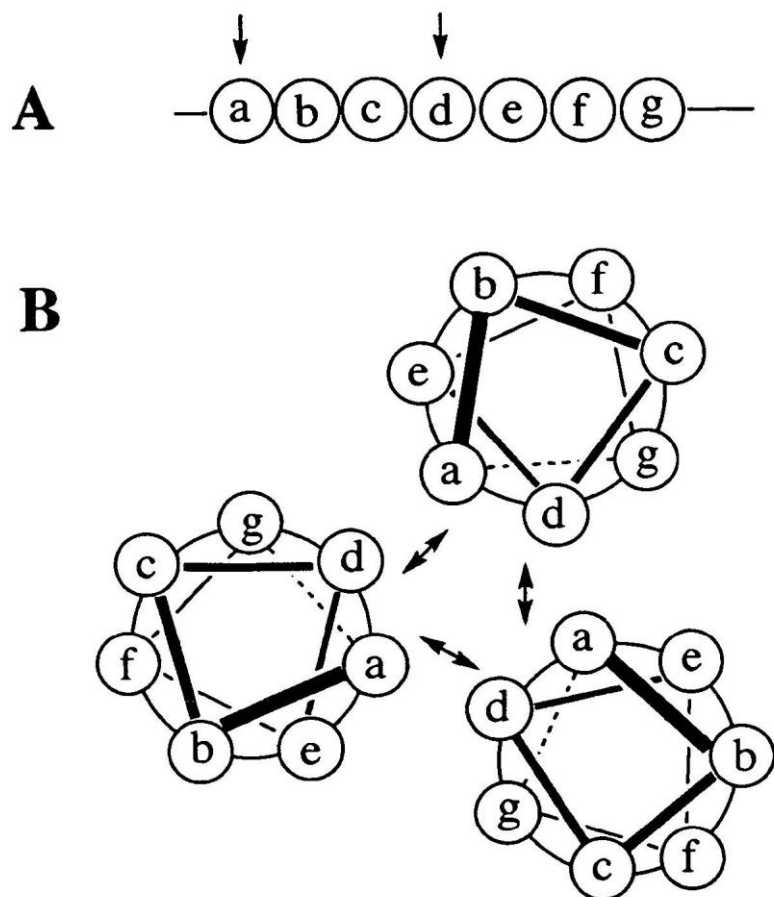


Fig. 3

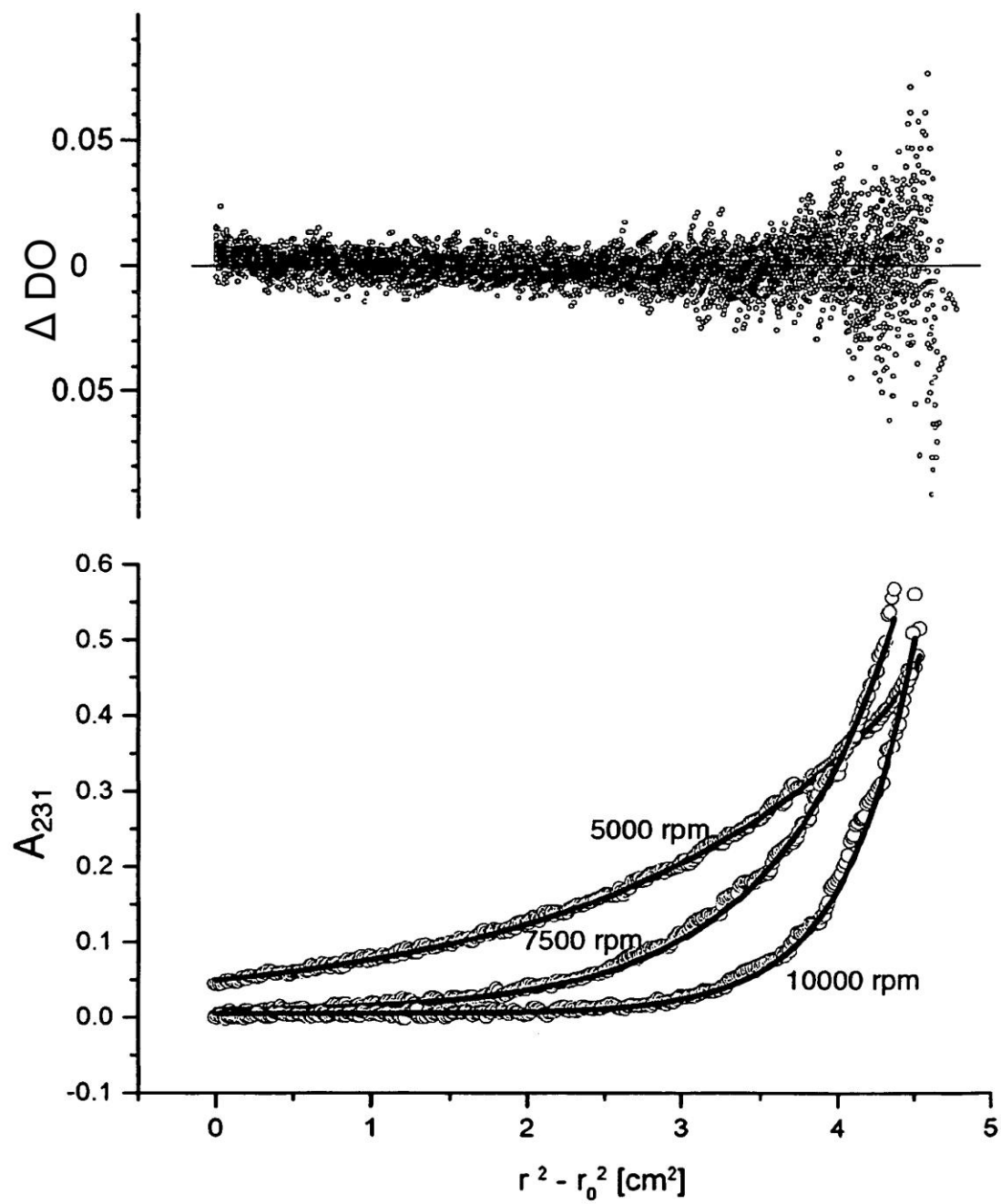


Fig. 4

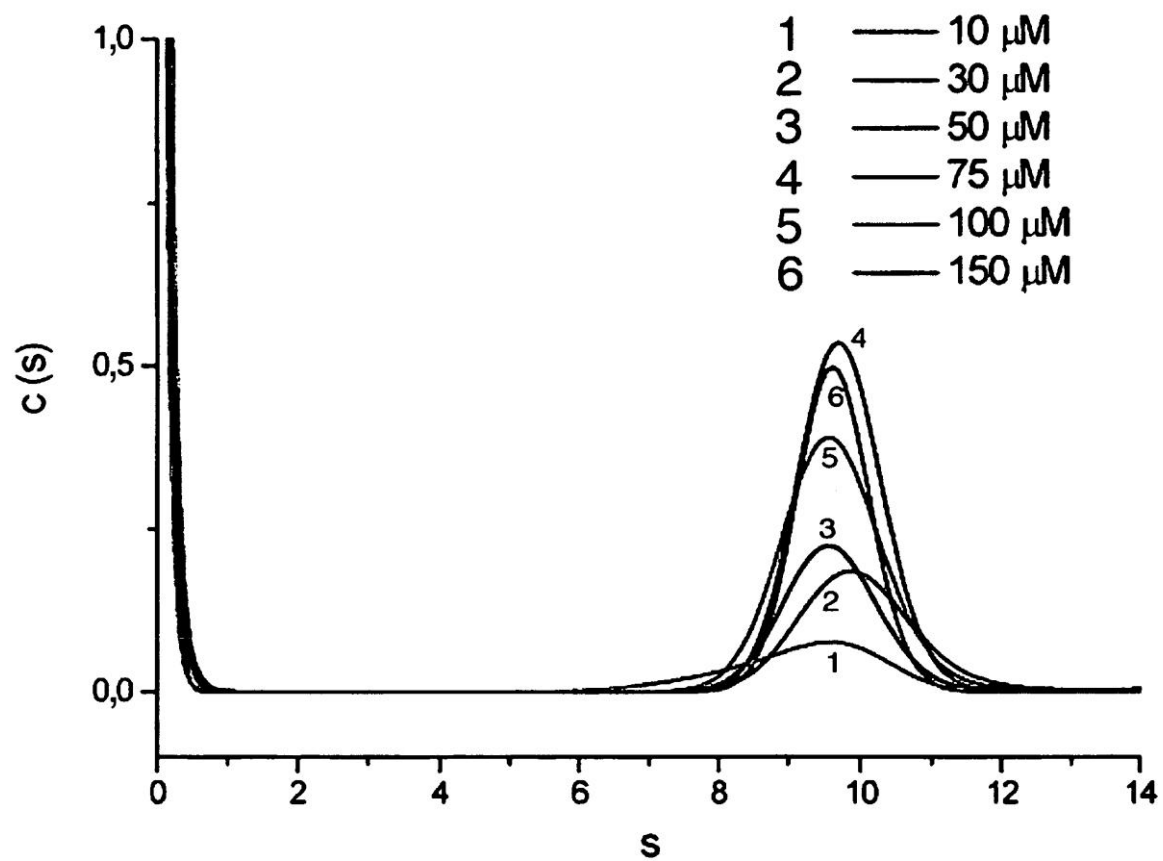


Fig. 5

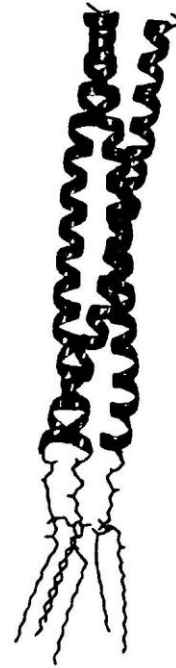
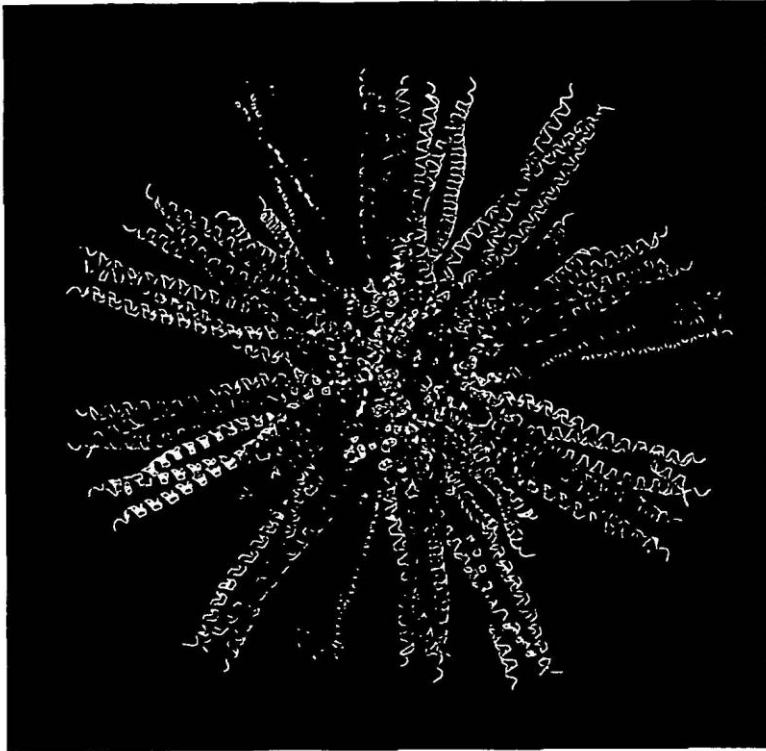


Fig. 6

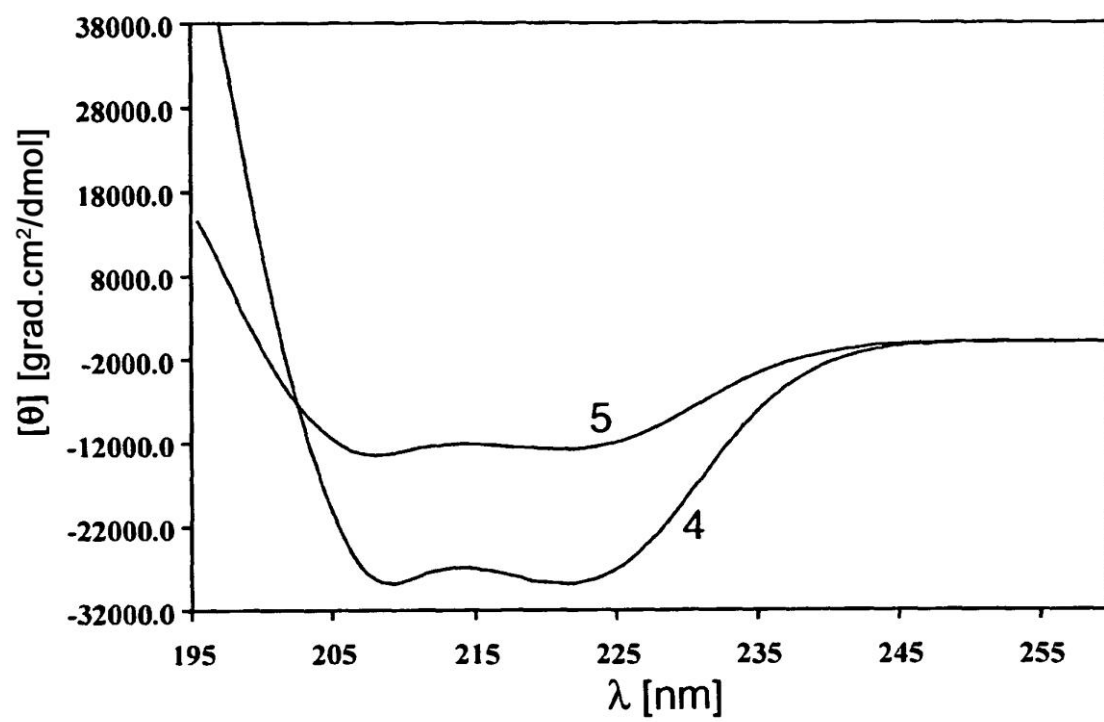


Fig. 7

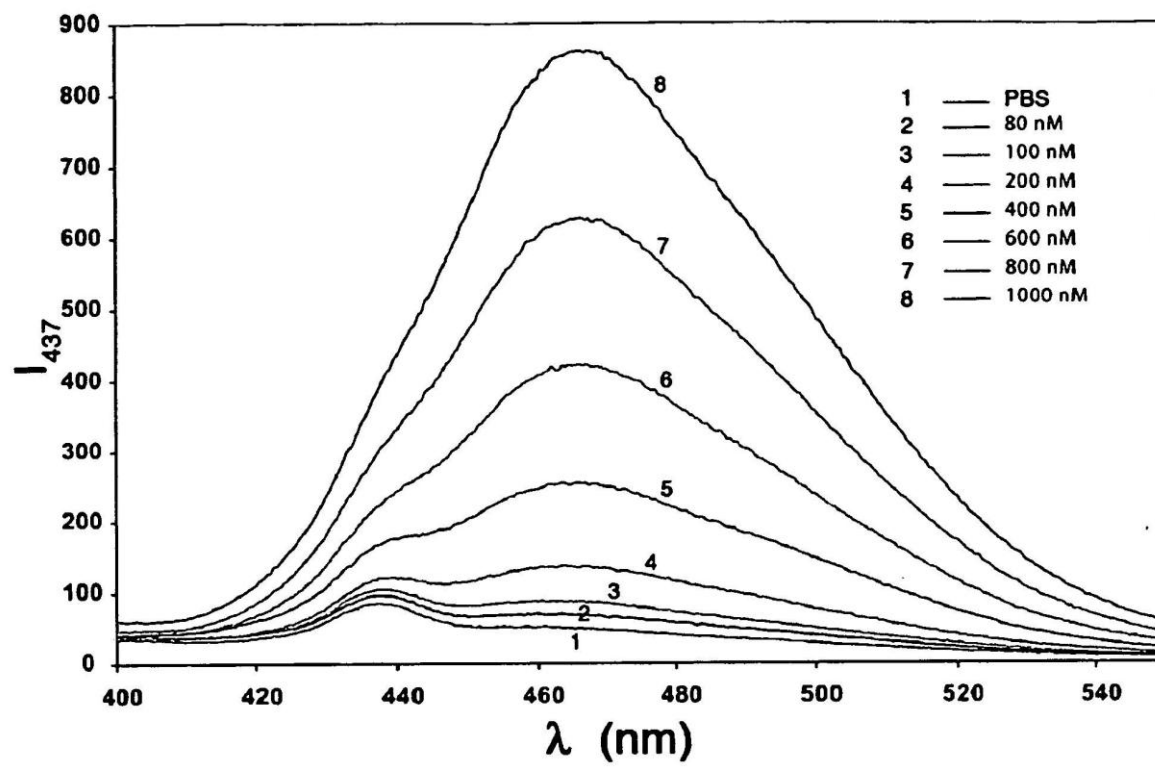


Fig. 8

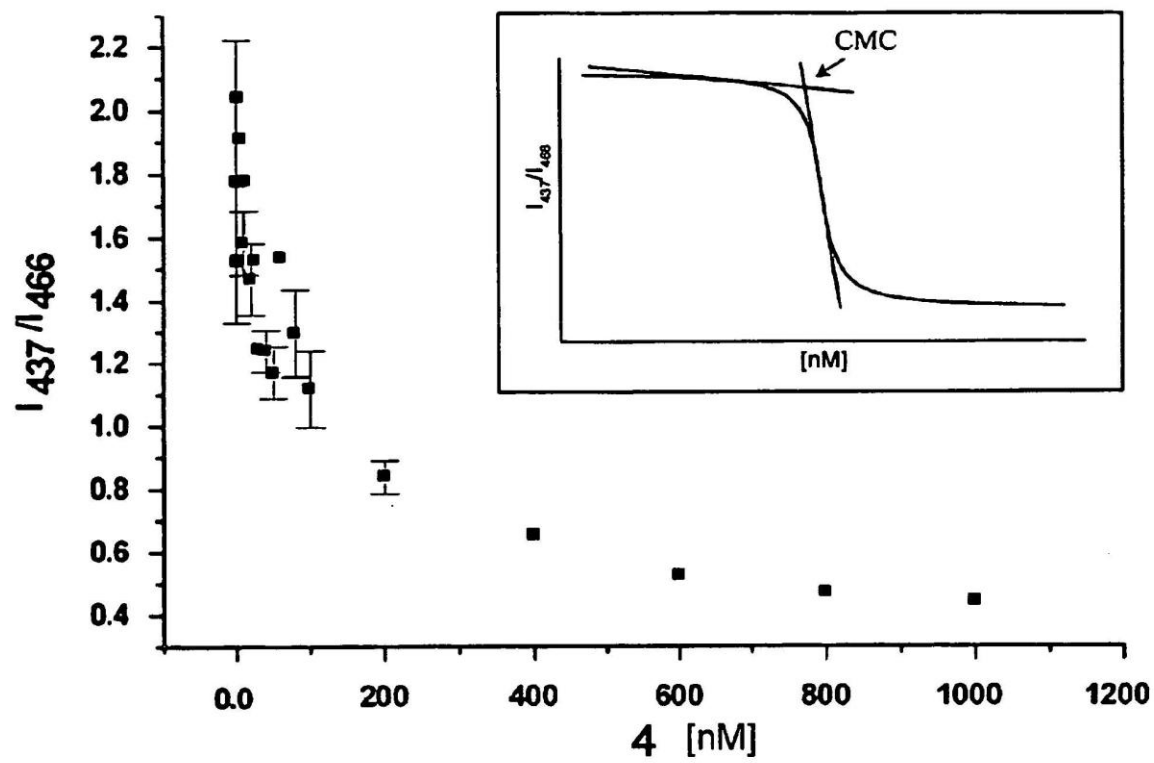


Fig. 9

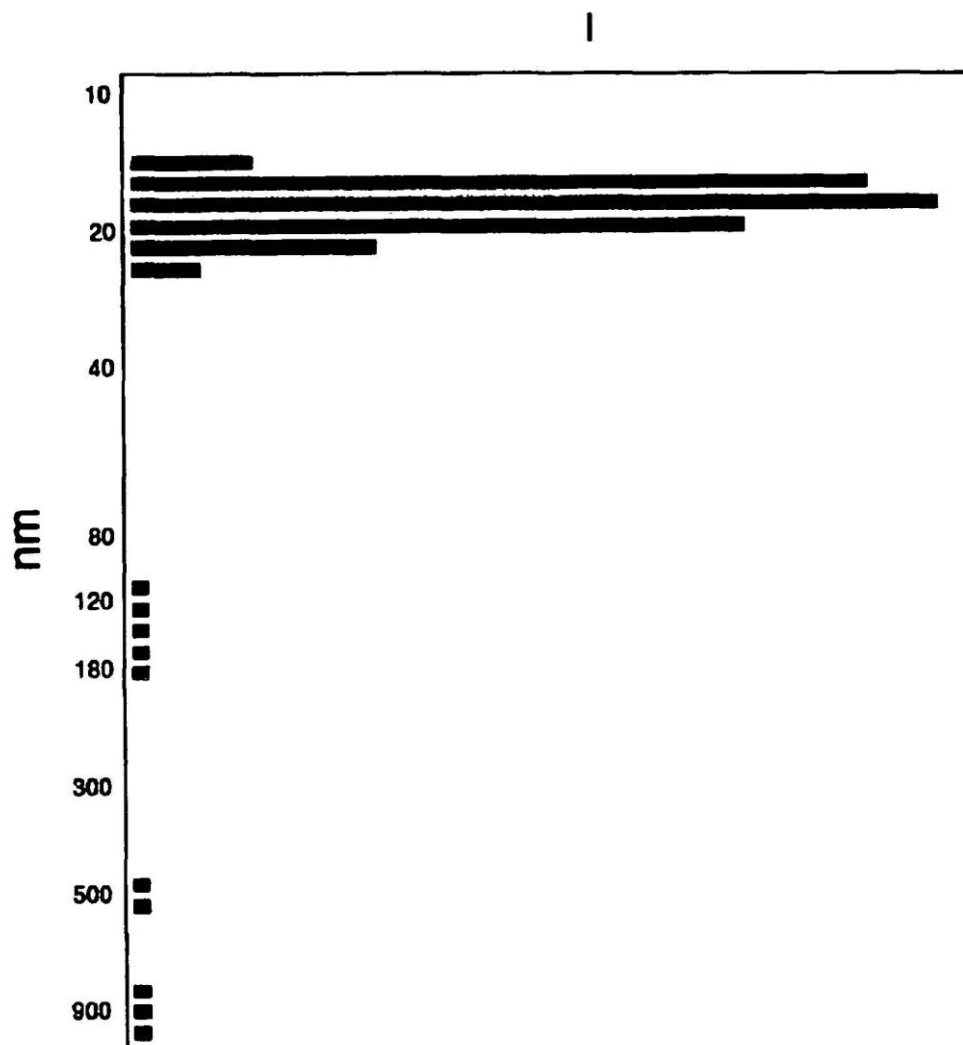


Fig. 10

