

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 220**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/385** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2005 E 05729595 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 1740207**

54 Título: **Vectores y construcciones para administración de antígenos**

30 Prioridad:

**13.04.2004 GB 0408164**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**14.03.2013**

73 Titular/es:

**IMMUNE TARGETING SYSTEMS (ITS) LIMITED  
(100.0%)**

**London Bioscience Innovation Centre, 2 Royal  
College Street  
London NW1 0NH , GB**

72 Inventor/es:

**BONNET, DOMINIQUE;  
BROWN, CARLTON, B.;  
GEORGES, BERTRAND y  
SIZER, PHILIP J.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 398 220 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

Vectores y construcciones para administración de antígenos

5 La presente invención se relaciona con nuevas construcciones para administración de antígenos y con su utilización en métodos de inmunización. En particular, la invención se relaciona con construcciones útiles en la inmunización frente al virus de la inmunodeficiencia humana.

10 **Antecedentes de la invención**

Los recientes avances en nuestra comprensión de las respuestas inmunológicas de mamíferos han conducido a la prevención de ciertas enfermedades en el hombre a través de la vacunación profiláctica y al control y tratamiento de enfermedades mediante el uso de inmunoterapéuticos. Los tipos de enfermedades que pueden ser abordadas por intervención inmunológica incluyen las causadas por agentes infecciosos, los cánceres, las alergias y las enfermedades autoinmunes. En estos casos, más generalmente, la premisa del tratamiento médico es la administración eficiente de antígenos a células de reconocimiento inmune apropiadas. Por ejemplo, la vacunación profiláctica ha erradicado con éxito la viruela a nivel mundial por administración de una cepa viva atenuada del virus que lleva todos los antígenos del virus de tipo salvaje. De forma similar, infecciones debidas a la bacteria *Haemophilus influenzae* serotipo b se han visto significativamente reducidas en los países occidentales después del desarrollo de una vacuna basada en el antígeno polisacárido de la pared celular bacteriana. Más aún, algunos cánceres, tales como el melanoma humano, responden a inmunoterapia utilizando células dendríticas (CD) autólogas como adyuvante celular y péptidos definidos derivados de la proteína melanosómica gp100 como fuente de antígeno específico de tumores para generar una respuesta inmune mediada por células.

25 Se puede restaurar la autotolerancia a autoantígenos en el tratamiento de la encefalomielitis autoinmune experimental por inyección de un neuroantígeno específico que constituye el blanco de la respuesta inmune destructiva. De aquí que se pueda obtener especificidad mediante dicho tratamiento sin necesidad de inmunosupresión a largo plazo.

30 Para enfermedades infecciosas, se ha producido el progreso más rápido en el control de la enfermedad cuando el anticuerpo producido para el antígeno administrado es capaz de neutralizar el agente infeccioso o la toxina segregada por el mismo, ya esté esto mediado por IgM, por IgG o por IgA. De igual modo, las enfermedades autoinmunes han sido tratadas con antígenos que pueden mejorar la acción de los autoanticuerpos. Sin embargo, para la erradicación de células infectadas con virus, células cancerosas y células que albergan bacterias intracelulares, también se requieren respuestas inmunes celulares. Por ejemplo, los virus intracelulares (v.g., retrovirus, oncomavirus, ortomixovirus, paramixovirus, togavirus, rbdovirus, arenavirus, adenovirus, herpesvirus, poxvirus, papovavirus y virus de la rubeola) son capaces de replicarse y propagarse a las células adyacentes sin exponerse a anticuerpos. La importancia de la inmunidad mediada por células queda enfatizada por la incapacidad de los niños con deficiencia primaria de las células T para eliminar estos virus, mientras que los pacientes con deficiencia de inmunoglobulinas, pero con la inmunidad mediada por células intacta, no sufren esta discapacidad. Un número pequeño, aunque importante, de bacterias, hongos, protozoos y parásitos sobreviven y se replican en el interior de células huésped. Estos organismos incluyen Mycobacteria (tuberculosis y lepra), Legionella (enfermedad del legionario), Rickettsiae (fiebre maculosa de las Montañas Rocosas), Chlamydiae, *Listeria monocytogenes*, Brucella, *Toxoplasma gondii*, Leishmania, Trypanosoma, *Candida albicans*, Cryptococcus, Rhodotorula y Pneumocystis. Al vivir en el interior de células, estos organismos son inaccesibles para los anticuerpos circulantes. Las respuestas inmunes innatas también resultan ineficaces. La principal defensa inmune frente a estos organismos es la inmunidad mediada por células, que implica tanto a los linfocitos T citolíticos CD8+ como a los linfocitos T helper CD4.

50 El desarrollo de vacunas y de inmunoterapéuticos capaces de provocar una respuesta inmune mediada por células efectiva y mantenida constituye uno de los mayores retos en vacunología. En particular, el desarrollo de una vacuna segura y eficaz para la prevención y el tratamiento de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) se ha visto obstaculizado por la incapacidad de los candidatos a vacunas para estimular una inmunidad celular potente, duradera y relevante para la enfermedad.

55 La respuesta inmune mediada por células del huésped responsable de la erradicación de patógenos intracelulares o de células cancerosas se denomina respuesta Th1. Ésta se caracteriza por la inducción de linfocitos T citotóxicos (CTL) y linfocitos T helper (HTL), que da lugar a la activación de los mecanismos efectores inmunes, así como de citoquinas inmunoestimulantes, tales como el IFN-gamma y la IL-2. La importancia de las respuestas Th1 en el control de la infección vírica ha sido recientemente mostrada por Lu *et al.* (Nature Medicine (2004)). Este estudio clínico con individuos crónicamente infectados por VIH-1 demostró una correlación positiva entre la supresión de la carga vírica y las respuestas tanto de las células T CD4+ que expresan IL-2 o IFN-gamma específicas de VIH-1 como de las células efectoras CD8+ específicas de HIV-1. Las estrategias inmunológicas actuales para mejorar la

inmunidad celular inducida por vacunas e inmunoterapéuticos incluyen el desarrollo de versiones vivas atenuadas del patógeno y el uso de vectores vivos para administrar antígenos apropiados o ADN codificante de tales antígenos. Dichas aproximaciones están limitadas por consideraciones de seguridad en un ambiente regulador cada vez más estricto. Más aún, los problemas que surgen de la escalabilidad de los procedimientos de fabricación y el coste limitan con frecuencia la viabilidad comercial de productos de origen biológico.

En este contexto, vacunas sintéticas racionalmente definidas basadas en el uso de péptidos han recibido una considerable atención como candidatos potenciales para el desarrollo de nuevas vacunas profilácticas y de inmunoterapéuticos. Los epitopos de las células T y de las células B representan las únicas partes activas de un inmunógeno reconocidas por el sistema inmune adaptativo. Se pueden usar pequeños péptidos que cubran regiones epitópicas de las células T o B como inmunógenos para inducir una respuesta inmune, que en último lugar presenta una reacción cruzada con el antígeno nativo del que derivó la secuencia. Los péptidos son antígenos muy atractivos, ya que están químicamente bien definidos, son altamente estables y pueden ser diseñados para contener epitopos de las células T y B. Se pueden seleccionar epitopos de las células T, incluyendo epitopos CTL y T helper, en base a su capacidad para unirse a moléculas del MHC, de tal forma que se puede conseguir un amplio cubrimiento de población (The HLA Factsbook, Marsh, S., Academic Press. 2000). Más aún, la capacidad para seleccionar epitopos de células T y B apropiados permite dirigir la respuesta inmune a múltiples epitopos conservados de patógenos que se caracterizan por una elevada variabilidad de secuencia (tal como VIH, virus de la hepatitis C (VHC) y malaria).

Con objeto de estimular las respuestas de los linfocitos T, los péptidos sintéticos contenidos en una vacuna o un producto inmunoterapéutico deben ser preferiblemente interiorizados por las células presentadoras de antígeno, y especialmente las células dendríticas. Las células dendríticas (CD) tienen un papel crucial en la iniciación de las respuestas inmunes mediadas por células T primarias. Estas células existen en dos estadios principales de la maduración asociados a diferentes funciones. Las células dendríticas inmaduras (CDi) se localizan en la mayoría de los tejidos o en la circulación y son reclutadas hacia los sitios inflamados. Son células captadoras de antígenos altamente especializadas, que expresan grandes cantidades de receptores implicados en la captación de antígenos y la fagocitosis. Después de la captura y del procesamiento de antígenos, las CDi se trasladan a localizaciones locales de células T en los nódulos linfáticos o el bazo. Durante este proceso, las CD pierden su capacidad captadora de antígenos y se convierten en CD maduras (CDm) inmuoestimulantes.

Las células dendríticas son células presentadoras eficientes que inician la respuesta inmune del huésped frente a un antígeno peptídico asociado a moléculas del MHC de clase I y de clase II. Son capaces de imprimir las células T CD4 y CD8 naíf. Según los modelos actuales de rutas de procesamiento y presentación de antígenos, los antígenos exógenos se interiorizan en los compartimentos endocíticos de las células presentadoras de antígeno, donde se degradan en péptidos, algunos de los cuales se unen a moléculas del MHC de clase II. Los complejos MHC de clase II/péptido maduros son entonces transportados a la superficie celular para su presentación a linfocitos T CD4. Por el contrario, el antígeno endógeno se degrada en el citoplasma por la acción del proteosoma antes de ser transportado al citoplasma, donde se une a moléculas del MHC de clase I nacientes. Las moléculas del MHC de clase I estables acoplejadas con péptidos son entonces transportadas a la superficie celular para estimular los CTL CD8. El antígeno exógeno puede ser también presentado sobre moléculas del MHC de clase I por APC profesionales en un proceso llamado presentación cruzada. Los fagosomas que contienen antígeno extracelular pueden fusionarse con el retículo endoplásmico y el antígeno puede conseguir la maquinaria necesaria para cargar péptido en las moléculas del MHC de clase I. Es bien reconocido, sin embargo, que los péptidos libres son frecuentemente inmunógenos pobres por sí solos (Fields Virology, Volumen 1, Tercera Edición, 1996).

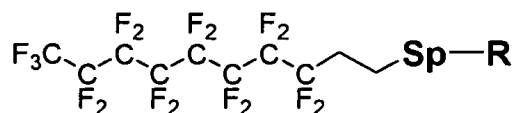
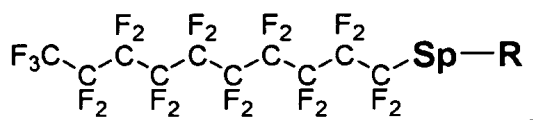
Para optimizar la eficacia de las vacunas o agentes terapéuticos peptídicos, se han desarrollado diversas estrategias vacunales para dirigir los antígenos a la célula presentadora de antígeno con objeto de abordar la ruta del MHC de clase I y provocar respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL). Como ejemplo de un sistema de administración sintético, se han unido covalentemente cadenas acílicas grasas a péptidos como medio de administración de un epitopo al compartimento intracelular del MHC de clase I con objeto de inducir actividad CTL. Dichos lipopéptidos, por ejemplo con una cadena de monopalmitoílo unida a un péptido que representa un epitopo de la proteína Env del VIH, están descritos en la patente EE.UU. 5.871.746. Se han suministrado otras tecnologías destinadas a administrar epitopos al compartimento intracelular y así inducir CTL. Éstas incluyen vectores tales como Penetratina, TAT y sus derivados, ADN, vectores víricos, virosomas y liposomas. Sin embargo, estos sistemas o bien provocan respuestas CTL muy débiles, o bien se asocian a problemas de toxicidad, o bien son complicados y caros de fabricar a escala comercial.

Existe, por lo tanto, una necesidad reconocida de vectores mejorados para dirigir la administración intracelular de antígenos en el desarrollo de vacunas y fármacos destinados a provocar una respuesta inmune celular. Un vector en el contexto de inmunoterapéuticos o vacunas es cualquier agente capaz de transportar o dirigir un antígeno hacia las células de respuesta inmune en un huésped. Se ha visto que los surfactantes fluorados tienen concentraciones micelares críticas menores que sus contrapartidas hidrogenadas y, por lo tanto, se autoorganizan en estructuras micelares a una concentración menor que la molécula hidrocarbonada equivalente. Esta propiedad fisicoquímica se

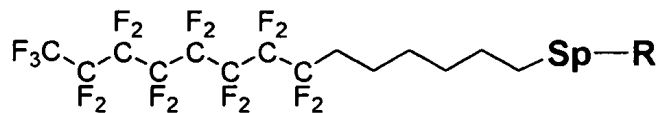
relaciona con las fuertes interacciones hidrofóbicas y las bajas interacciones de Van der Waal asociadas a las cadenas fluoradas que aumentan dramáticamente la tendencia de los anfífilos fluorados a autoorganizarse en agua y a acumularse en las interfases. La formación de dichas estructuras macromoleculares facilita su captación endocítica por las células, por ejemplo las células presentadoras de antígeno (Reichel F. *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 7989-7997). Más aún, la actividad hemolítica sufre una fuerte reducción y con frecuencia se suprime cuando se introducen cadenas fluoradas en un surfactante (Riess, J.G., Pace, S., Zarif, L., Adv. Mater. 1991, 3, 249-251), dando así lugar a una reducción en la toxicidad celular.

Esta invención busca solucionar el problema de la administración de antígenos a las células de respuesta inmune utilizando un nuevo vector fluorocarbonado con objeto de aumentar la inmunogenicidad de los antígenos administrados. El vector fluorocarbonado puede incluir una o más cadenas derivadas de radicales perfluorocarburo o mixtos fluorocarburo/hidrocarburo y puede ser saturado o insaturado, teniendo cada cadena de 3 a 30 átomos de carbono. Con objeto de unir el vector al antígeno a través de una unión covalente, se incorpora un grupo reactivo, o ligando, como componente del vector; por ejemplo, se incluye -CO-, -NH-, S, O o cualquier otro grupo adecuado; el uso de dichos ligandos para conseguir uniones covalentes es bien conocido en la técnica. El grupo reactivo puede localizarse en cualquier posición de la molécula fluorocarbonada. Se puede conseguir la copulación del vector fluorocarbonado al antígeno a través de grupos funcionales tales como -OH, -SH, -COOH y -NH<sub>2</sub> presentes de forma natural o introducidos sobre cualquier sitio del antígeno. Como ejemplos de tales uniones, se incluyen enlaces amida, hidrazona, disulfuro, tioéter y oxima. Alternativamente, se pueden usar uniones no covalentes; por ejemplo, se puede formar una interacción iónica mediante un catión que une entre sí un residuo de histidina de un antígeno peptídico y un ácido carboxílico del vector fluorocarbonado. Eventualmente, se puede incorporar un elemento espaciador (peptídico o no peptídico) para permitir la escisión del antígeno con respecto al elemento fluorocarbonado para el procesamiento en la célula presentadora de antígeno y para optimizar la presentación estérica del antígeno. También se puede incorporar el espaciador para ayudar en la síntesis de la molécula y para mejorar su estabilidad y/o solubilidad. Como ejemplos de espaciadores, se incluyen polietilenglicol (PEG), aminoácidos tales como lisina o arginina, que pueden escindirse con enzimas proteolíticas, e hidrocarburos.

Así, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una construcción vector fluorocarbonado-antígeno de estructura

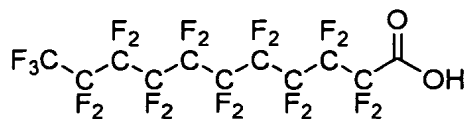


o

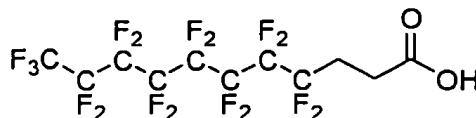


donde Sp es un resto espaciador químico eventual y R es un péptido inmunogénico derivado de un agente infeccioso, una proteína autóloga o un antígeno canceroso, cuyo péptido incluye al menos un epitopo del MHC de clase I o al menos un epitopo del MHC de clase II.

En una realización particular de la fórmula anterior, el vector puede ser ácido perfluoroundecanoico de la siguiente fórmula (I):

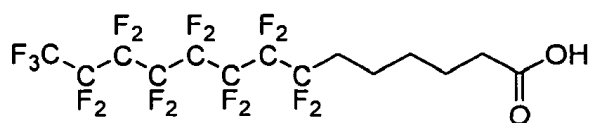


o alternativamente ácido 2H,2H,3H,3H-perfluoroundecanoico de la siguiente fórmula (II):



5

o ácido heptadecafluoropentadecanoico de la siguiente fórmula (III):



10

El antígeno asociado al vector es un péptido capaz de inducir una respuesta inmune en un animal, incluidos los humanos. Preferiblemente, la respuesta inmune tendrá un efecto beneficioso en el huésped. Los péptidos pueden derivar de un virus, de una bacteria o micobacteria, de un parásito, de un hongo o de cualquier agente infeccioso o de un antígeno autólogo o de un alérgeno.

15

Como ejemplos de virus, se incluyen, aunque sin limitación, el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) o 2, el virus de la gripe, el virus herpes (VHS-1 y VHS-2), el virus de la hepatitis A (VHA), el virus de la hepatitis B (VHB) o el virus de la hepatitis C (VHC).

20

Como ejemplos de bacterias y micobacterias, se incluyen, aunque sin limitación, *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella*, *Rickettsiae*, *Chlamydiae* y *Listeria monocytogenes*.

25

Como ejemplos de parásitos, se incluyen, aunque sin limitación, *Plasmodium falciparum* y otras especies de la familia de los plasmodios.

30

Como ejemplos de hongos, se incluyen, aunque sin limitación, *Candida albicans*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Pneumocystis*.

35

Como antígenos autólogos o autoantígenos, se incluyen, aunque sin limitación, los siguientes antígenos asociados a cánceres: HER-2/neu, expresado en el cáncer de mama, gp100 o MAGE-3, expresado en el melanoma, P53, expresado en el cáncer colorrectal, y NY-ESO-1 o LAGE-1, expresado por muchos cánceres humanos.

40

Como alérgenos se incluyen, aunque sin limitación, fosfolipasa A<sub>2</sub> (API m1), asociada a reacciones severas frente a las abejas, Derp-2, Der p 2, Der f, Der p 5 y Der p 7, asociados a reacción frente al ácaro del polvo doméstico *Dermatophagoides pteronssinus*, el alérgeno de la cucaracha Bla g 2 y el alérgeno mayor del polen del abedul Bet v1.

45

Así, en una realización, la presente invención proporciona una construcción vector-antígeno donde el antígeno es, o representa, un antígeno de un virus, de una bacteria, de una micobacteria, de un parásito o de un hongo, una proteína autóloga o un antígeno canceroso.

50

Los antígenos pueden ser cualesquiera péptidos siempre que presenten un epitopo inmunológicamente reconocible. Dichos antígenos pueden derivar por purificación de la proteína nativa o ser producidos por tecnología recombinante o por síntesis química. Los métodos para la preparación de antígenos son bien conocidos en la técnica. Más aún, los antígenos también incluyen ADN o un oligonucleótido codificante de un péptido antigénico.

Para que la construcción sea inmunológicamente activa, el antígeno debe incluir uno o más epitopos. Los péptidos utilizados en la presente invención contienen preferiblemente una secuencia de al menos siete, más preferiblemente de entre 9 y 100, aminoácidos, y más preferiblemente de entre alrededor de 15 y 35 aminoácidos. El péptido puede consistir en, por ejemplo, entre 7 y 70 aminoácidos. Preferiblemente, se selecciona la secuencia de aminoácidos del

- 5 péptido portador de epitopo(s) para aumentar la solubilidad de la molécula en solventes acuosos. Más aún, el extremo del péptido que no se conjuga con el vector puede ser alterado para promover la solubilidad de la construcción mediante la formación de estructuras multimoleculares, tales como micelas, lamelas, túbulos o liposomas. Por ejemplo, se podría añadir un aminoácido de carga positiva al péptido con objeto de promover la organización espontánea de micelas. Se pueden copular tanto el extremo N como el extremo C del péptido al vector para crear la construcción. Para facilitar la síntesis a gran escala de la construcción, se pueden modificar los residuos de aminoácidos N- o C-terminales del péptido. Cuando el péptido deseado es particularmente sensible a la escisión por peptidasas, se puede reemplazar el enlace peptídico normal por un mimético peptídico no escindible; dichos enlaces y métodos de síntesis son bien conocidos en la técnica.
- 10 El péptido puede ser un epitopo del VIH o uno o más epitopos env del VIH, por ejemplo péptidos seleccionados entre las SEC ID N° 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ó 36 o sus combinaciones. Como ejemplo específico, el péptido NNTRKRIRIQRGPGRFVTVIGK-NH<sub>2</sub> representa un epitopo de la proteína Env (301-322) del VIH-1, que ha mostrado ser inmunológicamente activo. Esto representa aún otra realización de la presente invención. (Referencia <http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/index.html>).
- 15 El péptido puede incluir múltiples epitopos y/o puede ser un péptido de fusión. Se pueden unir más de un antígeno entre sí antes de la unión al ligando. Uno ejemplo de ello es el uso de péptidos de fusión, donde un epitopo T helper promiscuo puede unirse covalentemente a uno o a múltiples epitopos CTL o a uno o a múltiples epitopos de células B, que pueden ser un péptido, un carbohidrato o un ácido nucleico. Como ejemplo, el epitopo T helper promiscuo podría ser el péptido PADRE, el péptido del toxoide del tétanos (830-843) o la hemaglutinina de la gripe, HA(307-319).
- 20 En otra realización, por lo tanto, la construcción vector-antígeno es una en la que R es más de un epitopo o antígeno unidos entre sí. Por ejemplo, el péptido puede incluir uno o más epitopos de una proteína vírica. El péptido puede incluir más de un epitopo solapante lineal. Los epitopos pueden ser solapantes lineales, creando de este modo un grupo de epitopos multiespecíficos densamente empaquetados.
- 25 La presente invención proporciona también vacunas e inmunoterapéuticos que incluyen una o más construcciones vector fluorocarbonado-antígeno. Los productos de múltiples componentes de este tipo son deseables, ya que es probable que sean más efectivos para provocar respuestas inmunes apropiadas. Por ejemplo, la formulación óptima de un inmunoterapéutico para el VIH puede incluir una serie de epitopos de diferentes proteínas del VIH. En este caso, cada epitopo puede unirse a un vector fluorocarbonado común, o cada epitopo podría unirse a un vector dedicado. Alternativamente, se pueden incorporar múltiples epitopos a una formulación con objeto de conferir inmunidad frente a una variedad de patógenos. Un producto de múltiples componentes puede contener una o más construcciones vector-antígeno, más preferiblemente de 2 a aproximadamente 20 y más preferiblemente de 3 a aproximadamente 8 de tales construcciones.
- 30 Las composiciones de la invención contienen vectores fluorocarbonados asociados a antígenos eventualmente junto con uno o más soportes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Dichos adyuvantes, capaces de potenciar aún más la respuesta inmune, pueden incluir, aunque sin limitación, derivados del dipéptido de muramilo (MDP), CpG, monofosforil lípido A, adyuvantes aceite en agua, adyuvantes agua en aceite, sales de aluminio, citoquinas, complejo inmunoestimulante (ISCOM), liposomas, micropartículas, saponinas, citoquinas o toxinas y toxoides bacterianos. Otros adyuvantes útiles serán bien conocidos para un experto en la técnica. La elección del soporte, de ser necesario, va frecuentemente en función de la vía de administración de la composición. En esta invención, las composiciones pueden ser formuladas para cualquier vía y medio de administración adecuados. Como soportes o diluyentes farmacéuticamente aceptables, se incluyen los utilizados en formulaciones adecuadas para administración oral, ocular, rectal, nasal, tópica (incluyendo la bucal y la sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo la subcutánea, la intramuscular, la intravenosa y la intradérmica).
- 35 La formulación puede ser administrada en cualquier forma adecuada, por ejemplo como un líquido, un sólido, un aerosol o un gas. Por ejemplo, las formulaciones orales pueden adoptar la forma de emulsiones, jarabes o soluciones o tabletas o cápsulas, a las que se puede dar un revestimiento entérico para proteger el principio activo de la degradación en el estómago. Las formulaciones nasales pueden ser sprays o soluciones. Las formulaciones transdérmicas pueden ser adaptadas para su sistema de administración particular y pueden consistir en parches. Las formulaciones para inyección pueden ser soluciones o suspensiones en agua destilada u otro solvente o agente suspensor farmacéuticamente aceptable.
- 40 Así, en otro aspecto, la presente invención proporciona una formulación profiláctica o terapéutica que contiene la construcción vector-antígeno con o sin un soporte y/o adyuvante adecuado.
- 45 La dosificación apropiada de la vacuna o del inmunoterapéutico que se ha de administrar a un paciente será
- 50
- 55
- 60

determinada en la clínica. Sin embargo, como guía, una dosis humana adecuada, que puede depender de la vía preferida de administración, puede ser de 1 a 1.000 µg. Pueden ser necesarias múltiples dosis para alcanzar un efecto inmunológico, las cuales, de ser necesarias, serán típicamente administradas con un intervalo de entre 2 y 12 semanas. Cuando se requiere un refuerzo de la respuesta inmune a lo largo de períodos más prolongados, se pueden aplicar dosis repetidas con un intervalo de 3 meses a 5 años.

La formulación puede combinar la construcción vector-antígeno con otro principio activo para efectuar la administración de más de una vacuna o fármaco. También se puede observar un efecto sinérgico mediante la coadministración de los dos o más principios activos. En el tratamiento de la infección por VIH, un ejemplo de uno de tales fármacos es la terapia antirretrovírica altamente activa (TARAA).

En otros aspectos, la invención proporciona:

- i) El uso de la construcción inmunogénica como se describe aquí en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o de sus síntomas. El medicamento es una vacuna profiláctica o un producto farmacéutico inmunoterapéutico y puede ser para administración parenteral, oral, ocular, rectal, nasal, transdérmica, tópica o vaginal.
- ii) La construcción vector fluorocarbonado-antígeno para uso como vacuna profiláctica o producto farmacéutico inmunoterapéutico. Se puede usar la vacuna o el producto en un método de tratamiento por inducción de una respuesta inmune.
- iii) Los vectores fluorocarbonados y la construcción vector fluorocarbonado-antígeno para uso en un método de tratamiento del organismo humano o animal.

Los ejemplos se refieren a las figuras, donde:

- Figura 1: muestra los cromatogramas de HPLC de diversos péptidos y construcciones a T=0.  
 Figura 2: muestra los cromatogramas de HPLC de diversos péptidos y construcciones almacenados a 40 durante 27 días.  
 Figura 3: muestra la evaluación de la concentración micelar crítica para dos péptidos, FAVS-3-ENV y FAVS-1-ENV.  
 Figura 4: muestra el análisis del tamaño de partícula por espectrometría de cuasi dispersión de la luz después de 20 horas de reposo para diversas construcciones peptídicas.  
 Figura 5: muestra la respuesta inmune celular valorada por ensayo ELISPOT de IFN-gamma *ex vivo* en ratones tras una sola inmunización (A, B), un primer refuerzo (C, D) y un segundo refuerzo (E, F).  
 Figura 6 muestra la naturaleza de los linfocitos T cebados *in vivo* mediante diversas construcciones fluorocarburo-péptido.  
 Figura 7: muestra la respuesta inmune celular valorada por ensayo ELISPOT de IFN-γ *ex vivo* en ratones tras tres inmunizaciones con FAVS-1-ENV solo o en combinación con murabutida.  
 Figura 8: medición de citoquinas tras tres inyecciones con FAVS-1-ENV solo o en combinación con murabutida.  
 Figura 9: muestra la respuesta inmune celular valorada por ensayo ELISPOT de IFN-γ *ex vivo* en ratones tras dos administraciones intranasales con FAVS-1-ENV solo o en combinación con murabutida.

### Ejemplo 1

Síntesis de péptidos vectorizados con fluorocarburos

Se sintetizaron los siguientes péptidos vectorizados con fluorocarburos:

FAVS-1-ENV: NNTRKRIRIQRGPGRFVTIGK-C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-K-NH<sub>2</sub>  
 FAVS-2-ENV: NNTRKRIRIQRGPGRFVTIGK-C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CO-K-NH<sub>2</sub>  
 FAVS-3-ENV: IRIQRGPGRFVTIGKK-CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(PEG)<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CO-K-NH<sub>2</sub>

donde se utiliza el código de una letra para aminoácidos estándar y PEG es CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O.

NNTRKRIRIQRGPGRFVTIGK es el péptido ENV(301-322) del virus de la inmunodeficiencia humana.

Se realizó la síntesis peptídica en un sintetizador de péptidos automático ABI 430 o ABI 433, sobre resina de amida Rink (0,38 mmol/g de carga), usando Nsc (2-(4-nitrofenilsulfonil)etoxicarbonil)- o Fmoc ((9-fluorenilmetilcarbonil)-aminoácidos. Se promovió la copulación con HOCT (6-cloro-1-oxibenzotriazol) y DIC (1,3-diisopropilcarbodiimida) y se realizó la desprotección de Fmoc/Nsc usando piperidina al 20% en DMF (dimetilformamida). Se remataron los extremos N no copulados con anhídrido acético como parte de cada ciclo. Se consiguieron la escisión del péptido con respecto a la resina y la desprotección concomitante de las cadenas laterales utilizando TFA, agua y TIS

(diisopropilsilano) (95:3:2), con aislamiento bruto del producto por precipitación en éter dietílico frío. Se realizó la purificación por HPLC preparatoria utilizando columnas Jupiter C5 o Luna C18 (2) (250 x 22 mm) y se verificó la masa peptídica por espectrometría de masas.

5 Se verificó la pureza del péptido antes de llevar a cabo los experimentos por HPLC (HP 1050) utilizando una columna de Supelco (C5, 250 × 4,6 mm, 300 Å, 5 µm) bajo elución en gradiente. Solvente A (90% de agua, 10% de acetonitrilo, 0,1% de TFA), Solvente B (10% de agua, 90% de acetonitrilo, 0,1% de TFA). Se usó un gradiente del 0 al 100% de B en 30 minutos y la temperatura de la columna era de 40°C. Se fijó la longitud de onda del detector UV a 215 nm. La pureza de los péptidos vectorizados con fluorocarburos en cada caso era mayor del 90%.

10 Se valoró la estabilidad química de muestras herméticamente selladas que contenían péptidos vectorizados liofilizados a 4°C, 20°C y 40°C junto con el péptido no vectorizado como comparador (NNTRKRIRIQRGPGRAFVTIGK-NH<sub>2</sub>). Se monitorizó la estabilidad a lo largo del tiempo por HPLC utilizando las condiciones antes descritas. Los datos son mostrados en las figuras 1 y 2.

15 Para cada conjugado peptídico, no se observó signo alguno de degradación después de 27 días de incubación a 40°C, eluyendo un solo pico al mismo tiempo de retención que el encontrado a T=0.

## 20 Ejemplo 2

Análisis fisicoquímico de los péptidos vectorizados con fluorocarburos

### (i) Solubilidad

25 Se confirmó la solubilidad de los péptidos vectorizados con fluorocarburos en solución acuosa a concentraciones útiles para una formulación farmacéutica. Se prepararon soluciones de péptidos a 20°C disolviendo el polvo de péptido liofilizado con PBS (0,01 M, pH 7,2) a través de un rango de concentraciones. Se agitaron entonces las preparaciones en vórtex durante un minuto. Se recogió una alícuota y se centrifugó el resto de la solución durante 10 minutos a 12.000 rpm. Se añadieron a una placa de fondo plano de 96 pocillos que contenía alícuotas de 25 µl de diluciones seriadas de cada péptido 200 µl del reactivo de trabajo BCA (Pierce, UK), que contenía la solución A (ácido biconínico, carbonato de sodio y tartrato de sodio en una solución 0,1 M de hidróxido de sodio, 50 vol.) y la B (solución de sulfato cúprico al 4%, 1 vol.). Después de incubar durante 45 minutos a 37°C y de enfriar durante 10 minutos, se midió la absorbancia a 570 nm. Se analizaron las placas con un contador multietiqueta Wallac Victor (Perkin Elmer). Para cada péptido, se representó una curva de calibración, que se usó para determinar la concentración peptídica en la fracción soluble, expresada en nmol/ml. Se presentan los datos en la Tabla 1. Se vio que todos los péptidos eran totalmente solubles a la concentración de antígeno usada para los estudios de inmunización murinos.

40 Tabla 1: Resumen del ensayo de solubilidad realizado mediante el método de ensayo de proteínas

Péptido	Solubilidad
Péptido libre	>3.300 nmol/ml
FAVS-1-ENV	>4.000 nmol/ml
FAVS-2-ENV	>500 nmol/ml
FAVS-3-ENV	>3.000 nmol/ml

### (ii) Concentración micelar crítica [CMC]

45 Se determinó la concentración micelar crítica de los péptidos vectorizados con fluorocarburos en solución salina fisiológica tamponada con fosfatos por unión de colorante con ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico (ANS). Partiendo de soluciones de 300 µg de péptido/ml, se prepararon diluciones seriadas a la mitad de las soluciones de péptido y de péptido-vector en PBS (0,01 M, pH 7,2) a 20°C, de las cuales se añadieron 200 µl a los pocillos de una microplaca. Se añadieron entonces 40 µl de ANS recién disuelto en PBS a cada pocillo. Después de dos minutos, se excitó la placa a 355 nm y se hizo un barrido a 460 nm en un fluorímetro de microplacas Victor. Se representó la razón (intensidad de fluorescencia de la muestra/intensidad de fluorescencia del blanco) en una escala lineal frente a la concentración en una escala logarítmica. Se presentan los datos en la Figura 3.

### (iii) Análisis del tamaño de partícula

55 Se realizó el análisis del tamaño de partícula en un espectrómetro de cuasi dispersión de la luz Malvern 4700C (Malvern Ltd., UK) equipado con un láser de argón (Uniphase Corp., San José, CA) ajustado a 488 nm. Se mantuvieron las muestras a una temperatura de 25°C. El láser tiene una geometría variable del detector para la medición de la dependencia angular. Se realizaron las mediciones a ángulos de 90° y 60°. Se prepararon soluciones



disolviendo el péptido en solución salina tamponada con fosfatos 0,01 M filtrada a una concentración de 500 nmol/ml y agitando en vórtex durante 1 minuto. Se dispensaron entonces las soluciones en cubetas (volumen de trabajo de 1 ml). Se tomaron mediciones después de 15 minutos a un ángulo de 90° (Figura 4). El resultado del valor Krecuento es proporcional al número de partículas detectadas; en todos los casos, el Krecuento era >10 con objeto de asegurarse de la obtención de mediciones de distribución de tamaño fiables.

Referencia ITS	Tiempo de reposo (h)	Krecuento	Tamaño (nm)		Tamaño medio (nm)	Polidispersidad
			Población 1	Población 2		
FAVS-1-ENV	0,25	177	28	-	28,3	0,151
	20	230	32	-	32,7	0,180
FAVS-2-ENV	0,25	190	15	120	28,5	0,450
	20	245	20	300	68,4	0,539
FAVS-3-ENV	0,25	201	70	400	209	0,659
	20	225	105	800	207	0,647

Tabla 2: Tamaño de partícula de solución micelar en PBS.

### 10 Ejemplo 3

#### (i) Inmunogenicidad de los péptidos vectorizados con fluorocarburos

Se compraron ratones libres de patógenos específicos (hembras Balb/c de 6-8 semanas) a Harlan (UK). Se disolvieron los péptidos ENV, FAVS-1-ENV, FAVS-2-ENV o FAVS-3-ENV en PBS (0,01 M, pH 7,2). Se normalizó cada dosis a 50 nmol de péptido por ml en base al contenido neto en péptido obtenido por análisis de aminoácidos. Se inmunizaron ratones (3 por grupo) subcutáneamente bajo la piel del área interescapular con 50 nmol de péptido en un volumen de 100 µl de PBS, pH 7,2. Se administraron tres dosis a intervalos de diez días. Un grupo de ratones que recibió una dosis de imprimación de péptido libre mezclado con adyuvante completo de Freund (50 nmol de péptido en PBS emulsionados en igual volumen de adyuvante) y dosis de refuerzo de adyuvante incompleto de Freund sirvió como control positivo. Diez días después de la inmunización final, los ratones fueron sacrificados y se extirparon los bazos para valorar la respuesta inmune celular al péptido. Para determinar el progreso del desarrollo de la respuesta inmune, también se establecieron grupos de ratones que recibieron una sola y dos dosis de péptido.

Se monitorizó la respuesta celular *in vivo* imprimada por los péptidos vectorizados por ELISPOT de IFN-gamma sobre células esplénicas frescas con objeto de enumerar la frecuencia *ex vivo* de células que producen IFN-gamma específicas de péptidos, y más específicamente de linfocitos T CD8+ específicos de péptidos, imprimadas tras la inmunización. Se volvieron a estimular las células esplénicas *in vitro* con el péptido ENV(301-322) NNTRKRIRIQRGPGRAFVTIGK, que contenía un epitopo T-helper bien conocido, y ENV (311-320) RGPGRAFVTI, un péptido más corto correspondiente al epitopo CD8 (MHC de clase I restringido en H-2Dd, conocido como P18-I10), con objeto de cubrir ambos componentes de la respuesta inmune celular (actividad celular T Helper y T CD8).

Se reunieron los bazos de cada grupo de ratones y se aislaron las células del bazo. Se lavaron las células tres veces en RPMI-1640 antes de hacer el recuento. Se realizaron ensayos murinos Elispot de IFN-γ utilizando el kit Diaclone (Diaclone, Francia) según las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones. Se distribuyeron cultivos por duplicado de células esplénicas a una densidad celular de  $5 \times 10^5$ /pocillo en pocillos con fondo de PVDF revestidos con anticuerpo anti-IFN-gamma (Multiscreen™ de 96 pocillos - microplaca IP - Millipore) con la concentración apropiada de péptido (10, 1, 0 mg/ml de epitopo T helper ENV(301-322) o CTL P18-I10) en medio de cultivo (RPMI-1640) con 5 µM de β-mercaptoetanol y 5 mM de glutamina suplementado con un 10% de suero de ternera fetal durante 18 horas a 37°C bajo una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. Se contaron las manchas utilizando una unidad lectora ELISPOT de Carl Zeiss Vision. Los resultados corresponden a los valores medios obtenidos con cada una de las condiciones después de restar el fondo. Se expresan los resultados como unidades formadoras de manchas (SFC) por millón de células esplénicas de entrada (Figura 5).

#### 45 (ii) Naturaleza de los linfocitos T imprimados *in vivo* por los fluorocarburo-péptidos (separación de células T CD4 y CD8)

Se distribuyeron células esplénicas de ratones inmunizados en microplacas de 48 pocillos a una densidad celular de  $2,5 \times 10^6$ /pocillo con 1 µg/ml de péptidos T helper ENV(301-322) o CTL P18-I10. El día 3, se añadieron 5 ng/ml de IL-2 murina recombinante a cada pocillo. El día 7, se recogieron las células esplénicas preestimuladas, se lavaron tres veces en RPMI 1640, se contaron y se separaron por clasificación celular magnética utilizando perlas magnéticas conjugadas con anticuerpos monoclonales de rata anti-CD8a y CD4 de ratón (MACS, Microbeads Miltenyi Biotec, UK) según las instrucciones del fabricante. Se distribuyeron las células T CD4 y CD8 + a una densidad celular de  $2,5 \times 10^5$ /pocillo por duplicado en pocillos con fondo de PVDF revestidos de anticuerpo

(Multiscreen™ de 96 pocillos-microplaca IP, Millipore) con 1 mg/ml de péptido en medio de cultivo (RPMI-1640) con 5 µM de β-mercaptoetanol, glutamina, aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio, suplementado con un 10% de suero de ternera fetal, durante 12 horas a 37°C bajo una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. Se contaron las manchas usando una unidad lectura ELISpot de Carl Zeiss Vision. Los resultados corresponden a los valores medios obtenidos con cada una de las condiciones tras restar el fondo (<10 manchas). Se expresan los resultados como unidades formadoras de manchas (SFC) por millón de células esplénicas de entrada.

Según los ensayos ELISPOT de IFN-γ *ex vivo*, las construcciones FAVS-péptido eran capaces de imprimir una fuerte respuesta inmune celular frente a los péptidos ENV tanto largo (ENV301-322) como corto (epitopo CTL P18-I10) después de una sola exposición *in vivo* al antígeno (Figura 5A y B). La Figura 6 demuestra que las células T específicas de ENV tanto CD4+ como CD8+ se imprimaban eficientemente *in vivo*.

La intensidad de la respuesta tras la imprimación con los FAVS-péptidos estaba en el mismo rango que las respuestas obtenidas de ratones inmunizados con el péptido nativo emulsionado en adyuvante de Freund. Las respuestas de las células T específicas de ENV están claramente amplificadas después de un primer y un segundo refuerzo con la formulación FAVS-1-ENV (Figura 5C, D, E, F), según se resume en la Figura 6.

Esto demuestra claramente la capacidad de los FAVS-péptidos para ser captados por las células presentadoras de antígeno *in vivo* con objeto de alcanzar las rutas del MHC de clase I y del MHC de clase II y así imprimir fuertes respuestas inmunes celulares.

#### Ejemplo 4

Inmunogenicidad de los péptidos vectorizados con fluorocarburos coadministrados con adyuvante sintético

Con objeto de valorar el impacto potencial de un inmunoestimulante sintético sobre la inmunogenicidad cuantitativa y cualitativa de los FAVS-péptidos, se inyectó FAVS-1-ENV solo y en combinación con murabutida. La murabutida (N-acetilmuramil-L-alanil-D-glutamino-O-n-butiléster, un derivado sintético del dipéptido de muramilo y agonista NOD-2) es un inmunopotenciador sintético que activa los mecanismos inmunes innatos y que se sabe aumenta las respuestas tanto celulares como humorales cuando se combina con inmunógenos ("Immune and antiviral effects of the synthetic immunomodulator murabutide: Molecular basis and clinical potential", G. Bahr, en: "Vaccine adjuvants: Immunological and Clinical Principles", eds. Hackett y Harn (2004), Humana Press).

Se compraron ratones libres de patógenos específicos (hembras Balb/c de 6-8 semanas) a Harlan (UK). Se utilizó la construcción FAVS-1-ENV a dos niveles de dosis diferentes, recibiendo un grupo de ratones 50 nmoles y un segundo grupo 5 nmoles de construcción. Se inmunizaron ratones (3 por grupo) subcutáneamente bajo la piel del área interescapular con FAVS-1-ENV solo o en combinación con 100 µg de murabutida en un volumen total de 100 µl de PBS, pH 7,2. Se administraron tres dosis a intervalos de diez días. También se estableció un grupo control que recibió murabutida sola.

Diez días después de la inmunización final, los ratones fueron sacrificados y se extirparon los bazo para valorar la respuesta inmune celular frente a los péptidos de los epitopos T helper ENV(301-322) o CTL P18-I10. Se realizaron las mediciones del ELISpot de interferón-gamma y de las citoquinas Th-1 y Th-2 sobre los bazo aislados como se describe en el Ejemplo 3. Brevemente, se cultivaron las células esplénicas con la concentración apropiada de péptido (10 ó 0 µg/ml de epitopo T helper ENV (301-322) o CTL P18-I10) en medio de cultivo durante 18 horas a 37°C bajo una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizó entonces el ensayo ELISpot de IFN-γ. Se contaron las manchas usando una unidad lectora ELISpot de Carl Zeiss Vision. Los resultados corresponden a los valores medios obtenidos con cada una de las condiciones tras restar el fondo (<10 manchas). Se expresan los resultados como unidades formadoras de manchas (SFC) por millón de células esplénicas de entrada (Figura 7).

Se realizaron mediciones de citoquinas múltiples (IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) sobre células esplénicas frescas reestimuladas con el péptido ENV (301-322) procedentes de ratones inmunizados con la dosis de 5 nmol de FAVS-1-ENV. Se recogieron los sobrenadantes a las 24 horas y a las 48 horas. Se midieron los niveles de citoquinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN-γ) en las muestras de sobrenadantes de cultivo celular usando el ELISA en sándwich específico de citoquinas según el formato múltiple desarrollado por SearchLight™ Proteomic Arrays (Pierce Biotechnology, Woburn, MA). Se expresaron los resultados en pg de citoquina/ml.

Se vio que FAVS-1-ENV administrado solo inducía predominantemente la producción de citoquinas Th-1 (es decir, IL-2 e IFN-γ), produciéndose también bajos niveles de citoquinas Th-2. La inclusión de murabutida en la formulación dio lugar a la inducción de una respuesta Th-1/Th-2 más equilibrada, con mayores niveles de citoquinas Th-2, tales como IL-5, IL-10 e IL-13 (Figura 8).

**Ejemplo 5**

Inmunogenicidad de los péptidos vectorizados con fluorocarburos administrados por mucosas

5 Se compraron ratones libres de patógenos específicos (hembras Balb/c de 6-8 semanas) a Harlan (UK). Se administró FAVS-1-ENV (50 nmoles por ratón) dos veces intranasalmente en PBS 0,01 M solo o en combinación con 100 µg de murabutida con 10 días de intervalo entre ambas administraciones. Los ratones fueron ligeramente anestesiados con isoflurano (Isoflo, Solvay, UK). Se administraron 20 µl de solución de péptido soluble (10 µl/orificio nasal) utilizando una micropipeta. Un grupo control recibió PBS solamente. Cada grupo de dosificación consistía en seis animales. Los ratones fueron sacrificados 10 días después de la última administración por asfixia con dióxido de carbono. Se extirparon los bazo, se reunieron para cada grupo de ratones y se aislaron las células esplénicas. Se lavaron las células tres veces con RPMI-1640 antes de hacer el recuento. Se llevó a cabo el recuento utilizando una cámara de recuento Thomas. Se cultivaron las células esplénicas de los ratones individuales con la concentración apropiada de péptido (10 ó 0 µg/ml de epítipo T helper ENV (301-322) o CTL P18-I10) en medio de cultivo durante 18 horas a 37°C bajo una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizó entonces el ensayo Elispot de IFN-γ utilizando el kit Diaclone como se describe en el Ejemplo 3. Se contaron las manchas utilizando una unidad lectora Elispot de Carl Zeiss Vision. Los resultados corresponden a los valores medios obtenidos con cada una de las condiciones tras restar el fondo (<10 manchas). Se expresan los resultados como unidades formadoras de manchas (SFC) por millón de células esplénicas de entrada. Los datos representan la media para 6 ratones.

20 La totalidad de los seis ratones por grupo inmunizados intranasalmente con FAVS-1-ENV solo o en combinación con murabutida produjeron una potente respuesta de células T sistémica. La combinación con murabutida dio lugar a aumentos modestos en la frecuencia de células T productoras de IFN-gamma (Figura 9).

**Ejemplo 6**

Ejemplos de péptidos del VIH

30 Como péptidos candidatos para unión al vector fluorocarbonado para producir una vacuna profiláctica o terapéutica para el VIH, se pueden incluir los siguientes uno o más péptidos o fragmentos de los mismos, u homólogos (incluyendo las correspondientes secuencias consenso, ancestrales o de árbol central del VIH-1 que representan diferentes clados, tales como, aunque sin limitación, los clados A, B, C, D, F, G y H referidos en la base de datos de Los Alamos National Laboratory 2004) o variantes naturales y no naturales de los mismos, pero no necesariamente de manera exclusiva. Se han utilizado los códigos estándar de aminoácidos de una letra y de tres letras. Los homólogos tienen al menos un 50% de identidad en comparación con una secuencia de referencia. Preferiblemente, un homólogo tiene un 80, 85, 90, 95, 98 ó 99% de identidad con una secuencia natural. Las secuencias que se facilitan a continuación tienen una longitud de 35 aminoácidos. Los fragmentos de estas secuencias que contienen uno o más epítipos son también péptidos candidatos para unión al vector fluorocarbonado.

SEC ID N° 1

WKGEGAVVIQDNSDIKVVPRRKAKIIRDYGKQMAG

Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Val-Ile-Gln-Asp-Asn-Ser-Asp-Ile-  
Lys-Val-Val-Pro-Arg-Arg-Lys-Ala-Lys-Ile-Ile-Arg-Asp-Tyr-Gly-  
Lys-Gln-Met-Ala-Gly

SEC ID N° 2

EIYKRWIIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFR

Glu-Ile-Tyr-Lys-Arg-Trp-Ile-Ile-Leu-Gly-Leu-Asn-Lys-Ile-Val-  
Arg-Met-Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Ile-Leu-Asp-Ile-Arg-Gln-Gly-Pro-  
Lys-Glu-Pro-Phe-Arg

SEC ID N° 3

EHLKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGGYSAGERIVDII

Glu-His-Leu-Lys-Thr-Ala-Val-Gln-Met-Ala-Val-Phe-Ile-His-Asn-  
Phe-Lys-Arg-Lys-Gly-Gly-Ile-Gly-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Glu-Arg-  
Ile-Val-Asp-Ile-Ile

SEC ID N° 4

WEFVNTPLVLKWLWYQLEKEPIVGAETFYVDGAANR

Trp-Glu-Phe-Val-Asn-Thr-Pro-Pro-Leu-Val-Lys-Leu-Trp-Tyr-Gln-  
Leu-Glu-Lys-Glu-Pro-Ile-Val-Gly-Ala-Glu-Thr-Phe-Tyr-Val-Asp-  
Gly-Ala-Ala-Asn-Arg

SEC ID N° 5

GERIVDIIATDIQTKELQKQITKIQNFRVYYRDSR

Gly-Glu-Arg-Ile-Val-Asp-Ile-Ile-Ala-Thr-Asp-Ile-Gln-Thr-Lys-  
Glu-Leu-Gln-Lys-Gln-Ile-Thr-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-  
Tyr-Arg-Asp-Ser-Arg

SEC ID N° 6

FRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKWSA

Phe-Arg-Lys-Tyr-Thr-Ala-Phe-Thr-Ile-Pro-Ser-Ile-Asn-Asn-Glu-  
Thr-Pro-Gly-Ile-Arg-Tyr-Gln-Tyr-Asn-Val-Leu-Pro-Gln-Gly-Trp-  
Lys-Gly-Ser-Pro-Ala

SEC ID N° 7

NWFDITNWLWYIKIFIMIVGGLIGLRIVFAVLSIV

Asn-Trp-Phe-Asp-Ile-Thr-Asn-Trp-Leu-Trp-Tyr-Ile-Lys-Ile-Phe-  
Ile-Met-Ile-Val-Gly-Gly-Leu-Ile-Gly-Leu-Arg-Ile-Val-Phe-Ala-  
Val-Leu-Ser-Ile-Val

SEC ID N° 8

ENPYNTPVFAIKKDKSTKWRKLVDFRELNKRTQDF

Glu-Asn-Pro-Tyr-Asn-Thr-Pro-Val-Phe-Ala-Ile-Lys-Lys-Lys-Asp-  
Ser-Thr-Lys-Trp-Arg-Lys-Leu-Val-Asp-Phe-Arg-Glu-Leu-Asn-Lys-  
Arg-Thr-Gln-Asp-Phe

SEC ID N° 9

VASGYIEAEVIPAETGQETAYFLLKLAGRWPVKTI

Val-Ala-Ser-Gly-Tyr-Ile-Glu-Ala-Glu-Val-Ile-Pro-Ala-Glu-Thr-  
Gly-Gln-Glu-Thr-Ala-Tyr-Phe-Leu-Leu-Lys-Leu-Ala-Gly-Arg-Trp-  
Pro-Val-Lys-Thr-Ile

SEC ID N° 10

PDKSESELVSQIIEQLIKKEKVYLAWVPAHKGIGG

Pro-Asp-Lys-Ser-Glu-Ser-Glu-Leu-Val-Ser-Gln-Ile-Ile-Glu-Gln-  
Leu-Ile-Lys-Lys-Glu-Lys-Val-Tyr-Leu-Ala-Trp-Val-Pro-Ala-His-  
Lys-Gly-Ile-Gly-Gly

SEC ID N° 11

NRWQVMIVWQVDRMRIRTWKSLVKHHMYISRKAKG

Asn-Arg-Trp-Gln-Val-Met-Ile-Val-Trp-Gln-Val-Asp-Arg-Met-Arg-  
Ile-Arg-Thr-Trp-Lys-Ser-Leu-Val-Lys-His-His-Met-Tyr-Ile-Ser-

Arg-Lys-Ala-Lys-Gly

SEC ID N° 12

HPDKWTVQPIVLPEKDSWTFVNDIQKLVGKLNWASQ

His-Pro-Asp-Lys-Trp-Thr-Val-Gln-Pro-Ile-Val-Leu-Pro-Glu-Lys-  
Asp-Ser-Trp-Thr-Val-Asn-Asp-Ile-Gln-Lys-Leu-Val-Gly-Lys-Leu-  
Asn-Trp-Ala-Ser-Gln

SEC ID N° 13

PAIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMDDLIVGS

Pro-Ala-Ile-Phe-Gln-Ser-Ser-Met-Thr-Lys-Ile-Leu-Glu-Pro-Phe-  
Arg-Lys-Gln-Asn-Pro-Asp-Ile-Val-Ile-Tyr-Gln-Tyr-Met-Asp-Asp-  
Leu-Tyr-Val-Gly-Ser

SEC ID N° 14

MARGAHTNDVKQLTEAVQKIATESIVIWGKTPKFKL

Met-Arg-Gly-Ala-His-Thr-Asn-Asp-Val-Lys-Gln-Leu-Thr-Glu-Ala-  
Val-Gln-Lys-Ile-Ala-Thr-Glu-Ser-Ile-Val-Ile-Trp-Gly-Lys-Thr-  
Pro-Lys-Phe-Lys-Leu

SEC ID N° 15

EKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNNTMLNNTVGGHQ

Glu-Lys-Ala-Phe-Ser-Pro-Glu-Val-Ile-Pro-Met-Phe-Ser-Ala-Leu-  
Ser-Glu-Gly-Ala-Thr-Pro-Gln-Asp-Leu-Asn-Thr-Met-Leu-Asn-Thr-  
Val-Gly-Gly-His-Gln

SEC ID N° 16

NLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLK

Asn-Leu-Leu-Arg-Ala-Ile-Glu-Ala-Gln-Gln-His-Leu-Leu-Gln-Leu-  
Thr-Val-Trp-Gly-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Ala-Arg-Val-Leu-Ala-Val-

Glu-Arg-Tyr-Leu-Lys

SEC ID N° 17

ASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKCLKHIVWASR

Ala-Ser-Val-Leu-Ser-Gly-Gly-Glu-Leu-Asp-Arg-Trp-Glu-Lys-Ile-  
Arg-Leu-Arg-Pro-Gly-Gly-Lys-Lys-Lys-Tyr-Lys-Leu-Lys-His-Ile-  
Val-Trp-Ala-Ser-Arg

SEC ID N° 18

ELYKYKVVKIEPLGVAPTKAKRRVVQREKRAVGIG

Glu-Leu-Tyr-Lys-Tyr-Lys-Val-Val-Lys-Ile-Glu-Pro-Leu-Gly-Val-  
Ala-Pro-Thr-Lys-Ala-Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gln-Arg-Glu-Lys-Arg-  
Ala-Val-Gly-Ile-Gly

SEC ID N° 19

FPISPIETVPVVKLKPGMDGPKVKQWPLTEEKIKAL

Phe-Pro-Ile-Ser-Pro-Ile-Glu-Thr-Val-Pro-Val-Lys-Leu-Lys-Pro-  
Gly-Met-Asp-Gly-Pro-Lys-Val-Lys-Gln-Trp-Pro-Leu-Thr-Glu-Glu-  
Lys-Ile-Lys-Ala-Leu

SEC ID N° 20

QIYQEPFKNLKTGKYARMRGAHTNDVKQLTEAVQK

Gln-Ile-Tyr-Gln-Glu-Pro-Phe-Lys-Asn-Leu-Lys-Thr-Gly-Lys-Tyr-  
Ala-Arg-Met-Arg-Gly-Ala-His-Thr-Asn-Asp-Val-Lys-Gln-Leu-Thr-  
Glu-Ala-Val-Gln-Lys

SEC ID N° 21

NLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLK

Asn-Leu-Leu-Arg-Ala-Ile-Glu-Ala-Gln-Gln-His-Leu-Leu-Gln-Leu-  
Thr-Val-Trp-Gly-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Ala-Arg-Val-Leu-Ala-Val-  
Glu-Arg-Tyr-Leu-Lys

SEC ID N° 22

AGLKKKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAFTI

Ala-Gly-Leu-Lys-Lys-Lys-Lys-Ser-Val-Thr-Val-Leu-Asp-Val-Gly-  
Asp-Ala-Tyr-Phe-Ser-Val-Pro-Leu-Asp-Lys-Asp-Phe-Arg-Lys-Tyr-  
Thr-Ala-Phe-Thr-Ile

SEC ID N° 23

TTNQKTELQAIHLALQDSGLEVNIVTDSQYALGII

Thr-Thr-Asn-Gln-Lys-Thr-Glu-Leu-Gln-Ala-Ile-His-Leu-Ala-Leu-  
Gln-Asp-Ser-Gly-Leu-Glu-Val-Asn-Ile-Val-Thr-Asp-Ser-Gln-Tyr-  
Ala-Leu-Gly-Ile-Ile

SEC ID N° 24

VSQNYPIVQNLQGMVHQAI SPRTLNAWVKVVEEK

Val-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-Asn-Leu-Gln-Gly-Gln-Met-  
Val-His-Gln-Ala-Ile-Ser-Pro-Arg-Thr-Leu-Asn-Ala-Trp-Val-Lys-  
Val-Val-Glu-Glu-Lys

SEC ID N° 25

EAELELAENREILKEPVHGVYYDPSKDLIAEIQKQ

Glu-Ala-Glu-Leu-Glu-Leu-Ala-Glu-Asn-Arg-Glu-Ile-Leu-Lys-Glu-  
Pro-Val-His-Gly-Val-Tyr-Tyr-Asp-Pro-Ser-Lys-Asp-Leu-Ile-Ala-  
Glu-Ile-Gln-Lys-Gln

SEC ID N° 26

TPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIVLPEKD

Thr-Pro-Asp-Lys-Lys-His-Gln-Lys-Glu-Pro-Pro-Phe-Leu-Trp-Met-  
Gly-Tyr-Glu-Leu-His-Pro-Asp-Lys-Trp-Thr-Val-Gln-Pro-Ile-Val-  
Leu-Pro-Glu-Lys-Asp

SEC ID N° 27

EPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQN

Glu-Pro-Phe-Arg-Asp-Tyr-Val-Asp-Arg-Phe-Tyr-Lys-Thr-Leu-Arg-  
  
Ala-Glu-Gln-Ala-Ser-Gln-Glu-Val-Lys-Asn-Trp-Met-Thr-Glu-Thr-  
Leu-Leu-Val-Gln-Asn



SEC ID N° 28

NEWTLELLEELKSEAVRHFPRIWLHGLGQHIYETY

Asn-Glu-Trp-Thr-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Ser-Glu-Ala-  
Val-Arg-His-Phe-Pro-Arg-Ile-Trp-Leu-His-Gly-Leu-Gly-Gln-His-  
Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr

SEC ID N° 29

EGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPG

Glu-Gly-Leu-Ile-Tyr-Ser-Gln-Lys-Arg-Gln-Asp-Ile-Leu-Asp-Leu-  
Trp-Val-Tyr-His-Thr-Gln-Gly-Tyr-Phe-Pro-Asp-Trp-Gln-Asn-Tyr-  
Thr-Pro-Gly-Pro-Gly

SEC ID N° 30

HFLKEKGGLEGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPD

His-Phe-Leu-Lys-Glu-Lys-Gly-Gly-Leu-Glu-Gly-Leu-Ile-Tyr-Ser-  
Gln-Lys-Arg-Gln-Asp-Ile-Leu-Asp-Leu-Trp-Val-Tyr-His-Thr-Gln-  
Gly-Tyr-Phe-Pro-Asp

SEC ID N° 31

FPVRPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIY

Phe-Pro-Val-Arg-Pro-Gln-Val-Pro-Leu-Arg-Pro-Met-Thr-Tyr-Lys-  
Ala-Ala-Val-Asp-Leu-Ser-His-Phe-Leu-Lys-Glu-Lys-Gly-Gly-Leu-  
Glu-Gly-Leu-Ile-Tyr

SEC ID N° 32

FPQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDTGADDTVLE

Phe-Pro-Gln-Ile-Thr-Leu-Trp-Gln-Arg-Pro-Leu-Val-Thr-Ile-Lys-  
Ile-Gly-Gly-Gln-Leu-Lys-Glu-Ala-Leu-Leu-Asp-Thr-Gly-Ala-Asp-  
Asp-Thr-Val-Leu-Glu

SEC ID N° 33

LVITTYWGLHTGERDWHLGQGVSIWRKKRYSTQV

Leu-Val-Ile-Thr-Thr-Tyr-Trp-Gly-Leu-His-Thr-Gly-Glu-Arg-Asp-  
Trp-His-Leu-Gly-Gln-Gly-Val-Ser-Ile-Glu-Trp-Arg-Lys-Lys-Arg-  
Tyr-Ser-Thr-Gln-Val

**SEC ID N° 34**

APPEESFRFGEETTTTPSQKQEPIDKELYPLASLRS

Ala-Pro-Pro-Glu-Glu-Ser-Phe-Arg-Phe-Gly-Glu-Glu-Thr-Thr-Thr-  
Pro-Ser-Gln-Lys-Gln-Glu-Pro-Ile-Asp-Lys-Glu-Leu-Tyr-Pro-Leu-  
Ala-Ser-Leu-Arg-Ser

**SEC ID N° 35**

KRRVVQREKRAVGIGAMFLGFLGAAGSTMGAASMT

Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gln-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-Val-Gly-Ile-Gly-  
Ala-Met-Phe-Leu-Gly-Phe-Leu-Gly-Ala-Ala-Gly-Ser-Thr-Met-Gly-  
Ala-Ala-Ser-Met-Thr

**SEC ID N° 36**

GLGQHIYETYGDTWAGVEAIIRILQQLLFIFRIG

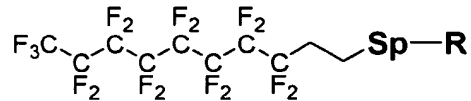
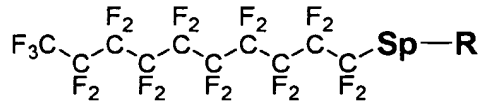
Gly-Leu-Gly-Gln-His-Ile-Tyr-Glu-Thr-Tyr-Gly-Asp-Thr-Trp-Ala-  
Gly-Val-Glu-Ala-Ile-Ile-Arg-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Leu-Phe-Ile-  
His-Phe-Arg-Ile-Gly

Los péptidos candidatos para su inclusión en una vacuna profiláctica o terapéutica para el VIH pueden ser péptidos de cualquiera de los dominios estructurales o funcionales Gag, Pol, Nef, Env, Vif, Vpr, Vpu, Tat o Rev en cualquiera de tales combinaciones.

5

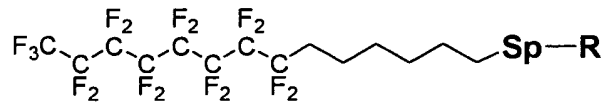
REIVINDICACIONES

1. Una construcción vector fluorocarbonado-antígeno de estructura



5

o



10

donde Sp es un resto espaciador químico eventual y R es un péptido inmunogénico derivado de un agente infeccioso, de una proteína autóloga o de un antígeno canceroso, cuyo péptido incluye al menos un epitopo del MHC de clase I o al menos un epitopo del MHC de clase II.

15 2. La construcción de la reivindicación 1, donde el agente infeccioso es un virus, una bacteria, una micobacteria, un parásito o un hongo.

3. La construcción de la reivindicación 1 ó 2, donde el péptido consiste en entre 7 y 70 aminoácidos.

20 4. La construcción de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el péptido incluye además al menos un epitopo de células B.

5. La construcción de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el péptido incluye dos o más epitopos solapantes.

25 6. La construcción de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el péptido incluye uno o más epitopos de una proteína vírica.

7. La construcción de la reivindicación 6, donde el virus es un virus de la inmunodeficiencia humana.

30 8. La construcción de la reivindicación 7, donde el péptido es un epitopo del VIH.

9. La construcción de la reivindicación 7, donde el péptido es uno o más epitopos env del VIH.

35 10. La construcción de la reivindicación 7 donde el péptido es seleccionado entre las SEC ID N° 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ó 36 o sus combinaciones.

40 11. La construcción de la reivindicación 9 donde el péptido es un péptido del epitopo env del VIH con una secuencia de aminoácidos de NNTRKRIRIQRGPGRAFVTIGK-NH<sub>2</sub> (SEC ID N° 38).

12. La construcción de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el péptido incluye múltiples epitopos y/o es un péptido de fusión.

45 13. La construcción de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, donde el virus es un virus de la gripe.

14. Una composición que contiene una o más construcciones vector fluorocarbonado-antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y uno o más soportes, excipientes, diluyentes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

15. La composición de la reivindicación 14 formulada para administración parenteral, oral, ocular, rectal, nasal, transdérmica, tópica o vaginal.

5 16. La composición de la reivindicación 14, donde la composición es un líquido, un sólido, un aerosol o un gas.

17. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, que incluye un adyuvante seleccionado entre el grupo consistente en derivados del dipéptido de muramilo (MDP), CpG, monofosforil lípido A, adyuvantes aceite en agua, adyuvantes agua en aceite, sales de aluminio, complejos inmunoestimulantes (ISCOM), liposomas, micropartículas, saponinas, citoquinas y toxinas y toxoides bacterianos.

10 18. La construcción de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 para uso en un método de tratamiento del organismo humano o animal mediante terapia.

15 19. La construcción de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 para uso como vacuna profiláctica o producto farmacéutico inmunoterapéutico.

20 20. El uso de la construcción de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 en la preparación de una vacuna profiláctica o de un producto farmacéutico inmunoterapéutico.

21. El uso de la reivindicación 20, donde la vacuna o producto es para administración parenteral, oral, ocular, rectal, nasal, transdérmica, tópica o vaginal.

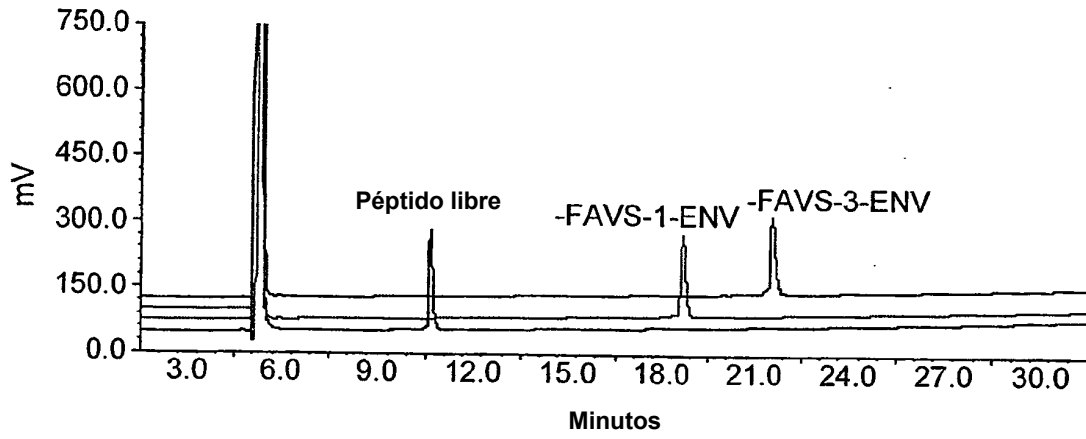


FIG. 1

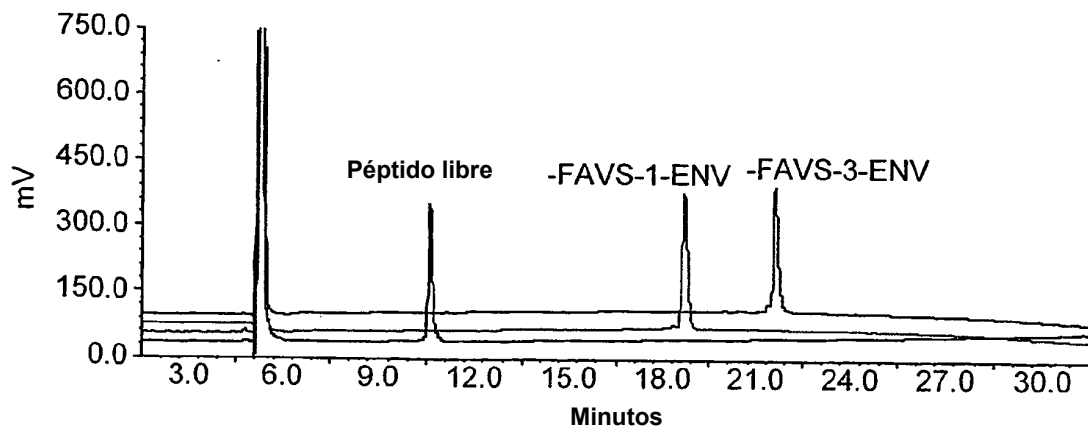
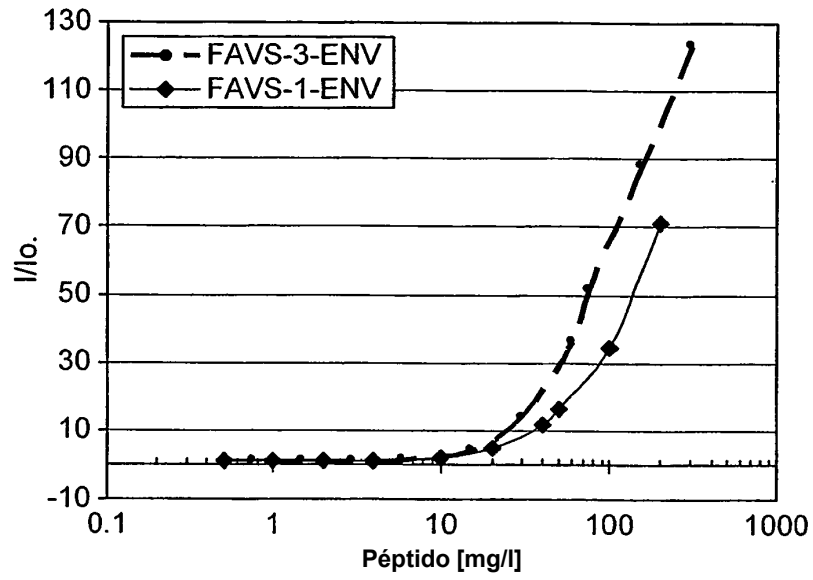
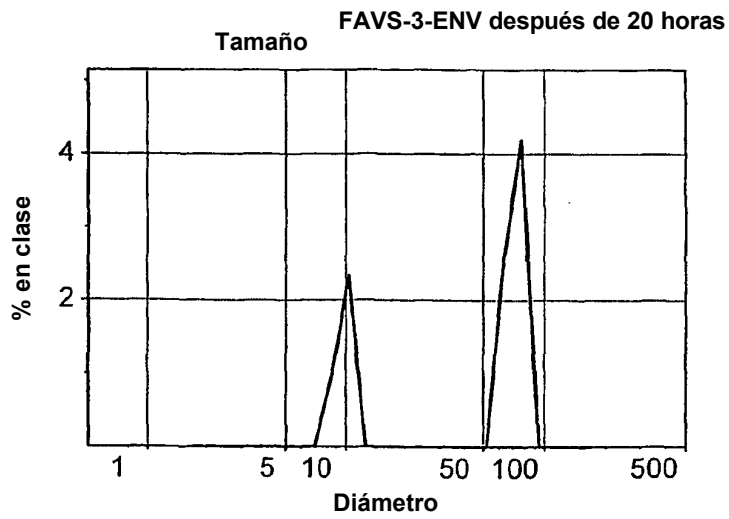
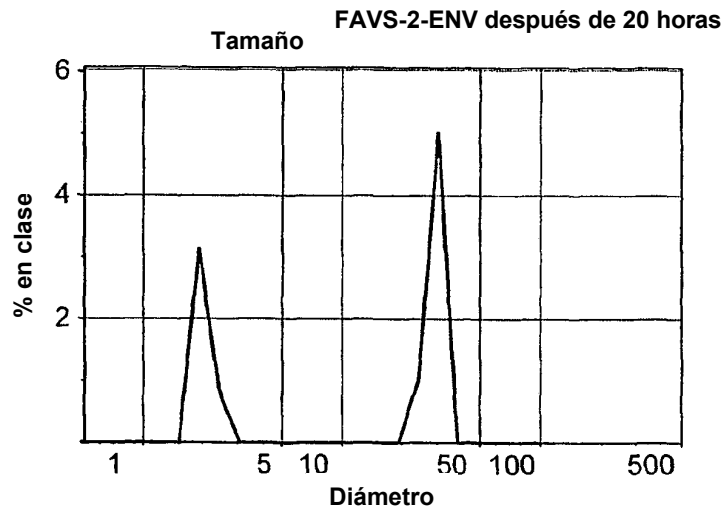
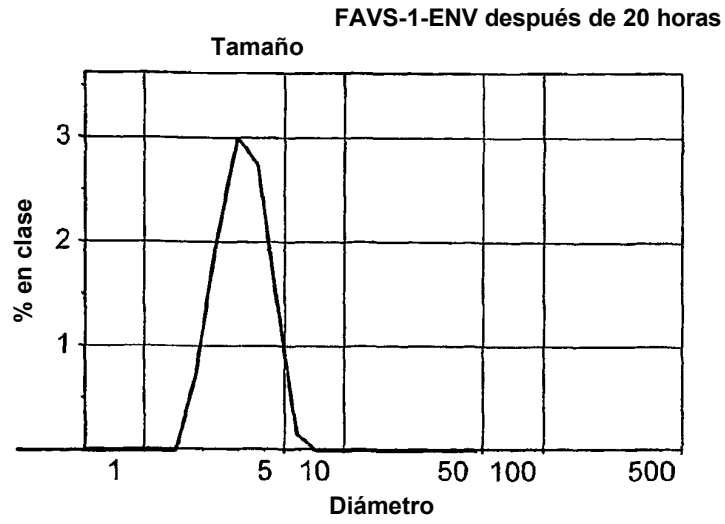


FIG. 2



Péptido	CMC (mg/l)	CMC (nmol/ml)
ENV	Ninguno	Ninguno
FAVS-1-ENV	15	1.6
FAVS-3-ENV	15	1.7

FIG. 3



**FIG. 4**

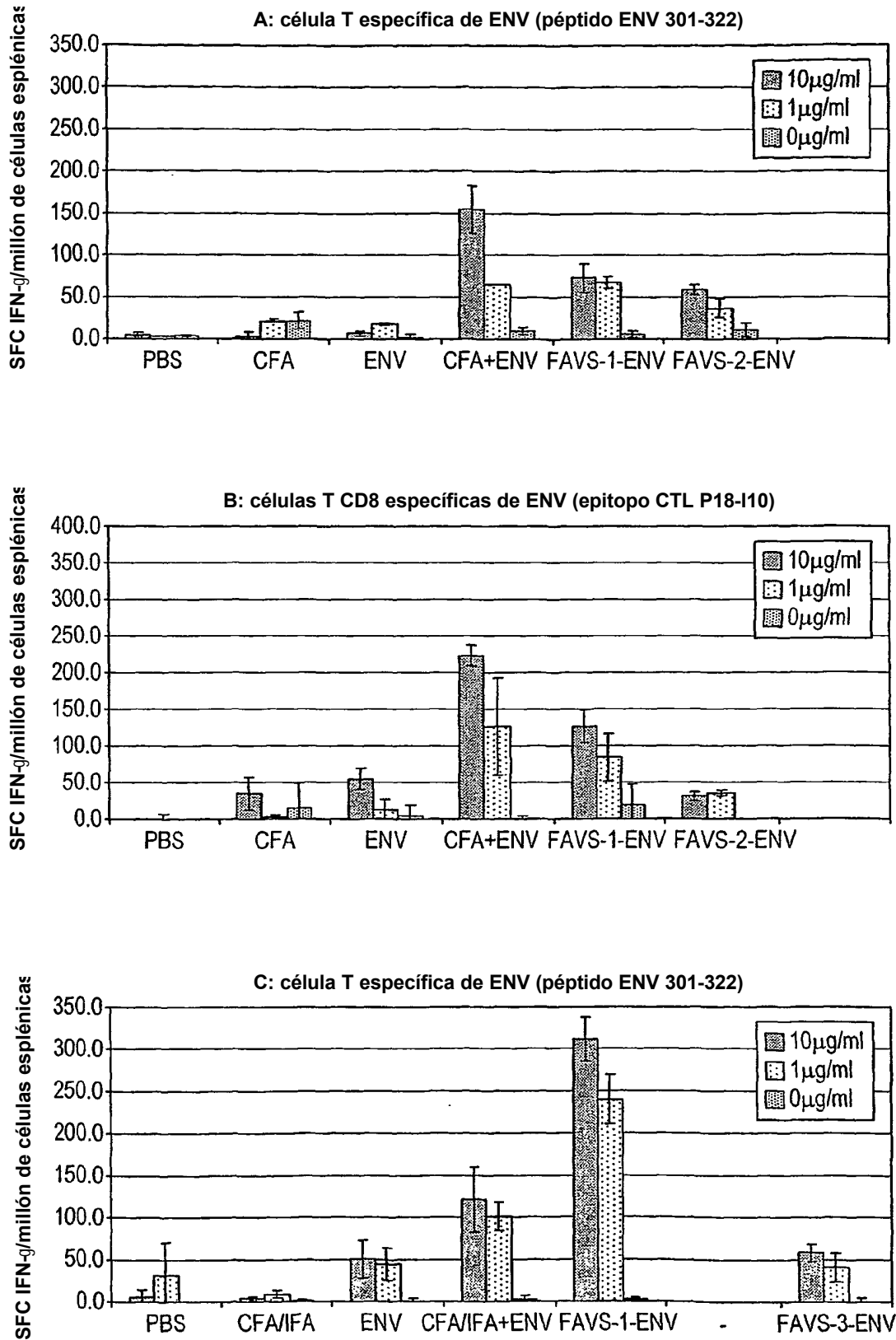
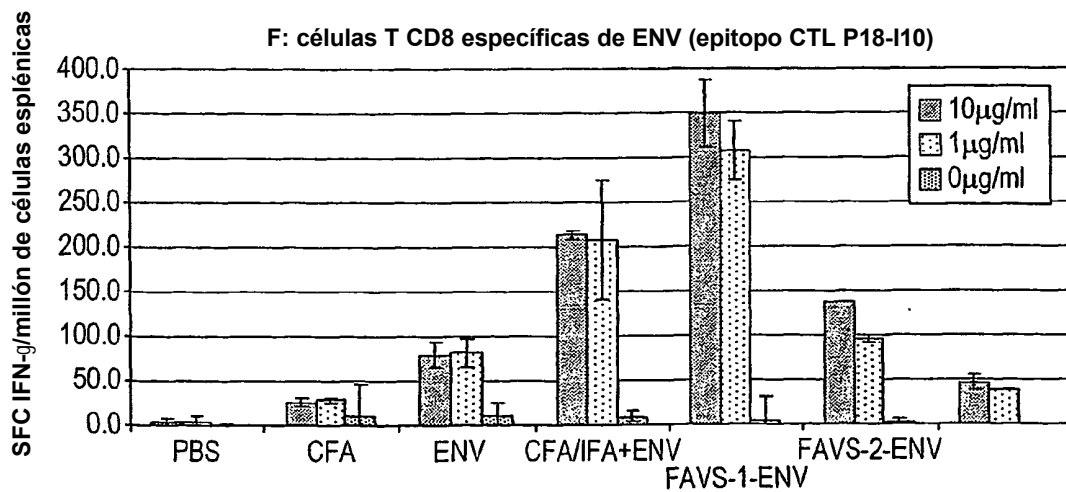
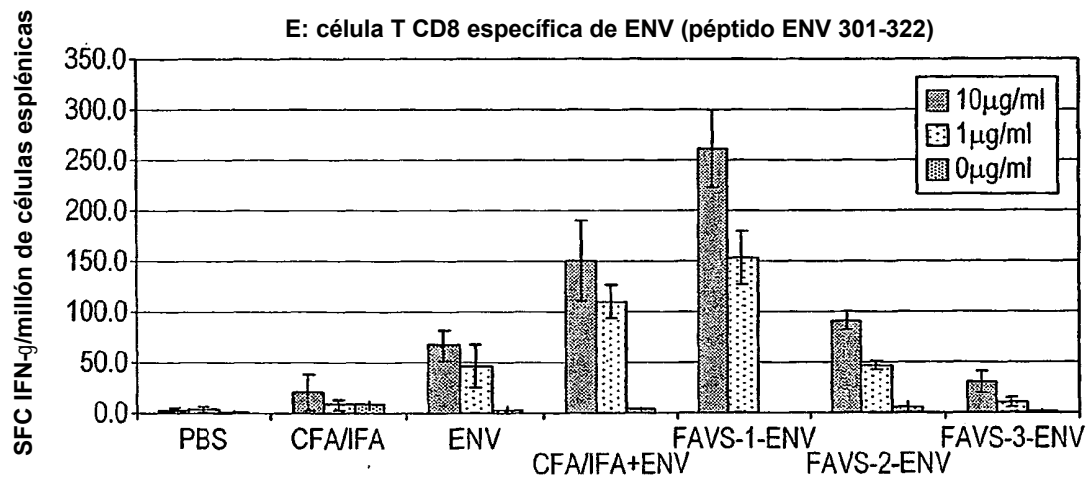
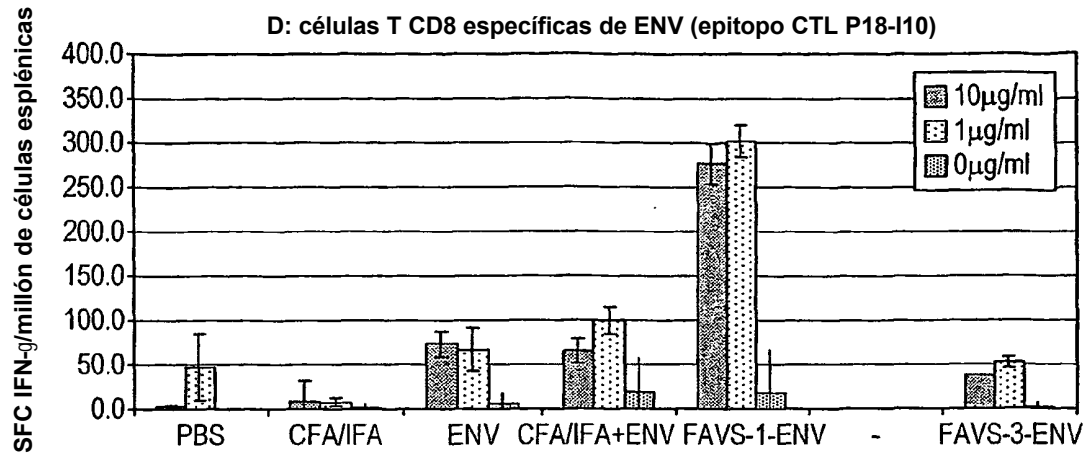


FIG. 5





**FIG. 5 cont.**

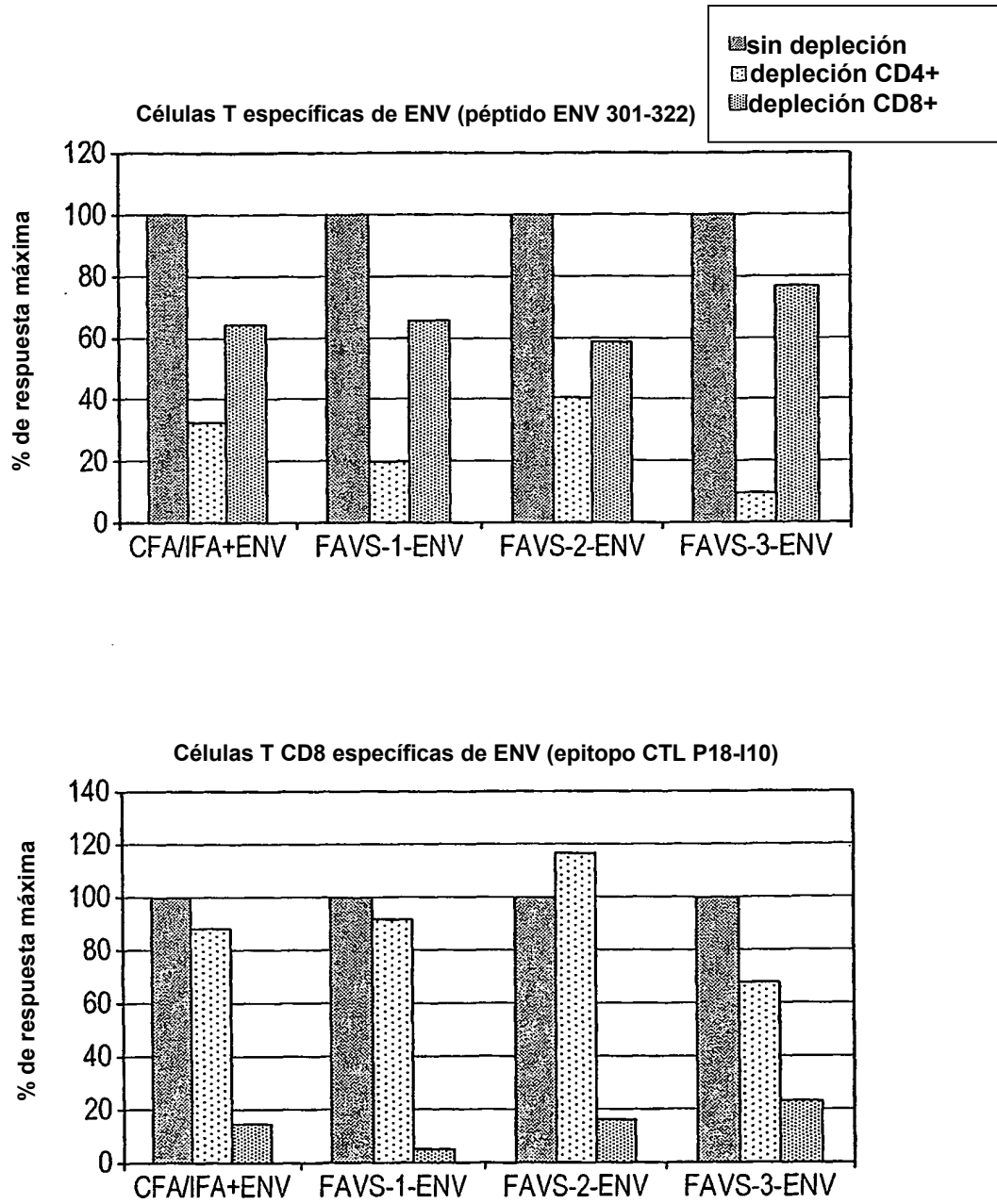
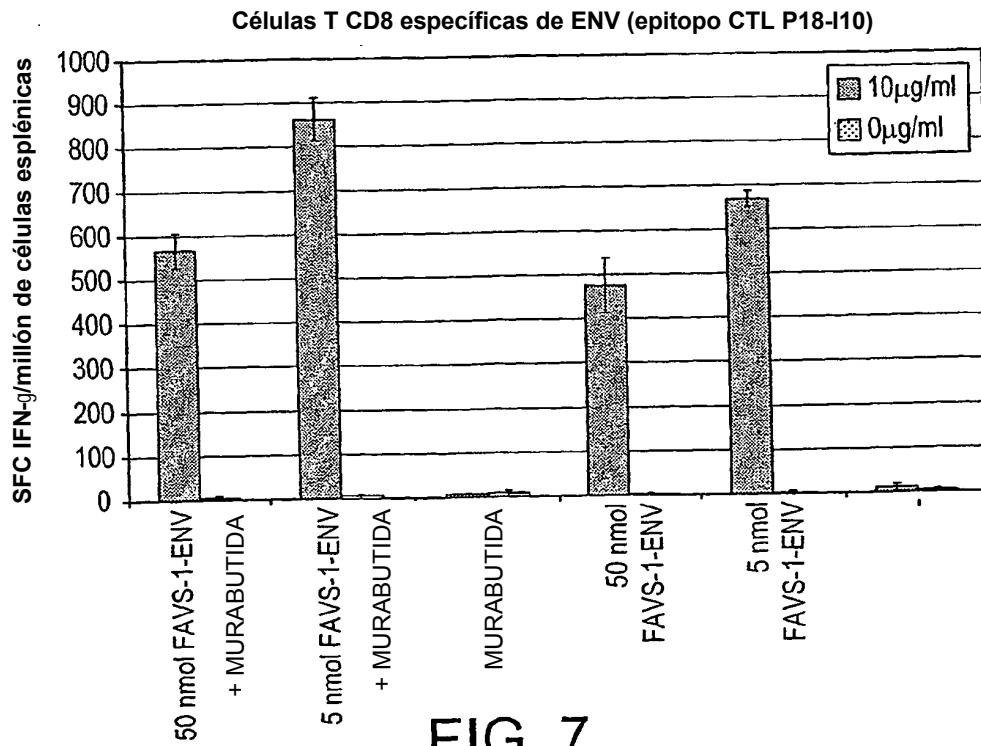
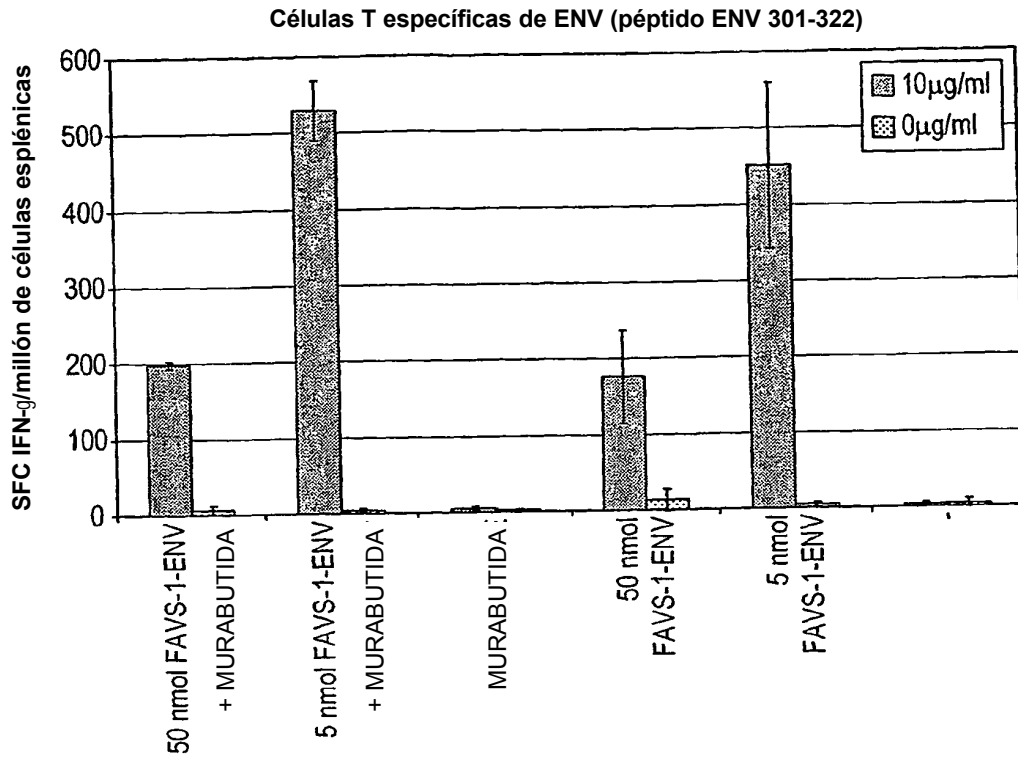


FIG. 6



**FIG. 7**

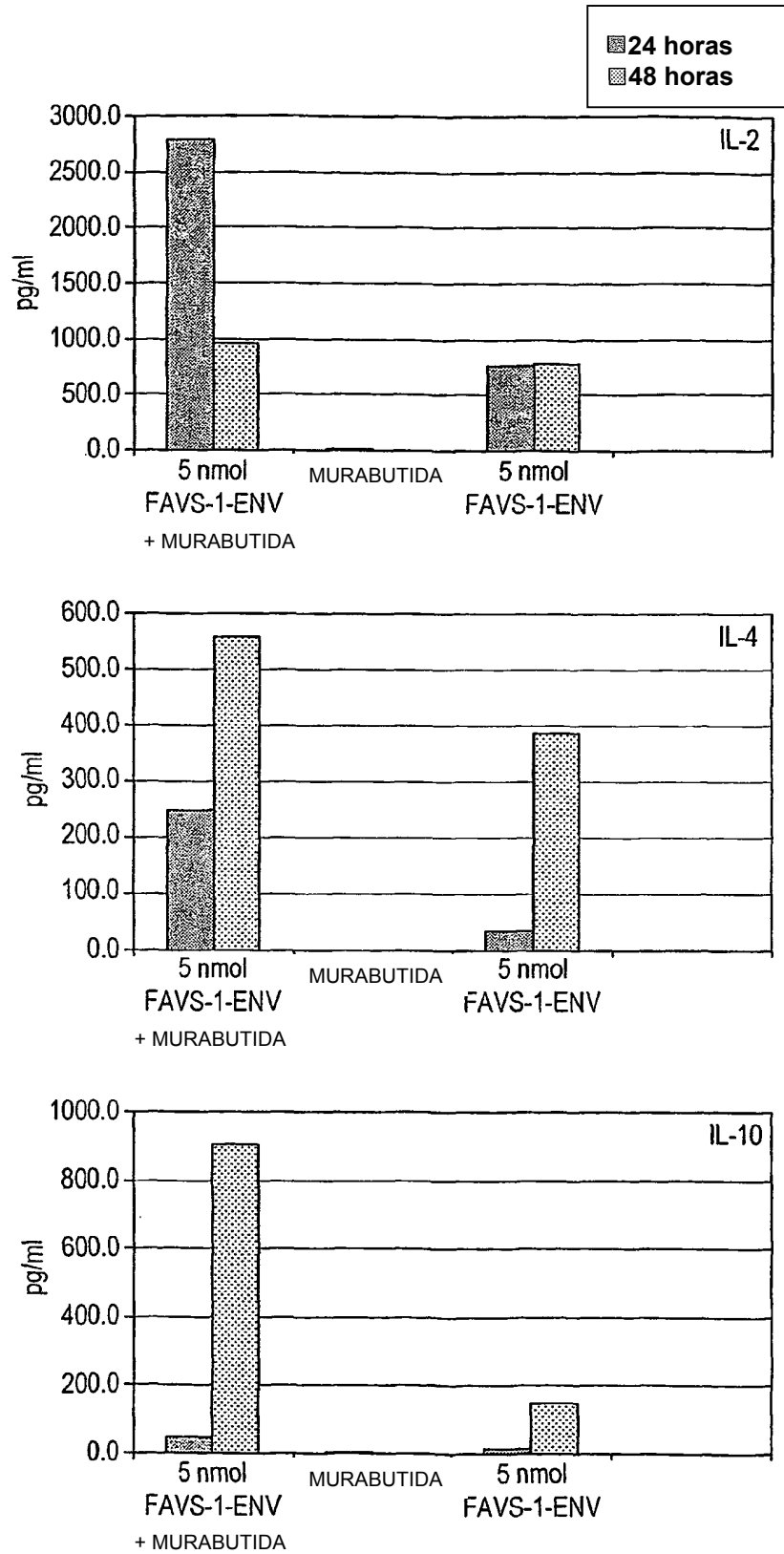
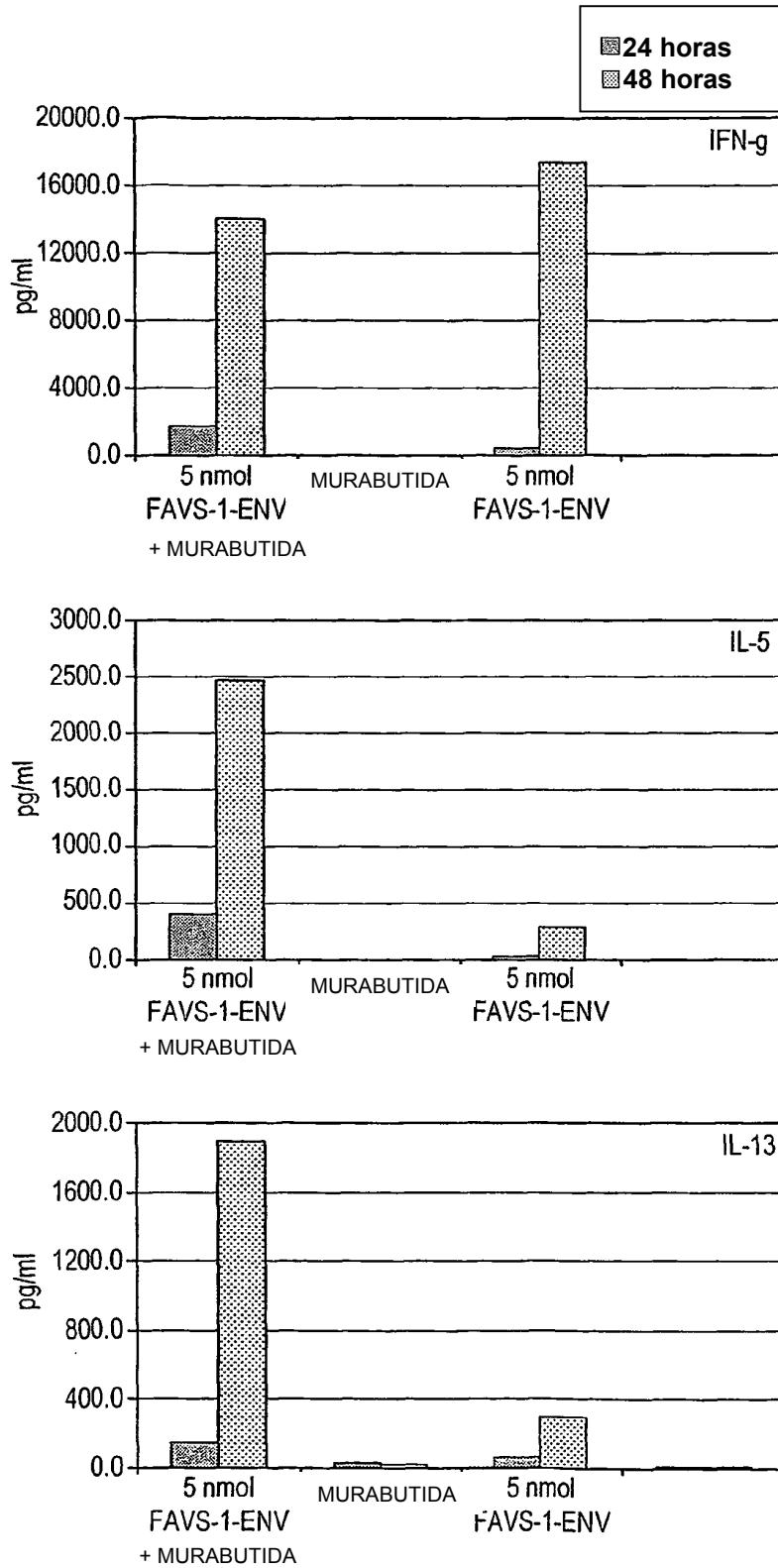
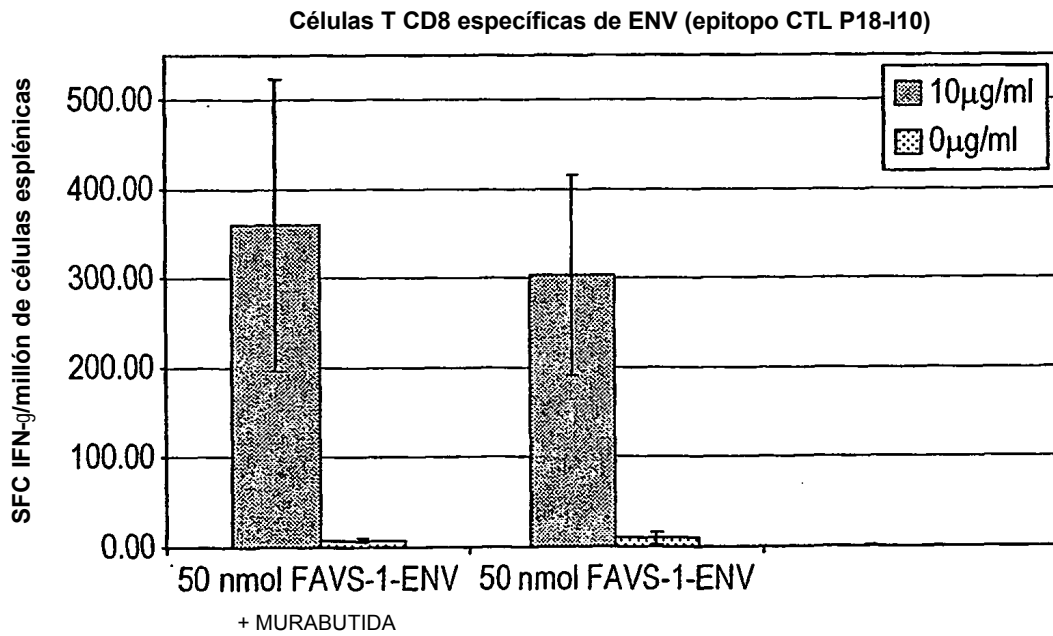
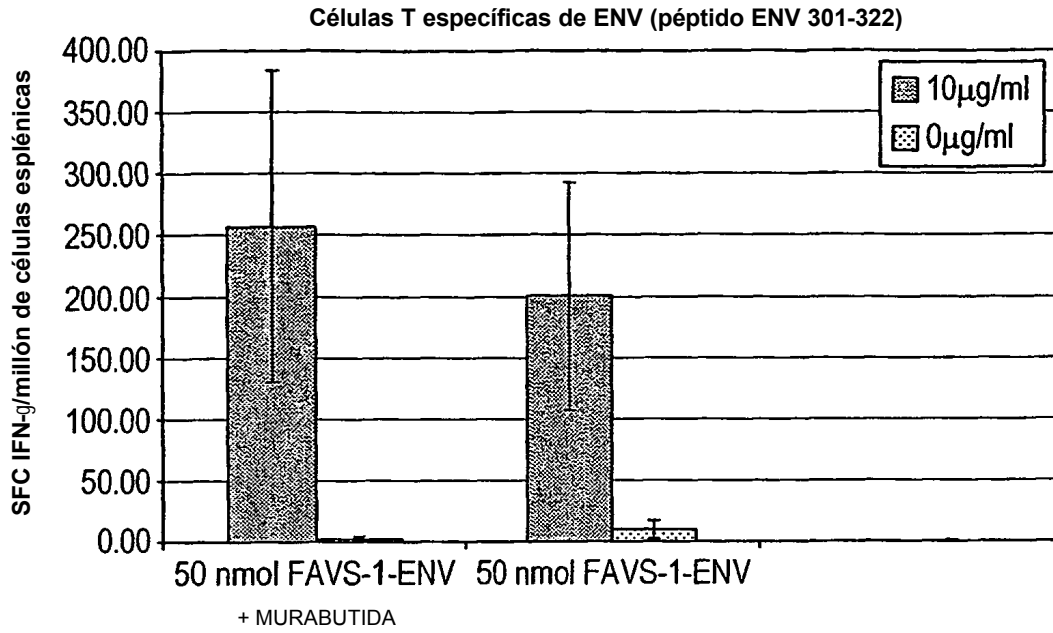


FIG. 8



**FIG. 8 cont.**



**FIG. 9**