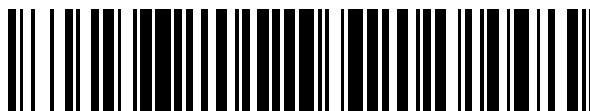


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 972**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/045** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61K 39/295** (2006.01)

**A61P 31/12** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2002 E 02737666 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 1409527**

54 Título: **Nuevos epítomos de linfocitos T citotóxicos del citomegalovirus humano (HCMV), poliepítomos, composiciones que los comprenden, y usos de diagnóstico y profilácticos y terapéuticos para ellos**

30 Prioridad:

**26.06.2001 AU PR593101**

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

**03.12.2014**

73 Titular/es:

**THE COUNCIL OF THE QUEENSLAND INSTITUTE  
OF MEDICAL RESEARCH (100.0%)  
300 HERSTON ROAD  
HERSTON, QLD 4029, AU**

72 Inventor/es:

**KHANNA, RAJIV;  
ELKINGTON, REBECCA ANN y  
WALKER, SUSAN JENNIFER**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 523 972 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**

Nuevos epítomos de linfocitos T citotóxicos del citomegalovirus humano (HCMV), poliepitomos, composiciones que los comprenden, y usos de diagnóstico y profilácticos y terapéuticos para ellos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a epítomos de péptidos aislados y composiciones que los comprenden para uso para provocar respuestas de CTL frente a citomegalovirus (CMV). En particular, la presente invención se refiere a péptidos aislados que comprenden uno o más epítomos de CTL del citomegalovirus humano (HCMV), y a composiciones de vacuna que los comprenden, para uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de infección por  
 10 CMV frente a seres humanos. La presente invención también proporciona métodos para producir linfocitos T aislados capaces de reconocer epítomos del péptido HCMV, y métodos para producir tales linfocitos T. Los epítomos de péptidos aislados y los linfocitos T son particularmente útiles en la monitorización de respuestas inmunitarias en diversos marcos clínicos (por ejemplo trasplante) y en el diagnóstico de infección por HCMV.

Antecedentes de la invención

1. Información general

15 Esta memoria descriptiva contiene información de secuencia de aminoácidos preparada usando Patentin Version 3.1, presentada aquí después del Resumen. Cada secuencia se identifica en el listado de secuencias mediante el indicador numérico <210>, seguido del identificador de la secuencia (por ejemplo <210>1, <210>2, etc.). La longitud de cada secuencia y el organismo fuente se indican mediante la información proporcionada en los campos de los indicadores numéricos <211> y <213>, respectivamente. Las secuencias citadas en la memoria descriptiva se  
 20 definen mediante el término "SEC ID NO: ", seguido del identificador de la secuencia (por ejemplo, SEC ID NO: 1 se refiere a la secuencia designada <400>1).

Como se usa aquí, la expresión "derivado de" se debe tomar para indicar que un número entero especificado se puede obtener de una fuente particular, sin embargo no necesariamente de forma directa de esa fuente.

25 Excepto que el contexto lo requiera de otro modo o se señale específicamente lo contrario, los números enteros, etapas, o elementos de la invención citados aquí como números enteros, etapas o elementos singulares engloban claramente tanto las formas singular como plural de los números enteros, etapas o elementos citados.

A lo largo de esta memoria descriptiva, excepto que el contexto lo requiera de otro modo, la palabra "comprender", o variaciones tales como "que comprende" o "comprendiendo", se entenderá que implica la inclusión de una etapa o elemento o número entero señalado, o grupo de etapas o elementos o números enteros, pero no la exclusión de  
 30 cualquier otra etapa o elemento o número entero, o grupo de elementos o números enteros.

La presente invención se lleva a cabo sin experimentación innecesaria usando, excepto que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, virología, tecnología de ADN recombinante, síntesis peptídica en disolución, síntesis peptídica en fase sólida, e inmunología. Tales procedimientos se describen, por ejemplo, en los siguientes textos.

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

10. Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. Land y Fenichel, R.L. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73 336-342

11. Merrifield, R.B. (1963). *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154.

5 12. Barany, G. y Merrifield, R.B. (1979) en *The Peptides* (Gross, E. y Meienhofer, J. eds.), vol. 2, p. 1-284, Academic Press, New York.

13. Wunsch, E., ed. (1974) *Synthese von Peptiden en Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie* (Müller, E., ed.), vol. 15, 4ª ed., Partes 1 y 2, Thieme, Stuttgart.

14. Bodanszky, M. (1984) *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg.

15. Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg.

10 16. Bodanszky, M. (1985) *Int. J. Peptide Protein Res.* 25, 449-474.

17. *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).

## 2. Descripción de la técnica relacionada

15 HCMV pertenece a la subfamilia  $\eta$  del grupo del virus del herpes, que son grandes virus de ADN estrictamente específicos de especies hospedantes, que codifican alrededor de 170-200 polipéptidos antigénicamente distintos. HCMV se encuentra universalmente en todas las localizaciones geográficas y grupos socioeconómicos, e infecta entre 50 y 85% de adultos (Alford y Brief, en: *Virology*, 2ª Edición, Fields et. al. eds, Raven Press, 1990).

20 Para la mayoría de las personas sanas que adquieren infección primaria por HCMV después del nacimiento, hay pocos síntomas y ninguna consecuencia de salud a largo plazo. Ocasionalmente, algunos adultos con infección primaria por HCMV presentan síntomas de un síndrome semejante a la mononucleosis, con fiebre prolongada y una hepatitis leve. Una vez infectado con HCMV, el virus permanece dormido estableciendo un depósito de células infectadas latentemente a partir de las cuales se produce la reactivación crónica de bajo grado en el ciclo productivo (lítico) del virus a lo largo de la vida. Aunque los factores que controlan la latencia y reactivación no están completamente comprendidos, la alteración del sistema inmunitario mediado por las células del cuerpo, ya sea por  
25 inmunosupresión inducida por fármacos o infección por ciertos patógenos, puede reactivar consistentemente el virus (Zaia y Forman, *Infect Dis Clin North Am* 9, 879-900, 1995).

30 Hay situaciones clínicas en las que la infección por HCMV es una causa significativa de morbimortalidad. Por ejemplo, la infección por HCMV plantea riesgos de salud importantes al feto en el útero, a personas que trabajan con niños, y a individuos que tienen un sistema inmunitario comprometido, tales como, por ejemplo, aquellos infectados con HIV-1 o que han sufrido transplante de órganos (Britt, *Trends Microbiol* 4, 34-81, 1996; Plotkin, *Pediatr Infect Dis J* 18, 313-325, 1999).

35 Con respecto particular a los riesgos de salud para un feto en el útero, esos riesgos parecen estar casi exclusivamente asociados co mujeres no inmunitarias que se infectan durante el embarazo (Fowler et. al, *New Engl J Med* 326, 663-667, 1992; Murph et. al., en: *Epidemiology of congenital cytomegalovirus infection: maternal risk factors and molecular analysis cytomegalovirus strains.* 1998). Los estudios epidemiológicos han mostrado que 80%-90% de bebés no nacidos en desarrollo que adquieren infección por HCMV congénita presentan un patrón variable de secuelas patológicas en los primeros pocos años de vida, que pueden incluir pérdida de audición, alteración de la visión, y retraso mental. Otro 5% a 10% de infantes que están infectados pero sin síntomas en el nacimiento tendrán subsiguientemente grados variables de problemas de audición y mentales o de coordinación. En 1996 solo, se  
40 estimaron más de 17.000 casos de secuelas o muerte inducida por HCMV en Europa y en los Estados Unidos de América (Plotkin, *Pediatr Infect Dis J* 18, 313-325, 1999).

Adicionalmente, estudios recientes sugieren que individuos seropositivos a HCMV que han sufrido angioplastia coronaria desarrollan restenosis más frecuentemente que los pacientes seronegativos (Field, *Antivir Chem Chemother* 10, 219-232, 1999), aunque aún se ha de demostrar una relación de causa-efecto.

45 Hay también una probabilidad de que exista un beneficio terapéutico significativo a derivar para individuos que pertenecen a esos grupos de alto riesgo, reduciendo su carga de HCMV. En consecuencia, existe la necesidad de una vacuna eficaz para proporcionar tal reducción en la carga de HCMV.

50 Ha habido un número de intentos en el diseño de una vacuna frente al HCMV (para una revisión, véanse Britt, *Trends Microbiol* 4, 34-81, 1996; Plotkin, *Pediatr Infect Dis J* 18, 313-325, 1999), usando cepas de HCMV atenuadas o vacunas de subunidades.

Las primeras vacunas contra HCMV se basaron en la inmunización usando cepas atenuadas de HCMV, tales como, por ejemplo, la cepa Towne y la cepa AD-169 (Elek y Stern, *Lancet* 1, 1-5, 1974; Neff et. al., *Proc Soc Exp Biol Med* 160, 32-37, 1979). Aunque se mostró que ambos virus atenuados provocan respuestas celulares y humorales,

ninguna de las vacunas evitó la infección fetal en mujeres embarazadas que experimentan una infección primaria por HCMV. Además, los voluntarios normales vacunados mostraron protección limitada frente a la exposición vírica usando la cepa Toledo de HCMV (Quinnan et. al., *Ann Intern Med* 101, 478-483, 1984; Adler et. al., *Pediatr Infect Dis J.* 17, 200-206, 1998). Las vacunas de subunidades se han basado en formulaciones de un solo antígeno de HCMV, tales como, por ejemplo, el polipéptido de glicoproteína B (gB) de longitud completa en combinación con el adyuvante MF59 (Chiron), o como alternativa, un polipéptido de gB de longitud completa recombinante expresado usando un vector vírico (Pass et. al., *J Infect Dis* 180, 970-975, 1999; Adler et. al. *J Infect Dis* 180, 843-846, 1999). Adicionalmente, recientemente se ha probado en un ensayo clínico un virus de la viruela del canario que expresa un polipéptido de pp65 de HCMV recombinante de longitud completa, y se ha mostrado que provoca una fuerte respuesta CTL y de anticuerpos frente a este antígeno (Gyulai et. al., *Proceedings of the Seventh International Cytomegalovirus Workshop*, Brighton, UK, 7-9 de marzo de 1999, resumen).

Sin embargo, es probable que las formulaciones de vacunas basadas en uno o más antígenos de HCMV de longitud completa presenten un número de limitaciones. Por ejemplo, la expresión de proteínas de HCMV tales como pp65 puede inhibir el procesamiento proteosómico de IE-1 a través de una actividad de cinasa asociada (Gilbert et al., *Nature* 383, 720, 1996). Además, también se sabe que otros genes asociados con la fase temprana de infección por HCMV interfieren en diversas etapas de la ruta del procesamiento del MHC clase I y su presentación (Reddehase, *Curr. Opin. Immunol.* 12, 390-396, 2000).

Las vacunas a base de epítomos de CTL proporcionan una tecnología alternativa para superar las limitaciones potenciales asociadas con el uso de antígenos de HCMV de longitud completa. Sin embargo, el grado elevado de polimorfismo de HLA en poblaciones humanas presenta un obstáculo importante para la aplicación práctica de epítomos de CTL definidos como vacunas. Se encuentra bajo investigación una vacuna basada en un único epítomo de CTL específico de pp65 de HCMV (NLVPMVATV; SEC ID NO: 5) enlazado al epítomo de linfocitos T auxiliares de unión a pan-HLA-DR y una o dos moléculas de ácido palmítico (Zaia et al., *Hematol. (Am. Soc. Hematol. Educat. Program.)* 339-355, 2000; La Rosa et al., *Blood* 97, 1776-1786, 2001).

Para cualquier vacuna de subunidades frente a HCMV, se supone que la protección frente a HCMV se puede lograr induciendo inmunidad celular frente a un antígeno viriónico individual. Hay pruebas de que, en portadores sanos del virus HCMV, las respuestas de linfocitos T subdominantes también están dirigidas contra otros antígenos viriónicos, tales como, por ejemplo, pp150, IE-1, y gH, que también pueden desempeñar un papel crucial a la hora de controlar la reactivación de HCMV (para un repaso, véanse *Trends Microbiol* 4, 34-38, 1996; Ito, *Nippon Rinsho* 56, 62-68, 1998).

Claramente, el desarrollo de una vacuna eficaz frente a HCMV requiere la elucidación de antígenos víricos que activan una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) protectora y la determinación de epítomos de CTL inmunodominantes en esos antígenos.

Los epítomos de CTL se han descrito para dos polipéptidos de HCMV inmunodominantes, en particular pp65 e IE-1 (Borysiewicz et al., *J. Exp. Med.* 168, 919, 1988; Sissons, *J. Royal. Coll. Phys., Lond.* 20, 40, 1986; Wills et al., *J. Virol.* 70, 7569, 1996; Kern et al., *Intervirology* 42, 322, 1999; Weekes et al., *J. Virol.* 73, 2099, 1999; Reddehase, *Curr. Opin. Immunol.* 12, 390-396, 2000).

Los epítomos de CTL conocidos ejemplares derivados de pp65 de HCMV se describen aquí con referencia a las SEC ID Nos: 1-17 y 55. Se describen epítomos enunciados como SEC ID Nos: 1-17 que tienen las siguientes restricciones de HLA:

1. SVLGPISGHVLK (SEC ID NO: 1) está restringida a HLA A\*11xx (Diamond, *USSN* 6.074.645, 13 de junio de 2000);
2. FTSQYRIQGKL (SEC ID NO: 2) está restringida a HLA A\*2402 (Longmate et al., *Immunogenet.* 52, 165-173, 2000);
3. FVFPTKDVALR (SEC ID NO: 3) está restringida a HLA A\*68xx (Longmate et al., *Immunogenet.* 52, 165-173, 2000);
4. FPTKDVAL (SEC ID NO: 4) está restringida a HLA B\*35xx (Diamond *USSN* 6.074.645, 13 de junio de 2000);
5. NLVPMVATV (SEC ID NO: 5) está restringida a HLA A\*02xx (Wills et al., *J. Virol.* 70, 7569-7579, 1996);
6. MLNIPSINV (SEC ID NO: 6) está restringida a HLA A\*0201 (Solache et al., *J. Immunol.* 163, 5512-5518, 1999);
7. RIFAELEGV (SEC ID NO: 7) está restringida a HLA A\*0201 (Diamond et al., *Blood* 90, 1751-1767, 1997);
8. TPRVTGGGGAM (SEC ID NO: 8) está restringida a HLA B\*07xx (Wills et al., *J. Virol.* 70, 7569-7579, 1996; Kern et al., *Nature Med.* 4, 975-978, 1998; Diamond *USSN* 6.074.645, 13 de junio de 2000);

9. RIPHERNGFTVL (SEC ID NO: 9) está restringida a HLA B\*07xx (Weekes et al., J. Virol. 73, 2099-2108, 1999; Diamond USSN 6.074.645, 13 de junio 2000);

10. RLLQTGIHV (SEC ID NO: 10) está restringida a HLA A\*0201 (Solache et al., J. Immunol. 163, 5512-5518, 1999);

5 11. VIGDQYVKV (SEC ID NO: 11) está restringida a HLA A\*0201 (Solache et al., J. Immunol. 163, 5512-5518, 1999);

12. ALFFFDIDL (SEC ID NO: 12) está restringida a HLA A\*0201 (Solache et al., J. Immunol. 163, 5512-5518, 1999);

10 13. YSEHPTFTSQY (SEC ID NO: 13) está restringida a HLA A\*01xx (Diamond, USSN 6.074.645, 13 de junio de 2000);

14. VLCPKNMII (SEC ID NO: 14) está restringida a HLA A\*0201 (Solache et al., J. Immunol. 163, 5512-5518, 1999);

15. DIYRIFAEL (SEC ID NO: 15) está restringida a HLA A\*0201 (Solache et al., J. Immunol. 163, 5512-5518, 1999);

15 16. ILARNLVPMV (SEC ID NO: 16) está restringida a HLA A\*0201 (Diamond et al., Blood 90, 1751-1767, 1997; Solache et al., J. Immunol. 163, 5512-5518, 1999); y

17. EFFWDANDIY (SEC ID NO: 17) está restringida a HLA B\*44xx (Longmate et al., Immunogenet. 52, 165-173, 2000).

20 El epítipo enunciado en SEC ID NO: 55 (IPSINVHHY) fue descrito por Gavin et al., J Immunol. 151, 3971-3980, 1993.

Los epítipos de CTL conocidos ejemplares derivados de IE-1 de HCMV se describen aquí con referencia a SEC ID Nos: 18-20. Respectivamente, esos epítipos se describen por tener las siguientes restricciones de HLA:

1. YILEETSVM (SEC ID NO: 18) está restringida a HLA A\*02xx (Retiere et al., J. Virol. 74, 3948-3952, 2000);

25 2. CVETMCNEY (SEC ID NO: 19) está restringida a HLA B\*18xx (Retiere et al., J. Virol. 74, 3948-3952, 2000); y

3. RRIEEICMK (SEC ID NO: 20) está restringida a HLA B\*27xx (Salquin et al., Eur. J. Immunol. 30, 2531-2539, 2000).

30 Aunque hay ciertas pruebas que sugieren que los antígenos de HCMV distintos de pp65 o IE-1 también pueden ser útiles para provocar el control mediante CTL de la infección por HCMV, tales como, por ejemplo, pp150 de HCMV y gB de HCMV, la información sobre la utilidad de esos antígenos es limitada (Gyulai et al., J. Infect. Dis. 181, 537-546, 2000). Un epítipo de CTL conocido ejemplar procedente de pp150 de HCMV se describe aquí con referencia a SEC ID NO: 21, que tiene la siguiente restricción de HLA:

1. TTVYPPSSTAK (SEC ID NO: 21) está restringida a HLA A\*0301 (Longmate et al., Immunogenet. 52, 165-173, 2001).

35 La solicitud de patente WO 98/02746 ya describe péptidos que derivan del antígeno pp50 de HCMV.

#### Sumario de la invención

40 En el trabajo que condujo a la presente invención, se buscó cartografiar de forma exhaustiva respuestas de CTL frente a una amplia variedad de antígenos de HCMV que son expresados en diferentes etapas de la infección y desempeñan un papel importante en la patogénesis global de enfermedades asociadas a HCMV, en particular pp28, pp50, pp65, pp150, pp71, gH, gB, IE-1, IE-2, US2, US3, US6, US11, y UL18.

45 Se empleó una estrategia muy eficiente y rápida, basada en el uso de algoritmos predictivos, ELISPOT y ensayos de citotoxicidad, para realizar de forma exhaustiva el perfil de respuestas de CTL restringidas a HLA clase I frente a HCMV en una cohorte de veinticuatro portadores sanos del virus. Los análisis preliminares de estas secuencias antigénicas de HCMV, usando algoritmos a base de ordenador y ensayos de estabilización de péptidos, sugiere fuertemente que estos antígenos contenían epítipos de CTL. Los péptidos sintéticos se evaluaron subsiguientemente para determinar su capacidad para inducir actividad de CTL en linfocitos T de sangre periférica procedentes de donantes seropositivos, según se mide mediante producción de IFN- $\gamma$  en ELISPOT.

La invención, en su forma más amplia, se define por las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes. El epítipo que consiste en la secuencia expuesta en SEC ID NO: 165 representa una característica técnica especial de la invención reivindicada:

- 5 1. Un péptido aislado que comprende un epítipo de linfocitos T citotóxicos (CTL) de un antígeno pp50 de un citomegalovirus de seres humanos (HCMV), en el que dicho péptido tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 a 20 aminoácidos contiguos de dicho antígeno pp50, y en el que el epítipo de CTL consiste en la secuencia expuesta en SEC ID NO: 165 (VTEHDTLLY), o un lipopéptido que comprende dicho péptido.
2. El péptido o lipopéptido aislado de la reivindicación 1, en el que dicho péptido o lipopéptido se une a una célula de MHC Clase I que expresa CD8+.
- 10 3. El péptido o lipopéptido aislado según la reivindicación 1, en el que dicho péptido o lipopéptido se une a una célula de MHC Clase I que expresa HLA A1.
4. El péptido o lipopéptido aislado según la reivindicación 3, en el que dicho péptido o lipopéptido se une a una célula CD8+ que expresa HLA A1.
- 15 5. El péptido o lipopéptido aislado según la reivindicación 4, en el que dicho péptido consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 165 (VTEHDTLLY).
6. Un péptido de poliepítipo aislado que comprende dos o más epítipos de linfocitos T citotóxicos (CTL), en el que uno de dichos epítipos de CTL consiste en una secuencia expuesta en SEC ID NO: 165 (VTEHDTLLY), y uno o más de dichos epítipos de CTL consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- 20 SEC ID NO: 46 (YSEHPTFTSQY);  
 SEC ID NO: 5 (NLVPMVATV);  
 SEC ID NO: 101 (VLEETSVML);  
 SEC ID NO: 7 (RIFAELEGV);  
 SEC ID NO: 254 (IIYTRNHEV);
- 25 SEC ID NO: 135 (IMREFNSYK);  
 SEC ID NO: 21 (TTVYPPSSTAK);  
 SEC ID NO: 1 (SVLGPISGHVLK);  
 SEC ID NO: 116 (AYAQKIFKIL);  
 SEC ID NO: 33 (QYDPVAALF);
- 30 SEC ID NO: 2 (FTSOYRIQGKL);  
 SEC ID NO: 37 (YVKYVYESF);  
 SEC ID NO: 15 (DIYRIFAEL);  
 SEC ID NO: 3 (FVFPTKDVALR);  
 SEC ID NO: 134 (NVRRSWEEL);
- 35 SEC ID NO: 132 (KARDHLAVL);  
 SEC ID NO: 41 (QARLTVSGL);  
 SEC ID NO: 8 (TPRVTGGGAM);  
 SEC ID NO: 109 (KARAKKDEL);  
 SEC ID NO: 113 (QIKVRVDMV);
- 40 SEC ID NO: 112 (ELRRKMMYM);  
 SEC ID NO: 42 (RRRHRQDAL);  
 SEC ID NO: 162 (ARVYEIKCR);

SEC ID NO: 66 (CPSQEPMSIYVY);

SEC ID NO: 4 (FPTKDVAL);

SEC ID NO: 55 (IPSINVHHY);

SEC ID NO: 260 (FEQPTETPP);

5 SEC ID NO: 189 (YAYIYTTYL);

SEC ID NO: 56 (QEFFWDANDIY);

SEC ID NO: 170 (YEQHKITSY);

SEC ID NO: 51 (QEPMSIYVY);

SEC ID NO: 47 (SEHPTFTSQY); y

10 SEC ID NO: 63 (QAIRETVEL).

7. El péptido de poliepítoto aislado según la reivindicación 6, en el que dicho péptido de poliepítoto se une a células que expresan un alelo de MHC Clase I seleccionado del grupo que consiste en: HLA A1, HLA A2, HLA A3, HLA A11, HLA A23, HLA A24, HLA A26, HLA A29, HLA A30, HLA A68, HLA B7, HLA B8, HLA B27, HLA B35, HLA B41, HLA B44, HLA B57, y HLA B58.

15 8. El péptido de poliepítoto aislado según la reivindicación 6, en el que un epítoto de dicho péptido de poliepítoto tiene especificidad por el supertipo de HLA.

9. El péptido de poliepítoto aislado según la reivindicación 6, que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 309; SEC ID NO: 310; SEC ID NO: 311; SEC ID NO: 312; SEC ID NO: 313; SEC ID NO: 314; SEC ID NO: 315; SEC ID NO: 316; SEC ID NO: 317; y SEC ID NO: 318.

20 10. Una composición de vacuna profiláctica o terapéutica para provocar una respuesta inmunitaria celular en un sujeto humano frente a HCMV, comprendiendo dicha composición una cantidad eficaz del péptido o lipopéptido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o del péptido de poliepítoto aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en combinación con un vehículo, excipiente, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

25 11. La composición de vacuna profiláctica o terapéutica según la reivindicación 10, en la que el adyuvante comprende un adyuvante saponificado que comprende una saponina o una fracción de saponina.

30 12. Uso del péptido o lipopéptido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o del péptido de poliepítoto aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, o de la composición de vacuna profiláctica o terapéutica según la reivindicación 10 u 11, en la preparación de un medicamento para potenciar la inmunidad mediada por células específicas de HCMV de un sujeto humano, o para proporcionar memoria inmunológica en un sujeto no infectado contra una futura infección por HCMV.

35 13. El uso según la reivindicación 12, en el que el sujeto se selecciona del grupo que consiste en: (i) un sujeto que posee una infección por HCMV latente; (ii) un sujeto que posee una infección por HCMV activa; (iii) un sujeto que está inmunosuprimido; (iv) un sujeto que está inmunocomprometido; (v) un receptor de trasplante; y (vi) un sujeto en riesgo de sufrir una complicación que surge de infección por HCMV.

14. El uso según la reivindicación 13, en el que el sujeto es una mujer que tiene capacidad reproductora, o una mujer embarazada, o un receptor de trasplante de médula ósea.

40 15. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que la composición comprende una cantidad del péptido o lipopéptido suficiente para activar un CTL o un precursor de CTL en un sujeto.

16. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que la composición comprende una cantidad del péptido o lipopéptido suficiente para provocar o potenciar la expansión de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, o potenciar la inmunidad mediada por células (CMI) específicas de HCMV en un sujeto.

17. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en el que la composición es inyectable.

45 18. Un método para preparar un linfocito T reactivo a HCMV, comprendiendo dicho método poner en contacto *ex vivo* un linfocito T obtenido previamente de un sujeto humano con una cantidad eficaz del péptido o lipopéptido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o del péptido de poliepítoto aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, o de la composición de vacuna profiláctica o terapéutica según la reivindicación 10 u 11, suficiente para conferir reactividad con HCMV a dichos linfocitos T.

19. Un método para determinar si un sujeto ha sido previamente infectado o no con HCMV, o el nivel de inmunidad mediada por células específicas de HCMV en un sujeto, comprendiendo dicho método poner en contacto *ex vivo* un linfocito T obtenido previamente del sujeto con una célula presentadora de antígeno (APC) sensibilizada con el péptido o lipopéptido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o con el péptido de poliepítipo aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, o con la composición de vacuna profiláctica o terapéutica según la reivindicación 10 u 11, y determinar la activación de un CTL o un CTL precursor, en el que dicha activación de un CTL o un CTL precursor indica que el sujeto ha sido infectado previamente con HCMV, y en el que el nivel de activación de un CTL o un CTL precursor está correlacionado con el nivel de inmunidad mediada por células específicas de HCMV del sujeto.
20. El método de la reivindicación 19, en el que la activación de un CTL o un CTL precursor se realiza mediante un procedimiento que comprende un ensayo seleccionado del grupo que consiste en: ensayo de tetrameros de MHC clase 1, ensayo de citotoxicidad, ensayo para determinar la producción de IFN- $\gamma$ , ensayo de citocinas, ensayo de liberación de cromo, y ELISPOT.
21. El método según la reivindicación 20, en el que el linfocito T está contenido en una muestra biológica obtenida previamente de un sujeto humano.
22. El método según la reivindicación 21, en el que la muestra biológica obtenida previamente de un sujeto es médula ósea, timo, o una muestra que comprende sangre, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o una capa leuco-plaquetaria.
23. Un método para producir un CTL específico de HCMV, que comprende: (i) poner en contacto un linfocito T *ex vivo* con el péptido o lipopéptido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o con el péptido de poliepítipo aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, o con la composición de vacuna profiláctica o terapéutica según la reivindicación 11 ó 12, o una célula presentadora de antígeno (APC), o una estirpe celular linfoblastoide autóloga (LCL) sensibilizada con dicho péptido o lipopéptido o dicha vacuna; (ii) cultivar el linfocito T; y (iii) seleccionar linfocitos T que proliferan.
24. El método de la reivindicación 23, en el que la puesta en contacto en (i) es en presencia de una citocina.
25. El método de la reivindicación 24, en el que la citocina es IL-2.
26. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, que comprende estimular *ex vivo* células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) procedentes de un donante sano seropositivo a HCMV con una estirpe celular linfoblastoide autóloga (LCL) que se ha sensibilizado con el péptido o lipopéptido.
- También se han aislado CTLs tanto policlonales como clonados a partir de donantes seropositivos que mostraron fuertes respuestas en ensayos de citotoxicidad, confirmando de ese modo una fuerte actividad citolítica frente a células diana que se sensibilizaron con péptidos sintéticos, o, como alternativa, se infectaron con virus de la vacuna recombinante que codifica antígenos de HCMV individuales.
- Usando los enfoques anteriores, se identificó un gran número de nuevos epítomos de CTL de HCMV que tienen utilidad en la formación de vacunas frente a HCMV, o de otro modo que modulan el control inmunitario de HCMV, o como reactivos de diagnóstico para ensayar HCMV o la recuperación de la inmunidad mediada por linfocitos T específicos de HCMV tras el trasplante o durante el embarazo. También se confirmó la identificación de ciertos epítomos de CTL descritos previamente. Se mostró que respuestas de CTL CD8+ a HCMV contenían a menudo múltiples actividades específicas de antígenos que no se constreñían simplemente a pp65, IE-1, o pp150. De hecho, más del 40% de los epítomos de CTL están situados en antígenos distintos de pp65 e IE-1, que se consideraron previamente que eran los antígenos principales para el control de CTL. Se identificó un número de antígenos de HCMV por primera vez como dianas para la inmunidad celular específica de HCMV. De forma interesante, estas actividades también incluyeron respuestas de linfocitos T subdominantes frente a inmunomoduladores codificados por HCMV, tales como, por ejemplo, US2, US3, y UL18. El análisis clonal reveló nuevas respuestas individuales a antígenos tales como, por ejemplo, pp28, pp50, pp65, pp150, gB, gH, US2, IE-1 e IE-2. El repertorio global de respuestas de CTL específico de HCMV a partir de un espectro de portadores sanos del virus se distribuye a lo largo de la mayoría de los antígenos ensayados.
- Se han definido varios determinantes que restringen HLA reconocidos por los nuevos epítomos de CTL, además de nuevos determinantes que restringen HLA para ciertos epítomos de CTL de HCMV descritos previamente.
- También se diseñaron nuevos poliepítomos que comprenden múltiples epítomos de HCMV para uso en preparaciones de vacuna.
- También se han diseñado preparaciones de vacuna basándose en los nuevos epítomos y poliepítomos de la invención. Preferiblemente, una vacuna eficaz contra HCMV basada en el epítomo de CTL, que proporciona protección generalizada frente a HCMV en una población humana, comprende no sólo epítomos derivados de proteínas pp65 e IE-1, sino también otras regiones del genoma expresadas durante la infección temprana, tardía y latente.



- En consecuencia, un aspecto de la presente invención se refiere a un péptido inmunológicamente activo que comprende uno o más epítomos de CTL de un antígeno de HCMV o un derivado del mismo o una variante funcionalmente equivalente del mismo, en el que dicho péptido es preferiblemente capaz de provocar una respuesta inmunitaria celular frente a HCMV en un sujeto humano. Preferiblemente, el péptido dirige CTLs de un sujeto humano para reconocer y lisar células humanas infectadas con HCMV, proporcionando o potenciando de ese modo la inmunidad celular frente a HCMV. Preferiblemente, el péptido inmunológicamente activo, en asociación con una molécula de MCH Clase I, es reconocido por los CTLs de un sujeto sano seropositivo a HCMV, o un sujeto que tiene una infección latente o inactiva por HCMV.
- Preferiblemente, el péptido inmunológicamente activo de la invención presenta especificidad por el supertipo de HLA. Tal epítomo es claramente preferido para uso en formulaciones de vacuna, debido a que reduce el número total de epítomos requeridos para cubrir una proporción significativa de la población independientemente de la etnicidad, minimizando de ese modo las dificultades de formulación.
- Preferiblemente, el péptido inmunológicamente activo de la invención comprende adicionalmente uno o más determinantes CD4+ suficientes para facilitar una función de linfocito T auxiliar en el contexto de una molécula de MHC clase II en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC) de un sujeto humano infectado con HCMV. Por ejemplo, se proporcionan aquí varios péptidos 20-meros que comprenden epítomos de CTL contiguos o que solapan y funciones epitópicas de linfocitos T auxiliares según se evidencia por tener la capacidad de unirse tanto a células CD4<sup>+</sup> como a CD8<sup>+</sup>. Tal péptido tiene una ventaja con respecto de un epítomo de CTL mínimo de no requerir necesariamente la inclusión de un epítomo de linfocito T auxiliar exógeno en una formulación de vacuna.
- En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un péptido inmunológicamente activo que comprende un poliepítomo (es decir, dos o más epítomos distintos) de un antígeno de HCMV o un derivado del mismo o una variante funcionalmente equivalente del mismo, en el que dicho péptido es preferiblemente capaz de provocar una respuesta inmunitaria celular frente a HCMV en un sujeto humano.
- Preferiblemente, el poliepítomo no está restringido a un único haplotipo de MHC Clase I. Incluso más preferiblemente, el poliepítomo es específico para un número suficiente de moléculas de MHC Clase I para proporcionar cobertura para al menos alrededor de 35% de la población general, preferiblemente al menos alrededor de 55% de la población general, más preferiblemente al menos alrededor de 75% de la población general, y todavía más preferiblemente al menos alrededor de 95% de la población general, independientemente del origen racial o etnicidad. Los expertos en la técnica estarán fácilmente en posición de determinar el número de epítomos de CTL de HCMV individuales requeridos para proporcionar cobertura de cualquier población dada a partir de los datos de especificidad de HLA proporcionados aquí. Al igual que con epítomos individuales, el poliepítomo de la invención presenta preferiblemente especificidad por el supertipo de HLA, y/o comprende preferiblemente uno o más determinantes CD4+ suficientes para facilitar una función de linfocito T auxiliar en un sujeto humano infectado con HCMV.
- Otro aspecto de la invención se refiere a una composición de vacuna profiláctica o terapéutica para provocar una respuesta inmunitaria celular en un sujeto humano frente a HCMV, comprendiendo dicha composición un péptido inmunológicamente activo de la invención (es decir, un epítomo o poliepítomo) en combinación con un vehículo, excipiente, diluyente y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptables. La composición de vacuna puede comprender más de un epítomo o poliepítomo. La composición de vacuna de la invención puede ser una vacuna de subunidades que comprende el péptido o péptidos inmunológicamente activos o un derivado de los mismos o una variante funcionalmente equivalente de los mismos, o como alternativa, una vacuna a base de ácido nucleico que comprende ácido nucleico, tal como, por ejemplo, ADN o ARN, que codifica el péptido o polipéptido inmunológicamente activo o derivado o variante, y que se clona en un vector adecuado (por ejemplo, vector de virus de la vacuna, de la viruela del canario, de adenovirus, u otro vector de virus eucariota). Como alternativa, el péptido o derivado o variante se formula como una vacuna celular vía la administración de una célula presentadora de antígeno (APC) autóloga o alogénea, o una célula dendrítica que se ha tratado *in vitro* para presentar el péptido sobre su superficie.
- En una realización relacionada, la presente invención proporciona el uso de un péptido inmunológicamente activo de la invención, o una variante o derivado del mismo, en la preparación de una composición de vacuna para uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de infección por HCMV en un sujeto humano, que incluye el tratamiento terapéutico de una infección latente por HCMV en un sujeto humano.
- En una realización relacionada, la presente invención proporciona el uso de un péptido inmunológicamente activo de la invención, o una variante o derivado del mismo, en la preparación de una composición de vacuna para uso para provocar la función inmunitaria de un sujeto humano antes o durante o después del trasplante, en el que dicho sujeto posee una infección latente por HCMV o está en riesgo de ser infectado con HCMV.
- Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para potenciar el sistema inmunitario de un sujeto humano, que comprende administrar un péptido inmunológicamente activo que comprende un epítomo de CTL de un antígeno de HCMV o un derivado o variante del mismo, o una composición de vacuna que comprende dicho péptido o derivado o variante, durante un tiempo y en condiciones suficientes para activar un CTL y/o un precursor de CTL de dicho sujeto.

En una realización relacionada, la invención se refiere a un método para potenciar la inmunidad mediada por células específicas de HCMV de un sujeto humano, comprendiendo dicho método poner en contacto *ex vivo* un linfocito T obtenido de un sujeto humano con un péptido inmunológicamente activo que comprende un epítipo de CTL de un antígeno de HCMV o un derivado o variante del mismo, o una composición de vacuna que comprende dicho péptido o derivado o variante, durante un tiempo y en condiciones suficientes para conferir actividad frente a HCMV a dichos linfocitos T.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para proporcionar o potenciar la inmunidad frente a HCMV en un sujeto humano no infectado, que comprende administrar a dicho sujeto un péptido inmunológicamente activo que comprende un epítipo de CTL de un antígeno de HCMV o un derivado o variante del mismo, o una composición de vacuna que comprende dicho péptido o derivado o variante, durante un tiempo y en condiciones suficientes para proporcionar memoria inmunológica frente a una infección futura por HCMV.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para potenciar o conferir inmunidad frente a HCMV en un sujeto humano no infectado, que comprende poner en contacto *ex vivo* un linfocito T obtenido de un sujeto humano con un péptido inmunológicamente activo que comprende un epítipo de CTL de un antígeno de HCMV o un derivado o variante del mismo, o una composición de vacuna que comprende dicho péptido o derivado o variante, durante un tiempo y en condiciones suficientes para conferir actividad frente a HCMV a dichos linfocitos T.

Como será manifiesto a partir de la descripción aquí, el péptido inmunológicamente activo de la invención, o un derivado o variante del mismo, o una composición de vacuna que comprende dicho péptido o derivado o variante, es útil para estimular directamente un CTL o un CTL precursor *in vitro*. Usando tecnología de ensayo apropiado conocida por el experto, el péptido de la invención, o un derivado o variante funcionalmente equivalente del mismo, o una composición que comprende dicho péptido o derivado o variante, es útil para determinar el nivel de inmunidad específica de HCMV en un sujeto humano que sufre una infección primaria por HCMV o está en riesgo de infección por HCMV o la reactivación de la infección por HCMV, tal como, por ejemplo, un paciente de trasplante, un individuo infectado con HIV, una mujer que tiene capacidad reproductora o una mujer embarazada. En una realización relacionada, el péptido o composición de la invención es útil también para distinguir un individuo que es seropositivo de un individuo que no se ha expuesto a HCMV (es decir, un individuo seronegativo).

En consecuencia, otro aspecto de la invención se refiere a un método de diagnóstico para monitorizar cuantitativa o cualitativamente la inmunidad de linfocitos T específicos de HCMV en un sujeto humano, comprendiendo dicho método poner en contacto *ex vivo* un linfocito T obtenido de un sujeto humano con una APC sensibilizada con un péptido inmunológicamente activo que comprende un epítipo de CTL de un antígeno de HCMV, o un derivado o variante del mismo, o una composición de vacuna que comprende dicho péptido o derivado o variante, y determinar la activación de un CTL o CTL precursor, en el que dicha activación de un CTL o CTL precursor indica que el sujeto ha sido infectado previamente con HCMV.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para producir un CTL aislado o CTL precursor capaz de unirse a o lisar una célula humana infectada con HCMV, comprendiendo dicho método poner en contacto un linfocito T con un péptido aislado de la presente invención o una APC sensibilizada con un péptido aislado de la invención, cultivar el linfocito T, y seleccionar los linfocitos T que proliferan. Opcionalmente, el linfocito T se pone en contacto con péptido en presencia de una citocina, tal como, por ejemplo, IL-2.

La presente invención se extiende claramente a los clones de linfocitos T producidos usando un nuevo péptido inmunológicamente activo descrito aquí, y al uso de tales clones de linfocitos T en cualesquiera procedimientos de diagnóstico, profilácticos o terapéuticos para monitorizar la infección por HCMV, la latencia de infección por HCMV, la probabilidad de infección por HCMV en un sujeto humano, tal como, por ejemplo, antes, durante o después del trasplante de órganos (por ejemplo BMT), o durante el embarazo.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1a es una representación gráfica que muestra la estabilización de MHC en células T2 para diversos péptidos que se unen a HLA A2 derivados del antígeno de HCMV pp65. Los péptidos ensayados tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas a la derecha de la gráfica (es decir, SEC ID Nos: 6, 53, 10, 12, 52, 11, 54, 7, y 5, respectivamente, desde arriba hacia abajo). Las células T2 se incubaron inicialmente con 100  $\mu$ l de cada péptido (100  $\mu$ g/ml) durante 14-16 h a 26°C, seguido de la incubación a 37°C durante 2-3 h. La expresión de HLA A2 en estas células se analizó mediante citometría de flujo usando el anticuerpo BB7.2. La intensidad de la fluorescencia se indica como un porcentaje de la intensidad de fluorescencia para HLA A2 en células T2 incubadas a 26°C sin péptido. La línea punteada indica la media + 3 S.E.M. de la intensidad de la fluorescencia para HLA A2 en células T2 incubadas a 26°C sin péptido.

La Figura 1b es una representación gráfica que muestra estabilización de MHC en células T2 para diversos péptidos que se unen a HLA A2 derivados del antígeno de HCMV pp71. Los péptidos ensayados tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas a la derecha de la gráfica (es decir, SEC ID Nos: 177, 176, 175, y 174, respectivamente, desde arriba hacia abajo). Las células T2 se incubaron con péptido, y la expresión de HLA A2 en estas células se analizó mediante citometría de flujo usando el anticuerpo BB7.2 como se describe en

la leyenda de la Figura 1a. La intensidad de la fluorescencia se indica como se describe en la leyenda de la Figura 1a.

La Figura 1c es una representación gráfica que muestra estabilización de MHC en células T2 para diversos péptidos que se unen a HLA A2 derivados del antígeno de HCMV pp150. Los péptidos ensayados tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas a la derecha de la gráfica (es decir, SEC ID Nos: 140, 141, 122, 138, 139, 142, 145, 144, y 143, respectivamente, desde arriba hacia abajo). Las células T2 se incubaron con péptido, y la expresión de HLA A2 en estas células se analizó mediante citometría de flujo usando el anticuerpo BB7.2 como se describe en la leyenda de la Figura 1a. La intensidad de la fluorescencia se indica como se describe en la leyenda de la Figura 1a.

La Figura 1d es una representación gráfica que muestra estabilización de MHC en células T2 para diversos péptidos que se unen a HLA A2 derivados del antígeno de HCMV IE-1. Los péptidos ensayados tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas a la derecha de la gráfica (es decir, SEC ID Nos: 98, 102, 96, 101, 100, 103, 97, y 99, respectivamente, desde arriba hacia abajo). Las células T2 se incubaron con péptido, y la expresión de HLA A2 en estas células se analizó mediante citometría de flujo usando el anticuerpo BB7.2 como se describe en la leyenda de la Figura 1a. La intensidad de la fluorescencia se indica como se describe en la leyenda de la Figura 1a.

La Figura 1e es una representación gráfica que muestra estabilización de MHC en células T2 para diversos péptidos que se unen a HLA A2 derivados del antígeno de HCMV gB. Los péptidos ensayados tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas a la derecha de la gráfica (es decir, SEC ID Nos: 183, 188, 181, 187, 186, 182, 185, y 184, respectivamente, desde arriba hacia abajo). Las células T2 se incubaron con péptido, y la expresión de HLA A2 en estas células se analizó mediante citometría de flujo usando el anticuerpo BB7.2 como se describe en la leyenda de la Figura 1a. La intensidad de la fluorescencia se indica como se describe en la leyenda de la Figura 1a.

La Figura 1f es una representación gráfica que muestra estabilización de MHC en células T2 para diversos péptidos que se unen a HLA A2 derivados de los antígenos de HCMV pp50 y pp28. Los péptidos ensayados tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas a la derecha de la gráfica (es decir, SEC ID Nos: 164 y 163 para péptidos derivados de pp50, respectivamente, desde arriba hacia abajo; y SEC ID Nos: 155, 154, 153, 152, 151 y 150 para péptidos derivados de pp28, respectivamente, desde arriba hacia abajo). Las células T2 se incubaron con péptido, y la expresión de HLA A2 en estas células se analizó mediante citometría de flujo usando el anticuerpo BB7.2 como se describe en la leyenda de la Figura 1a. La intensidad de la fluorescencia se indica como se describe en la leyenda de la Figura 1a.

La Figura 1g es una representación gráfica que muestra estabilización de MHC en células T2 para diversos péptidos que se unen a HLA A2 derivados del antígeno de HCMV gH. Los péptidos ensayados tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas a la derecha de la gráfica (es decir, SEC ID Nos: 216, 206, 205, 201, 200, 204, 203, 198, 202, 197, 199, y 196, respectivamente, desde arriba hacia abajo). Las células T2 se incubaron con péptido, y la expresión de HLA A2 en estas células se analizó mediante citometría de flujo usando el anticuerpo BB7.2 como se describe en la leyenda de la Figura 1a. La intensidad de la fluorescencia se indica como se describe en la leyenda de la Figura 1a.

La Figura 1h es una representación gráfica que muestra estabilización de MHC en células T2 para diversos péptidos que se unen a HLA A2 derivados del antígeno de HCMV IE-2. Los péptidos ensayados tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas a la derecha de la gráfica (es decir, SEC ID Nos: 256, 254, 253, 252, y 251, respectivamente, desde arriba hacia abajo). Las células T2 se incubaron con péptido, y la expresión de HLA A2 en estas células se analizó mediante citometría de flujo usando el anticuerpo BB7.2 como se describe en la leyenda de la Figura 1a. La intensidad de la fluorescencia se indica como se describe en la leyenda de la Figura 1a.

La Figura 1i es una representación gráfica que muestra estabilización de MHC en células T2 para diversos péptidos que se unen a HLA A2 derivados de los antígenos de HCMV US3, US2, y UL18. Los péptidos ensayados tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas a la derecha de la gráfica (es decir, SEC ID Nos: 300, 298, y 299 para péptidos derivados de US3, respectivamente, desde arriba hacia abajo; SEC ID Nos: 296, 294, y 295 para péptidos derivados de US2, respectivamente, desde arriba hacia abajo; y SEC ID NO: 293, para el péptido derivados de UL18 en la parte inferior de la gráfica). Las células T2 se incubaron con péptido, y la expresión de HLA A2 en estas células se analizó mediante citometría de flujo usando el anticuerpo BB7.2 como se describe en la leyenda de la Figura 1a. La intensidad de la fluorescencia se indica como se describe en la leyenda de la Figura 1a.

La Figura 2a es una representación gráfica que muestra el análisis funcional *ex vivo* de respuestas de CTL específicos de HCMV frente a péptidos derivados de pp65 de HCMV o péptidos derivados de IE-1 de HCMV en una cohorte de ocho individuos seropositivos sanos positivos a HLA A2. Los péptidos del epítipo de CTL derivados de pp65 de HCMV (panel A) o de IE-1 de HCMV (panel B) se ensayaron usando ensayos ELISPOT. Los péptidos pp65 de HCMV tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas en el eje X del

panel A (es decir, SEC ID Nos: 10, 54, 5, 53, 6, y 7 respectivamente, de izquierda a derecha de la figura). Los péptidos IE-1 de HCMV tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas en el eje X del panel B (es decir, SEC ID Nos: 97, 96, 102, 101, y 18 respectivamente, de izquierda a derecha de la figura). Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedentes de individuos seropositivos sanos se estimularon con péptidos sintéticos individuales (10 µg/ml) procedentes de estos antígenos, y se midió la producción de IFN-γ en ensayos ELISPOT como se describe en la secciones de Material y Métodos. Los resultados se expresan como células formadoras de manchas (SFC) por 10<sup>6</sup> PBMC en la ordenada.

La Figura 2b es una representación gráfica que muestra el análisis funcional *ex vivo* de respuestas de CTL específicos de HCMV frente a péptidos derivados de pp150 de HCMV (panel C), péptidos derivados de pp28 (panel D), péptidos derivados de US2 (panel E), péptidos derivados de US3 (panel F), o péptidos derivados de pp50 (panel G), en una cohorte de ocho individuos seropositivos sanos positivos a HLA A2. Los péptidos del epítipo de CTL se ensayaron usando ensayos ELISPOT como se describe en la leyenda de la Figura 2a. Los datos se muestran como se describe en la leyenda de la Figura 2a. Los péptidos pp150 de HCMV tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas en el eje X del panel C (es decir, SEC ID Nos: 122, 141, 143, 144, y 140 respectivamente, de izquierda a derecha de la figura). El péptido pp28 de HCMV tuvo la secuencia de aminoácidos indicada en el eje X del panel D (es decir, SEC ID NO: 150). Los péptidos US2 de HCMV tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas en el eje X del panel E (es decir, SEC ID Nos: 294, 296 y 295 respectivamente, de izquierda a derecha de la figura). Los péptidos US3 de HCMV tuvieron las secuencias de aminoácidos indicada en el eje X del panel F (es decir, SEC ID Nos: 298 y 300 respectivamente, de izquierda a derecha de la figura). El péptido pp50 de HCMV tuvo la secuencia de aminoácidos indicada en el eje X del panel G (es decir, SEC ID NO: 163).

La Figura 2c es una representación gráfica que muestra el análisis funcional *ex vivo* de respuestas de CTL específicos de HCMV frente a péptidos derivados de gB de HCMV (panel H), péptidos derivados de gH (panel I), o péptidos derivados de IE-2 (panel J), en una cohorte de ocho individuos seropositivos sanos positivos a HLA A2. Los péptidos del epítipo de CTL se ensayaron usando ensayos ELISPOT como se describe en la leyenda de la Figura 2a. Los datos se muestran como se describe en la leyenda de la Figura 2a. Los péptidos gB de HCMV tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas en el eje X del panel H (es decir, SEC ID Nos: 181 y 187 respectivamente, de izquierda a derecha de la figura). Los péptidos gH de HCMV tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas en el eje X del panel I (es decir, SEC ID Nos: 206, 216, y 202 respectivamente, de izquierda a derecha de la figura). Los péptidos IE-2 de HCMV tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas en el eje X del panel J (es decir, SEC ID Nos: 254 y 251 respectivamente, de izquierda a derecha de la figura).

La Figura 3a es una representación gráfica que muestra el análisis funcional *ex vivo* de respuestas de linfocitos T específicos de HCMV frente a epítipos de CTL restringidos a HLA B8 derivados de antígenos pp65 de HCMV (panel izquierdo) o IE-1 de HCMV (panel derecho). Los epítipos del péptido se ensayaron usando ensayos ELISPOT. PBMC procedentes de individuos seropositivos sanos se estimularon con péptidos sintéticos individuales procedentes de estos antígenos, y se midió la producción de IFN-γ en ensayo ELISPOT como se describe aquí. Los péptidos y sus restricciones por HLA se indican en el eje X. Los péptidos pp65 de HCMV ensayados tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas (es decir, SEC ID Nos: 43, 14, y 44 respectivamente, desde la izquierda de la figura). Los péptidos IE-1 de HCMV ensayados tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas (es decir, SEC ID Nos: 109, 110, 111, 112, y 114 respectivamente, desde la izquierda de la figura). Las respuestas de linfocitos T, según se indican mediante células formadoras de manchas (SFC) por 10<sup>6</sup> PBMC, se indican en la ordenada.

La Figura 3b es una representación gráfica que muestra el análisis funcional *ex vivo* de respuestas de linfocitos T específicos de HCMV frente a epítipos de CTL restringidos a HLA B7 derivados de antígenos pp65 de HCMV (panel izquierdo) IE-1 (panel central), o pp150 de HCMV (panel derecho). Los epítipos del péptido se ensayaron usando ensayos ELISPOT. PBMC procedentes de individuos seropositivos sanos se estimularon con péptidos sintéticos individuales procedentes de estos antígenos, y se midió la producción de IFN-γ en ensayo ELISPOT como se describe aquí. Los péptidos y sus restricciones por HLA se indican en el eje X. Los péptidos pp65 de HCMV ensayados tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas (es decir, SEC ID Nos: 40 y 41 respectivamente, desde la izquierda de la figura). El péptido IE-1 de HCMV ensayado tuvo la secuencia de aminoácidos indicada (es decir, SEC ID NO: 109). Los péptidos pp150 de HCMV ensayados tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas (es decir, SEC ID Nos: 134, 132, 131 y 130 respectivamente, desde la izquierda de la figura). Las respuestas de linfocitos T, según se indican mediante células formadoras de manchas (SFC) por 10<sup>6</sup> PBMC, se indican en la ordenada.

La Figura 3c es una representación gráfica que muestra el análisis funcional *ex vivo* de respuestas de linfocitos T específicos de HCMV frente a epítipos de CTL que tienen restricciones por HLA A24, HLA B27, HLA A3, HLA B44 o HLA A1, derivándose dichos epítipos de CTL de los antígenos gH de HCMV (panel izquierdo), pp28 (panel central), o pp50 de HCMV (panel derecho). Los epítipos del péptido se ensayaron usando ensayos ELISPOT. PBMC procedentes de individuos seropositivos sanos se estimularon con péptidos sintéticos individuales procedentes de estos antígenos, y se midió la producción de IFN-γ en ensayo

ELISPOT como se describe aquí. Los péptidos y sus restricciones por HLA se indican en el eje X. Los péptidos gH de HCMV ensayados tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas (es decir, SEC ID Nos: 227, 243, 217, y 220 respectivamente, desde la izquierda de la figura). El péptido pp28 de HCMV ensayado estaba restringido a HLA B27, y tuvo la secuencia de aminoácidos indicada (es decir, SEC ID NO: 162). Los péptidos pp50 de HCMV ensayados tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas (es decir, SEC ID Nos: 170 y 165 respectivamente, desde la izquierda de la figura). Las respuestas de linfocitos T, según se indican mediante células formadoras de manchas (SFC) por  $10^6$  PBMC, se indican en la ordenada.

La Figura 4a es una representación gráfica que muestra el reconocimiento de epítomos de CTL de HCMV restringidos a HLA A2 por CTLs procedentes de un donante seropositivo sano designado SB. PBMC procedentes del donante se cocultivaron con PBMC autólogas sensibilizadas con péptidos (20  $\mu$ g/ml), a una relación de 2:1, durante 7 días. En el día 7, los cultivos se volvieron a estimular con LCLs transformadas con el EBV irradiadas con radiación  $\gamma$  autólogas sensibilizadas con epítomos de péptido. En el día 10, estas estirpes de linfocitos T se usaron como efectores policlonales en un ensayo estándar de liberación de  $^{51}$ Cr frente a blastos de fitohemaglutinina (PHA) autólogos sensibilizados con péptido. En estos ensayos se usó una relación efector:diana de 10:1. El porcentaje de lisis específica se indica en el eje X. Las secuencias de los epítomos de CTL completas (es decir, SEC ID Nos: 187, 18, 101, 97, 5, 122, y 254 respectivamente, desde arriba hacia abajo de la figura), los antígenos a partir de los cuales se derivan los péptidos (es decir, gB, IE-1, IE-1, IE-1, pp65, pp150 y IE-2 respectivamente, desde arriba hacia abajo de la figura), y la restricción por HLA (HLA A2) para cada epítomo se muestran en el eje Y. También se indica el donante respondedor (SB).

La Figura 4b es una representación gráfica que muestra el reconocimiento de epítomos de CTL de HCMV por CTLs de cuatro donantes seropositivos sanos designados CS, SE, SC y PP. PBMC procedentes de cada donante se cocultivaron con PBMC autólogas sensibilizadas con péptido (20  $\mu$ g/ml), se volvieron a estimular con LCLs transformadas con el EBV irradiadas con radiación  $\gamma$  autólogas sensibilizadas con epítomos de péptido, y se llevaron a cabo ensayos de liberación de  $^{51}$ Cr como se describe en la leyenda de la Figura 4A. El porcentaje de lisis específica se indica en el eje X. Las secuencias de los epítomos de CTL completas (es decir, SEC ID Nos: 292, 295, 113, 114, 112, 303, y 165 respectivamente, desde arriba hacia abajo de la figura), los antígenos a partir de los cuales se derivaron los péptidos (es decir, UL18, pp50, US2, IE-1, IE-1, IE-1, US6 y pp50 respectivamente, desde arriba hacia abajo de la figura), y las restricciones por HLA (HLA B44, HLA B44, HLA A2, HLA B8, HLA B8, HLA B8, HLA A24, y HLA A1 respectivamente, desde arriba hacia abajo de la figura) para cada epítomo se muestran en el eje Y. También se indican los donantes respondedor (es decir, CS, SE, SC, y PP) para cada péptido.

La Figura 5a es una representación gráfica que muestra el porcentaje de lisis específica a diferentes concentraciones de epítomos de CTL de HCMV, usando clones de CTL específicos de virus procedentes de portadores sanos de virus. Los clones de CTL procedentes de portadores sanos de virus se aislaron como se describe aquí y se incubaron con un epítomo de péptido derivado de IE-1 de HCMV y que tiene restricción por HLA A2, y que consiste en la secuencia VLEETSVML (SEC ID NO: 101;  $\blacklozenge$ ), o la secuencia YILEETSVM (SEC ID NO: 18;  $\blacksquare$ ). Los clones de CTL específicos para cada epítomo de péptido se ensayaron frente a blastos de PHA autólogos previamente sensibilizados con concentraciones variables de péptido sintético (eje X).

La Figura 5b es una representación gráfica que muestra el porcentaje de lisis específica a diferentes concentraciones de un epítomo de CTL derivado de pp65 de HCMV restringido a HLA A2 que tiene una secuencia de aminoácidos NLVPMATV (SEC ID NO: 5), usando clones de CTL específicos de virus procedentes de portadores sanos de virus. Los clones de CTL procedentes de portadores sanos de virus se aislaron como se describe aquí y se incubaron con el péptido. Los clones de CTL específicos para el epítomo del péptido se ensayaron frente a blastos de PHA autólogos sensibilizados previamente con concentraciones variables de péptido sintético (eje X). Los resultados se expresan como porcentaje de lisis específica.

La Figura 5c es una representación gráfica que muestra el porcentaje de lisis específica a diferentes concentraciones de un epítomo de CTL derivado de IE-2 de HCMV restringido a HLA A2 que tiene una secuencia de aminoácidos IYTRNHEV (SEC ID NO: 254), usando clones de CTL específicos de virus procedentes de portadores sanos de virus. Los clones de CTL procedentes de portadores sanos de virus se aislaron como se describe aquí y se incubaron con el péptido. Los clones de CTL específicos para el epítomo del péptido se ensayaron frente a blastos de PHA autólogos sensibilizados previamente con concentraciones variables de péptido sintético (eje X). Los resultados se expresan como porcentaje de lisis específica.

La Figura 5d es una representación gráfica que muestra el porcentaje de lisis específica a diferentes concentraciones de un epítomo de CTL derivado de IE-1 de HCMV restringido a HLA B8 que tiene una secuencia de aminoácidos QIKVRVDMV (SEC ID NO: 113), usando clones de CTL específicos de virus procedentes de portadores sanos de virus. Los clones de CTL procedentes de portadores sanos de virus se aislaron como se describe aquí y se incubaron con el péptido. Los clones de CTL específicos para el epítomo del péptido se ensayaron frente a blastos de PHA autólogos sensibilizados previamente con concentraciones variables de péptido sintético (eje X). Los resultados se expresan como porcentaje de lisis específica.

- 5 La Figura 6 es una representación gráfica que muestra la lisis específica por CTLs específicos de HCMV procedentes de donantes seropositivos a HCMV sanos designados SB (panel superior marcado SB CTL 62.3 y panel central marcado SB CTL 75.20) o SC (panel inferior marcado SC CTL ELRR) de LCLs autólogas infectadas con virus de la vacuna recombinante que expresa los antígenos de HCMV pp65 (Vacc.pp65), IE-1 (Vacc.IE-1), gB (Vacc.gB), gH (Vacc.gH), pp150 (Vacc.pp150) o pp28 (Vacc.pp28). Las LCLs se infectaron con constructos del virus de la vacuna durante 12-14 h a una multiplicidad de infección (MOI) de 10:1, y se procesaron para el ensayo estándar de liberación de <sup>51</sup>Cr. Los resultados se expresan como porcentaje de lisis específica observada en un ensayo estándar de liberación de cromo de 4 h. A lo largo del ensayo se usó una relación de efector a diana de 5:1.
- 10 La Figura 7a es una representación gráfica que muestra respuestas de linfocitos T específicos de HCMV *ex vivo* frente a conjuntos solapantes de péptidos derivados del antígeno de HCMV gB. Se ensayó un conjunto de 92 péptidos solapantes en una cohorte de cinco portadores sanos no relacionados de HCMV, designados RK (negro), SB (sombreado hacia delante), MB (punteado), SE (sombreado con líneas cruzadas) y MW (sombreado hacia atrás), usando ensayos ELISPOT. PBMC procedentes de estos donantes se estimularon con péptidos sintéticos individuales, y se midió la producción de IFN- $\gamma$  en ensayo ELISPOT como se describe aquí. Los resultados se expresan en la ordenada como células formadoras de manchas (SFC) por 10<sup>6</sup> PBMC. El número de péptido se indica en el eje X y en la parte superior de cada columna.
- 15 La Figura 7b es una representación gráfica que muestra respuestas de linfocitos T específicos de HCMV *ex vivo* frente a conjuntos solapantes de péptidos derivados del antígeno de HCMV pp65. Se ensayó un conjunto de 56 péptidos solapantes como se describe en la leyenda de la Figura 7a.
- 20 La Figura 7c es una representación gráfica que muestra respuestas de linfocitos T específicos de HCMV *ex vivo* frente a conjuntos solapantes de péptidos derivados del antígeno de HCMV IE-1. Se ensayó un conjunto de 49 péptidos solapantes como se describe en la leyenda de la Figura 7a.
- 25 La Figura 7d es una representación gráfica que muestra respuestas de linfocitos T específicos de HCMV *ex vivo* frente a conjuntos solapantes de péptidos derivados del antígeno de HCMV IE-2. Se ensayó un conjunto de 41 péptidos solapantes como se describe en la leyenda de la Figura 7a.
- 30 La Figura 7e es una representación gráfica que muestra respuestas de linfocitos T específicos de HCMV *ex vivo* frente a conjuntos solapantes de péptidos derivados del antígeno de HCMV gH. Se ensayó un conjunto de 74 péptidos solapantes como se describe en la leyenda de la Figura 7a.
- 35 La Figura 7f es una representación gráfica que muestra respuestas de linfocitos T específicos de HCMV *ex vivo* frente a conjuntos solapantes de péptidos derivados del antígeno de HCMV pp150. Se ensayó un conjunto de 104 péptidos solapantes como se describe en la leyenda de la Figura 7a.
- 40 La Figura 8 es una representación gráfica que muestra el reconocimiento por CTL de péptidos 20-meros procedentes de antígenos de HCMV mediante efectores policlonales de donantes seropositivos sanos. PBMC de donantes seropositivos a HCMV sanos, designados RK, JW, MB, CS y SE, se cocultivaron durante 7 días con PBMC autólogas sensibilizadas con cada epítipo de péptido específico (20  $\mu$ g/ml) a una relación de 2:1. Los péptidos ensayados tuvieron las secuencias de aminoácidos indicadas en la ordenada (es decir, SEC ID Nos: 75, 193, 117, 72, 92, 77, 90, 269, 70, 249, y 192 respectivamente, desde arriba hacia abajo de la figura). En el día 7, estos cultivos se volvieron a estimular con LCLs transformadas con EBV irradiadas con radiación  $\gamma$  autólogas sensibilizadas con epítipos de péptido. En el día 10, estas estirpes de linfocitos T se usaron como efectores policlonales en un ensayo estándar de liberación de <sup>51</sup>Cr frente a blastos de PHA autólogos sensibilizados con péptido. En estos ensayos se usó una relación de efector:diana de 10:1. Los resultados se expresan en el eje X como porcentaje de lisis específica.
- 45 La Figura 9 es una representación gráfica que muestra la función de clones de CTL específicos de HCMV derivados de donantes seropositivos a HCMV sanos designados RK (es decir, panel A; clones RK CTL OB6.13 y RK CTL 1C9.28), MB (es decir, panel B; clones MB CTL OB12.3 y MB CTL 1D9.7), y SB (es decir, panel C; clon SB CTL 1C7) generados mediante estimulación *in vitro* con péptidos 20-meros. Los clones se ensayaron en LCLs autólogas infectadas con virus de la vacuna recombinante que codifica antígenos de HCMV individuales (Vacc.pp28, Vacc.pp150, Vacc.gH, Vacc.gB, Vacc.IE-1 y Vacc.pp65 respectivamente, desde arriba hacia abajo en cada panel). Las LCLs se infectaron con constructos del virus de la vacuna durante 12-14 h (MOI de 10:1), y se procesaron para el ensayo estándar de liberación de <sup>51</sup>Cr. Los resultados se expresan en el eje X como porcentaje de lisis específica observada en un ensayo estándar de liberación de cromo de 4 h. A lo largo del ensayo se usó una relación de efector a diana de 5:1.
- 50 La Figura 10a es una representación que muestra la secreción de IFN- $\gamma$  por poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en ausencia de péptido (paneles marcados "Sin péptido") o en respuesta a péptidos 20-meros derivados de los antígenos pp65 de HCMV o gH de HCMV (paneles marcados "+ péptido"). Los péptidos 20-meros fueron un péptido 20-mero derivado de pp65 que tiene la secuencia SICPSQEPMSIYVYALPLKM (SEC ID NO: 90; designado SIC en la figura; panel izquierdo) y un péptido 20-mero derivado de gH que tiene la secuencia

RQTEKHELLVLVKKQLNRH (SEC ID NO: 249; designado RQT en la figura; panel derecho). Las células se acotaron progresivamente mediante dispersión hacia delante y lateral para linfocitos y CD3<sup>+</sup> para linfocitos T. Las poblaciones acotadas se representan gráficamente en gráficas de contorno de probabilidad como tinción de CD4 (eje horizontal) frente a tinción de IFN- $\gamma$  (eje vertical). Encima de cada caja se muestran las frecuencias de células positivas a CD4<sup>+</sup> y a IFN- $\gamma$  específicas de antígenos (en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales).

La Figura 10b es una representación que muestra la secreción de IFN- $\gamma$  por poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en ausencia de péptido (paneles marcados "Sin péptido") o en respuesta a péptidos 20-meros derivados de los antígenos pp65 de HCMV o gH de HCMV (paneles marcados "+ péptido"). Los péptidos 20-meros fueron un péptido 20-mero derivado de pp65 que tiene la secuencia SICPSQEPMSIYVYALPLKM (SEC ID NO: 90; designado SIC en la figura; panel izquierdo) y un péptido 20-mero derivado de gH que tiene la secuencia RQTEKHELLVLVKKQLNRH (SEC ID NO: 249; designado RQT en la figura; panel derecho). Las células se acotaron progresivamente mediante dispersión hacia delante y lateral para linfocitos y CD3<sup>+</sup> para linfocitos T. Las poblaciones acotadas se representan gráficamente en gráficas de contorno de probabilidad como tinción de CD8 (eje horizontal) frente a tinción de IFN- $\gamma$  (eje vertical). Encima de cada caja se muestran las frecuencias de células positivas a CD8<sup>+</sup> y a IFN- $\gamma$  específicas de antígenos (en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales).

La Figura 11a es una representación gráfica que muestra el cartografiado de secuencias epitópicas mínimas usando el ensayo ELISPOT. PBMC procedentes de un donante seropositivo sano, designado RK, se estimularon con péptidos solapantes derivados de antígeno IE-2 de HCMV, y se midió la producción de IFN- $\gamma$  en ensayos ELISPOT como se describe aquí. Los péptidos ensayados tuvieron las secuencias de aminoácidos FEQPTETP (SEC ID NO: 261), FEQPTETPP (SEC ID NO: 260), EQPTETPPE (SEC ID NO: 263), FEQPTETPPE (SEC ID NO: 262), QFEQPTETPPE (SEC ID NO: 264), o TAAKAYAVGQFEQPTETPPE (SEC ID NO: 269). Los datos se expresan como células formadoras de manchas (SFC) por 10<sup>6</sup> PBMC.

La Figura 11b es una representación gráfica que muestra el cartografiado de secuencias epitópicas mínimas usando un ensayo de CTL. Se ensayó un clon de CTL específico para el péptido derivado de IE-2 de HCMV que tiene la secuencia de aminoácidos TAAKAYAVGQFEQPTETPPE (SEC ID NO: 269) frente a blasto de PHA autólogo sensibilizado previamente con concentraciones variables de péptidos sintéticos solapantes que tiene la secuencia de aminoácidos FEQPTETPPE (SEC ID NO: 262;  $\blacklozenge$ ), FEQPTETPP (SEC ID NO: 260;  $\blacksquare$ ), o FEQPTETP (SEC ID NO: 261;  $\blacktriangle$ ). La concentración de péptido se indica en el eje X. El porcentaje de lisis específicas se indica en la ordenada.

La Figura 12a es una representación gráfica que muestra el análisis de restricción por HLA clase I de epítomos de CTL de HCMV derivados del antígeno IE-2 de HCMV frente a una estirpe de CTL restringida a HLA B41 de un donante seropositivo sano designado RK. El clon de CTL del donante RK se expuso a LCLs autólogas sensibilizadas con péptido procedentes del donante RK (Auto RK LCL) o a LCLs alogeneicas de donantes seropositivos sanos designados WS (es decir, WS LCL), MB (es decir, MB LCL), CS (es decir, CS LCL), BM21 (es decir, BM21 LCL) o SB (es decir, SB LCL), en un ensayo estándar de liberación de <sup>51</sup>Cr. Los alelos de HLA clase I compartidos por LCLs individuales con el donante RK (a partir del cual se estableció la línea de CTL) se muestran en el eje Y. Los datos se muestran como porcentaje de lisis específica en el eje X.

La Figura 12b es una representación gráfica que muestra el análisis de restricción por HLA clase I de epítomos de CTL de HCMV derivados del antígeno IE-1 de HCMV frente a una línea de CTL de un donante seropositivo sano designado CS que reconoce células diana revestidas con péptido que expresan HLA A23, HLA A24 y HLA A30. El clon de CTL del donante CS se expuso a LCLs autólogas sensibilizadas con péptido (Auto CS LCL) o a LCLs alogeneicas de donantes seropositivos sanos designados JW (es decir, JW LCL), PP (es decir, PP LCL), CSt (es decir, CSt LCL), DUCAF (es decir, DUCAF LCL) o WS (es decir, WS LCL), en un ensayo estándar de liberación de <sup>51</sup>Cr. Los alelos de HLA clase I compartidos por LCLs individuales con el donante CS (a partir del cual se estableció la línea de CTL) se muestran en el eje Y. Los datos se muestran como porcentaje de lisis específica en el eje X.

#### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

##### 1. Epítomos de HCMV aislados

Un aspecto de la presente invención proporciona un péptido aislado que comprende un epítopo de linfocito T citotóxico (CTL) de un antígeno de un citomegalovirus de seres humanos (HCMV) seleccionado del grupo que consiste en pp28, pp50, pp65, pp71, pp150, gB, gH, IE-1, IE-2, US2, US3, US6, US11, y UL18, o un derivado o variante funcionalmente equivalente de dicho péptido, en el que dicho péptido consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene alrededor de 9 a alrededor de 20 aminoácidos contiguos de dicho antígeno, y en el que:

(i) dicho epítopo de CTL de pp65 consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 22 (SQEPMSIYVY); SEC ID NO: 23 (ATVQQGNLKY); SEC ID NO: 24 (IRETVELRQY); SEC ID NO: 25 (IGDQYVKVY); SEC ID NO: 26 (TVQQGNLKY); SEC ID NO: 27 (YRIQKLEY); SEC ID NO: 28 (QVIGDQYVK); SEC ID NO: 29 (LLLQRGPQY); SEC ID NO: 30 (RVTGGGAMA); SEC ID NO: 31 (GVMTRGRK); SEC ID NO: 32 (VYALPLKML); SEC ID NO: 33

(QYDPVAALF); SEC ID NO: 34 (VYYTSAFVF); SEC ID NO: 35 (DVPSGKLFM); SEC ID NO: 36 (DIDLLLQRG); SEC ID NO: 37 (YVKVYLESF); SEC ID NO: 38 (TVQGQNLKY); SEC ID NO: 39 (EPMSIYVYAL); SEC ID NO: 40 (HVRVSQPSL); SEC ID NO: 41 (QARLTVSGL); SEC ID NO: 42 (RRRHRQDAL); SEC ID NO: 43 (QPKRRRHRQ); SEC ID NO: 44 (LCPKSIPL); SEC ID NO: 45 (YRIQKLEY); SEC ID NO: 46 (YSEHPTFTSQY); SEC ID NO: 47 (SEHPTFTSQY); SEC ID NO: 48 (CEDVPSGKLF); SEC ID NO: 49 (NEIHNPVAVF); SEC ID NO: 50 (RETVELRQY); SEC ID NO: 51 (QEPMSIYVY); SEC ID NO: 52 (QMWQARLTV); SEC ID NO: 53 (LMNGQQIFL); SEC ID NO: 54 (ILARNLVPM); SEC ID NO: 56 (QEFFWDANDIY); SEC ID NO: 57 (QEFFWDANDI); SEC ID NO: 58 (QYRIQKLE); SEC ID NO: 59 (RKHRHLPVADAV); SEC ID NO: 60 (DPVAALFFF); SEC ID NO: 61 (PGKISHIMLDVA); SEC ID NO: 62 (TRATKMQVI); SEC ID NO: 63 (QAIRETVEL); SEC ID NO: 64 (YHRTWDRHEGA); SEC ID NO: 65 (FMRPHERNGFTV); SEC ID NO: 66 (CPSQEPMSIYVY); SEC ID NO: 67 (LNIPSINVHHYPSAAERKHR); SEC ID NO: 68 (ATVQGQNLKYQEFFWDANDI); SEC ID NO: 69 (QEFFWDANDIYRIFAELEGV); SEC ID NO: 70 (PQYSEHPTFTSQYRIQKLE); SEC ID NO: 71 (SQYRIQKLEYRHTWDRHDE); SEC ID NO: 72 (VFTWPPWQAGILARNLVPMV); SEC ID NO: 73 (ILARNLVPMVATVQGQNLKY); SEC ID NO: 74 (DQYVKVYLESFCEDVPSGKL); SEC ID NO: 75 (YPSAAERKHRHLPVADAVIH); SEC ID NO: 76 (QYDPVAALFFFIDIDLLLQRG); SEC ID NO: 77 (IIKPGKISHIMLDVAFTSHE); SEC ID NO: 78 (AHELVCSEMENTRATKMQVIG); SEC ID NO: 79 (TRATKMQVIGDQYVKVYLES); SEC ID NO: 80 (MNGQQIFLEVQAIRETVELR); SEC ID NO: 81 (QAIRETVELRQYDPVAALFF); SEC ID NO: 82 (LTVSGLAWTRQQNQWKEPDV); SEC ID NO: 83 (WQPAQPKRRRHRQDALPGP); SEC ID NO: 84 (YRHTWDRHDEGAAQGGDDVW); SEC ID NO: 85 (TSAGRKRKSASATACTSGV); SEC ID NO: 86 (HRQDALPGPCIASTPKKHRG); SEC ID NO: 87 (YYTSAFVFPTKDVALRHVVC); SEC ID NO: 88 (VTTERKTTPRVTTGGGAMAGAS); SEC ID NO: 89 (QPFMRPHERNGFTVLCPKNM); SEC ID NO: 90 (SICPSQEPMSIYVYALPLKM); SEC ID NO: 91 (IYVYALPLKMLNIPSINVHH); SEC ID NO: 92 (QQNQWKEPDVYYTSAFVFPT); SEC ID NO: 93 (GAAQGGDDVWTSGSDSDEEL); SEC ID NO: 94 (TGGGAMAGASTSAGRKRKSA); y SEC ID NO: 95 (KDVALRHVCAHELVCSMEN);

(ii) dicho epítipo de CTL de IE-1 consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 96 (SLLSEFCRV); SEC ID NO: 97 (VLAELVKQI); SEC ID NO: 98 (ILGADPLRV); SEC ID NO: 99 (TMYGGISLL); SEC ID NO: 100 (LLSEFCRVL); SEC ID NO: 101 (VLEETSVM); SEC ID NO: 102 (CLQNALDIL); SEC ID NO: 103 (ILDEERDKV); SEC ID NO: 104 (IKEHMLKKY); SEC ID NO: 105 (DEEEAIVAY); SEC ID NO: 106 (KLGALQAK); SEC ID NO: 107 (QYILGADPL); SEC ID NO: 108 (KYTQTEEFK); SEC ID NO: 109 (KARAKKDEL); SEC ID NO: 110 (VMKRRIEEL); SEC ID NO: 111 (RHRKEHML); SEC ID NO: 112 (ELRRKMMYM); SEC ID NO: 113 (QIKVRVDMV); SEC ID NO: 114 (ELKRKMMYM); SEC ID NO: 115 (RRKMMYMCY); SEC ID NO: 116 (AYAQKIFKIL); SEC ID NO: 117 (CSPDEIMAYAQKIFKILDEE); SEC ID NO: 118 (SEPVSEIEEVAPEEEEDGAE); SEC ID NO: 119 (VLCCYVLEETSVMIAKRPLI); SEC ID NO: 120 (RRKMMYMCYRNIIEFFTKNSA); y SEC ID NO: 121 (NIEFFTKNSAFPKTTNGCSQ); y

(iii) dicho epítipo de CTL de pp150 consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 122 (GQTEPIAFV); SEC ID NO: 130 (RPSTPRAAV); SEC ID NO: 131 (SPWAPTAPL); SEC ID NO: 132 (KARDHLAVL); SEC ID NO: 133 (WPRERAWAL); SEC ID NO: 134 (NVRRSWEEL); SEC ID NO: 138 (RIEENLEGV); SEC ID NO: 139 (PLIPTTAVI); SEC ID NO: 140 (LIEDFDIYV); SEC ID NO: 141 (KMSVRETLV); SEC ID NO: 142 (FLGARSPSL); SEC ID NO: 143 (ALVNAVNL); SEC ID NO: 144 (ALVNFLRHL); SEC ID NO: 145 (NILQKIEKI); SEC ID NO: 146 (ERAWALKNPHLA); SEC ID NO: 147 (WPRERAWALKNPHLAYNPF); SEC ID NO: 148 (STSQKPVLGKRVATPHASAR); y SEC ID NO: 149 (HANTALVNAVNLVYTGRLI).

En una realización particularmente preferida, el péptido de la invención consiste en alrededor de 8-12 aminoácidos de longitud, o alrededor de 19-21 aminoácidos de longitud, más preferiblemente 9 ó 10 u 11 o 20 restos de longitud.

Como se usa aquí, la expresión "epítipo de CTL" se debe tomar para que signifique un péptido o polipéptido o antígeno de origen no natural de al menos alrededor de 9 aminoácidos de longitud y que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i) una secuencia que interacciona en un nivel significativo con un alelo de MHC Clase I según se determina usando un algoritmo predictivo para determinar epítipos que se unen a MHC Clase I, tal como, por ejemplo, el algoritmo SYFPEITHI de la Universidad de Tuebingen, Alemania, o el algoritmo del programa de Predicciones de Unión a Péptidos de HLA de la Bioinformatics and Molecular Analysis Section (BIMAS) del National Institutes of Health del Gobierno de los Estados Unidos de América;

(ii) una secuencia que se une a y/o estabiliza una molécula de MHC Clase I en la superficie de una célula que presenta antígeno (APC), independientemente de si dicha APC está o no en una forma sustancialmente aislada, tal como, por ejemplo, en la fracción de PBMC o en la fracción de capa leuco-plaquetaria de una muestra obtenida de un sujeto humano, o como alternativa, en su estado natural;

(iii) una secuencia que induce una respuesta de CTL de memoria o provoca la expresión de IFN- $\gamma$  por un



linfocito T, tal como, por ejemplo, linfocito T CD8<sup>+</sup>, linfocito T citotóxico (CTL) o linfocito T efector o linfocito T de memoria, independientemente de si dicho linfocito T está o no en una forma sustancialmente aislada, tal como, por ejemplo, en la fracción de PBMC o en la fracción de capa leuco-plaquetaria de una muestra obtenida de un sujeto humano, o como alternativa, en su estado natural; y

- 5 (iv) una secuencia que estimula la actividad de CTL en un ensayo estándar de citotoxicidad.

Preferiblemente, un epítipo de CTL como se define aquí comprende una secuencia que satisface al menos, preferiblemente al menos dos, y más preferiblemente al menos tres criterios funcionales citados en los párrafos (ii) a (iv) *más arriba*. Incluso más preferiblemente, un epítipo de CTL como se define aquí comprende una secuencia que satisface adicionalmente el criterio (i) *más arriba*.

- 10 Los epítipos de CTL particularmente preferidos de la invención son capaces de provocar una respuesta inmunitaria celular frente a HCMV intacto en células o tejidos humanos, tales como, por ejemplo, reconociendo y lisando células humanas infectadas con HCMV, proporcionando o potenciando de ese modo la inmunidad celular frente a HCMV.

Como se usa aquí, la expresión “pp28” o “pp28 de HCMV” o “antígeno pp28”, o expresión similar, se debe tomar para que signifique un polipéptido de HCMV que tiene una secuencia de aminoácidos públicamente disponible depositada con el número de acceso NCBI NC 001347 (Chee et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol 154, 125-169, 1990; y Bankier et al., DNA Seq 2, 1-12, 1991), y que tiene preferiblemente la función de una ADNasa, o un polipéptido relacionado de HCMV u otro virus del herpes  $\beta$  de seres humanos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con dicha secuencia. Los expertos en la técnica estarán al tanto de que el polipéptido pp28 de HCMV también se denomina “UL98”.

- 20 “NCBI” significa la base de datos del National Center for Biotechnology Information en la National Library of Medicine en el National Institutes of Health del gobierno de los Estados Unidos de América, Bethesda, MD 20894.

Un epítipo preferido de pp28 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 150 (LLIDPTSGL); SEC ID NO: 151 (LLVEPCARV); SEC ID NO: 152 (LLLIVTPVV); SEC ID NO: 153 (FLLSHDAAL); SEC ID NO: 154 (PLREYLADL); SEC ID NO: 155 (GLLGASMDL); SEC ID NO: 156 (LVEPCARVY); SEC ID NO: 157 (GIKHEGLVK); SEC ID NO: 158 (ELLAGGRVF); SEC ID NO: 159 (RLLDLAPNY); SEC ID NO: 160 (ELLGRLNVY); SEC ID NO: 161 (CRYKYLRKK); y SEC ID NO: 162 (ARVYEIKCR).

Incluso más preferiblemente, un epítipo de CTL de pp28 tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 150 (LLIDPTSGL) o SEC ID NO: 162 (ARVYEIKCR), y todavía más preferiblemente tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 162.

- 30 Como se usa aquí, la expresión “pp50” o “pp50 de HCMV” o “antígeno pp50”, o expresión similar, se debe tomar para que signifique un polipéptido de HCMV que tiene la secuencia de aminoácidos públicamente disponible depositada con el número de acceso NCBI QQBEV2 o P16790 (Chee et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol 154, 125-169, 1990), y que tiene preferiblemente la función de un factor de procesabilidad de ADN polimerasa o de una proteína accesoria de polimerasa como se describe por Leach y Mocarski, J. Virol., 63, 1783-1791, 1989, o un polipéptido relacionado de HCMV o de otro virus del herpes  $\beta$  de seres humanos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con dicha secuencia. Los expertos en la técnica estarán al tanto de que el polipéptido pp50 de HCMV también se denomina “UL44”.

Un epítipo preferido de pp50 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 163 (LLNCAVTKL); SEC ID NO: 164 (QLRSVIRAL); SEC ID NO: 165 (VTEHDTLLY); SEC ID NO: 166 (RGDPFDKNY); SEC ID NO: 167 (GLDRNSGNY); SEC ID NO: 168 (TLLNCAVTK); SEC ID NO: 169 (TVRSHCVSK); SEC ID NO: 170 (YEQHKITSY); SEC ID NO: 171 (TRVKRNVKK); SEC ID NO: 172 (SEDSVTFFEF); y SEC ID NO: 173 (TRLSEPPTL).

- 45 Incluso más preferiblemente, el epítipo de pp50 consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 163 (LLNCAVTKL); SEC ID NO: 165 (VTEHDTLLY); SEC ID NO: 166 (RGDPFDKNY); SEC ID NO: 167 (GLDRNSGNY); y SEC ID NO: 170 (YEQHKITSY). Todavía más preferiblemente, el epítipo de pp50 tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 165.

Como se usa aquí, la expresión “pp65” o “pp65 de HCMV” o “antígeno pp65”, o expresión similar, se debe tomar para que signifique un polipéptido de HCMV que tiene la secuencia de aminoácidos públicamente disponible depositada con el número de acceso NCBI WMBETW (Chee et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol 154, 125-169, 1990; y Pande et al., Virol., 82, 220-228, 1991), y que tiene preferiblemente la función de una fosfoproteína de matriz inferior o proteína de tegumento como se describe por Pande et al., Virol., 82, 220-228, 1991, o un polipéptido relacionado de HCMV u otro virus del herpes  $\beta$  de seres humanos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con dicha secuencia.

- 55 Epítipos particularmente preferidos de pp65 consistirán en una secuencia de aminoácidos enumerada aquí anteriormente, y más preferiblemente una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 25 (IGDQYVKVY); SEC ID NO: 26 (TVQGQNLKY); SEC ID NO: 27 (YRIQ GKLEY); SEC ID NO: 40

(HVRVSQPSL); SEC ID NO: 41 (QARLTVSGL); SEC ID NO: 42 (RRRHRQDAL); SEC ID NO: 53 (LMNGQQIFL); SEC ID NO: 54 (ILARNLVPM); SEC ID NO: 56 (QEFFWDANDIY); SEC ID NO: 57 (QEFFWDANDI); SEC ID NO: 58 (QYRIQKLE); SEC ID NO: 59 (RKHRHLPVADAV); SEC ID NO: 60 (DPVAALFFF); SEC ID NO: 61 (PGKISHIMLDVA); SEC ID NO: 63 (QAIRETVEL); SEC ID NO: 66 (CPSQEPMSIYVY); SEC ID NO: 67 (LNIPSINVHHYPSAAERKHR); SEC ID NO: 68 (ATVQQGNLKYQEFFWDANDI); SEC ID NO: 69 (QEFFWDANDIYRIFAELEGV); SEC ID NO: 70 (PQYSEHPTFTSQYRIQKLE); SEC ID NO: 71 (SQYRIQKLEYRHTWDRHDE); SEC ID NO: 72 (VFTWPPWQAGILARNLVPMV); SEC ID NO: 73 (ILARNLVPMVATVQQGNLKY); SEC ID NO: 75 (YPSAAERKHRHLPVADAVIH); SEC ID NO: 76 (QYDPVAALFFFDIDLLLQRG); SEC ID NO: 77 (IIKPGKISHIMLDVAFTSHE); SEC ID NO: 80 (MNGQQIFLEVQAIRETVELR); SEC ID NO: 81 (QAIRETVELRQYDPVAALFF); SEC ID NO: 87 (YYTSAFVFPTKDVLRHVVC); SEC ID NO: 90 (SICPSQEPMSIYVYALPLKM); y SEC ID NO: 92 (QQNQWKEPDVYYTSAFVFPT).

Como se usa aquí, la expresión “pp71” o “pp71 de HCMV” o “antígeno pp71”, o expresión similar, se debe tomar para que signifique un polipéptido de HCMV que tiene la secuencia de aminoácidos públicamente disponible depositada con los números de acceso NCBI NP 040017 o WMBES1 (Chee et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol 154, 125-169, 1990; Ruger et al., J. Virol., 61, 446-453, 1987; y Bankier et al., DNA Seq 2, 1-12, 1991), y que tiene preferiblemente la función de una fosfoproteína de la matriz superior como se describe por Ruger et al., J. Virol., 61, 446-453, 1987, o un polipéptido relacionado de HCMV u otro virus del herpes  $\beta$  de seres humanos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con dicha secuencia. Los expertos en la técnica estarán al tanto de que el polipéptido pp71 de HCMV también se denomina “UL82”.

Un epítipo particularmente preferido de pp71 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 174 (QLLIPKSFTL); SEC ID NO: 175 (TLVIPSWHV); SEC ID NO: 176 (LLIPKSFTL); SEC ID NO: 177 (DLVPLTVSV); SEC ID NO: 178 (CSDPNTYIHK); SEC ID NO: 179 (EYIVQIQNAF); y SEC ID NO: 180 (AEVVARHNPY).

Como se usa aquí, la expresión “pp150” o “pp150 de HCMV” o “antígeno pp150”, o expresión similar, se debe tomar para que signifique un polipéptido de HCMV que tiene la secuencia de aminoácidos públicamente disponible depositada con el número de acceso NCBI XPBEA9 (Chee et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol 154, 125-169, 1990), y que tiene preferiblemente la función de una fosfoproteína estructural grande (aproximadamente 150 kDa) como se describe por Jahn et al., J. Virol., 61, 1358-1367, 1987, o un polipéptido relacionado de HCMV u otro virus del herpes  $\beta$  de seres humanos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con dicha secuencia.

Epítopos particularmente preferidos de pp150 consistirán en una secuencia de aminoácidos enumerada aquí anteriormente, y más preferiblemente la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 146 (ERAWALKNPHLA) o SEC ID NO: 147 (WPRERAWALKNPHLAYNPFR).

Como se usa aquí, la expresión “gB” o “gB de HCMV” o “antígeno gB”, o expresión similar, se debe tomar para que signifique un polipéptido de HCMV que tiene la secuencia de aminoácidos públicamente disponible depositada con el número de acceso NCBI P06473 (Chee et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol 154, 125-169, 1990; Cranage et al., EMBO J. 5, 3057-3063, 1986; Kouzarides et al., Virol., 157, 397-413, 1987; Kouzarides et al., J. Virol., 61, 125-133, 1987), y que tiene preferiblemente la función de una ADN polimerasa o que es una glicoproteína como se describe por Kouzarides et al., J. Virol., 61, 125-133, 1987, o un polipéptido relacionado de HCMV u otro virus del herpes  $\beta$  de seres humanos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con dicha secuencia. Los expertos en la técnica estarán al tanto de que el polipéptido gB de HCMV también se denomina “UL55”.

Un epítipo particularmente preferido de gB tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 123 (AYEYVDYLF); SEC ID NO: 124 (SYENKTMQL); SEC ID NO: 125 (AYIYTTYLL); SEC ID NO: 126 (NTDFRVLEL); SEC ID NO: 127 (ATSTGDVVY); SEC ID NO: 128 (LDEGIMVVY); SEC ID NO: 129 (VKESPGRCY); SEC ID NO: 135 (IMREFNSYK); SEC ID NO: 136 (KMTATFLSK); SEC ID NO: 137 (CYSRPVVIF); SEC ID NO: 181 (RIWCLVVCV); SEC ID NO: 182 (QMLLALARL); SEC ID NO: 183 (GLDDLMSGL); SEC ID NO: 184 (IILVAIAVV); SEC ID NO: 185 (DLDEGIMVV); SEC ID NO: 186 (NLFPYLVSA); SEC ID NO: 187 (AVGGAVASV); SEC ID NO: 188 (YINRALAQI); SEC ID NO: 189 (YAYIYTTYL); SEC ID NO: 190 (VFETSGGLVV); SEC ID NO: 191 (DDYSNTHSTRYV); SEC ID NO: 192 (RSYAYIYTTYLLGSNTEYVA); SEC ID NO: 193 (TYEKYGNVSVFETSGGLWF); SEC ID NO: 194 (FETSGGLVFWQGIKQKSLV); y SEC ID NO: 195 (MQLIPDDYSNTHSTRYVTVK).

Incluso más preferiblemente, el epítipo de gB consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 187 (AVGGAVASV); SEC ID NO: 189 (YAYIYTTYL); SEC ID NO: 190 (VFETSGGLVV); SEC ID NO: 191 (DDYSNTHSTRYV); SEC ID NO: 192 (RSYAYIYTTYLLGSNTEYVA); SEC ID NO: 193 (TYEKYGNVSVFETSGGLWF); y SEC ID NO: 195 (MQLIPDDYSNTHSTRYVTVK).

Como se usa aquí, la expresión “gH” o “gH de HCMV” o “antígeno gH”, o expresión similar, se debe tomar para que signifique un polipéptido de HCMV que tiene la secuencia de aminoácidos públicamente disponible depositada con

el número de acceso NCBI P12824 (Chee et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol 154, 125-169, 1990; Cranage et al., J. Virol., 62, 1416-1422, 1988), y que es preferiblemente una glicoproteína como se describe por Cranage et al., J. Virol., 62, 1416-1422, 1988, o un polipéptido relacionado de HCMV u otro virus del herpes  $\beta$  de seres humanos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con dicha secuencia. Los expertos en la técnica estarán al tanto de que el polipéptido gH de HCMV también se denomina "UL75".

Un epítipo particularmente preferido de gH tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 196 (YLMDELRYV); SEC ID NO: 197 (YLTVFTVYL); SEC ID NO: 198 (TLTEDFFVV); SEC ID NO: 199 (LLMMSVYAL); SEC ID NO: 200 (YLLYRMLKT); SEC ID NO: 201 (ILFDGHDLL); SEC ID NO: 202 (LIFGHLPRV); SEC ID NO: 203 (SLVRLVYIL); SEC ID NO: 204 (LLYPTAVDL); SEC ID NO: 205 (ALDPYNEW); SEC ID NO: 206 (LMLLKNGTV); SEC ID NO: 207 (SAIIGIYLL); SEC ID NO: 208 (ITSLVRLVY); SEC ID NO: 209 (HHEYLSLDLY); SEC ID NO: 210 (AIIGIYLLY); SEC ID NO: 211 (QTEKHELLV); SEC ID NO: 212 (ATDSRLLMM); SEC ID NO: 213 (FLDAALDFNY); SEC ID NO: 214 (DTQGVINIMY); SEC ID NO: 215 (LRENTTQCTY); SEC ID NO: 216 (SAIIGIYLLY); SEC ID NO: 217 (SLRNSTVVR); SEC ID NO: 218 (ALALFAAAR); SEC ID NO: 219 (QLNRHSYLYK); SEC ID NO: 220 (RLFPDATVP); SEC ID NO: 221 (RLNTYALVSK); SEC ID NO: 222 (LVRLVYILSK); SEC ID NO: 223 (YLMDELRYVK); SEC ID NO: 224 (ELYLMGSLVH); SEC ID NO: 225 (ALTVEHVSYS); SEC ID NO: 226 (NYLDLSALL); SEC ID NO: 227 (SYVVTNQYL); SEC ID NO: 228 (SYLKDSDFL); SEC ID NO: 229 (TYALVSKDL); SEC ID NO: 230 (SYRSFSQQL); SEC ID NO: 231 (TYGRPIRFL); SEC ID NO: 232 (YYVFHMPRCL); SEC ID NO: 233 (MYMHSDDDVL); SEC ID NO: 234 (ETFPDLFCL); SEC ID NO: 235 (DLTETLERY); SEC ID NO: 236 (SPRTHYLML); SEC ID NO: 237 (FPDLFCLPL); SEC ID NO: 238 (SPRTHYLMLL); SEC ID NO: 239 (MPRCLFAGPL); SEC ID NO: 240 (TPMLLIFGHL); SEC ID NO: 241 (APYQRDNFIL); SEC ID NO: 242 (GRCQMLDRR); SEC ID NO: 243 (RRDHSLERL); SEC ID NO: 244 (SEALDPHAF); SEC ID NO: 245 (RENTTQCTY); SEC ID NO: 246 (DDVLFALDPY); SEC ID NO: 247 (HELLVLVKKQAQL); SEC ID NO: 248 (LTVSEHVSYYVT); SEC ID NO: 249 (RQTEKHELLVLVKKQAQLNRH); y SEC ID NO: 250 (ALTVEHVSYYVTNQYLIKG).

Incluso más preferiblemente, el epítipo de gH consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 247 (HELLVLVKKQAQL) o SEC ID NO: 249 (RQTEKHELLVLVKKQAQLNRH).

Como se usa aquí, la expresión "IE-1" o "IE-1 de HCMV" o "antígeno IE-1", o expresión similar, se debe tomar para que signifique un polipéptido de HCMV que tiene la secuencia de aminoácidos públicamente disponible depositada con el número de acceso NCBI EDBEM5 (Chee et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol 154, 125-169, 1990), y que tiene preferiblemente el perfil de expresión de una proteína de HCMV inmediata temprana, o un polipéptido relacionado de HCMV u otro virus del herpes  $\beta$  de seres humanos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con dicha secuencia. Los expertos en la técnica estarán al tanto de que el polipéptido IE-1 de HCMV también se denomina "UL123".

Los epítipos particularmente preferidos de IE-1 consistirán en una secuencia de aminoácidos enumerada aquí anteriormente, y más preferiblemente la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 97 (VLAELVKQI); SEC ID NO: 101 (VLEETSVML); SEC ID NO: 112 (ELRRKMMYM); SEC ID NO: 113 (QIKVRVDMV); SEC ID NO: 114 (ELKRKMMYM); SEC ID NO: 116 (AYAQKIFKIL); SEC ID NO: 117 (CSPDEIMAYAQKIFKILDEE); SEC ID NO: 118 (SEPVSEIEEVAPEEEEDGAE); y SEC ID NO: 119 (VLCCYVLEETSVMLAKRPLI).

Como se usa aquí, la expresión "IE-2" o "IE-2 de HCMV" o "antígeno IE-2", o expresión similar, se debe tomar para que signifique un polipéptido de HCMV que tiene la secuencia de aminoácidos públicamente disponible depositada con el número de acceso NCBI NC 001347 (Chee et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol 154, 125-169, 1990; Bankier et al., DNA Seq 2, 1-12, 1991), y que tiene preferiblemente el perfil de expresión de una proteína de HCMV inmediata temprana, o un polipéptido relacionado de HCMV u otro virus del herpes  $\beta$  de seres humanos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con dicha secuencia. Los expertos en la técnica estarán al tanto de que el polipéptido IE-2 de HCMV también se denomina "UL122".

Un epítipo particularmente preferido de IE-2 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 251 (FLMEHTMPV); SEC ID NO: 252 (LMQKFPKQV); SEC ID NO: 253 (NLALSTPFL); SEC ID NO: 254 (IYTRNHEV); SEC ID NO: 255 (IYTRNHEVK); SEC ID NO: 256 (LLGALNLCL); SEC ID NO: 257 (KPEPDFTIQY); SEC ID NO: 258 (IMKDKNTPF); SEC ID NO: 259 (PRKKKSKRI); SEC ID NO: 260 (FEQPTETPP); SEC ID NO: 261 (FEQPTETP); SEC ID NO: 262 (FEQPTETPPE); SEC ID NO: 263 (EQPTETPPE); SEC ID NO: 264 (QFEQPTETPPE); SEC ID NO: 265 (SDYNMIIHA); SEC ID NO: 266 (YRNMIIHAAT); SEC ID NO: 267 (CLPLMQKFP); SEC ID NO: 268 (IDEVSRMFRNTNRS); SEC ID NO: 269 (TAAKAYAVGQFEQPTETPPE); (SEC ID NO: 270 (FEQPTETPPEDLDTLSLAIE); SEC ID NO: 271 (MLPLIKQEDIKPEPDFTIQY); SEC ID NO: 272 (THQLCPRSSDYRNMIIHAAT); SEC ID NO: 273 (YRNMIIHAATPVDLLGALNL); SEC ID NO: 274 (TGPRKKKSKRISELDNEKVR); SEC ID NO: 275 (PVDLLGALNLCLPLMQKFPK); SEC ID NO: 276 (IQIYTRNHEVKSEVDAVRC); SEC ID NO: 277 (VKSEVDAVRCRLGTMCNLAL); SEC ID NO: 278 (RVKIDEVSRMFRNTNRSLEY); SEC ID NO: 279 (SSSSSSCSSASDSESESEEM); SEC ID NO: 280 (ASSPSTGSGTTPRBTSPHPL); SEC ID NO: 281 (PRVTSPTHPLSQMNHPLPD); SEC ID NO: 282 (PLGRPDEIDSSSSSSSSCSA); SEC ID NO: 283 (SDSESESEEMKCSSGGGASV); SEC ID NO: 284 (KCSSGGGASVTSSHGRGGF); SEC ID NO: 285 (CTPNVQTRRGRVKIDEVSRM); SEC ID NO: 286 (FRNTNRSLEYKNLPFTIPSM); SEC ID NO: 287 (HQVLDEAIKACKTMQVNNKG); SEC ID NO: 288

(CKTMQVNNKGIQIYTRNHE); SEC ID NO: 289 (KAAWSLKLHHTQLCPRSSD); y SEC ID NO: 290 (CLPLMQKFPKQVMVRFSTN).

5 Incluso más preferiblemente, el epítipo de IE-2 consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 254 (IYTRNHEV); SEC ID NO: 255 (IYTRNHEVK); SEC ID NO: 260 (FEQPTETPP); SEC ID NO: 261 (FEQPTETP); SEC ID NO: 262 (FEQPTETPPE); SEC ID NO: 263 (EQPTETPPE); SEC ID NO: 264 (QFEQPTETPPE); SEC ID NO: 269 (TAAKAYAVGQFEQPTETPPE); SEC ID NO: 270 (FEQPTETPPEDLDLTLAIE); y SEC ID NO: 276 (IQIYTRNHEVKSEVDAVRC).

10 Como se usa aquí, la expresión "UL18" o "UL18 de HCMV" o "antígeno UL18", o expresión similar, se debe tomar para que signifique un polipéptido de HCMV que tiene la secuencia de aminoácidos públicamente disponible depositada con el número de acceso NCBI P08560 (Chee et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol 154, 125-169, 1990; Beck y Barrell, Nature 331, 269-272, 1988), y que es preferiblemente una glicoproteína que tiene al menos una región de transmembrana, o un polipéptido relacionado de HCMV u otro virus del herpes  $\beta$  de seres humanos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con dicha secuencia.

15 Un epítipo particularmente preferido de UL18 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 291 (GEINITFIHY); SEC ID NO: 292 (TENGSFVAGY); SEC ID NO: 293 (TMWCLTLFV); y SEC ID NO: 308 (LELEIALGY).

Incluso más preferiblemente, el epítipo de UL18 consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 292 (TENGSFVAGY).

20 Como se usa aquí, la expresión "US2" o "US2 de HCMV" o "antígeno US2", o expresión similar, se debe tomar para que signifique un polipéptido de HCMV que tiene la secuencia de aminoácidos públicamente disponible depositada con el número de acceso NCBI QQBEC5 (Chee et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol 154, 125-169, 1990; Weston y Barrell, J. Mol. Biol. 192, 177-208, 1986), y que es preferiblemente una glicoproteína que tiene al menos una región de transmembrana, o un polipéptido relacionado de HCMV u otro virus del herpes  $\beta$  de seres humanos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con dicha secuencia.

25 Un epítipo particularmente preferido de US2 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 294 (LLVLFIVYV); SEC ID NO: 295 (SMMWMRFFV); SEC ID NO: 296 (TLLVLFIVYV); y SEC ID NO: 297 (VYVTVDCNL).

Incluso más preferiblemente, el epítipo de US2 consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 295 (SMMWMRFFV).

30 Como se usa aquí, la expresión "US3" o "US3 de HCMV" o "antígeno US3", o expresión similar, se debe tomar para que signifique un polipéptido de HCMV que tiene la secuencia de aminoácidos públicamente disponible depositada con los números de acceso NCBI QQBEC6 o P09712 o AAA45955 (Chee et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol 154, 125-169, 1990; Weston y Barrell, J. Mol. Biol. 192, 177-208, 1986; y Weston Virol. 162, 406-416, 1988), y que es preferiblemente una glicoproteína que se expresa tempranamente durante la infección, o un polipéptido relacionado de HCMV u otro virus del herpes  $\beta$  de seres humanos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con dicha secuencia.

35 Un epítipo particularmente preferido de US3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 298 (YLFSLVVLV); SEC ID NO: 299 (TLLVYLFSL); SEC ID NO: 300 (LLFRTLLVYL); y SEC ID NO: 301 (VYLFSLVVL).

40 Incluso más preferiblemente, el epítipo de US3 consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 298 (YLFSLVVLV).

45 Como se usa aquí, la expresión "US6" o "US6 de HCMV" o "antígeno US6", o expresión similar, se debe tomar para que signifique un polipéptido de HCMV que tiene la secuencia de aminoácidos públicamente disponible depositada con el número de acceso NCBI QQBEC7 (Chee et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol 154, 125-169, 1990; Weston y Barrell, J. Mol. Biol. 192, 177-208, 1986), y que es preferiblemente una glicoproteína que tiene al menos una región de transmembrana, o un polipéptido relacionado de HCMV u otro virus del herpes  $\beta$  de seres humanos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con dicha secuencia.

Incluso más preferiblemente, el epítipo de US6 consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 303 (LYLCCGITL).

50 Como se usa aquí, la expresión "US11" o "US11 de HCMV" o "antígeno US11", o expresión similar, se debe tomar para que signifique un polipéptido de HCMV que tiene la secuencia de aminoácidos públicamente disponible depositada con el número de acceso NCBI NC 001347 (Chee et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol 154, 125-169, 1990; Bankier et al., DNA Seq 2, 1-12; 1991), o un polipéptido relacionado de HCMV u otro virus del herpes  $\beta$  de seres humanos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con dicha secuencia.

55

Un epítipo particularmente preferido de US11 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 302 (YYVECEPRC); SEC ID NO: 304 (TLFDEPPPLV); SEC ID NO: 305 (TPRVYYQTL); SEC ID NO: 306 (APVAGSMPEL); y SEC ID NO: 307 (SESLVAKRY).

5 Como será conocido por los expertos en la técnica, un epítipo de CTL mínimo está restringido a linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresan subconjuntos particulares de moléculas de HLA Clase I. Preferiblemente, el epítipo de CTL de la presente invención está restringido a alelos de HLA seleccionados del grupo que consiste en: HLA A1, HLA A2, HLA A3, HLA A23, HLA A24, HLA A26, HLA A29, HLA A30, HLA B7, HLA B8, HLA B27, HLA B35, HLA B41, HLA B44, HLA B57, y HLA B58. En las Tablas 1, 3 y 4 aquí se proporcionan restricciones particulares a HLA para los epítipos de la invención.

10 En una realización particularmente preferida, el epítipo de la invención derivado de pp28 está restringido a un alelo de HLA seleccionado del grupo que consiste en: HLA A1, HLA A2, HLA A3, y HLA B27.

En una realización particularmente preferida, el epítipo de la invención derivado de pp50 está restringido a un alelo de HLA seleccionado del grupo que consiste en: HLA A1, HLA A2, HLA A3, HLA B27 y HLA B44.

15 En una realización particularmente preferida, el epítipo de la invención derivado de pp65 está restringido a un alelo de HLA seleccionado del grupo que consiste en: HLA A1, HLA A2, HLA A3, HLA A24, HLA B7, HLA B8, HLA B27, HLA B35, HLA B44, HLA B57, y HLA B58.

En una realización particularmente preferida, el epítipo de la invención derivado de pp71 está restringido a un alelo de HLA seleccionado del grupo que consiste en: HLA A1, HLA A2, HLA A24, y HLA B44.

20 En una realización particularmente preferida, el epítipo de la invención derivado de pp150 está restringido a un alelo de HLA seleccionado del grupo que consiste en: HLA A1, HLA A2, HLA B7 y HLA B8.

En una realización particularmente preferida, el epítipo de la invención derivado de gB está restringido a un alelo de HLA seleccionado del grupo que consiste en: HLA A1, HLA A2, HLA A3, HLA A24, HLA A29, HLA B41, HLA DR7 y HLA DR\*.

25 En una realización particularmente preferida, el epítipo de la invención derivado de gH está restringido a un alelo de HLA seleccionado del grupo que consiste en: HLA A1, HLA A2, HLA A3, HLA A24, HLA A26, HLA B7, HLA B27, y HLA B44.

En una realización particularmente preferida, el epítipo de la invención derivado de IE-1 está restringido a un alelo de HLA seleccionado del grupo que consiste en: HLA A1, HLA A2, HLA A3, HLA A23, HLA A24, HLA A30, HLA B7, HLA B8 y HLA B27.

30 En una realización particularmente preferida, el epítipo de la invención derivado de IE-2 está restringido a un alelo de HLA seleccionado del grupo que consiste en: HLA A1, HLA A2, HLA A3, HLA B8, HLA B35 y HLA B41.

En una realización particularmente preferida, el epítipo de la invención derivado de UL18 está restringido a un alelo de HLA seleccionado del grupo que consiste en: HLA A2 y HLA B44.

35 En una realización particularmente preferida, el epítipo de la invención derivado de US2 está restringido a HLA A2 o HLA A24.

En una realización particularmente preferida, el epítipo de la invención derivado de US3 está restringido a HLA A2 o HLA A24.

En una realización particularmente preferida, el epítipo de la invención derivado de US6 está restringido a HLA A24.

40 En una realización particularmente preferida, el epítipo de la invención derivado de US11 está restringido a un alelo de HLA seleccionado del grupo que consiste en: HLA A2, HLA A24, HLA B7, y HLA B44.

45 Preferiblemente, los péptidos inmunológicamente activos de la invención presentan especificidad por el supertipo de HLA. Tales epítipos se prefieren claramente en formulaciones de vacuna, debido a que reducen el número total de epítipos requeridos para cubrir una proporción significativa de la población independientemente de la etnicidad, minimizando de ese modo las dificultades de la formulación. Por ejemplo, los CTLs específicos para el epítipo de IE-1 de HCMV restringido a HLA A23 expuesto en SEC ID NOS: 116 ó 117 reconocen células diana que expresan HLA A23, HLA A24, y HLA A30 sensibilizadas con péptido. Adicionalmente, el epítipo de IE-1 de HCMV expuesto en SEC ID NO: 109 está restringido tanto a HLA B7 como a HLA B8. Adicionalmente, los CTLs específicos para el epítipo de pp65 de HCMV expuesto en SEC ID NOS: 57 ó 69 reconocen células diana que expresan HLA A1 y HLA A24 sensibilizadas con péptidos. Adicionalmente, los CTLs específicos para el epítipo de pp65 de HCMV expuesto en SEC ID NOS: 63, 80 u 81 reconocen células diana que expresan HLA B57 y HLA B58 sensibilizadas con péptidos.

50 Preferiblemente, el péptido inmunológicamente activo de la invención comprende adicionalmente uno o más

5 determinantes CD4+ suficientes para facilitar una función de linfocito T auxiliar en el contexto de una molécula de MHC clase II en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC) de un sujeto humano infectado con HCMV. Por ejemplo, se proporcionan aquí varios péptidos 20-meros que comprenden epítomos de CTL contiguos o solapantes y funciones de epítomos de linfocitos T auxiliares, como se evidencia por tener la capacidad para unirse tanto a células CD4+ como a células CD8+. Tal péptido tiene una ventaja con respecto a un epítomo de CTL mínimo al no requerir necesariamente la inclusión de un epítomo de linfocito T auxiliar exógeno en una formulación de vacuna.

10 Por ejemplo, un epítomo preferido de pp65 que comprende tanto epítomos de CTL como de linfocitos T auxiliares tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO:70 (PQYSEHPTFTSQYRIQGKLE); SEC ID NO: 76 (QYDPVAALFFFDIDLLLQRG); SEC ID NO: 77 (IIKPGKISHIMLDVAFTSHE); SEC ID NO: 80 (MNGQQIFLEVQAI RETVELR); SEC ID NO: 81 (QAI RETVELRQYDPVAALFF); SEC ID NO: 87 (YYTSAFVFPTKDVALRHVVC); SEC ID NO: 88 (VTTERKTPRV TGGGAMAGAS); SEC ID NO: 90 (SICPSQEPMSIYVYALPLKM); SEC ID NO: 92 (QQNQWKEPDVYYTSAFVFPT); y SEC ID NO: 94 (TGGGAMAGASTSAGRKRKSA).

15 Un epítomo particularmente preferido de pp150 que comprende tanto epítomos de CTL como de linfocitos T auxiliares tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 147 (WPRERAWALKNPHLAYNPFRR).

Un epítomo particularmente preferido de gB que comprende tanto epítomos de CTL como de linfocitos T auxiliares tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 192 (RSYAYIYTTYLLGSNTEYVA) o SEC ID NO: 195 (MQLIPDDYSNTHSTRYVTVK).

20 Un epítomo particularmente preferido de gH que comprende tanto epítomos de CTL como de linfocitos T auxiliares tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 249 (RQTEKHELLVLVKKAAQLNRH).

Un epítomo particularmente preferido de IE-1 que comprende tanto epítomos de CTL como de linfocitos T auxiliares consistirá en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 117 (CSPDEIMAYAQKIFKILDEE).

25 Un epítomo particularmente preferido de IE-2 que comprende tanto epítomos de CTL como de linfocitos T auxiliares tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 269 (TAAKAYAVGQFEQPTETPPE); SEC ID NO: 270 (FEQPTETPPEDLDLTLAIE); SEC ID NO: 279 (SSSSSSCSSASDSESESEEM); y SEC ID NO: 283 (SDSESESEEMKCSSGGASV).

30 Por "variante funcionalmente equivalente" de un epítomo ejemplificado aquí se quiere decir un péptido de la misma longitud que dicho epítomo y especificidad por HLA similar, y que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que dicho epítomo. El péptido o las variantes estructurales descritas aquí también pueden ser una parte funcional de un epítomo de péptido más largo que produce los efectos inmunológicos descritos aquí, con la condición de que el péptido más largo no tenga una especificidad por HLA diferente con respecto al péptido base del que deriva, y no sea un epítomo previamente conocido.

35 Las variantes de secuencias funcionalmente equivalentes se pueden diseñar y/o construir por los expertos en la técnica basándose en la presente descripción sin experimentación innecesaria. Por ejemplo, se ha establecido que moléculas individuales de MHC Clase I se unen preferentemente a péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que incluye una o más "posiciones de anclaje" invariantes que permiten al péptido unirse a moléculas de MHC Clase I con una afinidad elevada (K. Falk et al., Nature 351, 290-296, 1991). Adicionalmente, los aminoácidos distintos de aquellos en las posiciones de anclaje también contribuyen a la especificidad de la unión del péptido a moléculas de MHC Clase I. Las variantes preferidas de los péptidos ejemplificados retendrán tales restos de los péptidos base.

40 Preferiblemente, el péptido variante, con las posiciones de anclaje intactas del péptido base, también consistirá en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

45 (i) una secuencia que interacciona en un nivel significativo con un alelo de MHC Clase I según se determina usando un algoritmo predictivo para determinar epítomos que se unen a MHC Clase I, tal como, por ejemplo, el algoritmo SYFPEITHI de la Universidad de Tuebingen, Alemania, o el algoritmo del programa de Predicciones de Unión a Péptidos de HLA de la Bioinformatics and Molecular Analysis Section (BIMAS) del National Institutes of Health del Gobierno de los Estados Unidos de América;

50 (ii) una secuencia que se une a y/o estabiliza una molécula de MHC Clase I en la superficie de un APC, independientemente de si dicho linfocito T está o no en una forma sustancialmente aislada, tal como, por ejemplo, en la fracción de PBMC o en la fracción de capa leuco-plaquetaria de una muestra obtenida de un sujeto humano; o como alternativa, en su estado natural;

55 (iii) una secuencia que induce una respuesta de CTL de memoria o provoca la expresión de IFN- $\gamma$  por un linfocito T, tal como, por ejemplo, linfocito T CD8<sup>+</sup>, linfocito T citotóxico (CTL) o linfocito T efector, independientemente de si dicho linfocito T está o no en una forma sustancialmente aislada, tal como, por ejemplo, en la fracción de PBMC o en la fracción de capa leuco-plaquetaria de una muestra obtenida de un

sujeto humano, o como alternativa, en su estado natural; y

(iv) una secuencia que estimula la actividad de CTL en un ensayo estándar de citotoxicidad.

La determinación de tales criterios es fácilmente lograda a partir de la descripción proporcionada aquí.

Incluso más preferiblemente, una variante funcionalmente equivalente comprende una secuencia que satisface al menos , preferiblemente al menos dos, y más preferiblemente al menos tres criterios funcionales citados en los párrafos (ii) a (iv) *más arriba*. Incluso más preferiblemente, un epítipo de CTL como se define aquí comprende una secuencia que satisface adicionalmente el criterio (i) *más arriba*.

Las variantes preferidas incluirán típicamente sustituciones de aminoácidos conservativas con respecto a la secuencia del péptido base, tal como, por ejemplo, que consisten en la sustitución de un aminoácido por otro resto de hidrofobia, tamaño, carga, antigenicidad, etc., similar. Las sustituciones de aminoácidos conservativas particularmente preferidas se seleccionan del grupo que consiste en:

(i) una sustitución que implica cualesquiera dos de glicina, alanina y prolina;

(ii) una sustitución que implica cualesquiera dos de isoleucina, leucina y valina;

(iii) una sustitución que implica cualesquiera dos de metionina, treonina, serina, y cistina;

(iv) una sustitución que implica asparagina y glutamina;

(v) una sustitución que implica aspartato y glutamato;

(vi) una sustitución que implica lisina y arginina; y

(vii) una sustitución que implica cualesquiera dos de histidina, fenilalanina, triptófano y tirosina.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se realiza efectivamente en base a la hidrofilia, particularmente cuando la proteína o péptido equivalente funcional biológico creado de ese modo está destinado al uso en realizaciones inmunológicas, como en el presente caso (por ejemplo patente US nº 4.554.101). De hecho, la hidrofilia promedio local más grande de una proteína, según está gobernada por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad. Como se detalla en la patente US nº 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofilia a los restos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 +/-0,1); glutamato (+3,0 +/- 0,1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 +/- 0,1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Al realizar cambios basándose en valores de hidrofilia similares, se prefiere sustituir aminoácidos que tengan valores de hidrofilia en alrededor de +/-0,2 entre sí, más preferiblemente en alrededor de +/- 0,1, e incluso más preferiblemente en alrededor de +/- 0,05.

Los derivados preferidos de los presentes péptidos incluyen lipopéptidos, en los que un resto lipídico se conjuga a la secuencia de aminoácidos, actuando dicho resto lipídico como un adyuvante (Jung et al., *Angew Chem, Int Ed Engl* 10, 872, 1985; Martinon et al., *J Immunol* 149, 3416, 1992; Toyokuni et al., *J Am Chem Soc* 116, 395, 1994; Deprez, et al., *J Med Chem* 38, 459, 1995; Sauzet et al., *Vaccine* 13, 1339, 1995; BenMohamed et al., *Eur. J. Immunol.* 27, 1242, 1997; Wiesmuller et al., *Vaccine* 7, 29, 1989; Nardin et al., *Vaccine* 16, 590, 1998; Benmohamed, et al. *Vaccine* 18, 2843, 2000; y Obert, et al., *Vaccine* 16, 161, 1998). Los lipopéptidos adecuados no muestran ninguno de los efectos secundarios perjudiciales asociados con formulaciones adyuvantes, y se han observado tanto respuestas de anticuerpos como celulares frente a lipopéptidos. Se conocen varios restos lipídicos diferentes para uso en constructos lipopeptídicos. Los restos lipídicos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, grupos palmitoilo, miristoilo, estearoilo y decanoilo, o, más generalmente, se piensa que es útil cualquier grupo acilo graso saturado, monoinsaturado, o poliinsaturado, de C<sub>2</sub> a C<sub>30</sub>.

El lipoaminoácido S-[2,3-*bis*(palmitoiloxi)propil]cisteína, también conocido como Pam<sub>3</sub>Cys-OH (Wiesmuller et al., *Z. Physiol. Chem.* 364 593, 1983), es una versión sintética del resto N-terminal de la lipoproteína de Braun que abarca las membranas interna y externa de bacterias gramnegativas. La patente de los Estados Unidos de América nº 5.700.910 de Metzger et al (23 de diciembre de 1997), describe varias N-acil-S-(2-hidroxi)alquil]cisteínas para uso como intermedios en la preparación de lipopéptidos que se usan como adyuvantes sintéticos, estimulantes de linfocitos B, estimulantes de macrófagos, o vacunas sintéticas. Metzger et al. también enseñan el uso de tales compuestos como intermedios en la síntesis de Pam<sub>3</sub>Cys-OH (Wiesmuller et al., *Z. Physiol. Chem.* 364, 593, 1983), y de lipopéptidos que comprenden este lipoaminoácido o un análogo del mismo en el término N. Según Metzger et al., el resto peptídico de los lipopéptidos se conjugan al resto de lipoaminoácido mediante eliminación de los grupos protectores C-terminales en el lipoaminoácido, y usando después el compuesto resultante como un sustrato para la síntesis de lipopéptidos, tal como en la síntesis peptídica en fase sólida. Se ha mostrado que Pam<sub>3</sub>Cys es capaz de estimular respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de virus frente a células infectadas con el virus de la gripe (Deres et al., *Nature* 342, 561, 1989), y de provocar anticuerpos protectores frente a la glosopeda (Wiesmuller et al., *Vaccine* 7, 29, 1989; patente de los Estados Unidos nº 6.024.964 de Jung et al., 15 de febrero de

2000) cuando se acopla a los epítomos de CTL sintéticos apropiados. La ventaja de usar Pam<sub>3</sub>Cys en tales vacunas es que el compuesto es un compuesto de anclaje a la membrana (es decir, puede penetrar en la membrana plasmática de una célula para potenciar la inducción de linfocitos T citotóxicos en respuesta a epítomos de CTL específicos fijados vía sus términos N al lipoaminoácido.

- 5 Pam<sub>2</sub>Cys, un lipoaminoácido sintético que comprende un resto lipídico de lipopéptido activante de macrófagos (es decir, MALP-2), se ha sintetizado recientemente (Metzger et al., J Pept. Sci 1, 184, 1995). Se da a conocer que Pam<sub>2</sub>Cys es un estimulante más potente de esplenocitos y macrófagos que Pam<sub>3</sub>Cys (Metzger et al., J Pept. Sci 1, 184, 1995; Muhlradt et al., J Exp Med 185, 1951, 1997; y Muhlradt et al., Infect Immun 66, 4804, 1998).

10 Como alternativa, o además de la conjugación de uno o más restos lipídicos al epítomo de la invención, los epítomos se modifican mediante la adición de uno o más epítomos adicionales, tales como, por ejemplo, uno o más epítomos de linfocitos B de HCMV, epítomos de linfocitos T auxiliares de HCMV, o epítomos de linfocitos T auxiliares promiscuos/permisivos. A este respecto, la generación de una respuesta de anticuerpo frente a un antígeno dado requiere la generación de una fuerte respuesta de linfocitos T auxiliares (Vitiello et al, J. Clin. Invest. 95, 341-349, 1995; Livingston et al, J. Immunol. 159, 1383-1392, 1997). En consecuencia, es particularmente preferido derivatizar de esta manera los presentes epítomos de CTL. Como alternativa, los péptidos que contienen epítomos de linfocitos T promiscuos o permisivos se administran conjuntamente con el antígeno. Los ejemplos de epítomos de linfocitos T promiscuos o permisivos son el péptido de toxoide tetánico, pfg27 de *Plasmodium falciparum*, lactato deshidrogenasa, y gp120 de HIV (Contreas et al., Infect. Immun, 66, 3579-3590, 1998; Gaudebout et al., J. A.I.D.S. Human Retrovirol 14, 91-101, 1997; Kaumaya et al., J. Mol. Recog. 6, 81-94, 1993; y Fern y Good J. Immunol. 148, 907-913, 1992). Ghosh et al., Immunol 104, 58-66, 2001 y la Solicitud de Patente Internacional nº PCT/AU00/00070 (WO 00/46390) también describen epítomos de linfocitos T auxiliares procedentes de la proteína de fusión del virus del moquillo (CDV-F). Ciertos epítomos de linfocitos T auxiliares promiscuos inducen fuerte respuestas de linfocitos B frente a un antígeno dado, y pueden evitar ciertas respuestas inmunitarias restringidas por haplotipos (Kaumaya et al., J. Mol. Recog. 6, 81-94, 1993).

- 25 Como alternativa, o además, el péptido se derivatiza mediante enlace covalente a un adyuvante que es conocido para fines de inmunización, tal como, por ejemplo, dipéptido de muramilo, lípido o lipopolisacárido.

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

Preferiblemente, el péptido se sintetiza sobre un soporte de fase sólida, tal como, por ejemplo, una perla de gel de poliestireno que comprende poliestireno reticulado con divinilbenceno, preferiblemente 1% (p/p) de divinilbenceno que se hincha adicionalmente usando disolvente lipófilo, tal como, por ejemplo, diclorometano o dimetilformamida (DMF). El poliestireno se puede funcionalizar mediante adición de clorometano o grupos aminometilo. Como alternativa, el gel de polidimetilacrilamida reticulada y funcionalizada se puede usar una vez hinchado y solvado usando DMF o disolvente aprótico dipolar. También se pueden usar para la síntesis de péptidos otros soportes de fase sólida conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, perla derivada de polietilenglicol producida injertando polietilenglicol en la superficie de perlas de poliestireno inerte. Los soportes de fase sólida preferidos comercialmente disponibles incluyen PAL-PEG-PS, PAC-PEG-PS, KA, KR, o TGR (Applied Biosystems, CA 94404, USA).

Para la síntesis peptídica en fase sólida, los grupos bloqueantes que son estables a los tratamientos repetidos necesarios para la eliminación del grupo bloqueante de amino de la cadena peptídica en crecimiento y para los acoplamientos repetidos de aminoácidos se usan para proteger las cadenas laterales de aminoácidos durante la síntesis y para enmascarar la reactividad indeseada de los grupos funcionales  $\alpha$ -amino, carboxilo o de cadena lateral. Los grupos bloqueantes (también denominados grupos protectores o grupos enmascarantes) protegen así al grupo amino del aminoácido que tiene un grupo carboxilo activado que está implicado en la reacción de acoplamiento, o protegen al grupo carboxilo del aminoácido que tiene un grupo amino acilado que está implicado en la reacción de acoplamiento.

55 Durante la síntesis, el acoplamiento se produce tras la eliminación de un grupo bloqueante sin la destrucción de un enlace peptídico, o cualquier grupo protector unido a otra parte del péptido. Adicionalmente, el anclaje de péptido-resina que protege el término C del péptido está protegido mediante el procedimiento sintético hasta que se requiere la escisión desde la resina. En consecuencia, mediante la selección juiciosa de  $\alpha$ -aminoácidos ortogonalmente protegidos, los aminoácidos se añaden en localizaciones deseadas a un péptido en crecimiento mientras todavía está unido a la resina.



Los grupos bloqueantes de amino preferidos son fácilmente eliminables pero suficientemente estables para sobrevivir a las condiciones para la reacción de acoplamiento y otras manipulaciones, tales como, por ejemplo, modificaciones a los grupos de la cadena lateral.

- 5 Los grupos bloqueantes de amino preferidos se seleccionan del grupo que consiste en: (i) un grupo benciloxicarbonilo (Z o carbobenzoxi) que se elimina fácilmente mediante hidrogenación catalítica a temperatura ambiente y presión normal, o usando sodio en amoníaco líquido y ácido bromhídrico en ácido acético; (ii) un derivado de uretano; (iii) un grupo t-butoxicarbonilo (Boc) que se introduce usando azida de t-butoxicarbonilo o dicarbonato de di-terc-butilo, y se elimina usando ácido suave tal como, por ejemplo, ácido trifluoroacético (TFA al 10 50% en diclorometano) o HCl en ácido acético/dioxano/acetato de etilo; (iv) un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) que se escinde en condiciones suavemente básicas, no hidrolíticas, tales como, por ejemplo, usando una amina primaria o secundaria (por ejemplo piperidina al 20% en dimetilformamida); (v) un grupo 2-(4-bifenilil)propil(2)oxicarbonilo (Bpoc); (vi) un grupo 2-nitro-fenilsulfenilo (Nps); y (vii) un grupo ditia-succinilo (Dts).

Boc se usa ampliamente para proteger el término N en la química de Fmoc, o Fmoc se usa ampliamente para proteger el término N en la química de Boc.

- 15 Los grupos protectores de la cadena lateral variarán para las cadenas laterales funcionales de los aminoácidos que forman el péptido que se está sintetizando. Los grupos protectores de la cadena lateral se basan generalmente en el grupo Bzl o el grupo tBu. Los aminoácidos que tienen alcoholes o ácidos carboxílicos en la cadena lateral se protegen como éteres de Bzl, ésteres de Bzl, ésteres de cHex, éteres de tBu, o ésteres de tBu. La protección de la 20 cadena lateral de Fmoc aminoácidos requiere bloquear grupos que son idealmente estables a bases y lábiles a ácidos débiles (TFA). Por ejemplo, el grupo épsilon-amino de lisina se protege usando Mtt (por ejemplo, Fmoc-lisina(Mtt)-OH). Como alternativa, un derivado bencilico halogenado, tal como ClZ, se usa para proteger lisina si se requiere estabilidad potenciada a ácidos. El grupo tiol de cistina, el imidazol de histidina, o el grupo guanidina de arginina requieren generalmente una protección especializada. Se han descrito muchos grupos protectores diferentes para la síntesis peptídica (véase *The Peptides*, Gross et al. eds., Vol. 3, Academic Press, Nueva York, 1981). Por ejemplo, el grupo 4-metoxi-2,3,6-trimetilfenilsulfonilo (Nd-Mtr) es útil para la protección de la cadena 25 lateral de arginina; sin embargo, la desprotección de Arg(Mtr) requiere el tratamiento prolongado con TFA. Para proteger cistina se usa un número de grupos lábiles a ácidos suaves (TFA, trifluoroacetato de talio (III)/TFA), o grupos estables a TFA pero lábiles a trifluoroacetato de talio (III)/TFA, o grupos estables a ácidos suaves.

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

- 35 Como alternativa, el péptido de la invención se produce mediante la expresión recombinante de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de dicho péptido. La secuencia nucleotídica apropiada de dicho ácido nucleico deriva fácilmente de los datos de secuencias de aminoácidos proporcionados aquí, usando el código genético en combinación con tablas de preferencias de codones para el organismo en el que se ha de llevar a cabo la expresión del péptido. Tales métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica. En consecuencia, una realización 40 adicional de la invención se extiende claramente a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un péptido de la invención que tiene una secuencia de aminoácidos como se describe aquí en una cualquiera de SEC ID Nos: 22-318.

- Una vez que se ha determinado la secuencia nucleotídica apropiada que codifica el epitopo de péptido, el ácido nucleico que codifica los epitopos descritos aquí se produce mediante síntesis oligonucleotídica estándar. 45 Preferiblemente, el oligonucleótido se sintetiza con secuencias ligadoras o adaptadoras en los extremos 5' y 3' para facilitar la clonación subsiguiente en un sistema de vector adecuado usando técnicas estándar. Para expresar un péptido por medios recombinantes, el ácido nucleico que codifica dicho péptido se coloca en conexión operable con un promotor u otra secuencia reguladora capaz de regular la expresión en un sistema libre de células o en un sistema celular.

- 50 Colocar una molécula de ácido nucleico bajo el control regulador de, es decir, "en conexión operable con", una secuencia promotora significa situar dicha molécula de manera que la expresión está controlada por la secuencia promotora, generalmente situando el promotor 5' (en dirección 5') de la secuencia que codifica el péptido.

- El prerrequisito para producir polipéptidos y péptidos intactos en bacterias tales como *E. coli* es el uso de un promotor fuerte con un sitio de unión a ribosoma eficaz. Los promotores típicos adecuados para la expresión en 55 células bacterianas tales como *E. coli* incluyen, pero no se limitan a, el promotor *lacZ*, los promotores  $\lambda_L$  o  $\lambda_R$  sensibles a la temperatura, el promotor T7 o el promotor *tac* inducible por IPTG. En la técnica se conoce y se describe un número de otros sistemas de vectores para expresar la molécula de ácido nucleico de la invención en *E. coli*, por ejemplo en Ausubel et al (en: *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience, ISBN 047150338, 1987) o Sambrook et al (en: *Molecular cloning, A laboratory manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor

Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Se han descrito numerosos plásmidos con secuencias promotoras adecuadas para la expresión en bacterias y sitios de unión a ribosoma eficientes, tales como, por ejemplo, pKC30 ( $\lambda$ : Shimatake y Rosenberg, Nature 292, 128, 1981); pKK173-3 (*tac*: Amann y Brosius, Gene 40, 183, 1985), pET-3 (T7: Studier y Moffat, J. Mol. Biol. 189, 113, 1986); la serie de vectores pBAD/TOPO o pBAD/Thio-TOPO que contienen un promotor inducible por arabinosa (Invitrogen, Carlsbad, CA), el último de los cuales se diseña también para producir proteínas de fusión con tiorredoxina para potenciar la solubilidad de la proteína expresada; la serie de vectores de expresión pFLEX (Pfizer Inc., CT, USA); o la serie de vectores de expresión pQE (Qiagen, CA), entre otros.

Los promotores típicos adecuados para la expresión en virus de células eucariotas y células eucariotas incluye el promotor tardío de SV40, el promotor temprano de SV40 y el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor IE de CMV (temprano inmediato de citomegalovirus), entre otros. Los vectores preferidos para la expresión en células de mamíferos (por ejemplo, 293, COS, CHO, células 10T, células 293T) incluyen, pero no se limitan a, el conjunto de vectores pcDNA suministrado por Invitrogen, en particular pcDNA 3.1 myc-His-tag que comprende el promotor de CMV y que codifica una etiqueta 6xHis y MYC C-terminal; y el vector retrovírico pSR $\alpha$ tkneo (Muller et al., Mol. Cell. Biol., 11, 1785, 1991). El vector pcDNA 3.1 myc-His (Invitrogen) se prefiere particularmente para expresar una forma segregada del polipéptido de la invención o un derivado del mismo en células 293T, en el que el péptido o proteína expresada se puede purificar libre de proteínas conespecíficas, usando técnicas de afinidad estándar que emplean una columna de Níquel para la unión de la proteína vía la etiqueta His.

Existe públicamente un amplio intervalo de sistemas adicionales de hospedantes/vectores adecuados para expresar el péptido de la invención o un derivado inmunológico del mismo, y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al (en: Molecular cloning, A laboratory manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

Los medios para introducir el ácido nucleico que codifica el péptido, o un constructo génico que lo comprende, en una célula para la expresión son bien conocidos por los expertos en la técnica. La técnica usada para un organismo dado depende de las técnicas exitosas conocidas. Los medios para introducir ADN recombinante en células de animales incluyen microinyección, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas tales como usando lipofectamina (Gibco, MD, USA), y/o celfectina (Gibco, MD, USA), captación de ADN mediada por PEG, electroporación y bombardeo con micropartículas, tal como usando partículas de volframio u oro revestidas con ADN (Agracetus Inc., WI, USA), entre otros.

## 2. Poliepitopos de HCMV aislados

Un segundo aspecto de la presente invención proporciona un péptido poliepitópico inmunológicamente activo que comprende dos o más de los epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTL) de la invención descritos aquí anteriormente.

El número de epítomos de CTL contenidos en un único péptido poliepitópico se puede determinar fácilmente por los expertos en la técnica.

En el caso de péptidos sintéticos, el número máximo de epítomos de CTL a incluir en un único péptido poliepitópico está constreñido por la eficiencia de la síntesis peptídica, y, en general, se sintetiza fácilmente un péptido de hasta 400 aminoácidos, preferiblemente hasta 350 aminoácidos, más preferiblemente hasta 300 aminoácidos, incluso más preferiblemente hasta 250 ó 200 ó 150 ó 100 ó 50 aminoácidos de longitud. Esto significa que en un péptido poliepitópico sintético se incluyen fácilmente tantos como alrededor de 45 epítomos de CTL distintos de la presente invención. Como será bien conocido por los expertos en la técnica, la eficiencia de la síntesis peptídica está potenciada por péptidos más cortos. En una realización particularmente preferida de la invención, un péptido poliepitópico sintético comprende alrededor de 30-35 de los epítomos de CTL descritos aquí.

Para péptidos poliepitópicos recombinantes expresados en células aisladas que se han transfectado con un vector de expresión que comprende ácido nucleico que codifica el péptido poliepitópico, se puede incluir en un único péptido poliepitópico un número mucho más grande de epítomos de CTL distintos. Como será conocido por los expertos en la técnica, se pueden realizar fácilmente manipulaciones de ácidos nucleicos en un ácido nucleico que consiste en hasta varias kilobases de nucleótidos. Los métodos para la producción de péptidos recombinante se describen con detalle aquí más arriba y en los textos generales citados en la página 2.

ara ácido nucleico sintético que codifica el poliepitopo de la invención, se producen fácilmente con eficiencia elevada oligonucleótidos sintéticos de hasta alrededor de 50-110 nucleótidos de longitud, cada uno con una capacidad codificante de alrededor de 3-4 epítomos de CTL contiguos, y estos se pueden clonar en tándem en un vector adecuado sin experimentación excesiva para proporcionar el número necesario de epítomos de CTL contiguos.

Preferiblemente, el péptido poliepitópico de la invención comprende alrededor de 5-10 epítomos de CTL, más preferiblemente alrededor de 10-15 epítomos de CTL, incluso más preferiblemente alrededor de 15-20 epítomos de CTL, incluso aún más preferiblemente alrededor de 20-25 epítomos de CTL, incluso todavía más preferiblemente alrededor de 25-30 epítomos de CTL. En una realización particularmente preferida ejemplificada aquí, se proporciona un péptido poliepitópico aislado que comprende 26 ó 27 epítomos de CTL distintos de la invención.

Como será conocido por los expertos en la técnica de producción de poliepítopos, no es necesario introducir ningún espaciado entre los monómeros de epítopos individuales de un poliepítopo, o como alternativa, entre el resto peptídico y cualquier resto lipídico introducido al epítopo o poliepítopo.

5 Preferiblemente, el poliepítopo de la invención no está restringido a un único haplotipo de MHC Clase I. Incluso más preferiblemente, los poliepítopos están restringidos a un número suficiente de moléculas de MHC Clase I para proporcionar cobertura para una proporción significativa de la población general independientemente del origen racial o etnicidad. Los expertos en la técnica estarán fácilmente en posición de determinar el número de epítopos de CTL de HCMV individuales requerido para proporcionar cobertura de cualquier población dada a partir de los datos de especificidad por HLA proporcionados aquí.

10 Preferiblemente, un péptido poliepitópico comprende al menos secuencia de aminoácidos que están restringidas a alelos de MHC Clase I seleccionados del grupo que consiste en: HLA A1, HLA A2, HLA A3, HLA A11, HLA A23, HLA A24, HLA A26, HLA A29, HLA A30, HLA A68, HLA B7, HLA B8, HLA B27, HLA B35, HLA B41, HLA B44, HLA B57, y HLA B58. Los expertos en la técnica serán capaces fácilmente de lograr tal restricción amplia basándose en los datos de restricción por HLA proporcionados aquí para los epítopos de la invención y aquellos epítopos de la técnica anterior, siendo la única condición que al menos un epítopo de CTL de dicho poliepítopo sea distinto de un epítopo seleccionado del grupo que consiste en SEC ID Nos: 1-21.

Más preferiblemente, el péptido poliepitópico está restringido a alelos de MHC Clase I seleccionados del grupo que consiste en: HLA A1, HLA A2, HLA A3, HLA A11, HLA A23, HLA A24, HLA A26, HLA A30, HLA A68, HLA B7, HLA B8, HLA B27, HLA B35, HLA B41, HLA B44, HLA B57 y HLA B58. Tal restricción amplia por HLA se logra fácilmente usando epítopos de CTL que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: SEC ID NO: 13 (YSEHPTFTSQY; HLA A1); SEC ID NO: 165 (VTEHDTLLY; HLA A1); SEC ID NO: 5 (NLVPMVATV; HLA A2); SEC ID NO: 101 (VLEETSVML; HLA A2); SEC ID NO: 7 (RIFAELEGV; HLA A2); SEC ID NO: 254 (IIYTRNHEV; HLA A2); SEC ID NO: 135 (IMREFNSYK; HLA A3); SEC ID NO: 21 (TTVYPPSSTAK; HLA A3); SEC ID NO: 1 (SVLGPISGHVVK; HLA A11); SEC ID NO: 116 (AYAQKIFKIL; HLA A23/A24/A30); SEC ID NO: 33 (QYDPVAALF; HLA A24); SEC ID NO: 2 (FTSQYRIQGKL; HLA A24); SEC ID NO: 37 (YVKYVYESF; HLA A26); SEC ID NO: 15 (DIYRIFAEL; HLA A26); SEC ID NO: 3 (FVFPTKDVALR; HLA A68); SEC ID NO: 134 (NVRRSWEEL; HLA B7); SEC ID NO: 132 (KARDHLAVL; HLA B7); SEC ID NO: 41 (QARLTVSGL; HLA B7); SEC ID NO: 8 (TPRVTGGGAM; HLA B7); SEC ID NO: 109 (KARAKKDEL; HLA B7/B8); SEC ID NO: 113 (QIKVRVDMV; HLA B8); SEC ID NO: 112 (ELRRKMMYM; HLA B8); SEC ID NO: 42 (RRRHRQDAL; HLA B8); SEC ID NO: 162 (ARVYEIKCR; HLA B27); SEC ID NO: 66 (CPSQEPMSIYVY; HLA B35); SEC ID NO: 4 (FPTKDVAL; HLA B35); SEC ID NO: 55 (IPSINVHHY; HLA B35); SEC ID NO: 260 (FEQPTETPP; HLA B41); SEC ID NO: 189 (YAYIYTTYL; HLA B41); SEC ID NO: 56 (QEFFWDANDIY; HLA B44); SEC ID NO: 170 (YEQHKITSY; HLA B44); SEC ID NO: 51 (QEPMSIYVY; HLA B44); SEC ID NO: 47 (SEHPTFTSQY; HLA B44); y SEC ID NO: 63 (QAIRETVEL; HLA B57/B58), con la condición de que al menos una de dichas secuencias en el péptido poliepitópico sea distinta de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1 (SVLGPISGHVVK; HLA A11); SEC ID NO: 2 (FTSQYRIQGKL; HLA A24); SEC ID NO: 3 (FVFPTKDVALR; HLA A68); SEC ID NO: 4 (FPTKDVAL; HLA B35); SEC ID NO: 5 (NLVPMVATV; HLA A2); SEC ID NO: 7 (RIFAELEGV; HLA A2); SEC ID NO: 8 (TPRVTGGGAM; HLA B7); SEC ID NO: 13 (YSEHPTFTSQY; HLA A1); SEC ID NO: 15 (DIYRIFAEL; HLA A26); SEC ID NO: 21 (TTVYPPSSTAK; HLA A3); y SEC ID NO: 55 (IPSINVHHY).

40 Aún más preferiblemente, el péptido poliepitópico está restringido a alelos de MHC Clase I seleccionados del grupo que consiste en: HLA A1, HLA A2, HLA A3, HLA A23, HLA A24, HLA A26, HLA A30, HLA B7, HLA B8, HLA B27, HLA B35, HLA B41, HLA B44, HLA B57 y HLA B58. Tal restricción amplia por HLA se logra fácilmente usando epítopos de CTL que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: SEC ID NO: 165 (VTEHDTLLY; HLA A1); SEC ID NO: 101 (VLEETSVML; HLA A2); SEC ID NO: 254 (IIYTRNHEV; HLA A2); SEC ID NO: 135 (IMREFNSYK; HLA A3); SEC ID NO: 116 (AYAQKIFKIL; HLA A23/A24/A30); SEC ID NO: 33 (QYDPVAALF; HLA A24); SEC ID NO: 37 (YVKYVYESF; HLA A26); SEC ID NO: 134 (NVRRSWEEL; HLA B7); SEC ID NO: 132 (KARDHLAVL; HLA B7); SEC ID NO: 41 (QARLTVSGL; HLA B7); SEC ID NO: 109 (KARAKKDEL; HLA B7/B8); SEC ID NO: 113 (QIKVRVDMV; HLA B8); SEC ID NO: 112 (ELRRKMMYM; HLA B8); SEC ID NO: 42 (RRRHRQDAL; HLA B8); SEC ID NO: 162 (ARVYEIKCR; HLA B27); SEC ID NO: 66 (CPSQEPMSIYVY; HLA B35); SEC ID NO: 260 (FEQPTETPP; HLA B41); SEC ID NO: 189 (YAYIYTTYL; HLA B41); SEC ID NO: 56 (QEFFWDANDIY; HLA B44); SEC ID NO: 170 (YEQHKITSY; HLA B44); SEC ID NO: 51 (QEPMSIYVY; HLA B44); SEC ID NO: 47 (SEHPTFTSQY; HLA B44); y SEC ID NO: 63 (QAIRETVEL; HLA B57/B58).

Al igual que con los epítopos individuales, los poliepítopos de la invención presentan preferiblemente especificidad por el supertipo de HLA, y/o comprenden preferiblemente uno o más determinantes CD4+ suficientes para facilitar una función de linfocito T auxiliar en un sujeto humano infectado con HCMV. Preferiblemente, el péptido poliepitópico comprenderá al menos un epítopo que tiene especificidad por el supertipo de HLA, y más preferiblemente dos o tres o cuatro o cinco de tales epítopos. Preferiblemente, un péptido poliepitópico que tiene especificidad por el supertipo de HLA comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 116; SEC ID NO: 117; SEC ID NO: 109; SEC ID NO: 195; SEC ID NO: 57; SEC ID NO: 69; SEC ID NO: 63; SEC ID NO: 80; y SEC ID NO: 81.

En una realización particularmente preferida de la invención, se proporciona un péptido poliepitópico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 309; SEC ID NO: 310; SEC ID NO: 311; SEC ID NO: 312; SEC ID NO: 313; SEC ID NO: 314; SEC ID NO: 315; SEC ID NO: 316; SEC ID NO: 317; y SEC ID NO: 318.

5 Este aspecto de la invención engloba claramente un derivado o variante funcionalmente equivalente del péptido poliepitópico.

Como se usa aquí, la expresión “derivado o variante funcionalmente equivalente del péptido poliepitópico” se debe tomar para que incluya un derivado o variante funcionalmente equivalente de uno cualquiera o más epítopos de CTL contenidos en dicho péptido poliepitópico, o un derivado o variante como se describe aquí anteriormente y aplicado a un péptido poliepitópico (es decir, una variante de secuencia o lipopéptido de un péptido poliepitópico o un péptido poliepitópico que tiene epítopos de linfocitos B adicionales o epítopos de linfocitos T auxiliares conjugados a ellos).

La presente invención contempla claramente derivados de los presentes epítopos o poliepitopos que comprenden una molécula espaciadora, tal como, por ejemplo, un espaciador que comprende carbono o un resto de aminoácido. Para este fin, se prefieren particularmente dímeros, trímeros, tetrámeros, etc. de serina. Convenientemente, se usa un espaciador que comprende uno o más alfa-alquilaminoácidos que estabilizan la conformación (por ejemplo Aib) para prevenir que la hélice alfa se desestabilice. Se prefieren particularmente espaciadores del tipo X-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)<sub>n</sub>-Y, en el que n es un número entero que es 2 ó 4, y X e Y son grupos protectores, hidrógeno, hidroxilo, o grupos amino. Preferiblemente, tales espaciadores se añaden a una estructura lipídica antes de su adición al péptido, e incluyen un resto de aminoácido protegido terminal para facilitar la conjugación posterior del lipoaminoácido modificado al polipéptido.

### 3. Composiciones de vacuna

Otro aspecto de la invención proporciona una composición para provocar una respuesta inmunitaria celular en un sujeto humano frente a HCMV, comprendiendo dicha composición una cantidad eficaz de uno o más péptidos inmunológicamente activos de la invención (es decir, epítopos individuales o poliepitopos), o un derivado o variante funcionalmente equivalente de los mismos, en combinación con un vehículo, excipiente, diluyente farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante.

Como se usa aquí, la expresión “cantidad eficaz” significa una cantidad suficiente del presente péptido para producir activación de linfocitos T específicos de HCMV, y preferiblemente para provocar inmunidad mediada por células en el sujeto.

30 Las composiciones de vacuna de la invención pueden ser vacunas de subunidades que comprenden los péptidos inmunológicamente activos o un lipopéptido derivado de ellos.

Para las vacunas de subunidades, el epítipo o poliepitopo de péptido de la invención, o derivado o variante del mismo, se formula convenientemente en un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo, un disolvente acuoso, disolvente no acuoso, excipiente no tóxico, tal como una sal, conservante, tampón, y similar. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los disolventes acuosos incluyen agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, disoluciones salinas, vehículos parenterales tales como cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, etc. Los conservantes incluyen agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes. El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición de vacuna se ajustan según las pericias normales en la técnica.

Opcionalmente, la formulación de vacuna también incluirá un vehículo. Aunque no estrictamente necesario para lograr la producción de anticuerpos, el uso de una molécula vehículo de peso molecular está claramente englobado por la presente invención. Las moléculas vehículo usadas habitualmente son seroalbúmina bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana (KLH), ovoalbúmina, seroalbúmina de ratón, seroalbúmina de conejo, y similares. Los vehículos sintéticos también se usan y están fácilmente disponibles. Los medios para conjugar péptidos a proteínas vehículo son también bien conocidos en la técnica, e incluyen glutaraldehído, éster de m-maleimidobenzoi-N-hidroxisuccinimida, carbodiimida, y bis-bencidina diazotada.

En ciertas situaciones, también puede ser deseable formular el péptido, o derivado o variante del mismo, con un adyuvante para potenciar la respuesta inmunitaria frente al epítipo de CTL. Nuevamente, esto no es estrictamente esencial. Tales adyuvantes incluyen todos los compuestos inmunoestimulantes aceptables, tales como, por ejemplo, una citocina, toxina, o una composición sintética. Los adyuvantes ejemplares incluyen escualeno u otro aceite de origen animal; un copolímero de bloques; detergente, tal como Tween-80 u otro detergente no iónico; aceites, tales como, por ejemplo, Drakeol o Marcol; aceite vegetal tal como, por ejemplo, aceite de cacahuete; adyuvante derivado de *Corynebacterium*, tal como, por ejemplo, *C. parvum*; adyuvante derivado de *Propionibacterium*, tal como, por ejemplo, *P. acne*; adyuvante derivado de *Mycobacterium*, tal como, por ejemplo, *M. bovis*; proteína de poxvirus, tal como, por ejemplo, derivado del *virus de la vacuna*; componente vírico, tal como, por ejemplo, toxina de *Cholera*; citocina (monocina o interleucina) tal como, por ejemplo, IL-1, IL-2, o IL-12; factor de necrosis tumoral (TNF); interferón (IFN) tal como, por ejemplo, IFN- $\gamma$ ; BCG; hidróxido de aluminio; glicopéptidos sintéticos, tales como un

dipéptido de muramilo o derivado del mismo, incluyendo N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (tur-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado como nor-MDP), o N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina (CGP) 1983A, (denominado como MTP-PE); avridina; lípido A o derivado del mismo, tal como, por ejemplo, lípido A monofosforílico; sulfato de dextrano; DEAE-dextrano opcionalmente combinado con fosfato de aluminio; carboxi-polimetileno, tal como, por ejemplo Carbopol'EMA; emulsión de copolímero acrílico tal como, por ejemplo, Neocyl A640 (patente US nº 5.047.238); MPL; RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, dimicolato de trehalosa; extracto de la pared celular o esqueleto, tal como, por ejemplo, una combinación de MPL y TDM y CWS en una emulsión al 2% de escualeno/Tween 80; o una composición de adyuvante saponificada que comprende una saponina o una fracción de la misma, tal como, por ejemplo, QuilA, ISCOMATRIX, o ISCOM en combinación con uno o más de los adyuvantes descritos aquí u otro adyuvante conocido.

Un adyuvante particularmente preferido comprende un ISCOM y/o ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia) para potenciar la respuesta inmunitaria eficaz obtenida usando el epítipo o poliepítipo de la invención, y preferiblemente para potenciar la inducción de una respuesta de linfocito T citotóxico en un sujeto humano. ISCOM e ISCOMATRIX pueden potenciar las respuestas inmunitarias celular y humoral frente a los péptidos descritos aquí.

ISCOMATRIX son partículas de ISCOM que no tienen un antígeno incorporado o asociado. Un adyuvante de ISCOMATRIX contiene saponinas derivadas de *Quillaja saponaria* molina complejadas con lípidos, tales como, por ejemplo, colesterol y fosfolípidos. En condiciones definidas, este complejo puede formar partículas que tienen un diámetro promedio de 40 nm. Las propiedades inmunoestimulantes de este adyuvante son idealmente adecuadas a aplicaciones que requieren respuestas inmunitarias mediadas por células. En consecuencia, las partículas de ISCOMATRIX proporcionan propiedades tanto adyuvantes como de suministro de antígenos.

Cuando se incorporan antígenos en una partícula de ISCOMATRIX, o se asocian con una partícula de ISCOMATRIX previamente formada, se produce un ISCOM. Un ISCOM se puede preparar usando Quil A (una preparación semipurificada de saponinas) o fracciones de saponina purificadas. Las preparaciones de saponina preferidas incluyen, por ejemplo, ISCOMPREP703 (CSL Limited) que comprende una mezcla de las fracciones de saponina purificadas.

Además de los adyuvantes, puede ser deseable coadministrar modificadores de la respuesta biológica (BRM) con el péptido o variante o derivado, para disminuir la actividad de linfocitos T supresores. Los BRM ejemplares incluyen, pero no se limitan a, cimetidina (CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA, USA); indometacina (IND; 150 mg/d) (Lederle, NJ, USA); o ciclofosfamida de dosis baja (CYP; 75, 150 o 300 mg/m<sup>2</sup>) (Johnson/Mead, NJ, USA).

Los vehículos preferidos para la administración de la formulación de vacuna incluyen liposomas. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodean compartimentos acuosos. (Bakker-Woudenbergh et al., Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (Supl. 1), S61 (1993); y Kim, Drugs 46, 618 (1993)). Los liposomas son similares en composición a las membranas celulares, y, como resultado, los liposomas se administran generalmente de forma segura y son biodegradables.

Las técnicas para la preparación de liposomas, y la formulación (por ejemplo, encapsulamiento) de diversas moléculas, incluyendo péptidos y oligonucleótidos, con liposomas son bien conocidas por el experto.

Dependiendo del método de preparación, los liposomas pueden ser unilaminares o multilaminares, y pueden variar de tamaño con diámetros que oscilan desde 0,02 µm hasta más de 10 µm. En los liposomas se encapsula una variedad de agentes. Los agentes hidrófobos se reparten en las bicapas, y los agentes hidrófilos se reparten en el espacio o espacios acuosos internos (Machy et al., LIPOSOMES IN CELL BIOLOGY y PHARMACOLOGY (John Libbey 1987), y Ostro et al., American J. Hosp. Pharm. 46, 1576, 1989).

Los liposomas también se pueden adsorber a virtualmente cualquier tipo de célula y liberar entonces el agente encapsulado. Como alternativa, el liposoma se fusiona con la célula diana, con lo que los contenidos del liposoma se vacían en la célula diana. Como alternativa, un liposoma absorbido puede ser endocitosado por células que son fagocíticas. La endocitosis es seguida de la degradación intralisosómica de lípidos liposómicos, y la liberación de los agentes encapsulados (Scherphof et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 446, 368 (1985)). En el presente contexto, el péptido, o derivado o variante del mismo, se puede localizar en la superficie del liposoma, para facilitar la presentación del antígeno sin destrucción del liposoma o endocitosis. Independientemente del mecanismo de suministro, sin embargo, el resultado es la disposición intracelular del péptido asociado o su derivado o variante.

Los vectores liposómicos pueden ser aniónicos o catiónicos. Los vectores liposómicos aniónicos incluyen liposomas sensibles al pH que destruyen o se fusionan con la membrana endosómica tras la endocitosis y acidificación del endosoma. Los liposomas catiónicos son preferidos para mediar la transfección de células de mamíferos *in vitro*, o para el suministro general de ácidos nucleicos, pero se usan para el suministro de otras sustancias terapéuticas, tales como péptidos.

Las preparaciones de liposomas catiónicos se obtienen mediante metodologías convencionales (Feigner et al, Proc. Nat'l Acad. Sci USA 84, 7413 (1987); Schreier, Liposome Res. 2, 145 (1992)). Existen fácilmente preparaciones

comerciales, tales como Lipofectina (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, Md. USA). La cantidad de liposomas a administrar se optimizan basándose en una curva de respuesta frente a la dosis. Feigner et al., *más arriba*.

Otros liposomas adecuados que se usan en los métodos de la invención incluyen vesículas multilaminares (MLV), vesículas oligolaminares (OLV), vesículas unilaminares (UV), vesículas unilaminares pequeñas (SUV), vesículas unilaminares de tamaño medio (MUV), vesículas unilaminares grandes (LUV), vesículas unilaminares gigantes (GUV), vesículas multivesiculares (MVV), vesículas individuales u oligolaminares obtenidas mediante método de evaporación de fase inversa (REV), vesículas multilaminares obtenidas mediante el método de evaporación de fase inversa (MLV-REV), vesículas plurilaminares estables (SPLV), MLV congeladas y descongeladas (FATMLV), vesículas preparadas mediante métodos de extrusión (VET), vesículas preparadas mediante prensa francesa (FPV), vesículas preparadas mediante fusión (FUV), vesículas de deshidratación-rehidratación (DRV), y vesículas ampollas (BSV). El experto reconocerá que las técnicas para preparar estos liposomas son bien conocidas en la técnica (véase COLLOIDAL DRUG DELIVERY SYSTEMS, vol. 66, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc. 1994).

Otras formas de partícula de suministro, por ejemplo microesferas y similares, también se contemplan para el suministro de los epítomos o poliepítomos de péptido.

En REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, capítulos 83-92, páginas 1519-1714 (Mack Publishing Company 1990) (Remington's) se encuentra, por ejemplo, una guía para preparar formulaciones adecuadas y vehículos farmacéuticamente eficaces.

Como alternativa, se producen vacunas a base de ácido nucleico que comprenden ácido nucleico, tal como, por ejemplo, ADN o ARN, que codifica el epítomo o poliepítomo de péptido inmunológicamente activo y se clonan en un vector adecuado (por ejemplo, virus de la vacuna, viruela del canario, adenovirus, u otro vector vírico eucariota).

Como alternativa, el péptido se administra en forma de una vacuna celular vía la administración de APCs autólogas o alogeneicas o células dendríticas que se han tratado *in vitro* para presentar el péptido en su superficie.

#### 4. Métodos para potenciar la inmunidad específica de HCMV

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para potenciar la inmunidad mediada por células específica de HCMV de un sujeto humano, que comprende administrar al menos un péptido epitópico o péptido poliepítópico inmunológicamente activo de la invención, o un derivado o una variante funcionalmente equivalente de dicho péptido, o una composición de vacuna que comprende dicho péptido o variante o derivado, durante un tiempo y en condiciones suficientes para activar un CTL y/o un precursor de CTL de dicho sujeto.

Por "precursor de CTL" se quiere decir un linfocito T sin tratamiento previo (es decir, un linfocito T que expresa uno o más receptores de linfocitos T en su superficie y que es capaz de proliferar y diferenciarse en un linfocito T de memoria o linfocito T efector).

Preferiblemente, el péptido o vacuna se administra a un sujeto que posee una infección latente o activa por HCMV, o está de otro modo inmunosuprimido o inmunocomprometido, tal como, por ejemplo, un receptor de trasplante, o está en riesgo de complicaciones que surgen de una infección por HCMV, tal como, por ejemplo, una mujer que tiene capacidad reproductiva o una mujer embarazada. Preferiblemente, el receptor del trasplante es un receptor de trasplante de médula ósea (BMT).

En el presente contexto, el término "activar" significa la capacidad de un linfocito T para reconocer y lisar una célula que posee HCMV, o que la capacidad de un linfocito T para reconocer un epítomo de linfocito T de un antígeno de HCMV está potenciada, ya sea transitoriamente o de una manera sostenida. El término "activar" se debe tomar también para que incluya una reactivación de una población de linfocitos T tras la activación de una infección latente por HCMV, o tras la reinfección con HCMV, o tras la inmunización con un péptido o composición de la invención de un sujeto infectado previamente.

Los expertos en la técnica están al tanto que la activación óptima de linfocitos T requiere el reconocimiento semejante de antígeno/MHC por el receptor de linfocito T (TcR), y una coestimulación que implica la ligación de una variedad de moléculas de la superficie celular en el linfocito T con aquellas en una célula presentadora de antígeno (APC). Se prefieren las interacciones coestimulantes CD28/B7, CD40L/CD40 y OX40/OX40L, aunque no son esenciales, para la activación de linfocitos T. Pueden funcionar otras rutas de coestimulación.

Los métodos estándar se usan para determinar si se ha producido o no la activación de CTL en el sujeto, tal como, por ejemplo, usando ensayos de citotoxicidad, ELISPOT, o determinando la producción de IFN- $\gamma$  en PBMC del sujeto, esencialmente como se describe aquí.

Preferiblemente, el péptido o derivado o variante o composición de vacuna se administra durante un tiempo y en condiciones suficientes para provocar o potenciar la expansión de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

Además de apoyar a la inmunidad humoral, los linfocitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> funcionan en CMI como productores de citocinas, que median la hipersensibilidad de tipo retrasada y apoyan CTLs y que como tales son componentes

críticos de las respuestas de CMI frente a patógenos intracelulares. Por ejemplo, las respuestas de CTL restringidas al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) están soportadas por células Th1. En algunos casos, también se pueden necesitar linfocitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> para segregar suficiente citocina, tal como, por ejemplo, IL-2, para facilitar de ese modo la expansión de linfocitos T CD8<sup>+</sup> o para interactuar con la APC, haciéndola de ese modo más competente para activar linfocitos T CD8<sup>+</sup>. En tales circunstancias, se prefiere el uso de un péptido 20-mero que comprende epítomos tanto de CD4<sup>+</sup> como de CD8<sup>+</sup>, o como alternativa, el uso de un epítomo de CD8<sup>+</sup> de la invención en combinación con un epítomo de CD4<sup>+</sup> permisivo conocido.

Aún más preferiblemente, el péptido o derivado o variante o composición de vacuna se administra durante un tiempo y en condiciones suficientes para que se potencie en el sujeto la inmunidad mediada por células (CMI) específica de HCMV.

Por "CMI específica de HCMV" se quiere decir que los CTLs activados y expandidos clonalmente están restringidos por MHC y son específicos para un epítomo de CTL de la invención. Los CTLs se clasifican basándose en la especificidad por el antígeno y en la restricción por MHC (es decir, CTLs no específicos y CTLs específicos del antígeno, restringidos a MHC). Los CTLs no específicos están compuestos de diversos tipos celulares, incluyendo células NK y citotoxicidad dependiente de anticuerpos, y pueden funcionar muy tempranamente en la respuesta inmunitaria para disminuir la carga de patógeno, mientras que todavía se están estableciendo respuestas específicas del antígeno. Por el contrario, los CTLs restringidos a MHC logran actividad óptima más tarde que los CTL no específicos, generalmente antes de la producción de anticuerpos. Los CTLs específicos del antígeno inhiben o reducen la diseminación de HCMV, y preferiblemente terminan la infección.

La activación de CTL, la expansión clonal, o CMI se puede inducir sistémicamente, o se puede localizar compartimentalmente. En el caso de efectos localizados compartimentalmente, se prefiere utilizar una composición de vacuna formulada adecuadamente para la administración a ese compartimiento. Por otro lado, no hay tales requisitos restrictivos para inducir activación de CTL, expansión o CMI sistémicamente en el sujeto.

La cantidad eficaz de péptido a administrar, ya sea solo o en una composición de vacuna para provocar la activación de CTL, la expansión clonal o CMI, varía con la naturaleza del epítomo inmunogénico, la vía de administración, el peso, edad, sexo, o salud general del sujeto inmunizado, y la naturaleza de la respuesta de CTL buscada. Todas estas variables se determinan empíricamente por medios reconocidos en la técnica.

El péptido, opcionalmente formulado con cualquier vehículo, adyuvante, BRM, o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado o deseado, se administra convenientemente en forma de una composición inyectable. La inyección puede ser intranasal, intramuscular, subcutánea, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, o por cualquier vía conocida. Para inyección intravenosa, es deseable incluir uno o más reponedores de fluidos y nutrientes.

La dosis óptima a administrar y la vía preferida para la administración se establecen usando modelos de animales, tales como, por ejemplo, inyectando un ratón, rata, conejo, cobaya, perro, caballo, vaca, cabra o cerdo, con una formulación que comprende el péptido, y monitorizando entonces la respuesta inmunitaria de CTL frente al epítomo usando cualquier ensayo convencional como se describe en los Ejemplos.

El uso de ratones transgénicos HLA A2/K<sup>b</sup> que poseen un locus del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) Clase I quimérico humano-de ratón, compuesto de los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del alelo de HLA A\*0201 humano y el dominio  $\alpha 3$  de las moléculas de H-2K<sup>b</sup> Clase I de ratón (Vitiello et al., J. Exp. Med. 173, 1007, 1991) es particularmente preferido para ensayar respuestas de CTL a las composiciones de vacuna de la invención que comprenden epítomos o poliepítomos de péptido restringidos a HLA A2 *in vivo*.

En una realización relacionada, la invención proporciona un método para potenciar la inmunidad mediada por células específica de HCMV de un sujeto humano, comprendiendo dicho método poner en contacto *ex vivo* un linfocito T obtenido de un sujeto humano con un péptido inmunológicamente activo que comprende un epítomo de CTL de un antígeno de HCMV, o un derivado o variante del mismo, o una composición de vacuna que comprende dicho péptido o derivado o variante, durante un tiempo y en condiciones suficientes para conferir actividad frente a HCMV a dichos linfocitos T.

En una realización preferida, la invención proporciona un método para potenciar la inmunidad mediada por células específica de HCMV de un sujeto humano, comprendiendo dicho método:

(i) poner en contacto *ex vivo* un linfocito T obtenido de un sujeto humano con un péptido inmunológicamente activo que comprende un epítomo de CTL de un antígeno de HCMV, o un derivado o variante del mismo, o una composición de vacuna que comprende dicho péptido o derivado o variante, durante un tiempo y en condiciones suficientes para conferir actividad frente a HCMV a dichos linfocitos T; y

(ii) introducir los linfocitos T activados autólogamente en el sujeto, o alogeneicamente a otro sujeto humano.

El linfocito T puede ser un CTL o una célula precursora de CTL.

5 El sujeto humano del que se obtiene el linfocito T puede ser el mismo sujeto o un sujeto diferente al sujeto que se está tratando. El sujeto que se está tratando puede ser cualquier sujeto humano que posea una infección latente o activa por HCMV, o en riesgo de infección por HCMV o reactivación de infección por HCMV (por ejemplo, una mujer que tiene capacidad reproductora o una mujer embarazada o un paciente de trasplante, incluyendo un paciente de trasplante de médula ósea), o una persona que de otro modo necesita obtener vacunación frente a HCMV o desea de obtener vacunación frente a HCMV.

Tal transferencia adoptiva se lleva a cabo preferiblemente y la reactividad de HCMV se evalúa esencialmente como se describe por Einsele et al., Blood 99, 3916-3922, 2002.

10 Por "actividad frente a HCMV" se quiere decir que al linfocito T se le hace capaz de ser activado como se define aquí anteriormente (es decir, el linfocito T reconocerá y lisará una célula que posea HCMV o capaz de reconocer un epítipo de linfocito T de un antígeno de HCMV, ya sea transitoriamente o de manera sostenida). En consecuencia, se prefiere particularmente que el linfocito T sea un precursor de CTL que mediante el procedimiento de la invención se le hace capaz de reconocer y lisar una célula que posee HCMV o capaz de reconocer un epítipo de linfocito T de un antígeno de HCMV, ya sea transitoriamente o de manera sostenida.

15 Para tal aplicación *ex vivo*, el linfocito T está contenido preferiblemente en una muestra biológica obtenida de un sujeto humano, tal como, por ejemplo, una muestra de biopsia que comprende un órgano linfoide primario o central (por ejemplo, médula ósea o timo) o un órgano linfoide secundario o periférico (por ejemplo sangre, PBMC o una fracción de capa leuco-plaquetaria derivada de ella).

20 Preferiblemente, el linfocito T o muestra que contiene el linfocito T se obtuvo previamente de un sujeto humano tal como, por ejemplo, consultando a un médico que ha enviado la muestra para análisis a un laboratorio de patología.

Preferiblemente, el presente método comprende además obtener una muestra que comprende el linfocito T del sujeto, y más preferiblemente obtener dicha muestra de dicho sujeto.

25 Otro aspecto de la invención proporciona un método para proporcionar o potenciar inmunidad frente a HCMV en un sujeto humano no infectado, que comprende administrar a dicho sujeto un péptido inmunológicamente activo que comprende un epítipo de CTL de un antígeno de HCMV, o un derivado o variante del mismo, o una composición de vacuna que comprende dicho péptido o derivado o variante, durante un tiempo y en condiciones suficientes para proporcionar memoria inmunológica frente a una infección futura por HCMV.

30 En una realización relacionada, la invención proporciona un método para potenciar o conferir inmunidad frente a HCMV en un sujeto humano no infectado, que comprende poner en contacto *ex vivo* un linfocito T obtenido de dicho sujeto con un péptido inmunológicamente activo que comprende un epítipo de CTL de un antígeno de HCMV, o un derivado o variante del mismo, o una composición de vacuna que comprende dicho péptido o derivado o variante, durante un tiempo y en condiciones suficientes para conferir reactividad frente a HCMV a dichos linfocitos T.

35 En consecuencia, este aspecto de la invención proporciona la administración de una vacuna profiláctica al sujeto, en el que el sustituyente activo de dicha vacuna (es decir, el epítipo o poliepítipo de la invención) induce memoria inmunológica vía linfocitos T de memoria en un individuo no infectado. Las realizaciones preferidas de protocolos de vacunación descritos aquí para potenciar la inmunidad mediada por células específicas de HCMV de un sujeto humano se aplica, cambiando lo que sea necesario, a la inducción de memoria inmunológica frente a HCMV en un sujeto humano.

#### 5. Aplicaciones de diagnóstico

40 Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para determinar si un sujeto ha sido infectado previamente o no con HCMV, comprendiendo dicho método poner en contacto *ex vivo* un linfocito T obtenido del sujeto con una célula presentadora de antígeno (APC) sensibilizada con un péptido inmunológicamente activo que comprende un epítipo de CTL de un antígeno de HCMV, o un derivado o variante del mismo, o una composición de vacuna que comprende dicho péptido o derivado o variante, y determinar la activación de un CTL o CTL precursor, en el que dicha activación de un CTL o CTL precursor indica que el sujeto ha sido infectado previamente con HCMV.

El procedimiento del presente método es útil también para monitorizar el grado de inmunidad en un individuo que sufre una infección por HCMV o que posee una infección latente por HCMV. En consecuencia, el presente método es útil tanto para un análisis cuantitativo (es decir, el grado de inmunidad) como un análisis cualitativo (es decir, infectado frente a no infectado) de la inmunidad de linfocitos T específicos de HCMV.

50 En una realización relacionada, la invención proporciona un método para determinar el nivel de inmunidad mediada por células específicas de HCMV en un sujeto humano, comprendiendo dicho método poner en contacto *ex vivo* un linfocito T obtenido del sujeto con una célula presentadora de antígeno (APC) sensibilizada con un péptido inmunológicamente activo que comprende un epítipo de CTL de un antígeno de HCMV, o un derivado o variante del mismo, o una composición de vacuna que comprende dicho péptido o derivado o variante, y determinar el nivel de activación de un CTL o CTL precursor, en el que el nivel de activación de un CTL o CTL precursor está correlacionado con el nivel de inmunidad mediada por células específicas de HCMV del sujeto.



El sujeto humano del que se obtiene el linfocito T puede ser el mismo sujeto o un sujeto diferente al sujeto que se esté diagnosticando. El sujeto que se está diagnosticando puede ser cualquier sujeto humano que posea una infección latente o activa por HCMV, o en riesgo de una infección por HCMV o reactivación de infección por HCMV (por ejemplo, una mujer que tiene capacidad reproductora, o una mujer embarazada, o un paciente de trasplante, incluyendo un paciente de trasplante de médula ósea), o una persona que de otro modo necesita obtener una determinación de su estado de HCMV o está deseosa de obtener su estado de HCMV.

Para tal aplicación *ex vivo*, el linfocito T está contenido preferiblemente en una muestra biológica obtenida de un sujeto humano, tal como, por ejemplo, una muestra de biopsia que comprende un órgano linfoide primario o central (por ejemplo médula ósea o timo) o un órgano linfoide secundario o periférico (por ejemplo sangre, PBMC o una fracción de capa leuco-plaquetaria derivada de ella).

Preferiblemente, el linfocito T o muestra que comprende el linfocito T se obtuvo previamente de un sujeto humano, tal como, por ejemplo, consultando a un médico que ha enviado la muestra a un laboratorio de patología para el análisis.

Preferiblemente, el presente método comprende además obtener una muestra que comprende el linfocito T del sujeto, y más preferiblemente, obtener dicha muestra de dicho sujeto.

Para determinar la activación de un CTL o CTL precursor, o el nivel de inmunidad mediada por células específica de HCMV en un sujeto humano, se pueden usar métodos estándar para evaluar el número de linfocitos T en una muestra que son específicos de HCMV, o para determinar la capacidad de los linfocitos T en una muestra para ser activados de una manera específica de HCMV. Los formatos de ensayo preferidos incluyen un ensayo de citotoxicidad, ensayo para la producción de IFN- $\gamma$ , tal como, por ejemplo, el ensayo estándar de liberación de cromo, o ensayo ELISPOT como se describe aquí.

También se pueden utilizar ensayos de tetrámeros de MHC clase 1, particularmente para la cuantificación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específica del epítipo de HCMV (Altman et al., Science 274, 94-96, 1996; Ogg et al., Curr Opin Immunol. 10, 393-396, 1998). Para producir tetrámeros, el término carboxilo de una molécula de MHC, tal como, por ejemplo, la cadena pesada de HLA A2, se asocia con un epítipo o poliepítipo de péptido específico, y se trata para formar un complejo tetrámero que tiene unido a él una molécula informadora adecuada, preferiblemente un fluorocromo tal como, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina, ficocianina o alofocianina. La formación del tetrámero se logra, por ejemplo, produciendo la proteína de fusión de MHC-péptido como una molécula biotinilada, y mezclando entonces el MHC-péptido biotinilado con avidina desglucosilada que se ha marcado con un fluoróforo, en una relación molar de 4:1. Los tetrámeros producidos se unen a un conjunto distinto de receptores de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (TcRs) en un subconjunto de linfocitos T CD8<sup>+</sup> derivados del sujeto (por ejemplo en sangre completa o en una muestra de PBMC), al que el péptido está restringido por HLA. No hay ningún requisito para la activación o expansión *in vitro* de linfocitos T. Tras la unión, y el lavado de los linfocitos T para eliminar el tetrámero no unido o el tetrámero unido no específicamente, el número de células CD8<sup>+</sup> que se unen específicamente al tetrámero de HLA-péptido se cuantifica fácilmente mediante métodos de citometría de flujo estándar, tales como, por ejemplo, usando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). Los tetrámeros también se pueden fijar a partículas paramagnéticas o a perlas magnéticas, para facilitar la eliminación del informador unido no específicamente y la clasificación celular. Tales partículas están fácilmente disponibles de fuentes comerciales (por ejemplo Beckman Coulter, Inc., San Diego, CA, USA). La tinción del tetrámero no extermina las células marcadas; por lo tanto, la integridad celular se mantiene para el análisis posterior. Los tetrámeros de MHC permiten los análisis cuantitativos exactos de respuestas inmunitarias celulares específicas, incluso para sucesos extremadamente raros que se producen a menos de 1% de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Bodinier et al., Nature Med. 6, 707-710, 2000; Ogg et al., Curr Opin Immunol. 10, 393-396, 1998).

El número total de células CD8<sup>+</sup> en una muestra también se puede determinar fácilmente, tal como, por ejemplo, incubando la muestra con un anticuerpo monoclonal contra CD8 conjugado a una molécula informadora diferente a aquella usada para detectar el tetrámero. Tales anticuerpos están fácilmente disponibles (por ejemplo Becton Dickinson). Las intensidades relativas de las señales procedentes de las dos moléculas informadoras usadas permiten la cuantificación de tanto el número total de células CD8<sup>+</sup> como los linfocitos T unidos al tetrámero, y una determinación de la proporción de linfocitos T totales unidos al tetrámero.

También se pueden usar ensayos de citocinas para determinar la activación de un CRL o CTL precursor, o el nivel de inmunidad mediada por células específica de HCMV en un sujeto humano. En tales ensayos, se detecta una citocina tal como, por ejemplo, IL-2, o se determina la producción de una citocina como un indicador del nivel de linfocitos T reactivos con el antígeno de HCMV. Como se explica aquí anteriormente, los linfocitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> funcionan en CMI como productores de citocinas, tales como, por ejemplo, IL-2, para facilitar la expansión de linfocitos T CD8<sup>+</sup> o para interactuar con la APC, haciéndola de ese modo más competente para activar linfocitos T CD8<sup>+</sup>. En consecuencia, la producción de citocinas es una medida indirecta de la activación de linfocitos T.

Preferiblemente, el formato de ensayo de citocinas usado para determinar el nivel de una citocina o la producción de una citocina es esencialmente como se describe por Petrovsky y Harrison, J. Immunol. Methods 186, 37-46, 1995.

Preferiblemente, el ensayo de citocina se realiza en sangre completa o PBMC o capa leuco-plaquetaria.

6. Producción de linfocitos T específicos de HCMV para aplicaciones terapéuticas/de diagnóstico

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para producir un CTL específico de HCMV, que comprende poner en contacto un linfocito T con un péptido aislado de la presente invención o una APC sensibilizada con un péptido aislado de la invención, cultivar el linfocito T y seleccionar linfocitos T que proliferan.

Por "CTL específico de HCMV" se quiere decir un linfocito T o linfocito T precursor que es capaz de reconocer un epítipo de CTL de HCMV, o un poliepítipo que comprende dicho epítipo, o lisar una célula humana infectada con HCMV.

El linfocito T puede ser una célula humana o no humana, tal como, por ejemplo, un linfocito T efector o linfocito T de memoria o precursor de CTL. El linfocito T incluye (a) una célula que posee moléculas de MHC clase I capaz de reconocer el epítipo o poliepítipo de péptido, y (b) células capaces de ser convertidas en CTLs que tienen el potencial de células (a).

Los CTLs se producen *in vivo* o *ex vivo*. Para la producción *in vivo* de CTL, el péptido o composición que lo comprende se administra a un animal durante un tiempo y en condiciones suficientes para que se produzcan CTLs específicos de HCMV. Para la producción *ex vivo*, las células que se han retirado del cuerpo animal se ponen en contacto con el péptido o una APC que presenta el péptido o una LCL sensibilizada autóloga.

Preferiblemente, los CTLs específicos de HCMV monoclonales o policlonales se generan estimulando PBMCs de donantes seropositivos sanos con LCLs autólogas que se han sensibilizado previamente usando un péptido epitópico o péptido poliepitópico de la invención aislado, o una composición de vacuna de la invención que comprende dicho péptido epitópico o péptido poliepitópico. En una realización particularmente preferida, un virus recombinante que expresa un antígeno de HCMV o un péptido epitópico o un péptido poliepitópico, tal como, por ejemplo, un virus de la vacuna recombinante, se usa para sensibilizar la LCL. Los medios para sensibilizar LCLs serán bien conocidos por los expertos en la técnica.

En el presente contexto, "sensibilizar" incluye, por ejemplo, la transfección o transformación de una LCL con ácido nucleico que codifica dicho péptido (por ejemplo en forma de un fragmento subgenómico del virus o ácido nucleico sintético clonado en un vector de expresión adecuado, vector de vacuna, etc.), y la puesta en contacto de una LCL con un péptido aislado, o antígeno o proteína del virus.

En una realización particularmente preferida, los clones de linfocitos T procedentes de donantes individuales se generan mediante un procedimiento esencialmente como se describe en el Ejemplo 9.

Las células de animales no humanos son adecuadas para uso en aplicaciones de diagnóstico, tales como, por ejemplo, para la unión a epítipo de péptido o poliepítopos de péptido específicos para determinar la especificidad por HLA o la eficiencia de unión de dicho péptido. Como será manifiesto para los expertos en la técnica, tales clones de CTL son así útiles para ensayar epítopos de CTL recientemente sintetizados, incluyendo cualesquiera secuencias variantes de los epítopos descritos aquí, tales como, por ejemplo, mediante ensayo de tetrámeros de MHC clase 1, ensayo de citotoxicidad, ensayo para la producción de IFN- $\gamma$  (por ejemplo ensayo de liberación de cromo), ensayo de citocinas, ELISPOT, etc.

En el caso de células humanas, los CTLs producidos de esta manera se usan entonces para la transferencia adoptiva a seres humanos (por ejemplo introduciéndolos en el mismo sujeto o en un sujeto diferente) como parte de un régimen terapéutico, o para aplicaciones de diagnóstico.

Opcionalmente, el linfocito T se pone en contacto con péptido en presencia de una citocina, tal como, por ejemplo, IL-2.

La presente invención se extiende claramente a los clones de linfocitos T producidos usando un nuevo péptido inmunológicamente activo descrito aquí, y al uso de tales clones de linfocitos T en cualesquiera procedimientos de diagnóstico, profilácticos o terapéuticos para monitorizar la infección por HCMV, la latencia de la infección por HCMV, la probabilidad de infección por HCMV en un sujeto humano, tal como, por ejemplo, antes, durante o después del trasplante de órganos (por ejemplo BMT), o durante el embarazo.

A fin de que la naturaleza de la presente invención se pueda comprender más claramente, ahora se describirán formas preferidas con referencia a los siguientes Ejemplos no limitantes.

**Ejemplo 1**

50 Materiales y métodos

1. Establecimiento y mantenimiento de estirpes celulares

Se establecieron estirpes celulares linfoblastoides transformadas con el virus de Epstein Barr (LCLs) a partir de donantes seropositivos a HCMV mediante transformación vírica exógena de linfocitos B periféricos usando los aislados de virus B95.8 (Klein et al., *Intervirology* 3, 232-244, 1974) y QIMR-WIL (Pope et al., *Int J Cancer* 4, 255-260, 1969). Además, para ensayos de estabilización de MHC, se usó la estirpe celular híbrida B x T negativa al transportador de péptido (TAP) 174 x CEM.T2 (denominada T2) (Salter et al, *EMBO J.* 5, 943, 1986). Todas las estirpes celulares se mantuvieron normalmente en RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin más 10% de suero fetal de ternera (FCS) (medio de crecimiento).

Para generar blastos de fitohemaglutinina (PHA), se estimularon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con PHA (Commonwealth Serum Laboratories, Melbourne, Australia) y, después de 3 días de cultivo, se añadió medio de cultivo que contiene sobrenadante de MLA 144 e IL-2 humana recombinante muy purificada (rIL-2) (Khanna et al, *J. Exp Med* 176, 169, 1992). Los blastos de PHA se propagaron mediante sustitución dos veces a la semana de rIL-2 y del sobrenadante de MLA (sin PHA añadido adicional) durante un tiempo de hasta 6 semanas.

Células T2 transfectadas con antígenos de HLA clase I individuales se usaron para ensayos de estabilización de MHC (véase más abajo). Las células T2 que expresan HLA B35, HLA B7 y HLA B27 se han descrito en otra parte (Takiguchi et al, *Int. Immunol.* 6, 1345, 1994; Smith y Lutz, *J. Immunol.* 156, 3755, 1996; y Zweerink et al, *J. Immunol.* 150, 1763, 1993). Las células T2 que expresan HLA A3, HLA A24 y HLA B8 se establecieron transfecando vectores de expresión que codifican alelos individuales de clase I como se describe previamente (Khanna et al, *Eur. J. Immunol.* 29, 1587, 1999). De forma breve, los ADNc para estos alelos de HLA clase I se amplificaron usando cebadores específicos de las secuencias, y se clonaron en un vector de expresión EGFP-N1 (Clontech). Las células T2 se transfectaron con estos vectores de expresión recombinantes y se cultivaron en medio de crecimiento suplementado con G418 (800 µg/ml) durante tres semanas. Las células positivas a proteína fluorescente verde (GFP) se clasificaron usando el punto de vista de FACS, y las células purificadas se mantuvieron en medio de crecimiento suplementado con G418 (800 µg/ml). La expresión de HLA clase I en estos transfectantes se confirmó usando anticuerpos específicos de alelos de HLA.

## 2. Predicciones de epítomos y síntesis peptídica

Se usaron algoritmos predictivos para predecir epítomos de CTL putativos restringidos a HLA clase I a partir de la secuencia de aminoácidos de antígenos de HCMV pp28, pp50, pp65, pp150, pp71, gH, gB, IE-1, IE-2, US2, US3, US6, US11 y UL18. Los algoritmos usados fueron: (i) el algoritmo de predicción de epítomos en la base de datos SYFPEITHI de ligandos de MHC y motivos peptídicos que se unen a moléculas de MHC Clase I de la Universidad de Tuebingen, Alemania (Rammensee et al, *Immunogenetics* 50, 213, 1999); y (ii) el algoritmo de predicciones de unión a péptidos de HLA de la Bioinformatics and Molecular Analysis Section (BIMAS) del National Institutes of Health del gobierno de los Estados Unidos de América (Parker et al, *J. Immunol* 152, 163, 1994). Estos algoritmos se usaron para identificar epítomos potenciales para los alelos de HLA A1, A2, A3, A24, A26, B7, B8, B27, B35, y B44. A cada péptido se le asignó una puntuación en base a la fortaleza de la interacción entre la molécula de MHC y el péptido. Los péptidos que puntuaron más de 24 en las predicciones del programa SYFPEITHI, y los péptidos que puntuaron más de 100 a partir de las predicciones del programa BIMAS, se sintetizaron usando el método de fase sólida de Merrifield (Valerio et al, *Anal. Biochem* 197, 168, 1991), o se adquirieron de Chiron Mimotopes (Melbourne, Australia). Además, también se sintetizaron conjuntos de péptidos solapantes (péptidos 20-meros derivados de los antígenos de longitud completa pp65, gB, gH, pp150, IE-1 e IE-2, en los que cada miembro de cada conjunto solapa con otro miembro del mismo conjunto en 10 restos de aminoácidos). Todos los péptidos se disolvieron en 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) y se diluyeron en medio RPMI 1640 libre de suero, para uso en ensayos que evaluaron su capacidad para unirse a moléculas de MHC e inducir tanto la producción de IFN- $\gamma$  ELISPOT como la actividad de CTL en PBMC y clones de linfocitos T de donantes.

## 3. Ensayo de estabilización de MHC

La capacidad de los péptidos sintéticos para estabilizar moléculas de MHC en la superficie de la estirpe celular T2 se midió mediante inmunofluorescencia indirecta (Burrows et al, *J. Virol* 70, 4829, 1966). Se incubaron células T2 ( $2 \times 10^5$ ) en medio AIM-V libre de suero (GibcoBRL, Invitrogen™, Melbourne, Australia) en presencia de 5 µM de péptido durante 1 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en una atmósfera humidificada. Éstas se incubaron entonces durante otras 14-16 h a 26°C, después de cuyo tiempo las células se devolvieron a 37°C durante 2 h antes de la tinción inmunofluorescente. Las células se lavaron libres de péptido no unido con medio de crecimiento antes de la adición de anticuerpo primario. Se añadió anticuerpo monoclonal específico anti-alelo de HLA a las células T2, y se incubó a 4°C durante 30 min. Los anticuerpos específicos de HLA usados en este estudio fueron MA2.1 (específico de HLA A2, nº de acceso ATCC HB54), SFR8-B6 (específico de HLA Bw6, nº de acceso ATCC HB152), TU109 (específico de HLA Bw4; Muller et al., *Hum Immunol* 14, 333-349, 1989). Después de lavaron con medio de crecimiento, estas células se incubaron con anticuerpo específico anti-Ig de ratón marcado con FITC o con PE (Silenus, AMRAD, Australia) a 4°C durante 30 min. Finalmente, las células se lavaron y se resuspendieron en 500 µl de PBS fría suplementada con 1% de FCS. Una muestra de células T2 se incubó con medio AIM-V solo a 26°C durante 14-16 h, y sirvió como control negativo. El segundo control negativo comprendió una muestra de células T2 que se había cultivado en medio de crecimiento sin péptido a 37°C. Las intensidades de fluorescencia se midieron entonces con un FACScan o FACScalibur (BD Biosciences, San José, CA). La Eficiencia de Estabilización de MHC (MSE) para

cada péptido se calculó como el porcentaje de potenciación de la fluorescencia promedio con respecto a la fluorescencia determinada para la muestra de control negativo.

#### 4. Ensayo ELISPOT

Se usó el ensayo ELISPOT para evaluar si la estimulación de PBMC procedentes de un gran panel de donantes seropositivos con péptidos de HCMV podría inducir la expresión de IFN- $\gamma$  en linfocitos T. De forma breve, una placa de nitrocelulosa de 96 pocillos (Multiscreen, Millipore) se revistió toda la noche a 4°C con anticuerpo monoclonal de ratón anti-IFN- $\gamma$  IgG1 (10  $\mu$ g/ml; Mabtech Nacka, Suecia). La placa se lavó entonces seis veces en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se bloqueó durante 1 hora a 37°C con PBS suplementada con 5% de FCS. La disolución de bloqueo se eliminó, y se añadió PBMC de donantes sanos seropositivos a HCMV a una concentración de 2,5 x 10<sup>5</sup> células por pocillo en medio de crecimiento. Estas células se incubaron durante 18 h a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en presencia de péptidos sintéticos de antígenos de HCMV (10  $\mu$ g/ml). Tras la incubación, la placa se lavó tres veces con PBS suplementada con 0,05% de Tween, seguido de tres lavados con PBS sola. Se añadió anticuerpo de detección biotinilado anti-IFN- $\gamma$  (Mabtech Nacka, Suecia) a cada pocillo a una concentración final de 1  $\mu$ g/ml en PBS. Las placas se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 4 h y después se lavaron, como se describió anteriormente. Se añadió a cada pocillo estreptavidina-fosfatasa alcalina (Sigma) a una concentración final de 1  $\mu$ g/ml en PBS, y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 2 h. Después del lavado final con PBS, se añadió a cada pocillo el sustrato, fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo y nitroazul de tetrazolio, y las placas se incubaron durante 30 min. a RT. Las células que produjeron IFN- $\gamma$  en respuesta a la presencia de péptido se detectaron como manchas violáceas en la membrana de nitrocelulosa de cada pocillo. Las manchas se contaron automáticamente usando una cámara de circuito cerrado (CCD) y el software de análisis de imágenes ImagePro o un lector de ELISPOT automatizado (AID, Alemania). La frecuencia del precursor de linfocito T para cada péptido se basó en el número total de PBMC en el pocillo y el número de manchas específicas del péptido por pocillo, en un promedio de 3 pocillos. El número de manchas específicas de péptido también se calculó restando los valores del control negativo, que consistieron en PBMC sin péptido (un promedio de 3 pocillos), de los pocillos de ensayo.

#### 5. Enriquecimiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> para el ensayo ELISPOT

Para determinar si un péptido 20-mero particular contenía un epítipo restringido a CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, o ambos, se llevaron a cabo ensayos ELISPOT de agotamiento de células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> en PBMC de portadores sanos del virus. Para cualquier experimento, se usan tres poblaciones de células: a) PBMC agotadas de CD8<sup>+</sup>, b) PBMC agotadas de CD4<sup>+</sup>, y c) PBMC no agotadas. Estas poblaciones de células se evaluaron concurrentemente con los mismos péptidos en un ensayo ELISPOT convencional como se describe aquí anteriormente. Para realizar el agotamiento esencialmente según las instrucciones del fabricante, se usaron DYNABEADS M-450 (Dyna, Oslo, Noruega) que se unen específicamente a células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. Las perlas se lavaron dos veces en PBS fría suplementada con 2% de FCS usando aislamiento magnético. El número requerido de células se resuspendió en PBS fría suplementada con 2% de FCS, se añadió a las perlas, y después se incubó a 4°C, en la oscuridad, durante 30 min. (perlas con CD8<sup>+</sup>) o 60 min. (perlas con CD4<sup>+</sup>). Las poblaciones se agotaron de células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> usando separación magnética. Después del agotamiento, las células no fijadas se eliminaron y se lavaron una vez en medio de crecimiento, se contaron y se usaron en ensayo ELISPOT convencional. Las células agotadas se usaron a 1,7 x 10<sup>5</sup> células por pocillo, y la población no agotada se usó al número estándar de 2,5 x 10<sup>5</sup> células por pocillo. Después de la etapa de agotamiento, cada población celular respectiva se evaluó para determinar la pureza de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> mediante citometría de flujo de tres colores. Las muestras de poblaciones celulares agotadas se tiñeron con anticuerpo anti-CD3 conjugado directamente a isotiocianato de fluoresceína (FITC), anticuerpo anti-CD4 conjugado con fluorocromo de ficoeritrina (PE), y anticuerpo anti-CD8 conjugado con fluorocromo Tricolor (descrito más abajo). El porcentaje de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> presentes en la población agotada de CD8<sup>+</sup>, y el porcentaje de células CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> presentes en las poblaciones agotadas de CD4<sup>+</sup>, se evaluaron en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson). La pureza de cada población fue mayor que 90%, y los resultados de los ensayos ELISPOT se expresan como el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> en las poblaciones agotadas que respondieron frente a cada péptido al producir IFN- $\gamma$ .

#### 6. Tinción de citocina intracelular

Se incubaron PBMCs a 37°C en RPMI + 10% de FCS con y sin 10  $\mu$ g/ml de péptidos durante 6 horas. Se añadió GolgiPlug™ (Pharmingen, San Diego, CA, USA) a las muestras según las instrucciones del fabricante durante la segunda hora de incubación, y las células activadas con 25 ng/ml de 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA; Sigma-Aldrich Co, St. Louis MO) y 1  $\mu$ g/ml de ionomicina (Sigma) actuaron como control positivo. Tras la incubación, 1 x 10<sup>6</sup> células/muestra se lavaron y se resuspendieron en tampón de tinción que consiste en PBS con GolgiPlug™, 3% de FCS y azida sódica. Las células se tiñeron entonces con FITC anti-CD3 conjugado con FITC (UCHT1, Immunotech, Marsella, Francia), y anti-CD4 conjugado con Tricolor (TRI) (S3.5, Caltag, Burlingame, CA) o anti-CD8 (3B5, Caltag) durante 30 minutos, 4°C en la oscuridad. Las células se fijaron durante 20 min. a 4°C con Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences) y se resuspendieron en tampón de permeabilización Perm/Wash™ (BD Biosciences) según el protocolo del fabricante. Las células fijadas se tiñeron con anti-IFN- $\gamma$  humano conjugado con ficoeritrina (PE) (B27, Pharmingen) durante 30 min. a 4°C en la oscuridad. Como control negativo, las células se

tiñeron con anticuerpos de control de isotipo parejo apropiados. Las células se lavaron dos veces en tampón de permeabilización y se resuspendieron en tampón de tinción antes del análisis mediante citometría de flujo de tres colores en un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences). Todo el análisis de datos se llevó a cabo usando el software FlowJo (Tree Star, Inc. San Carlos, CA).

## 5 7. Generación de CTLs específicos de HCMV policlonales y clonales

Para generar CTLs policlonales, se cocultivaron durante siete días  $2 \times 10^6$  PBMC procedentes de donantes sanos seropositivos a HCMV con  $1 \times 10^6$  PBMC autólogas sensibilizadas con péptidos sintéticos (20  $\mu\text{g/ml}$ ). En el día 7, estos linfocitos se volvieron a estimular con LCLs autólogas sensibilizadas con péptidos. Después de 10 días de cultivo en medio de crecimiento suplementado con rIL-2 (20 U/ml) y 30% de TCGF, las células se usaron como efectores policlonales en un ensayo estándar de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  frente a blastos de PHA o LCLs autólogos sensibilizados con péptidos (Burrows et al., Eur. J. Immunol 22, 191, 1992).

Para generar clones de CTL específicos de HCMV, se cultivaron PBMC ( $10^6/\text{ml}$ ) con PBMC autólogas sensibilizadas con péptidos (relación de respondedor a estimulador de 2:1) en pocillos de cultivo de 2 ml (Linbro) durante 3 días en medio de crecimiento. Los clones de CTL, generados sembrando en agarosa al 0,35%, se establecieron y mantuvieron en medio de crecimiento que contiene rIL2 (Burrows et al, Eur. J. Immunol. 22, 191, 1992), y se volvieron a estimular una vez a la semana con LCLs autólogas irradiadas con radiación  $\gamma$  sensibilizadas con péptidos. Estos clones de CTL se identificaron en un panel de células diana ya sea sensibilizadas con péptidos sintéticos o infectadas con virus de la vacuna recombinante que codifica antígenos de HCMV individuales (véase más abajo).

## 20 8. Recombinantes del virus de la vacuna

Constructos del virus de la vacuna recombinante que codifican antígenos de HCMV y un constructo del virus de la vacuna de control obtenido mediante inserción del vector pSC11 solo y negativo para timidina cinasa (Vacc.TK) están públicamente disponibles (Riddell et al, Rev. Infect. Dis. 13 Supl. 11, S966-S973, 1991; Browne et al, Nature 347, 770, 1990; y Britt et al, J. Virol 64, 1079, 1990). Se infectaron células diana con virus de la vacuna recombinante a una multiplicidad de infección (MOI) de 10:1 durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ , como se describe por Khanna et al, J. Exp. Med. 176, 169, 1992 y Khanna et al, Immunol 74, 504, 1991. Después de la infección durante toda la noche, las células se lavaron con medio de crecimiento y se procesaron para los ensayos de CTL (Khanna et al, J. Immunol. Meth. 164, 41, 1993).

## 9. Ensayos de citotoxicidad

30 Células diana se infectaron con virus de la vacuna recombinantes o se presensibilizaron con epítomos de péptido sintético y se incubaron entonces con  $^{51}\text{Cr}$  durante 90 min. Tras la incubación, estas células se lavaron en medio de crecimiento y se usaron como dianas en un ensayo estándar de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  de 4-6 h (Burrows et al, Eur. J. Immunol 22, 191, 1992).

## EJEMPLO 2

### 35 Predicción del epítipo de HLA clase I y péptidos de unión a HLA procedentes de antígenos de HCMV

Los epítomos de CTL restringidos a HLA clase I se identificaron usando dos algoritmos a base de ordenador como se describe en el Ejemplo 1. Estos algoritmos predicen que secuencias de aminoácidos de 8, 9 ó 10-meros probablemente se unan con éxito a moléculas de MHC clase I (HLA A1, A2, A3, A24, A26, B7, B8, B27, B35 y B44) en base a la disociación de la interacción a mitad de tiempo. Los péptidos que se puntúan más de 24 en el programa SYFPEITHI y/o los péptidos que puntúan más de 100 en el programa BIMAS se dan en la Tabla 1.

Los péptidos enumerados en la Tabla 1 se usaron para identificar donantes seropositivos sanos. Todos los péptidos que se predijo que se unirían a alelos de HLA clase I también se analizaron para determinar su capacidad para unirse a moléculas MHC de HLA clase I y estabilizar su expresión en la superficie de células T2 transfectadas con alelos de HLA individuales. Los datos representativos para la estabilización de HLA A2 se muestran en las Figuras 1a a 1i. En la Tabla 1 también se proporciona un resumen de los datos de estabilización de MHC. Los péptidos que inducen una potenciación significativa de la intensidad de fluorescencia relativa en comparación con los controles negativos (es decir, mayor que la media + 3 S.E.M.) para cada alelo de HLA clase I se consideraron positivos. Los péptidos predictivos para HLA B44 y A26 no se evaluaron en estos ensayos, ya que los transfectantes de T2 para estos alelos no estuvieron disponibles para este estudio.

50 Los datos indican que un gran número de péptidos predichos por el enfoque bioinformático también mostraron fuerte unión a HLA Clase I.

## Ejemplo 3

Ensayo ELISPOT en péptidos predictivos de HLA A2

Para determinar si se podrían detectar respuestas de CTL de memoria frente a los epítomos potenciales de HCMV predictivos en portadores seropositivos sanos del virus, se usó el ensayo ELISPOT, que permite la identificación rápida de epítomos de CTL sin el cultivo *in vitro* prolongado. PBMC aisladas de una cohorte de portadores sanos del virus positivos a HLA A2 (Tabla 2) se estimularon con los péptidos que dieron un resultado positivo en los ensayos de unión a HLA (Ejemplo 2), y se detectaron aquellas células que produjeron IFN- $\gamma$ .

Los datos representativos en los ensayos ELISPOT de péptidos que se unen a HLA A2 se muestran en las Figuras 2a a 2c para péptidos derivados de pp65, IE-1, pp150, pp28, US2, US3, pp50, gB, gH, y IE-2 de HCMV.

En conjunto, las respuestas de linfocitos T para epítomos restringidos a HLA A2 en ensayos ELISPOT indicaron una jerarquía interesante entre los diferentes antígenos de HCMV. Como se da a conocer por Gyulai et al, J. Infect. Dis. 181, 1537-1546, 2000, pp65 fue claramente el antígeno más inmunodominante reconocido por todos los portadores del virus sanos (Figura 2a). La mayoría de los donantes reconoció dos o más epítomos en el antígeno pp65. Fue evidente un intervalo de frecuencias de CTL precursores para los epítomos de pp65 entre los diferentes donantes (Figura 2a), oscilando de 29 SFC/10<sup>6</sup> PBMC a 3752 SFC/10<sup>6</sup> PBMC.

Un epítomo de péptido conocido procedente de pp65 que tiene la secuencia NLVPMVATV (SEC ID NO: 5) fue el único epítomo reconocido por cada donante evaluado en este estudio. Otro epítomo conocido normalmente reconocido procedente de pp65 tiene la secuencia RIFAELEGV (SEC ID NO: 7), que fue reconocido por 5 de los 8 donantes evaluados. Para los epítomos de pp65, la frecuencia promedio del precursor fue la más elevada para NLVPMVATV (SEC ID NO: 5), seguido de LMNGQQIFL (SEC ID NO: 53), RIFAELEGV (SEC ID NO: 7) y MLNIPSINV (set ID NO: 6) respectivamente. De estos, el epítomo que tiene la secuencia expuesta en SEC ID NO: 53 no se ha descrito previamente. También se detectaron por dos donantes diferentes respuestas subdominantes ocasionales a otros epítomos, tales como, por ejemplo, RLLQTGIHV (SEC ID NO: 10) y ILARNLVPM (SEC ID NO: 54) en pp65.

IE-1 se consideró que es el segundo antígeno más inmunodominante tras pp65, seguido de pp150, gB, gH, IE-2, US2, pp28, US3 y pp50. Seis de los ocho donantes positivos a HLA A2 mostraron reactividad de CTL a al menos un epítomo de CTL en IE-1 (Figura 2b). De forma interesante, una de las respuestas de CTL más dominantes frente a cualquier epítomo se identificó en IE-1 (VLEETSVML; SEC ID NO: 101). Este epítomo mostró una frecuencia de precursor de 3752 SFC/10<sup>6</sup> PBMC en el donante SB. Este epítomo fue reconocido más eficientemente por tres donantes que un epítomo similar previamente descrito que tiene la secuencia YLEETSVM (SEC ID NO: 18; Retière et al, J. Virol 74, 3948-3952, 2000). Otros nuevos epítomos identificados a partir de IE-1 tuvieron las secuencias VLAELVKQI (SEC ID NO: 97), SLLSEFCRV (SEC ID NO: 96) y CLQNALDIL (SEC ID NO: 102), que mostraron una frecuencia comparativamente menor. Las frecuencias de CTL a epítomos en gB, gH, pp28, pp50, US2, US3, US11, IE-2 y pp150 fueron generalmente muy bajas, aunque los epítomos de CTL en gB y gH fueron más frecuentemente reconocidos por portadores del virus sanos cuando se compararon con pp150, pp28, US2, US3, US11 y pp50. Además, los antígenos IE-2, US2, US3 y US11 se identificaron por primera vez como dianas para las respuestas de linfocitos T. Aunque sólo se identificaron cuatro portadores del virus sanos positivos a HLA A2 como respondedores potenciales a los epítomos en estos cuatro antígenos, la identificación adicional para epítomos adicionales restringidos a través de otros alelos de HLA clase I identificó un número de otros epítomos dentro de estos antígenos (véase más abajo).

Una comparación de la reactividad de linfocitos T global frente a todos los antígenos evaluados entre la cohorte de portadores del virus sanos indicó que las respuestas de CTL no estaban generalmente constreñidas a un único antígeno de HCMV. La mayoría de los donantes positivos a HLA A2 evaluados en el estudio mostraron un amplio intervalo de respuestas de CTL a múltiples antígenos. Los donantes SB y CP mostraron el intervalo más amplio de reactividad de CTL, y reconocieron siete de los diez antígenos evaluados en nuestro estudio. Además, estos dos donantes reconocieron un mayor número de epítomos (11/30) que cualquier otro donante evaluado en nuestro estudio (Figuras 2a a 2c). De media, se dirigieron respuestas de CTL de nuestro panel de portadores del virus sanos de HLA A2 contra 6-7 epítomos diferentes. Estos resultados sugieren fuertemente que se requieren respuestas de CTL ampliamente dirigidas hacia múltiples epítomos para controlar eficientemente la replicación del HCMV. La amplia reactividad de linfocitos T permite a un individuo aclarar el HCMV más eficientemente que una respuesta de CTL muy enfocada contra un único antígeno, o un número limitado de epítomos. Estas observaciones destacan la importancia de diseñar una vacuna contra HCMV que combine, en un único régimen, todos aquellos antígenos que puedan proporcionar protección.

#### Ejemplo 4

Respuesta de linfocitos T a otros péptidos de HCMV predictivos de HLA clase I

Se evaluaron epítomos que se restringieron para HLA A1, A3, A24, A26, B7, B8, B27, B35 y B44 en ensayos ELISPOT, para determinar si se pudieran detectar respuestas de linfocitos T de memoria en portadores de virus de HLA parecidos sanos. Se estimularon PBMC de una cohorte de portadores del virus sanos (Tabla 2) con péptidos individuales, y se detectaron las células que produjeron IFN- $\gamma$ . Se identificaron epítomos de CTL que se restringieron mediante HLA A1, A3, A24, A26, B7, B8 o B27.

En las Figuras 3a a 3c se muestran datos representativos que muestran respuestas de ELISPOT para cada uno de estos alelos. Como en el caso de respuestas de CTL restringidas a HLA A2, tanto pp65 como IE-1 fueron claramente los antígenos más inmunodominantes (Figura 3a). Sorprendentemente, las respuestas de CTL frente a epítomos de IE-1 constituyeron en algunos individuos un 5-10% de su población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> total (datos no mostrados).  
 5 Otros antígenos tales como pp150, gH, pp28, pp50, IE-2 y UL18 también se identificaron como dianas potenciales para la respuesta de CTL restringida a clase I (Por ejemplos 3b, 3c). Aunque pp28 y 9950 se han identificado como dianas potenciales para la respuesta de CTL, este es el primer informe que cartografía múltiples epítomos de CTL restringidos mediante HLA A1, A2 y B27.

10 Fue de particular interés un epítomo de CTL restringido a HLA A1 procedente de pp50 que tiene la secuencia VTEHDTTLY (SEC ID NO: 165), que fue reconocido consistentemente como una de las respuestas más dominantes en todos (es decir, 6/6) los portadores de virus sanos positivos a HLA A1. Además, la frecuencia y la intensidad de esta respuesta fue comparable a la respuesta de CTL medida frente al epítomo de NLVPMVATV (SEC ID NO: 5) en donantes positivos a HLA A2. También se cartografiaron nuevos epítomos en los antígenos IE-2 y UL18.

En la Tabla 3 se presenta una lista extensa de todos los epítomos identificados usando el ensayo ELISPOT.

### 15 **Ejemplo 5**

Análisis de respuestas de CTL específicos de HCMV usando ensayos de citotoxicidad

Para confirmar adicionalmente los epítomos de CTL identificados mediante ensayos ELISPOT, se generaron estirpes de CTL policlonales y clonales, específicas para estos epítomos. Se estimularon PBMC procedentes de donantes seropositivos sanos con epítomos de péptidos sintéticos, y se establecieron y evaluaron clones de CTL y estirpes policlonales en ensayos estándar de liberación de <sup>51</sup>Cr.  
 20

En las Figuras 4a y 4b se muestran datos representativos de las estirpes de CTL policlonales establecidas a partir de los donantes SB, PP, CS, SE y SC. Para el donante SB (Figura 4a), se evaluaron siete epítomos representativos restringidos a HLA clase I procedentes de los antígenos IE-2, pp150, pp65, IE-1 y gB. Seis de estos siete epítomos evocaron fuertes respuestas de CTL, y se observó una menor actividad de CTL en la estirpe de CTL policlonal establecida contra el poliepítomo que tiene la secuencia GQTEPIAFV (SEC ID NO: 122).  
 25

De forma similar, las estirpes de CTL establecidas de otros donantes (PP, CS, SE y SC) también mostraron fuerte actividad citolítica frente a blastos de PHA autólogos sensibilizados por péptidos (Figura 4b).

La fortaleza global de la actividad de CTL observada en estos ensayos se correlaciona generalmente con el número de células productoras de IFN- $\gamma$  detectadas. Por ejemplo, el epítomo de VLEETSVML (SEC ID NO: 101) procedente del antígeno IE-1 de HCMV fue el epítomo más dominante para el donante SB en los ensayos ELISPOT (Tabla 3), y mostró fuerte actividad de CTL en los ensayos de citotoxicidad (Figura 4a).  
 30

Se estableció una serie de clones de CTL para caracterizar adicionalmente estos epítomos. En las Figuras 5a a 5d se presentan datos representativos de cuatro epítomos diferentes.

De particular interés fue el clon de CTL específico para el epítomo de VLEETSVML (SEC ID NO: 101) derivado del antígeno IE-1 de HCMV. Retière et al, J. Virol 74, 3948-3952, 2000 han identificado otro epítomo de IE-1 de HCMV restringido a HLA A2 (YILEETSVM; SEC ID NO: 18), que tiene una secuencia similar aunque no idéntica a este epítomo. Para determinar si las respuestas de CTL a estos epítomos son similares, se titularon estos péptidos y se comparó la actividad citotóxica en un ensayo estándar de liberación. Los datos presentados en la Figura 5a muestran claramente una falta de reconocimiento cruzado significativo entre estos epítomos. Estas observaciones también se han confirmado mediante estirpes de CTL policlonales establecidas a partir de otros donantes positivos a HLA A2 (datos no mostrados). De este modo, VLEETSVML (SEC ID NO: 101) y YILEETSVM (SEC ID NO: 18) representan epítomos de CTL distintos.  
 35  
 40

Otros clones de CTL evaluados en este estudio fueron específicos para el epítomo de pp65 restringido a HLA A2 NLVPMVATV (SEC ID NO: 5), como se muestra en la Figura 5b; el epítomo de IE-2 restringido a HLA A2 IYTRNHEV (SEC ID NO: 254; Figura 5c), o el epítomo IE-1 restringido a HLA B8 QIKVRVDMV (SEC ID NO: 113; Figura 5d). Una comparación de la reactividad global de CTL de clones específicos para IYTRNHEV (SEC ID NO: 254) reveló que este epítomo fue generalmente poco reconocido a concentraciones limitantes (Figura 5c). La concentración de péptido requerida para la lisis semimáxima para el epítomo de IYTRNHEV (SEC ID NO: 254) fue casi 100-500 veces mayor que los epítomos de NLVPMVATV (SEC ID NO: 5) y VLEETSVML (SEC ID NO: 101) respectivamente.  
 45  
 50 También se observó un patrón idéntico de titulación de péptidos con otros cinco clones de CTL diferentes específicos para el epítomo IYTRNHEV (SEC ID NO: 254) (datos no mostrados).

### **EJEMPLO 6**

Reconocimiento por CTL de antígenos de HCMV codificados por el virus de la vacuna recombinante

Los datos presentados aquí muestran claramente que los epítomos predichos por los algoritmos a base de ordenador, y evaluados subsiguientemente mediante ensayos ELISPOT, fueron de hecho capaces de evocar una fuerte respuesta de linfocitos T. Para demostrar que estos efectores de CTL también fueron capaces de reconocer células diana que expresan antígenos de HCMV de longitud completa, se aislaron más de 100 estirpes celulares T clonales o policlonales a partir de una cohorte de 14 donantes sanos inmunes a HCMV, usando el protocolo de estimulación descrito aquí anteriormente. Esas estirpes de CTL que muestran fuerte reactividad frente a las dianas sensibilizadas por péptido se evaluaron frente a LCLs autólogas infectadas con vectores del virus de la vacuna recombinante que expresaron los antígenos pp28, pp65, pp150, gH, gB, o IE-1 de HCMV. En la Figura 6 se muestran las reactividades de dos clones de CTL diferentes procedentes de los donantes SB, y una estirpe de CTL policlonal procedente del donante SC. Uno de estos clones reconoció células diana infectadas con virus de la vacuna recombinante que codifican pp65 (denominado como Vacc.pp65; panel superior de la Figura 6). Las otras dos estirpes de CTL restantes reconocieron células diana infectadas por Vacc.IE-1 (paneles central e inferior de la Figura 6). De forma similar, los clones/estirpes de CTL específicos para otros epítomos de CTL que muestran fuerte reactividad específica de péptidos reconocieron eficientemente dianas infectadas con el virus de la vacuna recombinante (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que los epítomos de CTL cartografiados usando la estrategia descrita aquí representan el repertorio global de respuestas de CTL frente a HCMV, y que estos epítomos son eficientemente procesados de forma endógena por células infectadas por el virus.

### Ejemplo 7

Ensayos ELISPOT y de CTL usando péptidos solapantes de antígenos de HCMV

Estudios previos tanto del grupo de nuestro laboratorio como de otros grupos han indicado que, aunque se pueden emplear con éxito algoritmos a base de ordenador para cartografiar un gran panel de nuevos epítomos, este enfoque está limitado por la disponibilidad de los motivos específicos para alelos de HLA individuales. Además, los epítomos restringidos a clase I que no se ajustan a las restricciones especificadas por los algoritmos a base de ordenador, con respecto a la longitud del epítomo y los restos de anclaje de unión a MHC potenciales, a menudo no se seleccionan por tales métodos predictivos. Para superar estas limitaciones potenciales, se seleccionaron seis de los antígenos de HCMV más dominantes (gB, gH, IE-1, IE-2, pp150 y pp65), y se sintetizaron conjuntos completos de péptidos solapantes (20 aminoácidos de longitud, solapando cada miembro con otro miembro del mismo conjunto en 10 aminoácidos) abarcando la longitud completa de cada antígeno. De este modo, se produjo un total de 450 péptidos. Los ensayos ELISPOT se usaron para determinar si se pudieron detectar respuestas de linfocitos T de memoria *ex vivo* en una cohorte de 14 portadores de virus sanos (Tabla 2). Se estimularon PBMC con péptidos individuales y se seleccionaron células que produjeron IFN- $\gamma$ . Los datos representativos de un subconjunto de cinco portadores de virus sanos se muestran en las Figuras 7a a 7f. Se detectaron fuertes respuestas ELISPOT a múltiples péptidos procedentes de diferentes antígenos de HCMV. Consistente con nuestro análisis previo, los péptidos de pp65 fueron los epítomos más frecuentemente reconocidos en los ensayos ELISPOT. El análisis con péptidos 20-meros también indicó que el antígeno IE-2 fue más reconocido a menudo cuando se comparó con IE-1, gB, gH y pp150.

El repertorio global de respuestas de linfocitos T a HCMV no estuvo constreñido a un único antígeno. En cada donante respondedor, se reconocieron consistentemente dos o más antígenos como dianas para el control de CTL. A pesar de la diversidad de estas respuestas, una respuesta dominante a uno o dos epítomos fue siempre evidente en donantes respondedores.

Además de la identificación de los epítomos mediante ELISPOT, su validez se confirmó adicionalmente estimulando específicamente linfocitos T con péptidos para generar estirpes de CTL policlonales y clonales. Los datos de uno de tales análisis basado en seis donantes diferentes (RK, JW, MB, CS, SB y SE) se presentan en la Figura 8.

La especificidad del antígeno de los efectores generados se confirmó subsiguientemente usando dianas LCLs autólogas infectadas con virus de la vacuna que expresó antígenos de HCMV individuales en un ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$ . Los datos presentados en la Figura 9, muestran que los clones de CTL procedentes de los donantes RK (panel A) y MB (panel B) reconocieron Vacc.gB (OB6.13, OB12.3) y Vacc.pp65 (1C9.28, ID9.7), respectivamente, mientras que una estirpe policlonal del donante SB (panel C) reconoció Vacc.pp65 (IC7 CTL).

El análisis de péptidos 20-meros solapantes identificó numerosas secuencias nuevas de proteínas de HCMV que no se identificaron usando algoritmos predictivos. Estos subraya la necesidad de combinar ambos enfoques para cartografiar de forma amplia los epítomos de CTL con antígenos codificados víricamente.

Cuando se usan péptidos 20-meros para cartografiar epítomos mediante ELISPOT, es posible que algunas respuestas pueden estar restringidas a MHC clase II, y no necesariamente restringidas a través de alelos de HLA clase I. Fue evidente a través de este estudio que algunos epítomos identificados usando ELISPOT no se pudieron confirmar usando análisis de citotoxicidad. En este caso, se investigó la existencia de un epítomo restringido a clase II en las secuencias de 20-meros usando tanto técnicas detención de IFN- $\gamma$  intracelular como ELISPOT de IFN- $\gamma$ . PBMC ser co-tiñeron con CD4, CD8, CD3 e IFN- $\gamma$  tras la estimulación con diversos péptidos 20-meros, y la proporción de poblaciones de CD4 $^{+}$  y CD8 $^{+}$  que respondió al péptido se analizó mediante citometría de flujo (Figuras 10a a 10b).



Para ensayo ELISPOT de IFN- $\gamma$ , se prepararon poblaciones tanto de PBMC agotadas en linfocitos T CD4<sup>+</sup> como agotadas en linfocitos T CD8<sup>+</sup>, se estimularon con péptidos 20-meros, y se evaluó el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> que respondieron al péptido produciendo IFN- $\gamma$ . Ambas de estas técnicas demostraron ser valiosas a la hora de caracterizar la presencia de epítomos restringidos a MHC clase II procedentes de antígenos de HCMV.

5 Además, se identificaron epítomos restringidos a MHC clase II a partir de secuencias de 20-meros que se pensaba que contenían solamente un epítomo restringido a MHC clase I. Por ejemplo, el péptido de pp65 de HCMV SICPSQEPMSIYVYALPLKM (SEC ID NO: 90) (denominado SIC en las Figuras 10a y 10b) estimuló la producción de IFN- $\gamma$  en células 3178 por 10<sup>6</sup> de PBMC procedentes del donante JW (véase la Tabla 4). Sin embargo, también se detectó producción sustancial de IFN- $\gamma$  en la población de CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> de PBMC procedentes del mismo donante tras el análisis de IFN- $\gamma$  intracelular. Además, el porcentaje de las células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> que respondió a la secuencia de 20-meros (1,18%) fue comparable al porcentaje de población de CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> de células que respondió (1,36%). Esto indicó que, no sólo esta secuencia contiene un epítomo de CTL restringido a clase I, sino también un epítomo restringido a MHC clase II. También se encontró que un segundo péptido 20-mero, que demostró ser difícil de caracterizar como un epítomo de CTL de CD8<sup>+</sup>, contiene un epítomo restringido a clase II. Los intentos repetidos de generar estirpes de linfocitos T citotóxicos tanto policlonales como clonales específicas para el péptido gH que tiene la secuencia RQTEKHELLVLVKKAKLNRH (SEC ID NO: 249) no tuvo éxito. Los resultados del análisis citométrico de flujo de la producción de IFN- $\gamma$  intracelular mostraron que 1,52% de linfocitos T CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> produjeron IFN- $\gamma$  en respuesta a este péptido, mientras que sólo lo hizo el 0,57% de la población de CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Figuras 10a y 10b). Por lo tanto, el conjunto peptídico expuesto en SEC ID NO: 249 indujo una respuesta más sustancial desde linfocitos T CD4<sup>+</sup> que desde linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

Cuando la frecuencia del precursor de las células que responden a péptidos 20-meros fue demasiado baja para ser detectada mediante citometría de flujo, se llevaron a cabo ensayos ELISPOT de IFN- $\gamma$  usando poblaciones de PBMC agotadas en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Esta técnica permitió tanto la visualización como la enumeración del número de células que producen IFN- $\gamma$  en respuesta a un péptido dado. Los resultados detallados del análisis de CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> de los péptidos 20-meros se presentan en la Tabla 4. El uso de estas dos técnicas ha resaltado la presencia de epítomos restringidos a MHC clase II no sólo en los antígenos diana de HCMV convencionales gB y gH (Plotkin et al, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 18, 313, 1999; y Britt et al, *Intervirology* 39, 401, 1996), sino así mismo en otros antígenos de HCMV. Este hallazgo puede tener implicaciones importantes para el diseño futuro de candidatos de vacuna que promuevan respuesta inmunitarias tanto citotóxicas como auxiliares para la protección frente a HCMV.

30 Para identificar las secuencias mínimas en los péptidos 20-meros cartografiados mediante ensayos ELISPOT, se sintetizaron péptidos 12-meros y/o 9-meros solapantes y se evaluaron en los ensayos ELISPOT y/o de CTL. Los datos de un estudio representativo se muestran en las Figuras 11a y 11b. Como se muestra más arriba en la Tabla 4, los ensayos ELISPOT en péptidos 20-meros indicaron una fuerte respuesta a los péptidos solapantes TAAKAYAVGQFEQPTETPPE (SEC ID NO: 269) y FEQPTETPPEDLDLTLAIE (SEC ID NO: 270) por el donante RK, que se confirmó subsiguientemente mediante ensayos de citotoxicidad *in vitro* (Tabla 4). Ambos ensayos indicaron que la secuencia FEQPTETPP (SEC ID NO: 260) fue la secuencia mínima requerida para inducir fuerte actividad lítica por linfocitos T procedentes del donante RK (Figuras 11a y 11b).

Un resumen de este análisis se presenta en la Tabla 4.

40 La restricción por HLA clase I de los epítomos de CTL se determinó comparando la lisis de blastos de PHA o LCLs autólogos sensibilizados por péptido y blastos de PHA o LCLs alogeneicos sensibilizados por péptido que comparten uno o más alelos. Por ejemplo, el análisis de restricción por HLA para las estirpes de CTL específicas para epítomos en los antígenos IE-2 e IE-1 se presentan en las Figuras 12a y 12b. Una estirpe de CTL específica de IE-2 procedente del donante RK reconoció las células diana positivas a HLA B41, indicando que este epítomo estaba restringido mediante el alelo de HLA B41 (Figura 12a). Fue de interés la reactividad de una estirpe de CTL específica de IE-1 procedente del donante CS, que reconoció células diana positivas tanto a HLA A23, A24 y A30 sensibilizadas con epítomo de péptido sintético (Figura 12b). Estos datos sugieren que este epítomo de IE-1 se puede unir eficientemente a múltiples alelos del supertipo HLA A24 (Sette y Sidney, *Immunogenetics* 50, 201, 1999).

En la Tabla 4 se presenta un resumen global del análisis de restricción por HLA para las secuencias de 20-meros.

### Ejemplo 8

50 Péptidos poliepitépicos

Según los procedimientos descritos aquí, se diseñaron péptidos que comprenden múltiples epítomos de HCMV que son específicos para los mismos elementos de restricción por HLA Clase I o para elementos diferentes. Los epítomos se diseñaron para maximizar la cobertura de la población lograda mediante la vacunación con ellos. En consecuencia, los epítomos de CTL que están restringidos por alelos de HLA expresados frecuentemente (véanse las Tablas 1, 3 y 4) se prefirieron para la inclusión en tales vacunas de poliepítomos, y se incluyeron los epítomos procedentes tanto de proteínas pp65, IE-1, y pp150 inmunodominantes, así como procedentes de antígenos subdominantes. En SEC ID Nos: 309-319 se presentan las secuencias de aminoácidos de diez (10) péptidos poliepitépicos representativos.

**EJEMPLO 9**

Generación de CTLs

1. Generación de CTLs policlonales

5 Los efectores de CTL policlonales se generan estimulando PBMCs procedentes de donantes seropositivos sanos con estirpes celulares linfoblastoides (LCLs) autólogas transformadas con HCMV, en los días 0 y 7.

2. Clonación en agar de linfocitos T

10 Los clones de linfocitos T procedentes de donantes individuales se generaron según lo siguiente. Se aislaron PBMCs y se suspendieron en medio a una concentración de  $2 \times 10^6$  células en placas de 24 pocillos (Costar, Cambridge, Mass.). Se añaden PBMC sensibilizadas por péptido procedentes del mismo donante a cada uno de estos pocillos a  $10^6$  células/pocillo. Después de tres días, las células se dispersan y se siembran en placas de cultivo de 3,5 cm de diámetro en agarosa al 0,35% (p/v) (Seaplaque, FMC Corp., Rockland, Me.) que contiene RPMI 1640, 20% de 2 x RPMI 1640, 20% de FCS, 16% de sobrenadante de MLA, y 50 U/ml de IL-2 recombinante (rIL-2). Las colonias aparecen en el agar después de cinco días. Éstas se identifican bajo el microscopio invertido (aumento 25X) como agrupamientos o cadenas de células discretas. Estas colonias se cosechan bajo el microscopio en una cabina de flujo laminar mediante succión en una pipeta de Gilson. Las colonias cosechadas se dispersan en medio de crecimiento de linfocitos T (RPMI 1640, 20% de FCS, 30% de sobrenadante de MLA y 20 U/ml de rIL-2), y se transfieren a una bandeja de microtitulación de 96 pocillos que contiene LCLs irradiadas con radiación  $\gamma$  sensibilizadas con péptido procedentes del mismo donante ( $10^3$  células/pocillo). Estas colonias continúan expandiéndose y se almacenan en nitrógeno líquido (aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/ampolla).

20 **EJEMPLO 10**

Procedimientos de diagnóstico usando clones de CTL

1. Identificación de clones de CTL en busca de la reactividad frente a virus de la vacuna recombinante de HCMV

25 Las LCLs se infectan con virus de la vacuna recombinantes a una multiplicidad de infección de 10:1 durante 1 hora a 37°C. Después de 14-16 horas, las células se lavan con medio de cultivo básico y se incuban con  $^{51}\text{Cr}$  durante 90 minutos, se lavan tres veces, y se usan como dianas en un ensayo estándar de liberación de cromo de 4-6 horas como se describe más abajo.

2. Identificación de péptido

30 Se lleva a cabo un ensayo estándar de liberación de cromo de 4-6 h en efectores de linfocitos T policlonales o clones de linfocitos T, para evaluar la especificidad por el epítipo del péptido. De forma breve, se añaden ( $10^4$  células/pocillo en 40  $\mu\text{l}$ ) células diana (blastos de PHA autólogos) marcadas (60 minutos, 37°C) con  $^{51}\text{Cr}$  (Amersham International, Inglaterra) y lavadas a 10  $\mu\text{l}$  de péptido (concentración final 10  $\mu\text{M}$ ) en una placa de 96 pocillos con pocillos en U (Nunc, Dinamarca). Después de una incubación durante 30 minutos a 37°C, se añaden entonces por pocillo en 150  $\mu\text{l}$  entre  $10^4$  y  $50 \times 10^4$  linfocitos T efectores (CTLs clonados o en bruto), por triplicado, para obtener una relación final de efector a diana de 10:1 ó 5:1. Se añaden dos controles: (i) medios y diana (liberación de fondo), y (ii) dianas (liberación total) para la adición de SDS, preferiblemente 100  $\mu\text{l}$  de SDS al 0,5%. La placa se centrifuga entonces a 500 rpm durante cinco minutos y se incuba a 37°C durante cinco horas. Tras la incubación, se retiran 20  $\mu\text{l}$  de sobrenadantes para el recuento gamma. Los resultados se expresan como % de lisis específica calculada como:

$$\frac{\text{recuentos medios (pocillos experimentales)} - \text{recuentos medios (pocillos de control)}}{\text{recuentos totales para la solubilización de SDS} - \text{recuentos medios (pocillos de control)}}$$

40

TABLA 1: Lista de epítipos de CTL predictivos restringidos a HLA clase I a partir de proteínas de HCMV, y eficiencia de la estabilización de MHC

pp28	(HLA)	MSE*
LLIDPTSGL (SEC ID NO: 150)	(A2)	+
LLVEPCARV (SEC ID NO: 151)	(A2)	++
LLLIVTPW (SEC ID NO: 152)	(A2)	++
FLLSHDAAL (SEC ID NO: 153)	(A2)	++
PLREYLADL (SEC ID NO: 154)	(A2)	-

ES 2 523 972 T3

GLLGASMDL	(SEC ID NO: 155)	(A2)	-
LVEPCARVY	(SEC ID NO: 156)	(A1/A3)	NT/++
GIKHEGLVK	(SEC ID NO: 157)	(A3)	+++
ELLAGGRVF	(SEC ID NO: 158)	(A3)	-
RLLDLAPNY	(SEC ID NO: 159)	(A3)	+++
ELLGRLNVY	(SEC ID NO: 160)	(A3)	-
CRYKYLRKK	(SEC ID NO: 161)	(B27)	-
ARVYEIKCR	(SEC ID NO: 162)	(B27)	-
pp50		(HLA)	MSE*
LLNCAVTKL	(SEC ID NO: 163)	(A2)	++
QLRSVIRAL	(SEC ID NO: 164)	(A2)	-
VTEHDTLLY	(SEC ID NO: 165)	(A1)	NT
RGDPFDKNY	(SEC ID NO: 166)	(A1)	NT
GLDRNSGNY	(SEC ID NO: 167)	(A1)	NT
TLLNCAVTK	(SEC ID NO: 168)	(A3)	+++
TVRSHCVSK	(SEC ID NO: 169)	(A3)	+++
TRVKRNVKK	(SEC ID NO: 171)	(B27)	-
YEQHKITSY	(SEC ID NO: 170)	(B44)	NT
SEDSVTFEF	(SEC ID NO: 172)	(B44)	NT
TRLSEPPTL	(SEC ID NO: 173)	(B27)	NT
US3		(HLA)	MSE*
YLFSLVVLV	(SEC ID NO: 298)	(A2)	+
TLLVYLFSL	(SEC ID NO: 299)	(A2)	++
LLFRTLIVYL	(SEC ID NO: 300)	(A2)	+++
VYLFSLVVL	(SEC ID NO: 301)	(A24)	-
IE-2		(HLA)	MSE*
FLMEHTMPV	(SEC ID NO: 251)	(A2)	++
LMQKFPKQV	(SEC ID NO: 252)	(A2)	+
NLALSTPFL	(SEC ID NO: 253)	(A2)	++
IYTRNHEV	(SEC ID NO: 254)	(A2)	+
LLGALNLCL	(SEC ID NO: 256)	(A2)	++
KPEPDFTIQY	(SEC ID NO: 257)	(A1)	NT
IYTRNHEVK	(SEC ID NO: 255)	(A3)	+++
IMKDKNTPF	(SEC ID NO: 258)	(B8)	+++
PRKKKSKRI	(SEC ID NO: 259)	(B8)	-
pp71		(HLA)	MSE*

ES 2 523 972 T3

QLLIPKSFTL	(SEC ID NO: 174)	(A2)	-
TLVIPSWHV	(SEC ID NO: 175)	(A2)	++
LLIPKSFTL	(SEC ID NO: 176)	(A2)	-
DLVPLTVSV	(SEC ID NO: 177)	(A2)	+
CSDPNTYIHK	(SEC ID NO: 178)	(A1)	NT
EYIVQIQNAF	(SEC ID NO: 179)	(A24)	+++
AEVVARHNPY	(SEC ID NO: 180)	(B44)	NT
pp150		(HLA)	MSE*
GQTEPIAFV	(SEC ID NO: 122)	(A2)	+
KMSVRETLV	(SEC ID NO: 141)	(A2)	++
FLGARSPSL	(SEC ID NO: 142)	(A2)	++
ALVNAVNKL	(SEC ID NO: 143)	(A2)	++
ALVNFLRHL	(SEC ID NO: 144)	(A2)	++
NILQKIEKI	(SEC ID NO: 145)	(A2)	+
LIEDFDIYV	(SEC ID NO: 140)	(A2)	++
PLIPTTAVI	(SEC ID NO: 139)	(A2)	-
RIEENLEGV	(SEC ID NO: 138)	(A2)	+
NVRRSWEEL	(SEC ID NO: 134)	(B7)	++
WPRERAWAL	(SEC ID NO: 133)	(B7/B8)	+++/>++
KARDHLAVL	(SEC ID NO: 132)	(B7)	+++
SPWAPTAPL	(SEC ID NO: 131)	(B7)	+++
RPSTPRAAV	(SEC ID NO: 130)	(A1)	NT
UL18		(HLA)	MSE*
GEINITFIHY	(SEC ID NO: 291)	(B44)	NT
TENGsfVAGY	(SEC ID NO: 292)	(B44)	NT
TMWCLTLFV	(SEC ID NO: 293)	(A2)	++
LELEIALGY	(SEC ID NO: 308)	(B44)	NT
US6		(HLA)	MSE*
LYLCCGITL	(SEC ID NO: 303)	(A24)	-
pp65		(HLA)	MSE*
SQEPMSIYVY	(SEC ID NO: 22)	(A1)	NT
ATVQGQNLKY	(SEC ID NO: 23)	(A1)	NT
IRETVELRQY	(SEC ID NO: 24)	(A1)	NT
IGDQYVKVY	(SEC ID NO: 25)	(A1)	NT
TVQGQNLKY	(SEC ID NO: 26)	(A1)	NT
YRIQ GKLEY	(SEC ID NO: 27)	(A1)	NT

ES 2 523 972 T3

QVIGDQYVK	(SEC ID NO: 28)	(A3)	++
LLLQRGPQY	(SEC ID NO: 29)	(A3)	+++
RVTGGGAMA	(SEC ID NO: 30)	(A3)	-
GVMTRGRLK	(SEC ID NO: 31)	(A3)	+++
VYALPLKML	(SEC ID NO: 32)	(A24)	-
QYDPVAALF	(SEC ID NO: 33)	(A24)	-
VYYTSAFVF	(SEC ID NO: 34)	(A24)	-
DIYRIFAEL	(SEC ID NO: 15)	(A24)	NT
DVPSGKLFM	(SEC ID NO: 35)	(A26)	NT
DIDLLLQRG	(SEC ID NO: 36)	(A26)	NT
YVKVYLESF	(SEC ID NO: 37)	(A26)	NT
TVQGQNLKY	(SEC ID NO: 38)	(A26)	NT
EPMSIYVYAL	(SEC ID NO: 39)	(B7)	+
HVRVSQPSL	(SEC ID NO: 40)	(B7)	++
QARLTVSGL	(SEC ID NO: 41)	(B7)	+++
RRRHRQDAL	(SEC ID NO: 42)	(B27/B8)	++/+
QPKRRRHRQ	(SEC ID NO: 43)	(B8)	-
LCPKSIPGL	(SEC ID NO: 44)	(B8)	-
VLCPKNMII	(SEC ID NO: 14)	(B8)	-
YRIQGKLEY	(SEC ID NO: 27)	(B27)	-
SEHPTFTSQY	(SEC ID NO: 47)	(B44)	NT
CEDVPSGKLF	(SEC ID NO: 48)	(B44)	NT
NEIHNPVAF	(SEC ID NO: 49)	(B44)	NT
RETVELRQY	(SEC ID NO: 50)	(B44)	NT
QEPMSIYVY	(SEC ID NO: 51)	(B44)	NT
QMWQARLTV	(SEC ID NO: 52)	(A2)	+
ALFFFDIDL	(SEC ID NO: 12)	(A2)	++
RLLQTGIHV	(SEC ID NO: 10)	(A2)	++
NLVPMVATV	(SEC ID NO: 5)	(A2)	++
LMNGQQIFL	(SEC ID NO: 53)	(A2)	++
MLNIPSINV	(SEC ID NO: 6)	(A2)	++
RIFAELEGV	(SEC ID NO: 7)	(A2)	++
ILARNLVPM	(SEC ID NO: 54)	(A2)	++
VIGDQYVKV	(SEC ID NO: 11)	(A2)	++
TPRVTGGGGAM	(SEC ID NO: 8)	(B7)	
RIPHERNGFTVL	(SEC ID NO: 9)	(B7)	

ES 2 523 972 T3

	gH	(HLA)	MSE*
YLMDELRYV	(SEC ID NO: 196)	(A2)	++
YLTVFTVYL	(SEC ID NO: 197)	(A2)	++
TLTEDFFVV	(SEC ID NO: 198)	(A2)	++
LLMMSVYAL	(SEC ID NO: 199)	(A2)	++
YLLYRMLKT	(SEC ID NO: 200)	(A2)	-
ILFDGHDLL	(SEC ID NO: 201)	(A2)	+++
LIFGHLPRV	(SEC ID NO: 202)	(A2)	++
SLVRLVYIL	(SEC ID NO: 203)	(A2)	+
LLYPTAVDL	(SEC ID NO: 204)	(A2)	+++
ALDPYNEVV	(SEC ID NO: 205)	(A2)	+++
LMLLKNGTV	(SEC ID NO: 206)	(A2)	-
SAIIGIYLL	(SEC ID NO: 207)	(A2)	-
ITSLVRLVY	(SEC ID NO: 208)	(A1)	NT
HHEYLSDLY	(SEC ID NO: 209)	(A1)	NT
AIIIGIYLLY	(SEC ID NO: 210)	(A1/A3)	NT/+++
QTEKHELLV	(SEC ID NO: 211)	(A1)	NT
ATDSRLLMM	(SEC ID NO: 212)	(A1)	NT
FLDAALDFNY	(SEC ID NO: 213)	(A1)	NT
DTQGVINIMY	(SEC ID NO: 214)	(A1)	NT
LRENTTQCTY	(SEC ID NO: 215)	(A1)	NT
SAIIGIYLLY	(SEC ID NO: 216)	(A1)	NT
SLRNSTVVR	(SEC ID NO: 217)	(A3)	+++
ALALFAAAR	(SEC ID NO: 218)	(A3)	-
QLNRHSYLK	(SEC ID NO: 219)	(A3)	+++
RLFPDATVP	(SEC ID NO: 220)	(A3)	-
RLNTYALVSK	(SEC ID NO: 221)	(A3)	+++
LVRLVYILSK	(SEC ID NO: 222)	(A3)	+++
YLMDELRYVK	(SEC ID NO: 223)	(A3)	-
ELYLMGSLVH	(SEC ID NO: 224)	(A3)	-
ALTVSEHVSY	(SEC ID NO: 225)	(A3)	++
NYLDSALL	(SEC ID NO: 226)	(A24)	-
SYVVTNQYL	(SEC ID NO: 227)	(A24)	-
SYLKDSDFL	(SEC ID NO: 228)	(A24)	-
TYALVSKDL	(SEC ID NO: 229)	(A24)	-
SYRSFSQQL	(SEC ID NO: 230)	(A24)	-

ES 2 523 972 T3

TYGRPIRFL	(SEC ID NO: 231)	(A24)	-
YYVFHMPRCL	(SEC ID NO: 232)	(A24)	-
MYMHDSDDVL	(SEC ID NO: 233)	(A24)	-
ETFPDLFCL	(SEC ID NO: 234)	(A26)	NT
DLTETLERY	(SEC ID NO: 235)	(A26)	NT
SPRTHYLML	(SEC ID NO: 236)	(B7)	+++
FPDLFCLPL	(SEC ID NO: 237)	(B7)	+++
SPRTHYLMML	(SEC ID NO: 238)	(B7)	+++
MPRCLFAGPL	(SEC ID NO: 239)	(B7)	+++
TPMLLIFGHL	(SEC ID NO: 240)	(B7)	++
APYQRDNFIL	(SEC ID NO: 241)	(B7)	+++
GRCQMLDRR	(SEC ID NO: 242)	(B27)	-
RRDHSLERL	(SEC ID NO: 243)	(B27)	-
SEALDPHAF	(SEC ID NO: 244)	(B44)	NT
RENTTQCTY	(SEC ID NO: 245)	(B44)	NT
DDVLFALDPY	(SEC ID NO: 246)	(B44)	NT
	IE-1	(HLA)	MSE*
SLLSEFCRV	(SEC ID NO: 96)	(A2)	+++
VLAELVKQI	(SEC ID NO: 97)	(A2)	++
ILGADPLRV	(SEC ID NO: 98)	(A2)	++
TMYGGISLL	(SEC ID NO: 99)	(A2)	++
LLSEFCRVL	(SEC ID NO: 100)	(A2)	++
VLEETSVML	(SEC ID NO: 101)	(A2)	++
YILEETSVM	(SEC ID NO: 18)	(A2)	++
CLQNALDIL	(SEC ID NO: 102)	(A2)	++
ILDEERDKV	(SEC ID NO: 103)	(A2)	++
IKEHMLKKY	(SEC ID NO: 104)	(A1)	NT
DEEEAIVAY	(SEC ID NO: 105)	(A1)	NT
CVETMCNEY	(SEC ID NO: 19)	(A1)	NT
KLGGALQAK	(SEC ID NO: 106)	(A3)	+++
QYILGADPL	(SEC ID NO: 107)	(A24)	+++
KYTQTEEF	(SEC ID NO: 108)	(A24)	-
KARAKKDEL	(SEC ID NO: 109)	(B7/B8)	-/-
VMKRRIEEI	(SEC ID NO: 110)	(B8)	+
RHRIKEHML	(SEC ID NO: 111)	(B8)	-
ELRRKMMYM	(SEC ID NO: 112)	(B8)	++

ES 2 523 972 T3

QIKVRVDMV	(SEC ID NO: 113)	(B8)	+
ELKRKMMYM	(SEC ID NO: 114)	(B8)	-
RRKMMYMCY	(SEC ID NO: 115)	(B27)	+
RRIEEICMK	(SEC ID NO: 20)	(B27)	-
US2		(HLA)	MSE*
LLVLFIVYV	(SEC ID NO: 294)	(A2)	-
SMMWMRFFV	(SEC ID NO: 295)	(A2)	++
TLLVLFIVYV	(SEC ID NO: 296)	(A2)	-
VYVTDCNL	(SEC ID NO: 297)	(A24)	-
gB		(HLA)	MSE*
RIWCLVVCV	(SEC ID NO: 181)	(A2)	-
QMLLALARL	(SEC ID NO: 182)	(A2)	+
GLDDLMSGI	(SEC ID NO: 183)	(A2)	++
IILVAIAVV	(SEC ID NO: 184)	(A2)	+
DLDEGIMVV	(SEC ID NO: 185)	(A2)	-
NLFPYLVSA	(SEC ID NO: 186)	(A2)	++
AVGGAVASV	(SEC ID NO: 187)	(A2)	-
YINRALAQI	(SEC ID NO: 188)	(A2)	++
CYSRPVVIF	(SEC ID NO: 137)	(A24)	-
KMTATFLSK	(SEC ID NO: 136)	(A3)	+++
IMREFNSYK	(SEC ID NO: 135)	(A3)	+++
VKESPGRCY	(SEC ID NO: 129)	(A1)	NT
LDEGIMVVY	(SEC ID NO: 128)	(A1)	NT
ATSTGDVVY	(SEC ID NO: 127)	(A1)	NT
NTDFRVLEL	(SEC ID NO: 126)	(A1)	NT
AYIYTTYLL	(SEC ID NO: 125)	(A24)	-
SYENKTMQL	(SEC ID NO: 124)	(A24)	-
AYEYVDYLF	(SEC ID NO: 123)	(A24)	-
US11		(HLA)	MSE*
YYVECEPRC	(SEC ID NO: 302)	(A24)	NT
TLFDEPPPLV	(SEC ID NO: 304)	(A2)	NT
TPRVYYQTL	(SEC ID NO: 305)	(B7)	+++
APVAGSMPEL	(SEC ID NO: 306)	(B7)	+++
SESLVAKRY	(SEC ID NO: 307)	B44)	NT



\*MSE: La eficiencia de la estabilización del MHC se evaluó usando células T2 transfectadas con alelos de HLA clase I individuales. Los niveles de HLA en presencia de péptido se expresan con respecto a la expresión en células T2 en ausencia de péptido a 26°C: +++ = 200-300%, ++ = 100-199%, + = 51-99%, - = 0-50%, incremento relativo en la expresión de HLA. NT: No evaluado

TABLA 2: Tipo de antígeno de HLA (clase I) de los donantes inmunes a HCMV incluidos en este estudio

Donante	Tipaje de HLA
MB	A1 A24 B8 B58
SB	A2 B35 B57
SC	A1 B8
JDu	A31 A33 B35 B58
JDa	A28 A31 B27 B18
JG	A1 A2 B7 B37
TD	A24 A26 B15 B62
RE	A11 A24 B35 B60
SE	A2 A29 B44 B60
TF	A2 A24 B40 B60
PH	A1 A2 B8 B44
CJ	A2 A3 B8 B60
RK	A23 A24 B27 B41
TK	A3 A25 B35 B44
MM	A1 A3 B50 B57
PP	A1 A24 B8 B14
CP	A2 A32 B7 B50
JP	A2 A28 B8 B62
CR	A1 A3 B35 B57
BS	A2 A11 B13 B27
CS	A3 A23 B35 B44
WS	A2 A32 B27 B60
JT	A2 A32 B44 B62
JW	A23 A32 B35 B49
MW	A1 A3 B8 B35
TC	A1 A11 B8 B35
CSt	A2 A26 B44 B35

ES 2 523 972 T3

TABLA 3

Lista completa de epítomos de CTL restringidos a HLA Clase I procedentes de antígenos de HCMV cartografiados mediante ensayos ELISPOT y de CTL					
Antígeno	Secuencia peptídica		Donante(s) y respuestas ELISPOT (SFC/10 <sup>6</sup> PBMC)	Restricción por HLA	Respuesta de CTL *
gB	RIWCLWCV	(SEC ID NO: 181)	JP(108), CP(105)	HLA A2	ND
	AVGGAVASV	(SEC ID NO: 187)	SB(192)	HLA A2	Y
	IMREFNSYK	(SEC ID NO: 135)	MB(202)	HLA A3	NT
	VKESPGRCY	(SEC ID NO: 129)	TC(51)	HLA A1	NT
	LDEGIMVVY	(SEC ID NO: 128)	TC(239)	HLAA1	NT
	ATSTGDVVY	(SEC ID NO: 127)	TC(239)	HLA A1	NT
	NTDFRVLEL	(SEC ID NO: 126)	TC(1631)	HLA A1	NT
	gH	LIFGHLPRV	(SEC ID NO: 202)	SE (84)	HLA A2
LMLLKNGTV		(SEC ID NO: 206)	CJ(80)	HLA A2	NT
IE-1	SLLSEFCRV	(SEC ID NO: 96)	WS (471)	HLA A2	ND
	VLAELVKQI	(SEC ID NO: 97)	SB(276)	HLA A2	Y
	VLEETSVML	(SEC ID NO: 101)	SB(3752), CP(245)	HLA A2	Y
	YILEETSVM	(SEC ID NO: 18)	SB(764)	HLA A2	ND
	CLQNALDIL	(SEC ID NO: 102)	SE (490)	HLA A2	NT
	KARAKKDEL	(SEC ID NO: 109)	MB(231), PH(235)	HLA B7/B8	ND
	QIKVRVDMV	(SEC ID NO: 113)	SC(2848), JP(475), PH(2425), TC(2251)	HLA B8	Y
	ELRRKMMYM	(SEC ID NO: 112)	SC(1243), JP(145), PH(430), TC(4999)	HLA B8	Y
	ELKRKMMYM	(SEC ID NO: 114)	SC(1000), MW(1992), PH(300), PP(100), TC(4999)	HLA B8	Y
	IKEHMLKKY	(SEC ID NO: 104)	TC(4232)	HLA A1	NT
	DEEEAIVAY	(SEC ID NO: 105)	TC(3903)	HLA A1	NT
CVETMCNEY	(SEC ID NO: 19)	TC(4187)	HLA A1	NT	
IE-2	IYTRNHEV	(SEC ID NO: 254)	SB(369),CP(80),SE (137)	HLA A2 HLA A2	Y NT
	FLMEHTMPV	(SEC ID NO: 251)	WS(137)		
pp28	LLIDPTSGL	(SEC ID NO: 150)	SB(270), NS (77)	HLA A2	NT
	ARVYEIKCR	(SEC ID NO: 162)	RK(148)	HLA B27	Y
pp50	LLNCAVTKL	(SEC ID NO: 163)	SE(59)	HLA A2	NT
	VTEHDTLLY	(SEC ID NO: 165)	MB(925), SC(902), MW(975), PP(230),		Y

ES 2 523 972 T3

			PH(1290), TC(2531), JG(1070)		
	YEQHKITSY	(SEC ID NO: 170)	CS(67)	HLA B44	ND
	RGDPFDKNY	(SEC ID NO: 166)	JG (720), TC(2739)	HLA A1	NT
	GLDRNSGNY	(SEC ID NO: 167)	MW(345), TC(507)	HLA A1	NT
pp150	KMSVRETLV	(SEC ID NO: 141)	SE(69)	HLAA2	NT
	ALVNAVKNL	(SEC ID NO: 143)	WS(60)	HLAA2	NT
	ALVNFLRHL	(SEC ID NO: 144)	WS(57)	HLA A2	NT
	LIEDFDIYV	(SEC ID NO: 140)	WS(88)	HLA A2	NT
	NVRRSWEEL	(SEC ID NO: 134)	MB(1431), CS(274)	HLA B7	ND
	KARDHLAVL	(SEC ID NO: 132)	MB(975)	HLA B7	ND
	SPWAPTAPL	(SEC ID NO: 131)	MB(180)	HLA B7	ND
	RPSTPRAAV	(SEC ID NO: 130)	MB(306)	HLA B7	ND
	WPRERAWAL	(SEC ID NO: 133)	TC(67)	HLAB8	NT
pp65	RLLTGIHV	(SEC ID NO: 10)	BS(57)	HLA A2	ND
	NLVPMVATV	(SEC ID NO: 5)	SB(1202), JP(1201), WS(1102), CJ(271), JT(1195), BS(161), CP(671), SE(170) CP(356), WS (335)	HLA A2	Y
	LMNGQQIFL	(SEC ID NO: 53)	CP(217), WS (751)	HLA A2 HLA	ND
	MLNIPSINV	(SEC ID NO: 6)	SB(65), JP(178),	A2 HLA A2	ND
	RIFAELEGV	(SEC ID NO: 7)	WS(236), JT(170), CP(275)		ND
pp65	ILARNLVPM	(SEC ID NO: 54)	SE(170)	HLA A2	ND
	HVRVSQPSL	(SEC ID NO: 40)	MB(783)	HLA B7	ND
	QARLTVSGL	(SEC ID NO: 41)	MB(1116)	HLA B7	ND
	IGDQYVKVY	(SEC ID NO: 25)	PH(565), TC (67)	HLA A1	NT
	TVQGQNLKY	(SEC ID NO: 26)	PH(385), TC(251)	HLA A1	NT
	YRIQKLEY	(SEC ID NO: 27)	TC(307)	HLA 1/B27	NT
	FPTKDVAL	(SEC ID NO: 4)	MW(445)	HLA B35	Y
	RRRHRQDAL	(SEC ID NO: 42)	PH(215), TC(71)	HLA B8	NT
	YSEHPTFTSQY	(SEC ID NO: 13)	MW(310), TC(359)	HLA-A1	NT
US2	SMMWMRFFV	(SEC ID NO: 295)	SE(393)	HLA A2	Y
	TLLVLFIVYV	(SEC ID NO: 296)	SE(46)	HLA A2	NT
	LLVLFIVYV	(SEC ID NO: 294)	WS(92)	HLA A2	NT
US3	YLFSLVVLV	(SEC ID NO: 298)	WS(73)	HLA A2	NT
	LLFRLLVYL	(SEC ID NO: 300)	SB(76), WS(77)	HLA A2	ND

ES 2 523 972 T3

UL18	TENGSFVAGY	(SEC ID NO: 292)	CS(283)	B44	ND
**La respuesta de CTL para cada uno de los péptidos se detectó usando el protocolo descrito en la sección "Material y métodos". Y: Sí; NT: No evaluado; ND: No detectado					

TABLA 4

Resumen de análisis ELISPOT basado en péptidos 20meros solapantes procedentes de antígenos de HCMV									
Antígeno	Secuencia peptídica	Donante(s) ELISPOT PBMC	Y (SFC/10 <sup>6</sup> )	Células respondedoras (%CD4/ %CD8)	Secuencia definida	Restricción de HLA	Respuesta CTL*	de	
gB	RSYAYITYLLGSNTEYVA (SEC ID NO: 192)	RK(170)		RK(0,39/0,58)	YAYITYYL (SEC ID NO: 189)	HLA B41	Y		
	TYEKYGNVSVFETSGGLWF (SEC ID NO: 193)	SE(75)		SE(0/0,097)	VFETSGGLW (SEC ID NO: 190)	HLA A29	Y		
	FETSGGLVFWQGIKQKSLV (SEC ID NO: 194)	MB(23), SB(185)		NT			ND		
	MLIPDDYSNTHSTRYVTVK (SEC ID NO: 195)	MB(238), SB(157)	MB(302),	MB(0,06/0,03)	DDYSNTHSTRYV (SEC ID NO: 191)	HLA DR7	Y		
gH	RQTEKHELLVLVKKAKLNRH (SEC ID NO: 249)	RK(313)		RK(1,52/0,57)	HELLVLVKKAKL (SEC ID NO: 247)	HLA DR*	Y		
	ALTVEHVSYYVTNQYLIKG (SEC ID NO: 250)	MB(23)		NT	LTVSEHVSYYVT (SEC ID NO: 248)		NT		
IE-1	CSPDEIMAYAQQIKILDEE (SEC ID NO: 117)	CS(1532)		CS(0,53/0,4)	AYAQQIKIL (SEC ID NO: 116)	HLA A23, A24 y A30	Y		
	SEPVSEIEEVAPEEEEEEDGAE (SEC ID NO: 118)	SE(200)		SE(0/0,097)	VLEETSVM (SEC ID NO: 101)	-	NT		
	VLCCYVLEETSVMMLAKRPLI(SEC ID NO: 119)	SB(2171)		NT		HLA A2	Y		
	RRKMMYMCYRNIEFFTKNSA (SEC ID NO: 120)	CP(632)		NT		-	NT		
	NIEFFTKNSAFPKTTNGCSQ (SEC ID NO: 121)	CP(1767)		NT		-	ND		
IE-2	TAAKAYAVGQFEQPTETPPE (SEC ID NO: 269)	RK(859), SB(326)		RK(0,2/0,35)	FEQPTETPP (SEC ID NO: 260)	HLA B41	Y		
	FEQPTETPPEDLTLSLAIE (SEC ID NO: 270)	RK(791)		RK(0,2/0,35)	FEQPTETPP (SEC ID NO: 260)	HLA B41	Y		

	MLPLIKQEDIKPEPDFTIQY (SEC ID NO: 271)	SB(132)	NT		-	NT
	THQLCPRSSDYRNMIHHAAT (SEC ID NO: 272)	SC(173), TC(124)	NT	SDYNNIIHA (SEC ID NO: 265)	HLA A1/B8	ND
	YRNMIHHAATPVDLLGALNL (SEC ID NO: 273)	SC(229), JW(132), TC(137)	NT	YRNMIHHAAT (SEC ID NO: 266)	HLA A1/B8/B35 HLA A2	ND
	TGPRKKKSKRISELDNEKVR (SEC ID NO: 274)	SB(148), SE(162)	SB(0,02/0,02)			ND
IE-2	PVDLLGALNLCLPLMQKFPK (SEC ID NO: 275)	SC(111), TC(169)	NT	CLPLMQKFP (SEC ID NO: 267)	HLA A1/B8	ND
	IQIYTRNHEVKSEVDAVRC (SEC ID NO: 276)	SE(203), SB(288)	SE(0/0,19)	IYTRNHEVK (SEC ID NO: 255)	HLA A2	Y
	VKSEVDAVRCRLGTMCNLAL (SEC ID NO: 277)	SE(253), SB(320)	SE(0/0,06)		HLA A2	NT
	RVKIDEVSRMFRNTNRSLEY (SEC ID NO: 278)	SC(306), TC(194)	NT	IDEVSRMFRNTNRS (SEC ID NO: 268)	HLA A1/B8	NT
	SSSSSSCSASDSESESEEM (SEC ID NO: 279)	JW(125), TC(93)	JW(0/0,01), TC(0/0,05)		HLA B35	ND
	ASSPSTGSGTPRBTSPHPL (SEC ID NO: 280)	JW(95)	NT		-	NT
	PRVTSPTPLSQMHPPLPD (SEC ID NO: 281)	JW(52), TC(96)	NT		HLA B35	NT
	PLGRPEDESSSSSSSSCSA (SEC ID NO: 282)	TC(46)	NT		-	NT
	SDSESESEEMKCSSGGGASV (SEC ID NO: 283)	TC(147)	TC(0,01/0,22)		-	NT
	KCSSGGGASVTSSHGRGGF (SEC ID NO: 284)	TC(54)	NT		-	NT
IE-2	CTPNVQTRRGRVKIDEVSRM (SEC ID NO: 285)	TC(89)	NT		-	NT

	FRNTRSLEYKNLPTIPSM (SEC ID NO: 286)	TC(187)	TC(0/0,25)	-	NT
	HQVLDEAIKACKTMQVNKNG (SEC ID NO: 287)	TC(234)	TC(0/0,18)	-	NT
	CKTMQVNKGIQIYTRNHE (SEC ID NO: 288)	TC(154)	TC(0/0,14)	-	NT
	KAAWSLKELHTHQLCPRSSD (SEC ID NO: 289)	TC(162)	TC(0/0,08)	-	NT
	CLPLMQKFPQVMVRIFSTN (SEC ID NO: 290)	TC(256)	TC(0/0,15)	CLPLMQKFP (SEC ID NO: 267)	NT
pp150	WPRERAWALKNPHLAYNPF (SEC ID NO: 147)	RE(83)	RE(0.03/0,27)	ERAWALKNPHLA (SEC ID NO: 146)	Y
	STSQKPVLGKRVATPHASAR (SEC ID NO: 148)	MW(215)	NT	-	ND
	HANTALVNAVNLVYTGRLI (SEC ID NO: 149)	MW(122)	NT	-	ND
pp65	LNIPSINVHHYPSAAERKHR (SEC ID NO: 67)	RE(285), TC(222)	NT	IPSINVHHY (SEC ID NO: 55)	Y
	ATVQGNLKYQEFFWDANDI (SEC ID NO: 68)	CS(226), PP(202), SC(687)	RE(0.03/0)	HLA B44	Y
		MW(189), RE(25)			
	QEFFWDANDYRIFAELEGV (SEC ID NO: 69)	CS(107)	NT	HLA B44	Y
		RE(30), PP(295), SC(704)	NT	HLA A1/A24	Y
	PQYSEHPTFTSQYRIQGKLE (SEC ID NO: 70)	RK(1393), SE(980), MB(413)	RK(1,69/0,96)	HLAA24	Y
			MB(0,05/0)	HLA A1	NT
			SE(0/0,87)		

	SQYRIQGKLEYRHTWDRHDE (SEC ID NO: 71)	SE(1203)	SE(0/2,0)	QYRIQGKLE (SEC ID NO: 58)	-	Y
	VFTWPPWQAGILARNLVPMV (SEC ID NO: 72)	SE(533), MB(420)	SE(0/0,45)	ILARNLVPMV (SEC ID NO: 16)	HLA A2	Y
	ILARNLVPMVATVQGQNLKY (SEC ID NO: 73)	MB(500), SB(216), MW(229)	NT	NLVPMVATV (SEC ID NO: 5)	HLA A2	Y
	DQYVKVYLEFCEDVPSGKL (SEC ID NO: 74)	SE(265)	SE(0/0,23)	-	-	ND
pp65	YPSAAERKHRHLPVADAVIH (SEC ID NO: 75)	SE(350)	SE(0/0,313)	RKHRHLPVADAV (SEC ID NO: 59)	-	Y
	QYDPVAALFFDIDLLLRGQ(SE Q ID NO: 76)	SB(97)	SB(0,22/0,03)	DPVAALFFF (SEC ID NO: 60)	HLA B35	Y
	IIPGKISHIMLDVAFTSHE(SEC ID NO: 77)	SC(691), PP(177), SB(155), JW(370)	JW(0,04/0,05)	PGKISHIMLDA (SEC ID NO: 61)	HLA B35	Y
			SB(0,02/0,03)			
	AHELVCSEMENTRATKMQVIG (SEC ID NO: 78)	MM(169), SB(231)	SB(0,04/0,01)	TRATKMQVI (SEC ID NO: 62)	HLA B57	ND
	TRATKMQVIGDQYVKVYLES (SEC ID NO: 79)	MM(139), SB(346)	SB(0,09/0,01)	TRATKMQVI (SEC ID NO: 62)	HLA B57	ND
	MNGQQIFLEVQAIRETVELR (SEC ID NO: 80)	MM(277), JD(2985)	JD(0,26/0,48)	QAIRETVEL (SEC ID NO: 63)	HLA B57 y B58 HLA B57 y B58	Y
	QAIRETVELRQYDPVAALFF (SEC ID NO: 81)	MM(102), SB(241), JD(2593)	JD(0,28/0,33)	QAIRETVEL (SEC ID NO: 63)	-	Y
	LTVSGLAWTRQQNQWKEPDV (SEC ID NO: 82)	SC(695)	NT		HLA B8	NT
	WQPAAPKRRRRHRQDALPGP (SEC ID NO: 83)	SC(615)	NT	RRRRQDAL (SEC ID NO: 42)	-	ND
	YRHTWDRHDEGAAQGGDDVW (SEC ID NO: 84)	SC(295)	NT	YHRTWDRHEGA (SEC ID NO: 64)		ND
pp65	TSAGRKRKSASATACTSGV (SEC ID NO: 85)	SC(138)	NT	-	-	NT



	HRQDALPGPCIASTPKKHRG (SEC ID NO: 86)	SC(109)	NT	-	-	NT	
	YYTSAFVPTKDVALRHC (SEC ID NO: 87)	JD(358), JW(858)	SB(775), JW(858)	JD(0,05/0,04)	FPTKDVAL (SEC ID NO: 4)	HLA B35	Y
	VTERKTPRVTTGGAMAGAS (SEC ID NO: 88)	JW(285), JD(319)	SC(322), JW(858)	JW(0,17/0,24)	-	-	ND
	QFMRPHERNGFTVLCPKNM (SEC ID NO: 89)	SE(783)		JD(0,05/0)	FMRPHERNGFTV (SEC ID NO: 65)	-	ND
	SICPSQEPMSIYVY ALPLKM (SEC ID NO: 90)	SB(1044), SB(76)	JW(3178)	JW(1,18/1,36)	CPSQEPMSIYVY (SEC ID NO: 66)	HLA B35	Y
	IYVYALPLKMLNIPSNVHH (SEC ID NO: 91)			NT	-	-	NT
	QQNQWKEPDVYYSAFVPT (SEC ID NO: 92)	JW(600)		JW(0/0,03)	-	-	Y
	GAAQGGDDVWTSGSDSEEL (SEC ID NO: 93)	JW(248)		JW(0/0,01)	-	-	ND
	TGGGAMAGASTSAGRKRKSA (SEC ID NO: 94)	JW(441)		JW(0,01/0,01)	-	-	ND
pp65	KDVALRHWCAHELVCSMEN (SEC ID NO: 95)	TC(50)		NT	-	-	NT
* La respuesta de CTL para cada uno de los péptidos se detectó usando el protocolo descrito en la sección "Material y métodos". Y: Sí; NT: No evaluado; ND: No detectado							

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Council of the Queensland Institute of Medical Research

<120> Nuevos epítomos de linfocitos T citotóxicos del citomegalovirus humano (HCMV), poliepítomos, composiciones que los comprenden, y usos de diagnóstico y terapéuticos para ellos

- 5 <130> 500553 HCMV CTL epitope pct  
 <150> AU PR5931  
 <151> 2001-06-26  
 <160> 318  
 <170> PatentIn version 3.1
- 10 <210> 1  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítomo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 1  
 Ser Val Leu Gly Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys  
 1 5 10
- 15 <210> 2  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítomo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano
- 20 <400> 2  
 Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu  
 1 5 10
- 25 <210> 3  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítomo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 3  
 Phe Val Phe Pro Thr Lys Asp Val Ala Leu Arg  
 1 5 10
- 30 <210> 4  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítomo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 4  
 Phe Pro Thr Lys Asp Val Ala Leu  
 1 5
- 35 <210> 5  
 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 5

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val  
1 5

5 <210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> -péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 6

10 Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val  
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

15 <400> 7

Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val  
1 5

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

20 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 8

Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Gly Ala Met  
1 5 10

<210> 9

<211> 11

25 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 9

Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val Leu  
1 5 10

<210> 10

30 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 10

Arg Leu Leu Gln Thr Gly Ile His Val  
1 5

<210> 11  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 5 <400> 11  
 Val Ile Gly Asp Gln Tyr Val Lys Val  
 1 5  
 <210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 10 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 12  
 Ala Leu Phe Phe Phe Asp Ile Asp Leu  
 1 5  
 <210> 13  
 <211> 11  
 15 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 13  
 Tyr Ser Glu His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr  
 1 5 10  
 <210> 14  
 20 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 14  
 Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile  
 1 5  
 25 <210> 15  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 15  
 Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu  
 30 1 5  
 <210> 16  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 16  
 Ile Leu Ala Arg Asn Leu Val Pro Met Val  
 1 5 10  
 <210> 17  
 <211> 10  
 5 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 17  
 Glu Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr  
 1 5 10  
 <210> 18  
 10 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano  
 <400> 18  
 Tyr Ile Leu Glu Glu Thr Ser Val Met  
 1 5  
 15 <210> 19  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano  
 <400> 19  
 Cys Val Glu Thr Met Cys Asn Glu Tyr  
 1 5  
 20 <210> 20  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano  
 25 <400> 20  
 Arg Arg Ile Glu Glu Ile Cys Met Lys  
 1 5  
 <210> 21  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 30 <213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano  
 <400> 21  
 Thr Thr Val Tyr Pro Pro Ser Ser Thr Ala Lys  
 1 5 10  
 <210> 22  
 <211> 10

<212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 22  
 Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr  
 1 5 10

5 <210> 23  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 23  
 Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys Tyr  
 1 5 10

10 <210> 24  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 24  
 Ile Arg Glu Thr Val Glu Leu Arg Gln Tyr  
 1 5 10

15 <210> 25  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 25  
 Ile Gly Asp Gln Tyr Val Lys Val Tyr  
 1 5

20 <210> 26  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 26  
 Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys Tyr  
 1 5

25 <210> 27  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 27  
 Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr  
 1 5

30

<210> 28  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 5 <400> 28  
 Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr Val Lys  
 1 5  
 <210> 29  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 10 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 29  
 Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr  
 1 5  
 <210> 30  
 <211> 9  
 15 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 30  
 Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala  
 1 5  
 <210> 31  
 20 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 31  
 Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys  
 1 5  
 25 <210> 32  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
 <400> 32  
 Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu  
 1 5  
 30 <210> 33  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 33

Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe  
1 5

<210> 34

<211> 9

5 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 34

Val Tyr Tyr Thr Ser Ala Phe Val Phe  
1 5

<210> 35

10 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 35

Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu Phe Met  
1 5

15 <210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 36

Asp Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly  
1 5

20 <210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

25 <400> 37

Tyr Val Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe  
1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

30 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 38

Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys Tyr  
1 5

<210> 39



## ES 2 523 972 T3

<211> 10  
<212> PRT  
<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
<400> 39  
5     Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr Ala Leu  
      1                     5                     10  
<210> 40  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
10    <400> 40  
      His Val Arg Val Ser Gln Pro Ser Leu  
      1                     5  
<210> 41  
<211> 9  
<212> PRT  
15    <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
<400> 41  
      Gln Ala Arg Leu Thr Val Ser Gly Leu  
      1                     5  
<210> 42  
<211> 9  
20    <212> PRT  
<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
<400> 42  
      Arg Arg Arg His Arg Gln Asp Ala Leu  
      1                     5  
<210> 43  
25    <211> 9  
<212> PRT.  
<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
<400> 43  
      Gln Pro Lys Arg Arg Arg His Arg Gln  
      1                     5  
30    <210> 44  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
<400> 44

ES 2 523 972 T3

Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu  
1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

5 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 45

Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr  
1 5

<210> 46

<211> 11

10 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 46

Tyr Ser Glu His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr  
1 5 10

<210> 47

15 <211> 10

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 47

Ser Glu His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr  
1 5 10

20 <210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 48

Cys Glu Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu Phe  
1 5 10

25 <210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

30 <400> 49

Asn Glu Ile His Asn Pro Ala Val Phe  
1 5

<210> 50

<211> 9

ES 2 523 972 T3

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 50

Arg Glu Thr Val Glu Leu Arg Gln Tyr  
1 5

5 <210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 51

Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr  
1 5

10 <210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

15 <400> 52

Gln Met Trp Gln Ala Arg Leu Thr Val  
1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

20 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 53

Leu Met Asn Gly Gln Gln Ile Phe Leu  
1 5

<210> 54

<211> 9

25 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 54

Ile Leu Ala Arg Asn Leu Val Pro Met  
1 5

<210> 55

30 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 55

Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr  
1 5

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

5 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 56

Gln Glu Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr  
1 5 10

<210> 57

<211> 10

10 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 57

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

<210> 58

15 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 58

Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu  
1 5

20 <210> 59

<211> 12

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 59

Arg Lys His Arg His Leu Pro Val Ala Asp Ala Val  
1 5 10

25 <210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

30 <400> 60

Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Phe Phe  
1 5

<210> 61

<211> 12

<212> PRT  
<213> péptido de epítoto de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
<400> 61  
Pro Gly Lys Ile Ser His Ile Met Leu Asp Val Ala  
1                   5                   10  
5 <210> 62  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> péptido de epítoto de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
<400> 62  
Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile  
1                   5  
10 <210> 63  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> péptido de epítoto de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
15 <400> 63  
Gln Ala Ile Arg Glu Thr Val Glu Leu  
1                   5  
<210> 64  
<211> 11  
<212> PRT  
20 <213> péptido de epítoto de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
<400> 64  
Tyr His Arg Thr Trp Asp Arg His Glu Gly Ala  
1                   5                   10  
<210> 65  
<211> 12  
25 <212> PRT  
<213> péptido de epítoto de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
<400> 65  
Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val  
1                   5                   10  
<210> 66  
30 <211> 12  
<212> PRT  
<213> péptido de epítoto de CTL de pp65 de citomegalovirus humano  
<400> 66  
Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr  
1                   5                   10

<210> 67

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

5 <400> 67

Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr Pro Ser Ala Ala Glu  
1 . 5 . . . . . 10 . . . . . 15

Arg Lys His Arg  
. . . . . 20

<210> 68

<211> 20

<212> PRT

10 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 68

Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys Tyr Gln Glu Phe Phe Trp Asp  
1 . . . . . 5 . . . . . 10 . . . . . 15

Ala Asn Asp Ile  
. . . . . 20

<210> 69

15 <211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 69

Gln Glu Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu  
1 . . . . . 5 . . . . . 10 . . . . . 15

Leu Glu Gly Val  
. . . . . 20

20 <210> 70

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 70

Pro Gln Tyr Ser Glu His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln  
1 . . . . . 5 . . . . . 10 . . . . . 15

Gly Lys Leu Glu  
. . . . . 20

25 <210> 71

ES 2 523 972 T3

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 71

Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr Arg His Thr Trp Asp  
1 5 10 15

Arg His Asp Glu  
20

5

<210> 72

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

10

<400> 72

Val Phe Thr Trp Pro Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala Arg Asn Leu  
1 5 10 15

Val Pro Met Val  
20

<210> 73

<211> 20

<212> PRT

15

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 73

Ile Leu Ala Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln  
1 5 10 15

Asn Leu Lys Tyr  
20

<210> 74

<211> 20

20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 74

Asp Gln Tyr Val Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Glu Asp Val Pro  
1 5 10 15

Ser Gly Lys Leu  
20

<210> 75

25

<211> 20

<212> PRT

ES 2 523 972 T3

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 75

Tyr Pro Ser Ala Ala Glu Arg Lys His Arg His Leu Pro Val Ala Asp  
1 5 10 15

Ala Val Ile His  
20

<210> 76

5 <211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 76

Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Phe Phe Asp Ile Asp Leu Leu  
1 5 10 15

Leu Gln Arg Gly  
20

10 <210> 77

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 77

Ile Ile Lys Pro Gly Lys Ile Ser His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe  
1 5 10 15

Thr Ser His Glu  
20

15 <210> 78

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

20 <400> 78

Ala His Glu Leu Val Cys Ser Met Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met  
1 5 10 15

Gln Val Ile Gly  
20

<210> 79

<211> 20

<212> PRT

25 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 79



ES 2 523 972 T3

Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr Val Lys Val  
1 5 10 15

Tyr Leu Glu Ser  
20

<210> 80

<211> 20

<212> PRT

5 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 80

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

Val Glu Leu Arg  
20

<210> 81

<211> 20

10 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 81

Gln Ala Ile Arg Glu Thr Val Glu Leu Arg Gln Tyr Asp Pro Val Ala  
1 5 10 15

Ala Leu Phe Phe  
20

<210> 82

15 <211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 82

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

20 Glu Pro Asp Val 20

<210> 83

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

25 <400> 83

ES 2 523 972 T3

Trp Gln Pro Ala Ala Gln Pro Lys Arg Arg Arg His Arg Gln Asp Ala  
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro  
 20

<210> 84

<211> 20

<212> PRT

5 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 84

Tyr Arg His Thr Trp Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp  
 1 5 10 15

Asp Asp Val Trp  
 20

<210> 85

<211> 20

10 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 85

Thr Ser Ala Gly Arg Lys Arg Lys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala Cys

1 5 10 15

Thr Ser Gly Val  
 20

15

<210> 86

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

20 <400> 86

His Arg Gln Asp Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile Ala Ser Thr Pro Lys  
 1 5 10 15

Lys His Arg Gly  
 20

<210> 87

<211> 20

<212> PRT

25 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 87

ES 2 523 972 T3

Tyr Tyr Thr Ser Ala Phe Val Phe Pro Thr Lys Asp Val Ala Leu Arg  
 1 5 10 15

His Val Val Cys  
 20

<210> 88

<211> 20

<212> PRT

5 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 88

Val Thr Thr Glu Arg Lys Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met  
 1 5 10 15

Ala Gly Ala Ser  
 20

<210> 89

<211> 20

10 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 89

Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val Leu Cys  
 1 5 10 15

Pro Lys Asn Met  
 20

<210> 90

15 <211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 90

Ser Ile Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr Ala Leu  
 1 5 10 15

Pro Leu Lys Met  
 20

20 <210> 91

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 91

ES 2 523 972 T3

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

Asn Val His His  
20

<210> 92

<211> 20

<212> PRT

5 <213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 92

Gln Gln Asn Gln Trp Lys Glu Pro Asp Val Tyr Tyr Thr Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Val Phe Pro Thr  
20

<210> 93

<211> 20

10 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 93

Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp Asp Val Trp Thr Ser Gly Ser Asp Ser  
1 5 10 15

Asp Glu Glu Leu  
20

<210> 94

15 <211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 94

Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala Ser Thr Ser Ala Gly Arg Lys  
1 5 10 15

Arg Lys Ser Ala  
20

20 <210> 95

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano

<400> 95

ES 2 523 972 T3

Lys Asp Val Ala Leu Arg His Val Val Cys Ala His Glu Leu Val Cys  
1 5 10 15

Ser Met Glu Asn  
20

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

5 <213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano

<400> 96

Ser Leu Leu Ser Glu Phe Cys Arg Val  
1 5

<210> 97

<211> 9

10 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano

<400> 97

Val Leu Ala Glu Leu Val Lys Gln Ile  
1 5

<210> 98

15 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano

<400> 98

Ile Leu Gly Ala Asp Pro Leu Arg Val  
1 5

20 <210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano

<400> 99

Thr Met Tyr Gly Gly Ile Ser Leu Leu  
1 5

25 <210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano

30 <400> 100

Leu Leu Ser Glu Phe Cys Arg Val Leu  
1 5

<210> 101  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano  
 5 <400> 101  
 Val Leu Glu Glu Thr Ser Val Met Leu  
 1 5  
 <210> 102  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 10 <213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano  
 <400> 102  
 Cys Leu Gln Asn Ala Leu Asp Ile Leu  
 1 5  
 <210> 103  
 <211> 9  
 15 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano  
 <400> 103  
 Ile Leu Asp Glu Glu Arg Asp Lys Val  
 1 5  
 <210> 104  
 20 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano  
 <400> 104  
 Ile Lys Glu His Met Leu Lys Lys Tyr  
 1 5  
 25 <210> 105  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano  
 <400> 105  
 30 Asp Glu Glu Glu Ala Ile Val Ala Tyr  
 1 5  
 <210> 106  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano

<400> 106

Lys Leu Gly Gly Ala Leu Gln Ala Lys  
1 5

<210> 107

<211> 9

5 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano

<400> 107

Gln Tyr Ile Leu Gly Ala Asp Pro Leu  
1 5

10 <210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano

<400> 108

15 Lys Tyr Thr Gln Thr Glu Glu Lys Phe  
1 5

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano

20 <400> 109

Lys Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu  
1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

25 <213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano

<400> 110

Val Met Lys Arg Arg Ile Glu Glu Ile  
1 5

<210> 111

<211> 9

30 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano

<400> 111

Arg His Arg Ile Lys Glu His Met Leu  
1 5

<210> 112  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano  
 5 <400> 112  
 Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met  
 1 5  
 <210> 113  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 10 <213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano  
 <400> 113  
 Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val  
 1 5  
 <210> 114  
 <211> 9  
 15 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano  
 <400> 114  
 Glu Leu Lys Arg Lys Met Met Tyr Met  
 1 5  
 <210> 115  
 20 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano  
 <400> 115  
 Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr  
 1 5  
 25 <210> 116  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano  
 <400> 116  
 Ala Tyr Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ile Leu  
 30 1 5 10  
 <210> 117  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano



ES 2 523 972 T3

<400> 117

Cys Ser Pro Asp Glu Ile Met Ala Tyr Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ile  
1 5 10 15

Leu Asp Glu Glu  
20

<210> 118

<211> 20

5

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano

<400> 118

Ser Glu Pro Val Ser Glu Ile Glu Glu Val Ala Pro Glu Glu Glu Glu  
1 5 10 15

Asp Gly Ala Glu  
20

<210> 119

10

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano

<400> 119

Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu Thr Ser Val Met Leu Ala Lys  
1 5 10 15

Arg Pro Leu Ile  
20

15

<210> 120

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano

<400> 120

Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn Ile Glu Phe Phe Thr  
1 5 10 15

Lys Asn Ser Ala  
20

20

<210> 121

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE1 de citomegalovirus humano

25

<400> 121

ES 2 523 972 T3

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

Gly Cys Ser Gln  
 20

- <210> 122

<211> 9

<212> PRT

5 <213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano

<400> 122

Gly Gln Thr Glu Pro Ile Ala Phe Val  
 1 5

<210> 123

<211> 9

10 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano

<400> 123

Ala Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe  
 1 5

<210> 124

15 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano

<400> 124

Ser Tyr Glu Asn Lys Thr Met Gln Leu  
 1 5

20 <210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano

<400> 125

Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr Tyr Leu Leu  
 1 5

25 <210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano

30 <400> 126

Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu  
 1 5

<210> 127  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano  
 5 <400> 127  
 Ala Thr Ser Thr Gly Asp Val Val Tyr  
 1 5  
 <210> 128  
 <211> 9  
 10 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano  
 <400> 128  
 Leu Asp Glu Gly Ile Met Val Val Tyr  
 1 5  
 <210> 129  
 15 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano  
 <400> 129  
 Val Lys Glu Ser Pro Gly Arg Cys Tyr  
 1 5  
 20 <210> 130  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano  
 <400> 130  
 Arg Pro Ser Thr Pro Arg Ala Ala Val  
 25 1 5  
 <210> 131  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano  
 30 <400> 131  
 Ser Pro Trp Ala Pro Thr Ala Pro Leu  
 1 5  
 <210> 132  
 <211> 9  
 <212> PRT

ES 2 523 972 T3

<213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano

<400> 132

Lys Ala Arg Asp His Leu Ala Val Leu  
1 5

<210> 133

5 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano

<400> 133

Trp Pro Arg Glu Arg Ala Trp Ala Leu  
1 5

10 <210> 134

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano

<400> 134

Asn Val Arg Arg Ser Trp Glu Glu Leu  
1 5

15 <210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano

20 <400> 135

Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser Tyr Lys  
1 5

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

25 <213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano

<400> 136

Lys Met Thr Ala Thr Phe Leu Ser Lys  
1 5

<210> 137

<211> 9

30 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano

<400> 137

Cys Tyr Ser Arg Pro Val Val Ile Phe  
1 5

- <210> 138  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano
- 5 <400> 138  
 Arg Ile Glu Glu Asn Leu Glu Gly Val  
 1 5  
 <210> 139  
 <211> 9  
 <212> PRT
- 10 <213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano  
 <400> 139  
 Pro Leu Ile Pro Thr Thr Ala Val Ile  
 1 5  
 <210> 140  
 <211> 9
- 15 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano  
 <400> 140  
 Leu Ile Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Val  
 1 5  
 <210> 141
- 20 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano  
 <400> 141  
 Lys Met Ser Val Arg Glu Thr Leu Val  
 1 5
- 25 <210> 142  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano  
 <400> 142
- 30 Phe Leu Gly Ala Arg Ser Pro Ser Leu  
 1 5  
 <210> 143  
 <211> 9  
 <212> PRT

ES 2 523 972 T3

<213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano

<400> 143

Ala Leu Val Asn Ala Val Asn Lys Leu  
1 5

<210> 144

5 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano

<400> 144

Ala Leu Val Asn Phe Leu Arg His Leu  
1 5

10 <210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano

<400> 145

Asn Ile Leu Gln Lys Ile Glu Lys Ile  
1 5

15 <210> 146

<211> 12

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano

20 <400> 146

Glu Arg Ala Trp Ala Leu Lys Asn Pro His Leu Ala  
1 5 10

<210> 147

<211> 20

<212> PRT

25 <213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano

<400> 147

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

Asn Pro Phe Arg  
20

<210> 148

<211> 20

30 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano

<400> 148

ES 2 523 972 T3

Ser Thr Ser Gln Lys Pro Val Leu Gly Lys Arg Val Ala Thr Pro His

1 5 10 15

Ala Ser Ala Arg  
20

<210> 149

5 <211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano

<400> 149

His Ala Asn Thr Ala Leu Val Asn Ala Val Asn Lys Leu Val Tyr Thr  
1 5 10 15

Gly Arg Leu Ile  
20

10 <210> 150

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp28 de citomegalovirus humano

<400> 150

Leu Leu Ile Asp Pro Thr Ser Gly Leu  
1 5

15 <210> 151

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp28 de citomegalovirus humano

20 <400> 151

Leu Leu Val Glu Pro Cys Ala Arg Val  
1 5

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

25 <213> péptido de epítipo de CTL de pp28 de citomegalovirus humano

<400> 152

Leu Leu Leu Ile Val Thr Pro Val Val  
1 5

<210> 153

<211> 9

30 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp28 de citomegalovirus humano

<400> 153

Phe Leu Leu Ser His Asp Ala Ala Leu  
1 5

<210> 154

5 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp28 de citomegalovirus humano

<400> 154

Pro Leu Arg Glu Tyr Leu Ala Asp Leu  
1 5

10 <210> 155

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp28 de citomegalovirus humano

<400> 155

Gly Leu Leu Gly Ala Ser Met Asp Leu  
1 5

15 <210> 156

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp28 de citomegalovirus humano

20 <400> 156

Leu Val Glu-Pro Cys Ala Arg Val Tyr  
1 5

<210> 157

<211> 9

<212> PRT

25 <213> péptido de epítipo de CTL de pp28 de citomegalovirus humano

<400> 157

Gly Ile Lys His Glu Gly Leu Val Lys  
1 5

<210> 158

<211> 9

30 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp28 de citomegalovirus humano

<400> 158

Glu Leu Leu Ala Gly Gly Arg Val Phe  
1 5



<210> 159  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp28 de citomegalovirus humano  
 5 <400> 159  
 Arg Leu Leu Asp Leu Ala Pro Asn Tyr  
 1 5  
 <210> 160  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 10 <213> péptido de epítipo de CTL de pp28 de citomegalovirus humano  
 <400> 160  
 Glu Leu Leu Gly Arg Leu Asn Val Tyr  
 1 5  
 <210> 161  
 <211> 9  
 15 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp28 de citomegalovirus humano  
 <400> 161  
 Cys Arg Tyr Lys Tyr Leu Arg Lys Lys  
 1 5  
 <210> 162  
 20 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp28 de citomegalovirus humano  
 <400> 162  
 Ala Arg Val Tyr Glu Ile Lys Cys Arg  
 1 5  
 25 <210> 163  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp50 de citomegalovirus humano  
 <400> 163  
 Leu Leu Asn Cys Ala Val Thr Lys Leu  
 30 1 5  
 <210> 164  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp50 de citomegalovirus humano

<400> 164  
 Gln Leu Arg Ser Val Ile Arg Ala Leu  
 1 5

<210> 165

<211> 9

5 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp50 de citomegalovirus humano

<400> 165  
 Val Thr Glu His Asp Thr Leu Leu Tyr  
 1 5

<210> 166

10 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp50 de citomegalovirus humano

<400> 166  
 Arg Gly Asp Pro Phe Asp Lys Asn Tyr  
 1 5

15 <210> 167

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp50 de citomegalovirus humano

<400> 167  
 Gly Leu Asp Arg Asn Ser Gly Asn Tyr  
 1 5

20 <210> 168

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp50 de citomegalovirus humano

25 <400> 168  
 Thr Leu Leu Asn Cys Ala Val Thr Lys  
 1 5

<210> 169

<211> 9

<212> PRT

30 <213> péptido de epítipo de CTL de pp50 de citomegalovirus humano

<400> 169  
 Thr Val Arg Ser His Cys Val Ser Lys  
 1 5

<210> 170

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp50 de citomegalovirus humano  
 <400> 170  
 Tyr Glu Gln His Lys Ile Thr Ser Tyr.  
 5 1 5  
 <210> 171  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp50 de citomegalovirus humano  
 10 <400> 171  
 Thr Arg Val Lys Arg Asn Val Lys Lys  
 1 5  
 <210> 172  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 15 <213> péptido de epítipo de CTL de pp50 de citomegalovirus humano  
 <400> 172  
 Ser Glu Asp Ser Val Thr Phe Glu Phe  
 1 5  
 <210> 173  
 <211> 9  
 20 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp50 de citomegalovirus humano  
 <400> 173  
 Thr Arg Leu Ser Glu Pro Pro Thr Leu  
 1 5  
 <210> 174  
 25 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp71 de citomegalovirus humano  
 <400> 174  
 Gln Leu Leu Ile Pro Lys Ser Phe Thr Leu  
 1 5 10  
 30 <210> 175  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de pp71 de citomegalovirus humano  
 <400> 175

Thr Leu Val Ile Pro Ser Trp His Val  
1 5

<210> 176

<211> 9

<212> PRT

5 <213> péptido de epítipo de CTL de pp71 de citomegalovirus humano

<400> 176

Leu Leu Ile Pro Lys Ser Phe Thr Leu  
1 5

<210> 177

<211> 9

10 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp71 de citomegalovirus humano

<400> 177

Asp Leu Val Pro Leu Thr Val Ser Val  
1 5

<210> 178

15 <211> 10

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp71 de citomegalovirus humano

<400> 178

Cys Ser Asp Pro Asn Thr Tyr Ile His Lys  
1 5 10

20 <210> 179

<211> 10

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp71 de citomegalovirus humano

<400> 179

Glu Tyr Ile Val Gln Ile Gln Asn Ala Phe  
1 5 10

25 <210> 180

<211> 10

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de pp71 de citomegalovirus humano

30 <400> 180

Ala Glu Val Val Ala Arg His Asn Pro Tyr  
1 5 10

<210> 181

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano

<400> 181

Arg Ile Trp Cys Leu Val Val Cys Val  
1 5

<210> 182

5 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano

<400> 182

Gln Met Leu Leu Ala Leu Ala Arg Leu  
1 5

10 <210> 183

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano

<400> 183

15 Gly Leu Asp Asp Leu Met Ser Gly Leu  
1 5

<210> 184

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano

20 <400> 184

Ile Ile Leu Val Ala Ile Ala Val Val  
1 5

<210> 185

<211> 9

<212> PRT

25 <213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano

<400> 185

Asp Leu Asp Glu Gly Ile Met Val Val  
1 5

<210> 186

<211> 9

30 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano

<400> 186

Asn Leu Phe Pro Tyr Leu Val Ser Ala  
1 5

<210> 187  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano  
 5 <400> 187  
 Ala Val Gly Gly Ala Val Ala Ser Val  
 1 5  
 <210> 188  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 10 <213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano  
 <400> 188  
 Tyr Ile Asn Arg Ala Leu Ala Gln Ile  
 1 5  
 <210> 189  
 <211> 9  
 15 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano  
 <400> 189  
 Tyr Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr Tyr Leu  
 1 5  
 <210> 190  
 20 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano  
 <400> 190  
 Val Phe Glu Thr Ser Gly Gly Leu Val Val  
 1 5 10  
 25 <210> 191  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano  
 <400> 191  
 Asp Asp Tyr Ser Asn Thr His Ser Thr Arg Tyr Val  
 30 1 5 10  
 <210> 192  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano

ES 2 523 972 T3

<400> 192

Arg Ser Tyr Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Thr  
1 5 10 15

Glu Tyr Val Ala  
20

<210> 193

<211> 20

5 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano

<400> 193

Thr Tyr Glu Lys Tyr Gly Asn Val Ser Val Phe Glu Thr Ser Gly Gly

1 5 10 15

Leu Val Val Phe  
20

10

<210> 194

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano

15 <400> 194

Phe Glu Thr Ser Gly Gly Leu Val Val Phe Trp Gln Gly Ile Lys Gln  
1 5 10 15

Lys Ser Leu Val  
20

<210> 195

<211> 20

<212> PRT

20 <213> péptido de epítipo de CTL de gB de citomegalovirus humano

<400> 195

Met Gln Leu Ile Pro Asp Asp Tyr Ser Asn Thr His Ser Thr Arg Tyr  
1 5 10 15

Val Thr Val Lys  
20

<210> 196

<211> 9

25 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 196  
 Tyr Leu Met Asp Glu Leu Arg Tyr Val  
 1 5

<210> 197

<211> 9

5 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 197

Tyr Leu Thr Val Phe Thr Val Tyr Leu  
 1 5

<210> 198

10 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 198

Thr Leu Thr Glu Asp Phe Phe Val Val  
 1 5

15 <210> 199

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 199

20 Leu Leu Met Met Ser Val Tyr Ala Leu  
 1 5

<210> 200

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

25 <400> 200

Tyr Leu Leu Tyr Arg Met Leu Lys Thr  
 1 5

<210> 201

<211> 9

<212> PRT

30 <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 201

Ile Leu Phe Asp Gly His Asp Leu Leu  
 1 5

<210> 202

<211> 9



<212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano  
 <400> 202 -  
 Leu Ile Phe Gly His Leu Pro Arg Val  
 1 5  
 5 <210> 203  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano  
 <400> 203  
 Ser Leu Val Arg Leu Val Tyr Ile Leu  
 1 5  
 10 <210> 204  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano  
 15 <400> 204  
 Leu Leu Tyr Pro Thr Ala Val Asp Leu  
 1 5  
 <210> 205  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 20 <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano  
 <400> 205  
 Ala Leu Asp Pro Tyr Asn Glu Val Val  
 1 5  
 <210> 206  
 <211> 9  
 25 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano  
 <400> 206  
 Leu Met Leu Leu Lys Asn Gly Thr Val  
 1 5  
 <210> 207  
 30 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano  
 <400> 207

Ser Ala Ile Ile Gly Ile Tyr Leu Leu  
1 5

<210> 208

<211> 9

<212> PRT

5 <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 208

Ile Thr Ser Leu Val Arg Leu Val Tyr  
1 5

<210> 209

<211> 9

10 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 209

His His Glu Tyr Leu Ser Asp Leu Tyr  
1 5

<210> 210

15 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 210

Ala Ile Ile Gly Ile Tyr Leu Leu Tyr

20

1 5

<210> 211

<211> 9

<212> PRT

25 <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 211

Gln Thr Glu Lys His Glu Leu Leu Val  
1 5

<210> 212

<211> 9

30 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 212

Ala Thr Asp Ser Arg Leu Leu Met Met  
1 5

- <210> 213
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano
- 5 <400> 213
- Phe Leu Asp Ala Ala Leu Asp Phe Asn Tyr  
1                    5                    10
- <210> 214
- <211> 10
- <212> PRT
- 10 <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano
- <400> 214
- Asp Thr Gln Gly Val Ile Asn Ile Met Tyr  
1                    5                    10
- <210> 215
- <211> 10
- 15 <212> PRT
- <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano
- <400> 215
- Leu Arg Glu Asn Thr Thr Gln Cys Thr Tyr  
1                    5                    10
- <210> 216
- 20 <211> 10
- <212> PRT
- <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano
- <400> 216
- Ser Ala Ile Ile Gly Ile Tyr Leu Leu Tyr  
1                    5                    10
- 25 <210> 217
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano
- <400> 217
- Ser Leu Arg Asn Ser Thr Val Val Arg  
1                    5                    10
- 30 <210> 218
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 218  
 Ala Leu Ala Leu Phe Ala Ala Ala Arg  
 1 5

<210> 219

<211> 9

5 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 219

Gln Leu Asn Arg His Ser Tyr Leu Lys  
 1 5

<210> 220

10 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 220

Arg Leu Phe Pro Asp Ala Thr Val Pro  
 1 5

15 <210> 221

<211> 10

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 221

Arg Leu Asn Thr Tyr Ala Leu Val Ser Lys  
 1 5 10

20 <210> 222

<211> 10

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

25 <400> 222

Leu Val Arg Leu Val Tyr Ile Leu Ser Lys  
 1 5 10

<210> 223

<211> 10

<212> PRT

30 <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 223

Tyr Leu Met Asp Glu Leu Arg Tyr Val Lys  
 1 5 10

<210> 224

<211> 10

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 224

Glu Leu Tyr Leu Met Gly Ser Leu Val His  
1 5 10

5

<210> 225

<211> 10

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

10

<400> 225

Ala Leu Thr Val Ser Glu His Val Ser Tyr  
1 5 10

<210> 226

<211> 9

<212> PRT

15

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 226

Asn Tyr Leu Asp Leu Ser Ala Leu Leu  
1 5

<210> 227

<211> 9

20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 227

Ser Tyr Val Val Thr Asn Gln Tyr Leu  
1 5

<210> 228

25

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 228

Ser Tyr Leu Lys Asp Ser Asp Phe Leu  
1 5

30

<210> 229

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 229

Thr Tyr Ala Leu Val Ser Lys Asp Leu  
1 5

<210> 230

<211> 9

5

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 230

Ser Tyr Arg Ser Phe Ser Gln Gln Leu  
1 5

<210> 231

10

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 231

Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Arg Phe Leu  
1 5

15

<210> 232

<211> 10

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 232

20

Tyr Tyr Val Phe His Met Pro Arg Cys Leu  
1 5 10

<210> 233

<211> 10

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

25

<400> 233

Met Tyr Met His Asp Ser Asp Asp Val Leu  
1 5 10

<210> 234

<211> 9.

<212> PRT

30

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 234

Glu Thr Phe Pro Asp Leu Phe Cys Leu  
1 5

<210> 235

<211> 9  
<212> PRT  
<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano  
<400> 235  
Asp Leu Thr Glu Thr Leu Glu Arg Tyr  
5 1 5  
<210> 236  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano  
10 <400> 236  
Ser Pro Arg Thr His Tyr Leu Met Leu  
1 5  
<210> 237  
<211> 9  
<212> PRT  
15 <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano  
<400> 237  
Phe Pro Asp Leu Phe Cys Leu Pro Leu  
1 5  
<210> 238  
<211> 10  
20 <212> PRT  
<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano  
<400> 238  
Ser Pro Arg Thr His Tyr Leu Met Leu Leu  
1 5 10  
<210> 239  
25 <211> 10  
<212> PRT  
<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano  
<400> 239  
Met Pro Arg Cys Leu Phe Ala Gly Pro Leu  
1 5 10  
30 <210> 240  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano  
<400> 240

Thr Pro Met Leu Leu Ile Phe Gly His Leu  
1 5 10

<210> 241

<211> 10

<212> PRT

5 <213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 241

Ala Pro Tyr Gln Arg Asp Asn Phe Ile Leu  
1 5 10

<210> 242

<211> 9

10 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 242

Gly Arg Cys Gln Met Leu Asp Arg Arg  
1 5

<210> 243

15 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 243

Arg Arg Asp His Ser Leu Glu Arg Leu  
1 5

20 <210> 244

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 244

Ser Glu Ala Leu Asp Pro His Ala Phe  
1 5

25

<210> 245

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

30 <400> 245

Arg Glu Asn Thr Thr Gln Cys Thr Tyr  
1 5

<210> 246



<211> 10

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 246

Asp Asp Val Leu Phe Ala Leu Asp Pro Tyr  
 1 5 10

5

<210> 247

<211> 12

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

10

<400> 247

His Glu Leu Leu Val Leu Val Lys Lys Ala Gln Leu  
 1 5 10

<210> 248

<211> 12

<212> PRT

15

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 248

Leu Thr Val Ser Glu His Val Ser Tyr Val Val Thr  
 1 5 10

<210> 249

<211> 20

20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 249

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

Leu Asn Arg His  
 20

<210> 250

25

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de gH de citomegalovirus humano

<400> 250

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

Leu Ile Lys Gly  
 20

<210> 251  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano  
 5 <400> 251  
 Phe Leu Met Glu His Thr Met Pro Val  
 1 5  
 <210> 252  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 10 <213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano  
 <400> 252  
 Leu Met Gln Lys Phe Pro Lys Gln Val  
 1 5  
 <210> 253  
 <211> 9  
 15 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano  
 <400> 253  
 Asn Leu Ala Leu Ser Thr Pro Phe Leu  
 1 5  
 <210> 254  
 20 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano  
 <400> 254  
 Ile Ile Tyr Thr Arg Asn His Glu Val  
 1 5  
 25 <210> 255  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano  
 <400> 255  
 30 Ile Ile Tyr Thr Arg Asn His Glu Val Lys  
 1 5 10  
 <210> 256  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 256  
 Leu Leu Gly Ala Leu Asn Leu Cys Leu  
 1 5

<210> 257

<211> 10

5 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 257  
 Lys Pro Glu Pro Asp Phe Thr Ile Gln Tyr  
 1 5 10

<210> 258

10 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 258  
 Ile Met Lys Asp Lys Asn Thr Pro Phe  
 1 5

15 <210> 259

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 259  
 Pro Arg Lys Lys Lys Ser Lys Arg Ile  
 1 5

20 <210> 260

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

25 <400> 260  
 Phe Glu Gln Pro Thr Glu Thr Pro Pro  
 1 5

<210> 261

<211> 8

<212> PRT

30 <213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 261  
 Phe Glu Gln Pro Thr Glu Thr Pro  
 1 5

<210> 262

<211> 10

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 262

Phe Glu Gln Pro Thr Glu Thr Pro Pro Glu  
1 5 10

5 <210> 263

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 263

Glu Gln Pro Thr Glu Thr Pro Pro Glu  
1 5

10

<210> 264

<211> 11

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

15 <400> 264

Gln Phe Glu Gln Pro Thr Glu Thr Pro Pro Glu  
1 5 10

<210> 265

<211> 9

<212> PRT

20 <213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 265

Ser Asp Tyr Asn Met Ile Ile His Ala  
1 5

<210> 266

<211> 10

25 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 266

Tyr Arg Asn Met Ile Ile His Ala Ala Thr  
1 5 10

<210> 267

30 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 267

ES 2 523 972 T3

Cys Leu Pro Leu Met Gln Lys Phe Pro  
1 5

<210> 268

<211> 14

<212> PRT

5 <213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 268

Ile Asp Glu Val Ser Arg Met Phe Arg Asn Thr Asn Arg Ser  
1 5 10

<210> 269

<211> 20

10 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 269

Thr Ala Ala Lys Ala Tyr Ala Val Gly Gln Phe Glu Gln Pro Thr Glu  
1 5 10 15

Thr Pro Pro Glu

15 20

<210> 270

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

20 <400> 270

Phe Glu Gln Pro Thr Glu Thr Pro Pro Glu Asp Leu Asp Thr Leu Ser  
1 5 10 15

Leu Ala Ile Glu  
20

<210> 271

<211> 20

<212> PRT

25 <213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 271

Met Leu Pro Leu Ile Lys Gln Glu Asp Ile Lys Pro Glu Pro Asp Phe  
1 5 10 15

Thr Ile Gln Tyr  
20

<210> 272

<211> 20

30 <212> PRT

ES 2 523 972 T3

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 272

Thr His Gln Leu Cys Pro Arg Ser Ser Asp Tyr Arg Asn Met Ile Ile  
1 5 10 15

His Ala Ala Thr  
20

5

<210> 273

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

10

<400> 273

Tyr Arg Asn Met Ile Ile His Ala Ala Thr Pro Val Asp Leu Leu Gly  
1 5 10 15

Ala Leu Asn Leu  
20

<210> 274

<211> 20

<212> PRT

15

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 274

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

Glu Lys Val Arg  
20

<210> 275

<211> 20

20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 275

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

Lys Phe Pro Lys  
20

<210> 276

25

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

ES 2 523 972 T3

<400> 276

Ile Gln Ile Ile Tyr Thr Arg Asn His Glu Val Lys Ser Glu Val Asp  
1 5 10 15

Ala Val Arg Cys  
20

<210> 277

<211> 20

5

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 277

Val Lys Ser Glu Val Asp Ala Val Arg Cys Arg Leu Gly Thr Met Cys  
1 5 10 15

Asn Leu Ala Leu  
20

<210> 278

10

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 278

Arg Val Lys Ile Asp Glu Val Ser Arg Met Phe Arg Asn Thr Asn Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Glu Tyr  
20

15

<210> 279

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 279

Ser Ser Ser Ser Ser Cys Ser Ser Ala Ser Asp Ser Glu Ser Glu  
1 5 10 15

20

Ser Glu Glu Met  
20

<210> 280

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

25

<400> 280

ES 2 523 972 T3

Ala Ser Ser Pro Ser Thr Gly Ser Gly Thr Pro Arg Asx Thr Ser Pro  
1 5 10 15

Thr His Pro Leu  
20

<210> 281

<211> 20

<212> PRT

5 <213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 281

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

Pro Leu Pro Asp  
20

<210> 282

<211> 20

10 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 282

Pro Leu Gly Arg Pro Asp Glu Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
1 5 10 15

Cys Ser Ser Ala  
20

<210> 283

15 <211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 283

Ser Asp Ser Glu Ser Glu Ser Glu Glu Met Lys Cys Ser Ser Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Ala Ser Val  
20

20 <210> 284

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 284



ES 2 523 972 T3

Lys Cys Ser Ser Gly Gly Gly Ala Ser Val Thr Ser Ser His His Gly  
1 5 10 15

Arg Gly Gly Phe  
20

<210> 285

<211> 20

<212> PRT

5 <213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 285

Cys Thr Pro Asn Val Gln Thr Arg Arg Gly Arg Val Lys Ile Asp Glu  
1 5 10 15

Val Ser Arg Met  
20

<210> 286

<211> 20

10 <212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 286

Phe Arg Asn Thr Asn Arg Ser Leu Glu Tyr Lys Asn Leu Pro Phe Thr  
1 5 10 15

Ile Pro Ser Met

15 20

<210> 287

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

20 <400> 287

His Gln Val Leu Asp Glu Ala Ile Lys Ala Cys Lys Thr Met Gln Val  
1 5 10 15

Asn Asn Lys Gly  
20

<210> 288

<211> 20

<212> PRT

25 <213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 288

ES 2 523 972 T3

Cys Lys Thr Met Gln Val Asn Asn Lys Gly Ile Gln Ile Ile Tyr Thr  
 1 5 10 15

Arg Asn His Glu  
 20

<210> 289

<211> 20

<212> PRT

5 <213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 289

Lys Ala Ala Trp Ser Leu Lys Glu Leu His Thr His Gln Leu Cys Pro  
 1 5 10 15

Arg Ser Ser Asp  
 20

10 <210> 290

<211> 20

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de IE2 de citomegalovirus humano

<400> 290

Cys Leu Pro Leu Met Gln Lys Phe Pro Lys Gln Val Met Val Arg Ile  
 1 5 10 15

Phe Ser Thr Asn  
 20

15 <210> 291

<211> 10

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de UL18 de citomegalovirus humano

20 <400> 291

Gly Glu Ile Asn Ile Thr Phe Ile His Tyr  
 1 5 10

<210> 292

<211> 10

<212> PRT

25 <213> péptido de epítipo de CTL de UL18 de citomegalovirus humano.

<400> 292

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

<210> 293

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de UL18 de citomegalovirus humano  
 <400> 293  
 Thr Met Trp Cys Leu Thr Leu Phe Val  
 5 1 5  
 <210> 294  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de US2 de citomegalovirus humano  
 10 <400> 294  
 Leu Leu Val Leu Phe Ile Val Tyr Val  
 1 5  
 <210> 295  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 15 <213> péptido de epítipo de CTL de US2 de citomegalovirus humano  
 <400> 295  
 Ser Met Met Trp Met Arg Phe Phe Val  
 1 5  
 <210> 296  
 <211> 10  
 20 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de US2 de citomegalovirus humano  
 <400> 296  
 Thr Leu Leu Val Leu Phe Ile Val Tyr Val  
 1 5 10  
 <210> 297  
 25 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de US2 de citomegalovirus humano  
 <400> 297  
 Val Tyr Val Thr Val Asp Cys Asn Leu  
 1 5  
 30 <210> 298  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de US3 de citomegalovirus humano  
 <400> 298

Tyr Leu Phe Ser Leu Val Val Leu Val  
 1 5  
 <210> 299  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 5 <213> péptido de epítipo de CTL de US3 de citomegalovirus humano  
 <400> 299  
 Thr Leu Leu Val Tyr Leu Phe Ser Leu  
 1 5  
 <210> 300  
 <211> 10  
 10 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de US3 de citomegalovirus humano  
 <400> 300  
 Leu Leu Phe Arg Thr Leu Leu Val Tyr Leu  
 1 5 10  
 <210> 301  
 15 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de US3 de citomegalovirus humano  
 <400> 301  
 Val Tyr Leu Phe Ser Leu Val Val Leu  
 1 5  
 20 <210> 302  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de US11 de citomegalovirus humano  
 <400> 302  
 Tyr Tyr Val Glu Cys Glu Pro Arg Cys  
 1 5  
 25 <210> 303  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> péptido de epítipo de CTL de US6 de citomegalovirus humano  
 <400> 303  
 30 Leu Tyr Leu Cys Cys Gly Ile Thr Leu  
 1 5  
 <210> 304  
 <211> 10  
 <212> PRT

ES 2 523 972 T3

<213> péptido de epítipo de CTL de US11 de citomegalovirus humano

<400> 304

Thr Leu Phe Asp Glu Pro Pro Pro Leu Val  
1 5 10

<210> 305

5 <211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de US11 de citomegalovirus humano

<400> 305

Thr Pro Arg Val Tyr Tyr Gln Thr Leu  
1 5

10 <210> 306

<211> 10

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de US11 de citomegalovirus humano

<400> 306

Ala Pro Val Ala Gly Ser Met Pro Glu Leu  
1 5 10

15 <210> 307

<211> 9

<212> PRT

<213> péptido de epítipo de CTL de US11 de citomegalovirus humano

20 <400> 307

Ser Glu Ser Leu Val Ala Lys Arg Tyr  
1 5

<210> 308

<211> 9

<212> PRT

25 <213> péptido de epítipo de CTL de UL18 de citomegalovirus humano

<400> 308

Leu Glu Leu Glu Ile Ala Leu Gly Tyr  
1 5

<210> 309

<211> 241

30 <212> PRT

<213> péptido de poliepítipo sintético

<400> 309

ES 2 523 972 T3

Val Thr Glu His Asp Thr Leu Leu Tyr Asn Leu Val Pro Met Val Ala  
 1 5 10 15

Thr Val Val Leu Glu Glu Thr Ser Val Met Leu Arg Ile Phe Ala Glu  
 20 25 30

Leu Glu Gly Val Ile Ile Tyr Thr Arg Asn His Glu Val Ile Met Arg  
 35 40 45

Glu Phe Asn Ser Tyr Lys Ala Tyr Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ile Leu  
 50 55 60

Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Tyr Val Lys Tyr Val Tyr Glu  
 65 70 75 80

Ser Phe Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Asn Val Arg Arg Ser  
 85 90 95

Trp Glu Glu Leu Lys Ala Arg Asp His Leu Ala Val Leu Gln Ala Arg  
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Gly Leu Lys Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Gln  
 115 120 125

Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val Glu Leu Lys Arg Lys Met Met Tyr  
 130 135 140

Met Arg Arg Arg His Arg Gln Asp Ala Leu Ala Arg Val Tyr Glu Ile  
 145 150 155 160

Lys Cys Arg Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr Phe  
 165 170 175

Glu Gln Pro Thr Glu Thr Pro Pro Tyr Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr Tyr  
 180 185 190

Leu Gln Glu Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Tyr Glu Gln His  
 195 200 205

Lys Ile Thr Ser Tyr Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr Ser Glu  
 210 215 220

His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr Gln Ala Ile Arg Glu Thr Val Glu  
 225 230 235 240

Leu

<210> 310

<211> 241

5 <212> PRT

ES 2 523 972 T3

<213> péptido de polieptótopo sintético

<400> 310

Asn Val Arg Arg Ser Trp Glu Glu Leu Val Thr Glu His Asp Thr Leu  
1 5 10 15

Leu Tyr Ala Tyr Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ile Leu Asn Leu Val Pro  
20 25 30

Met Val Ala Thr Val Val Leu Glu Glu Thr Ser Val Met Leu Gln Glu  
35 40 45

Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr Ser Glu His Pro Thr Phe Thr Ser Gln  
50 55 60

Tyr Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val Glu Leu Lys Arg Lys Met  
65 70 75 80

Met Tyr Met Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Ile Ile Tyr Thr  
85 90 95

Arg Asn His Glu Val Tyr Glu Gln His Lys Ile Thr Ser Tyr Gln Ala  
100 105 110

Ile Arg Glu Thr Val Glu Leu Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser Tyr Lys  
115 120 125

Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr Gln Tyr Asp Pro  
130 135 140

Val Ala Ala Leu Phe Lys Ala Arg Asp His Leu Ala Val Leu Tyr Val  
145 150 155 160

Lys Tyr Val Tyr Glu Ser Phe Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu  
165 170 175

Phe Glu Gln Pro Thr Glu Thr Pro Pro Tyr Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr  
180 185 190

Tyr Leu Gln Ala Arg Leu Thr Val Ser Gly Leu Lys Ala Arg Ala Lys  
195 200 205

Lys Asp Glu Leu Arg Arg Arg His Arg Gln Asp Ala Leu Ala Arg Val  
210 215 220

Tyr Glu Ile Lys Cys Arg Gln Glu Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile  
225 230 235 240

5 Tyr

<210> 311

<211> 250

ES 2 523 972 T3

<212> PRT

<213> péptido de poliepitopo sintético

<400> 311

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

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

Ser Val Met Leu Lys Ala Arg Asp His Leu Ala Val Leu Ala Tyr Ala  
35 40 45

Gln Lys Ile Phe Lys Ile Leu Val Thr Glu His Asp Thr Leu Leu Tyr  
50 55 60

Tyr Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr Tyr Leu Gln Glu Phe Phe Trp Asp Ala  
65 70 75 80

Asn Asp Ile Tyr Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr Arg Ile Phe  
85 90 95

Ala Glu Leu Glu Gly Val Ile Ile Tyr Thr Arg Asn His Glu Val Ile  
100 105 110

Met Arg Glu Phe Asn Ser Tyr Lys Ser Glu His Pro Thr Phe Thr Ser  
115 120 125

Gln Tyr Gln Ala Arg Leu Thr Val Ser Gly Leu Gln Tyr Asp Pro Val  
130 135 140

Ala Ala Leu Phe Tyr Glu Gln His Lys Ile Thr Ser Tyr Gln Ala Ile  
145 150 155 160

Arg Glu Thr Val Glu Leu Tyr Val Lys Tyr Val Tyr Glu Ser Phe Asp  
165 170 175

Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Asn Val Arg Arg Ser Trp Glu Glu  
180 185 190

Leu Lys Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Glu Leu Lys Arg Lys Met  
195 200 205

Met Tyr Met Arg Arg Arg His Arg Gln Asp Ala Leu Ala Arg Val Tyr  
210 215 220

Glu Ile Lys Cys Arg Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val  
225 230 235 240

Tyr Phe Glu Gln Pro Thr Glu Thr Pro Pro  
245 250

5

<210> 312

<211> 241



ES 2 523 972 T3

<212> PRT

<213> péptido de poliepitopo sintético

<400> 312

Asn Val Arg Arg Ser Trp Glu Glu Leu Lys Ala Arg Asp His Leu Ala  
 1 . . . . . 5 . . . . . 10 . . . . . 15

Val Leu Gln Ala Arg Leu Thr Val Ser Gly Leu Lys Ala Arg Ala Lys  
 . . . . . 20 . . . . . 25 . . . . . 30

Lys Asp Glu Leu Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val Glu Leu Lys  
 . . . . . 35 . . . . . 40 . . . . . 45

Arg Lys Met Met Tyr Met Arg Arg Arg His Arg Gln Asp Ala Leu Ala  
 . . . . . 50 . . . . . 55 . . . . . 60

Arg Val Tyr Glu Ile Lys Cys Arg Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser  
 65 . . . . . 70 . . . . . 75 . . . . . 80

Ile Tyr Val Tyr Phe Glu Gln Pro Thr Glu Thr Pro Pro Tyr Ala Tyr  
 . . . . . 85 . . . . . 90 . . . . . 95

Ile Tyr Thr Thr Tyr Leu Gln Glu Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile  
 . . . . . 100 . . . . . 105 . . . . . 110

Tyr Tyr Glu Gln His Lys Ile Thr Ser Tyr Gln Glu Pro Met Ser Ile  
 . . . . . 115 . . . . . 120 . . . . . 125

Tyr Val Tyr Ser Glu His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr Gln Ala Ile  
 130 . . . . . 135 . . . . . 140

Arg Glu Thr Val Glu Leu Val Thr Glu His Asp Thr Leu Leu Tyr Asn  
 145 . . . . . 150 . . . . . 155 . . . . . 160

Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Val Leu Glu Glu Thr Ser Val Met  
 . . . . . 165 . . . . . 170 . . . . . 175

Leu Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Ile Ile Tyr Thr Arg Asn  
 . . . . . 180 . . . . . 185 . . . . . 190

His Glu Val Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser Tyr Lys Ala Tyr Ala Gln  
 . . . . . 195 . . . . . 200 . . . . . 205

Lys Ile Phe Lys Ile Leu Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Tyr  
 210 . . . . . 215 . . . . . 220

Val Lys Tyr Val Tyr Glu Ser Phe Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu  
 225 . . . . . 230 . . . . . 235 . . . . . 240

5 Leu

<210> 313

ES 2 523 972 T3

<211> 241

<212> PRT

<213> péptido de poliepitopo sintético

<400> 313

Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr Phe Glu Gln Pro  
1 5 10 15

Thr Glu Thr Pro Pro Tyr Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr Tyr Leu Gln Glu  
20 25 30

Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Tyr Glu Gln His Lys Ile Thr  
35 40 45

Ser Tyr Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr Ser Glu His Pro Thr  
50 55 60

Phe Thr Ser Gln Tyr Val Thr Glu His Asp Thr Leu Leu Tyr Asn Leu  
65 70 75 80

Val Pro Met Val Ala Thr Val Val Leu Glu Glu Thr Ser Val Met Leu  
85 90 95

Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Ile Ile Tyr Thr Arg Asn His  
100 105 110

Glu Val Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser Tyr Lys Asn Val Arg Arg Ser  
115 120 125

Trp Glu Glu Leu Lys Ala Arg Asp His Leu Ala Val Leu Gln Ala Arg  
130 135 140

Leu Thr Val Ser Gly Leu Lys Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Gln  
145 150 155 160

Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val Glu Leu Lys Arg Lys Met Met Tyr  
165 170 175

Met Arg Arg Arg His Arg Gln Asp Ala Leu Ala Arg Val Tyr Glu Ile  
180 185 190

Lys Cys Arg Ala Tyr Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ile Leu Gln Tyr Asp  
195 200 205

Pro Val Ala Ala Leu Phe Tyr Val Lys Tyr Val Tyr Glu Ser Phe Asp  
210 215 220

Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Gln Ala Ile Arg Glu Thr Val Glu  
225 230 235 240

Leu

<210> 314

5

<211> 241

<212> PRT

<213> Péptido de polieptopo sintético

<400> 314

Ala Tyr Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ile Leu Asn Leu Val Pro Met Val  
1 5 10 15

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

Lys Met Met Tyr Met Val Thr Glu His Asp Thr Leu Leu Tyr Phe Glu  
35 40 45

Gln Pro Thr Glu Thr Pro Pro Ala Arg Val Tyr Glu Ile Lys Cys Arg  
50 55 60

Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Val Leu Glu Glu Thr Ser Val  
65 70 75 80

Met Leu Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr Ile Ile  
85 90 95

Tyr Thr Arg Asn His Glu Val Arg Arg Arg His Arg Gln Asp Ala Leu  
100 105 110

Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser Tyr Lys Gln Ile Lys Val Arg Val Asp  
115 120 125

Met Val Tyr Glu Gln His Lys Ile Thr Ser Tyr Gln Tyr Asp Pro Val  
130 135 140

Ala Ala Leu Phe Ser Glu His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr Gln Glu  
145 150 155 160

Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Tyr Val Lys Tyr Val Tyr Glu  
165 170 175

Ser Phe Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Lys Ala Arg Asp His  
180 185 190

Leu Ala Val Leu Gln Ala Arg Leu Thr Val Ser Gly Leu Lys Ala Arg  
195 200 205

Ala Lys Lys Asp Glu Leu Tyr Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr Tyr Leu Gln  
210 215 220

Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr Gln Ala Ile Arg Glu Thr Val Glu  
225 230 235 240

Leu

<210> 315

5

ES 2 523 972 T3

<211> 241

<212> PRT

<213> péptido de poliepitopo sintético

<400> 315

Tyr Glu Gln His Lys Ile Thr Ser Tyr Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr  
1 5 10 15

Val Tyr Glu Leu Lys Arg Lys Met Met Tyr Met Arg Arg Arg His Arg  
20 25 30

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

5 Gln Lys Ile Phe Lys Ile Leu Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe  
50 55 60

Tyr Val Lys Tyr Val Tyr Glu Ser Phe Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala  
65 70 75 80

Glu Leu Ser Glu His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr Gln Ala Ile Arg  
85 90 95

Glu Thr Val Glu Leu Asn Val Arg Arg Ser Trp Glu Glu Leu Lys Ala  
100 105 110

Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Val Thr Glu His Asp Thr Leu Leu Tyr  
115 120 125

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Val Leu Glu Glu Thr Ser Val  
130 135 140

Met Leu Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Ile Ile Tyr Thr Arg  
145 150 155 160

Asn His Glu Val Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser Tyr Lys Gln Ile Lys  
165 170 175

Val Arg Val Asp Met Val Phe Glu Gln Pro Thr Glu Thr Pro Pro Tyr  
180 185 190

Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr Tyr Leu Gln Glu Phe Phe Trp Asp Ala Asn  
195 200 205

Asp Ile Tyr Lys Ala Arg Asp His Leu Ala Val Leu Gln Ala Arg Leu  
210 215 220

Thr Val Ser Gly Leu Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val  
225 230 235 240

Tyr

ES 2 523 972 T3

<210> 316

<211> 241

<212> PRT

<213> péptido de poliepitopo sintético

5

<400> 316

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

Cys Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Tyr Val Lys Tyr Val  
20 25 30

Tyr Glu Ser Phe Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Tyr Ala Tyr  
35 40 45

Ile Tyr Thr Thr Tyr Leu Ile Ile Tyr Thr Arg Asn His Glu Val Ile  
50 55 60

Met Arg Glu Phe Asn Ser Tyr Lys Ser Glu His Pro Thr Phe Thr Ser  
65 70 75 80

Gln Tyr Ala Tyr Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ile Leu Gln Tyr Asp Pro  
85 90 95

Val Ala Ala Leu Phe Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Gln Glu  
100 105 110

Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Val Arg Arg Ser Trp Glu  
115 120 125

Glu Leu Lys Ala Arg Asp His Leu Ala Val Leu Val Leu Glu Glu Thr  
130 135 140

Ser Val Met Leu Gln Ala Arg Leu Thr Val Ser Gly Leu Lys Ala Arg  
145 150 155 160

Ala Lys Lys Asp Glu Leu Glu Leu Lys Arg Lys Met Met Tyr Met Val  
165 170 175

Thr Glu His Asp Thr Leu Leu Tyr Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val  
180 185 190

Tyr Arg Arg Arg His Arg Gln Asp Ala Leu Cys Pro Ser Gln Glu Pro  
195 200 205

ES 2 523 972 T3

Met Ser Ile Tyr Val Tyr Phe Glu Gln Pro Thr Glu Thr Pro Pro Tyr  
 210 215 220

Glu Gln His Lys Ile Thr Ser Tyr Gln Ala Ile Arg Glu Thr Val Glu  
 225 230 235 240

Leu

<210> 317

<211> 241

<212> PRT

5 <213> péptido de polieptopo sintético

<400> 317

Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met  
 1 5 10 15

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

Arg Asp His Leu Ala Val Leu Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val  
 35 40 45

Tyr Val Lys Tyr Val Tyr Glu Ser Phe Val Leu Glu Glu Thr Ser Val  
 50 55 60

Met Leu Asn Val Arg Arg Ser Trp Glu Glu Leu Ile Met Arg Glu Phe  
 65 70 75 80

Asn Ser Tyr Lys Ala Tyr Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ile Leu Glu Leu  
 85 90 95

Lys Arg Lys Met Met Tyr Met Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe  
 100 105 110

Ser Glu His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr Gln Ala Arg Leu Thr Val  
 115 120 125

ES 2 523 972 T3

Ser Gly Leu Lys Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Gln Ile Lys Val  
 130 135 140

Arg Val Asp Met Val Arg Arg Arg His Arg Gln Asp Ala Leu Ala Arg  
 145 150 155 160

Val Tyr Glu Ile Lys Cys Arg Phe Glu Gln Pro Thr Glu Thr Pro Pro  
 165 170 175

Tyr Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr Tyr Leu Gln Glu Phe Phe Trp Asp Ala  
 180 185 190

Asn Asp Ile Tyr Tyr Glu Gln His Lys Ile Thr Ser Tyr Val Thr Glu  
 195 200 205

His Asp Thr Leu Leu Tyr Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr Arg  
 210 215 220

Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Ile Ile Tyr Thr Arg Asn His Glu  
 225 230 235 240

Val

<210> 318

<211> 241

<212> PRT

5 <213> péptido de polieptótopo sintético

<400> 318

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Ala Arg Leu Thr Val Ser  
 1 5 10 15

Gly Leu Val Thr Glu His Asp Thr Leu Leu Tyr Tyr Ala Tyr Ile Tyr  
 20 25 30

Thr Thr Tyr Leu Gln Glu Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Val  
 35 40 45

Leu Glu Glu Thr Ser Val Met Leu Glu Leu Lys Arg Lys Met Met Tyr

ES 2 523 972 T3

50                                 55                                 60

Met Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Gln Glu Pro Met Ser Ile  
65                                 70                                 75                                 80

Tyr Val Tyr Ile Ile Tyr Thr Arg Asn His Glu Val Ile Met Arg Glu  
                                  85                                 90                                 95

Phe Asn Ser Tyr Lys Arg Arg Arg His Arg Gln Asp Ala Leu Ala Tyr  
                          100                                 105                                 110

Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ile Leu Ser Glu His Pro Thr Phe Thr Ser  
                  115                                 120                                 125

Gln Tyr Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Tyr Val Lys Tyr Val  
          130                                 135                                 140

Tyr Glu Ser Phe Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Asn Val Arg  
145                                 150                                 155                                 160

Arg Ser Trp Glu Glu Leu Lys Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Ala  
                          165                                 170                                 175

Arg Val Tyr Glu Ile Lys Cys Arg Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser  
                  180                                 185                                 190

Ile Tyr Val Tyr Phe Glu Gln Pro Thr Glu Thr Pro Pro Gln Ile Lys  
          195                                 200                                 205

Val Arg Val Asp Met Val Tyr Glu Gln His Lys Ile Thr Ser Tyr Gln  
          210                                 215                                 220

Ala Ile Arg Glu Thr Val Glu Leu Lys Ala Arg Asp His Leu Ala Val  
225                                 230                                 235                                 240

Leu



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido aislado que comprende un epítipo de linfocitos T citotóxicos (CTL) de un antígeno pp50 de un citomegalovirus de seres humanos (HCMV), en el que dicho péptido tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 a 20 aminoácidos contiguos de dicho antígeno pp50, y en el que el epítipo de CTL consiste en la secuencia expuesta en SEC ID NO: 165 (VTEHDTLLY), o un lipopéptido que comprende dicho péptido.
2. El péptido o lipopéptido aislado de la reivindicación 1, en el que dicho péptido o lipopéptido se une a una célula de MHC Clase I que expresa CD8+.
3. El péptido o lipopéptido aislado según la reivindicación 1, en el que el péptido o lipopéptido se une a una célula de MHC Clase I que expresa HLA A1.
- 10 4. El péptido o lipopéptido aislado según la reivindicación 3, en el que el péptido o lipopéptido se une a una célula CD8+ que expresa HLA A1.
5. El péptido o lipopéptido aislado según la reivindicación 4, en el que dicho péptido consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 165 (VTEHDTLLY).
- 15 6. Un péptido de poliepítipo aislado que comprende dos o más epítipos de linfocitos T citotóxicos (CTL), en el que uno de dichos epítipos de CTL consiste en una secuencia expuesta en SEC ID NO: 165 (VTEHDTLLY), y uno o más de dichos epítipos de CTL consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- SEC ID NO: 46 (YSEHPTFTSQY);
- SEC ID NO: 5 (NLVPMVATV);
- SEC ID NO: 101 (VLEETSVML);
- 20 SEC ID NO: 7 (RIFAELEGV);
- SEC ID NO: 254 (IIYTRNHEV);
- SEC ID NO: 135 (IMREFNSYK);
- SEC ID NO: 21 (TTVYPPSSTAK);
- SEC ID NO: 1 (SVLGPISGHVLK);
- 25 SEC ID NO: 116 (AYAQKIFKIL);
- SEC ID NO: 33 (QYDPVAALF);
- SEC ID NO: 2 (FTSOYRIQGKL);
- SEC ID NO: 37 (YVKYVYESF);
- SEC ID NO: 15 (DIYRIFAEL);
- 30 SEC ID NO: 3 (FVFPTKDVALR);
- SEC ID NO: 134 (NRRSWEEL);
- SEC ID NO: 132 (KARDHLAVL);
- SEC ID NO: 41 (QARLTVSGL);
- SEC ID NO: 8 (TPRVTGGGAM);
- 35 SEC ID NO: 109 (KARAKKDEL);
- SEC ID NO: 113 (QIKVRVDMV);
- SEC ID NO: 112 (ELRRKMMYM);
- SEC ID NO: 42 (RRRHRQDAL);
- SEC ID NO: 162 (ARVYEIKCR);
- 40 SEC ID NO: 66 (CPSQEPMSIYVY);
- SEC ID NO: 4 (FPTKDVAL);

SEC ID NO: 55 (IPSINVHHY);  
 SEC ID NO: 260 (FEQPTETPP);  
 SEC ID NO: 189 (YAYIYTTYL);  
 SEC ID NO: 56 (QEFFWDANDIY);  
 5 SEC ID NO: 170 (YEQHKITSY);  
 SEC ID NO: 51 (QEPMSIYVY);  
 SEC ID NO: 47 (SEHPTFTSQY); y  
 SEC ID NO: 63 (QAIRETVEL).

10 7. El péptido de poliepítipo aislado según la reivindicación 6, en el que dicho péptido de poliepítipo se une a células que expresan un alelo de MHC Clase I seleccionado del grupo que consiste en: HLA A1, HLA A2, HLA A3, HLA A11, HLA A23, HLA A24, HLA A26, HLA A29, HLA A30, HLA A68, HLA B7, HLA B8, HLA B27, HLA B35, HLA B41, HLA B44, HLA B57, y HLA B58.

8. El péptido de poliepítipo aislado según la reivindicación 6, en el que un epítipo de dicho péptido de poliepítipo tiene especificidad por el supertipo de HLA.

15 9. El péptido de poliepítipo aislado según la reivindicación 6, que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 309; SEC ID NO: 310; SEC ID NO: 311; SEC ID NO: 312; SEC ID NO: 313; SEC ID NO: 314; SEC ID NO: 315; SEC ID NO: 316; SEC ID NO: 317; y SEC ID NO: 318.

20 10. Una composición de vacuna profiláctica o terapéutica para provocar una respuesta inmunitaria celular en un sujeto humano frente a HCMV, comprendiendo dicha composición una cantidad eficaz del péptido o lipopéptido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o del péptido de poliepítipo aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en combinación con un vehículo, excipiente, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

11. La composición de vacuna profiláctica o terapéutica según la reivindicación 10, en la que el adyuvante comprende un adyuvante saponificado que comprende una saponina o una fracción de saponina.

25 12. Uso del péptido o lipopéptido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o del péptido de poliepítipo aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, o de la composición de vacuna profiláctica o terapéutica según la reivindicación 10 u 11, en la preparación de un medicamento para potenciar la inmunidad mediada por células específicas de HCMV de un sujeto humano, o para proporcionar memoria inmunológica en un sujeto no infectado contra una futura infección por HCMV.

30 13. El uso según la reivindicación 12, en el que el sujeto se selecciona del grupo que consiste en: (i) un sujeto que posee una infección por HCMV latente; (ii) un sujeto que posee una infección por HCMV activa; (iii) un sujeto que está inmunosuprimido; (iv) un sujeto que está inmunocomprometido; (v) un receptor de trasplante; y (vi) un sujeto en riesgo de sufrir una complicación que surge de infección por HCMV.

35 14. El uso según la reivindicación 13, en el que el sujeto es una mujer que tiene capacidad reproductora, o una mujer embarazada, o un receptor de trasplante de médula ósea.

15. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que la composición comprende una cantidad del péptido o lipopéptido suficiente para activar un CTL o un precursor de CTL en un sujeto.

40 16. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que la composición comprende una cantidad del péptido o lipopéptido suficiente para provocar o potenciar la expansión de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, o potenciar la inmunidad mediada por células (CMI) específicas de HCMV en un sujeto.

17. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en el que la composición es inyectable.

45 18. Un método para preparar un linfocito T reactivo a HCMV, comprendiendo dicho método poner en contacto *ex vivo* un linfocito T obtenido previamente de un sujeto humano con una cantidad eficaz del péptido o lipopéptido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o del péptido de poliepítipo aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, o de la composición de vacuna profiláctica o terapéutica según la reivindicación 10 u 11, suficiente para conferir reactividad con HCMV a dichos linfocitos T.

50 19. Un método para determinar si un sujeto ha sido previamente infectado o no con HCMV, o el nivel de inmunidad mediada por células específicas de HCMV en un sujeto, comprendiendo dicho método poner en contacto *ex vivo* un linfocito T obtenido previamente del sujeto con una célula presentadora de antígeno (APC) sensibilizada con el péptido o lipopéptido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o con el péptido de poliepítipo

- aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, o con la composición de vacuna profiláctica o terapéutica según la reivindicación 10 u 11, y determinar la activación de un CTL o un CTL precursor, en el que dicha activación de un CTL o un CTL precursor indica que el sujeto ha sido infectado previamente con HCMV, y en el que el nivel de activación de un CTL o un CTL precursor está correlacionado con el nivel de inmunidad mediada por células específicas de HCMV del sujeto.
- 5
20. El método de la reivindicación 19, en el que la activación de un CTL o un CTL precursor se realiza mediante un procedimiento que comprende un ensayo seleccionado del grupo que consiste en: ensayo de tetrámeros de MHC clase 1, ensayo de citotoxicidad, ensayo para determinar la producción de IFN- $\gamma$ , ensayo de citocinas, ensayo de liberación de cromo, y ELISPOT.
- 10
21. El método según la reivindicación 20, en el que el linfocito T está contenido en una muestra biológica obtenida previamente de un sujeto humano.
22. El método según la reivindicación 21, en el que la muestra biológica obtenida previamente de un sujeto es médula ósea, timo, o una muestra que comprende sangre, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o una capa leuco-plaquetaria.
- 15
23. Un método para producir un CTL específico de HCMV, que comprende: (i) poner en contacto un linfocito T *ex vivo* con el péptido o lipopéptido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o con el péptido de poliepítipo aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, o con la composición de vacuna profiláctica o terapéutica según la reivindicación 11 ó 12, o una célula presentadora de antígeno (APC), o una estirpe celular linfoblastoide autóloga (LCL) sensibilizada con dicho péptido o lipopéptido o dicha vacuna; (ii) cultivar el linfocito T; y
- 20
- (iii) seleccionar linfocitos T que proliferan.
24. El método de la reivindicación 23, en el que la puesta en contacto en (i) es en presencia de una citocina.
25. El método de la reivindicación 24, en el que la citocina es IL-2.
26. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, que comprende estimular *ex vivo* células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) procedentes de un donante sano seropositivo a HCMV con una estirpe celular linfoblastoide autóloga (LCL) que se ha sensibilizado con el péptido o lipopéptido.
- 25

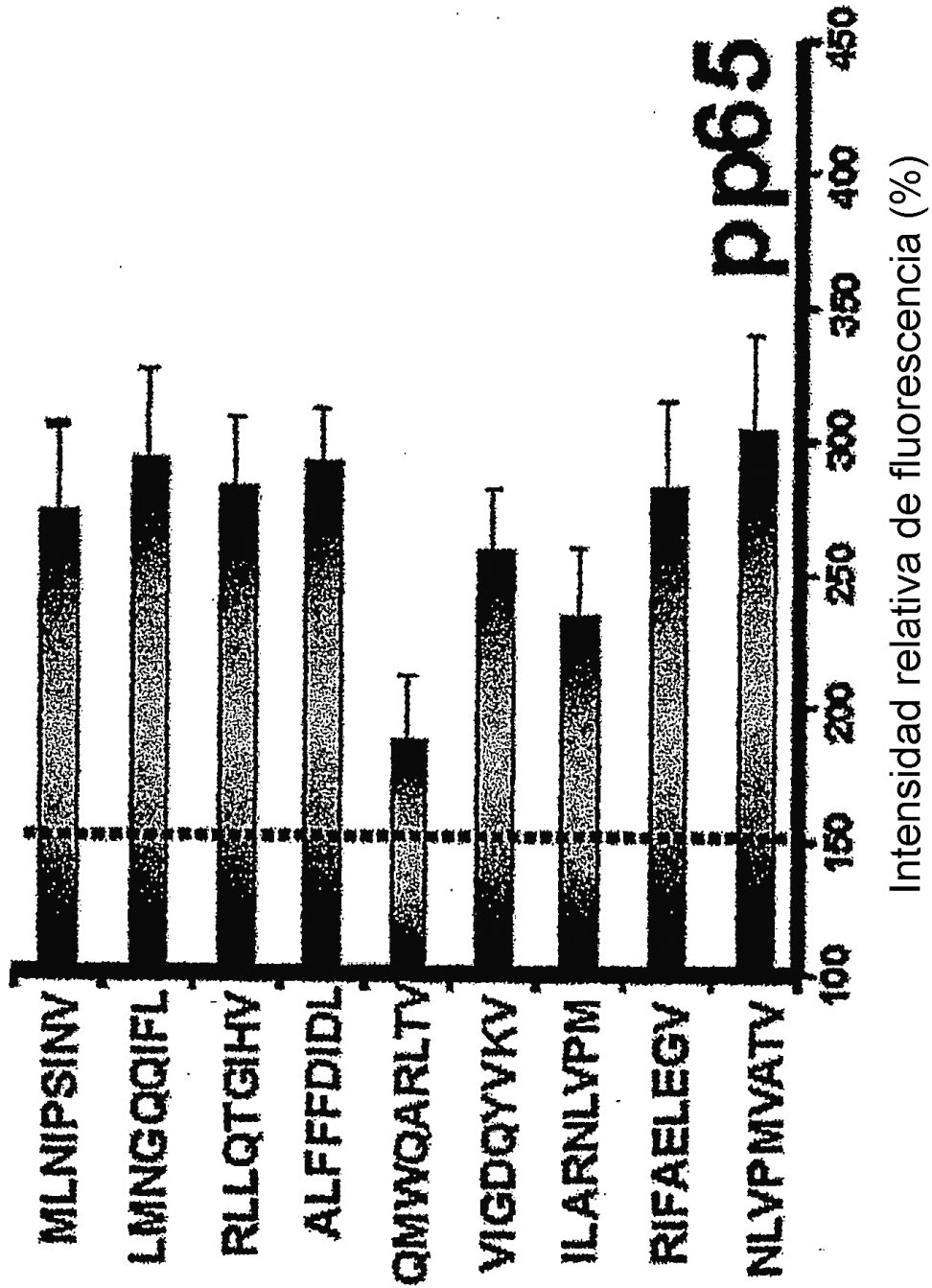


Figura 1a

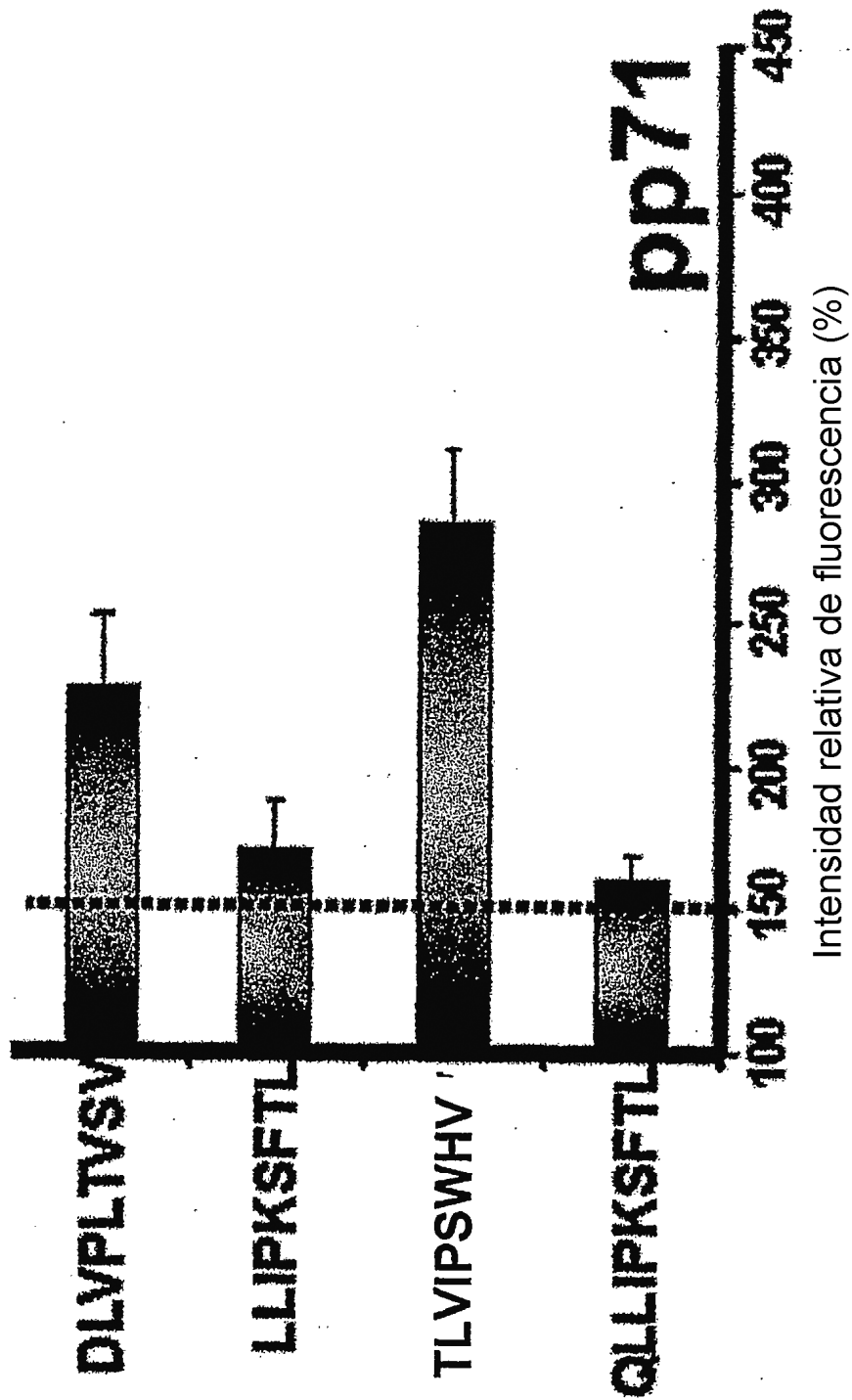


Figura 1b

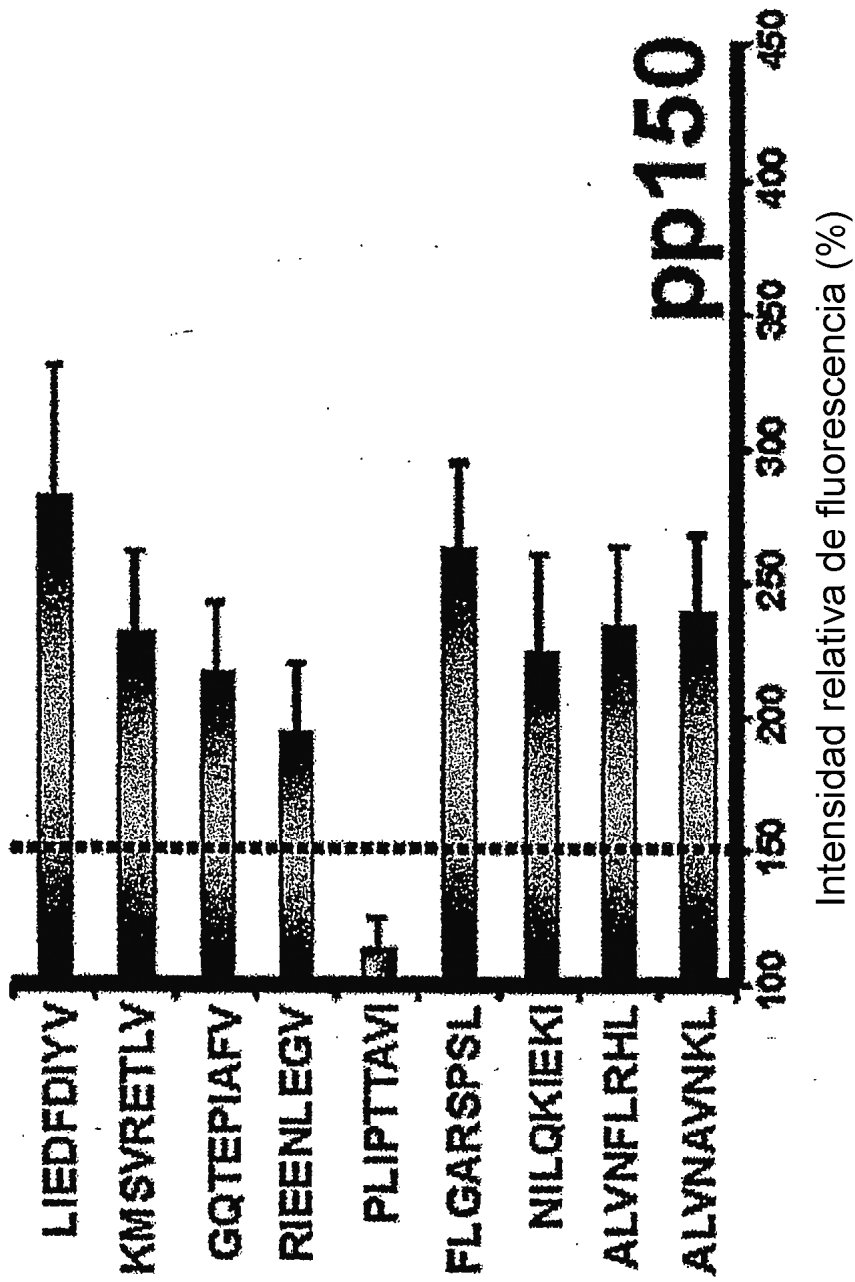


Figura 1c

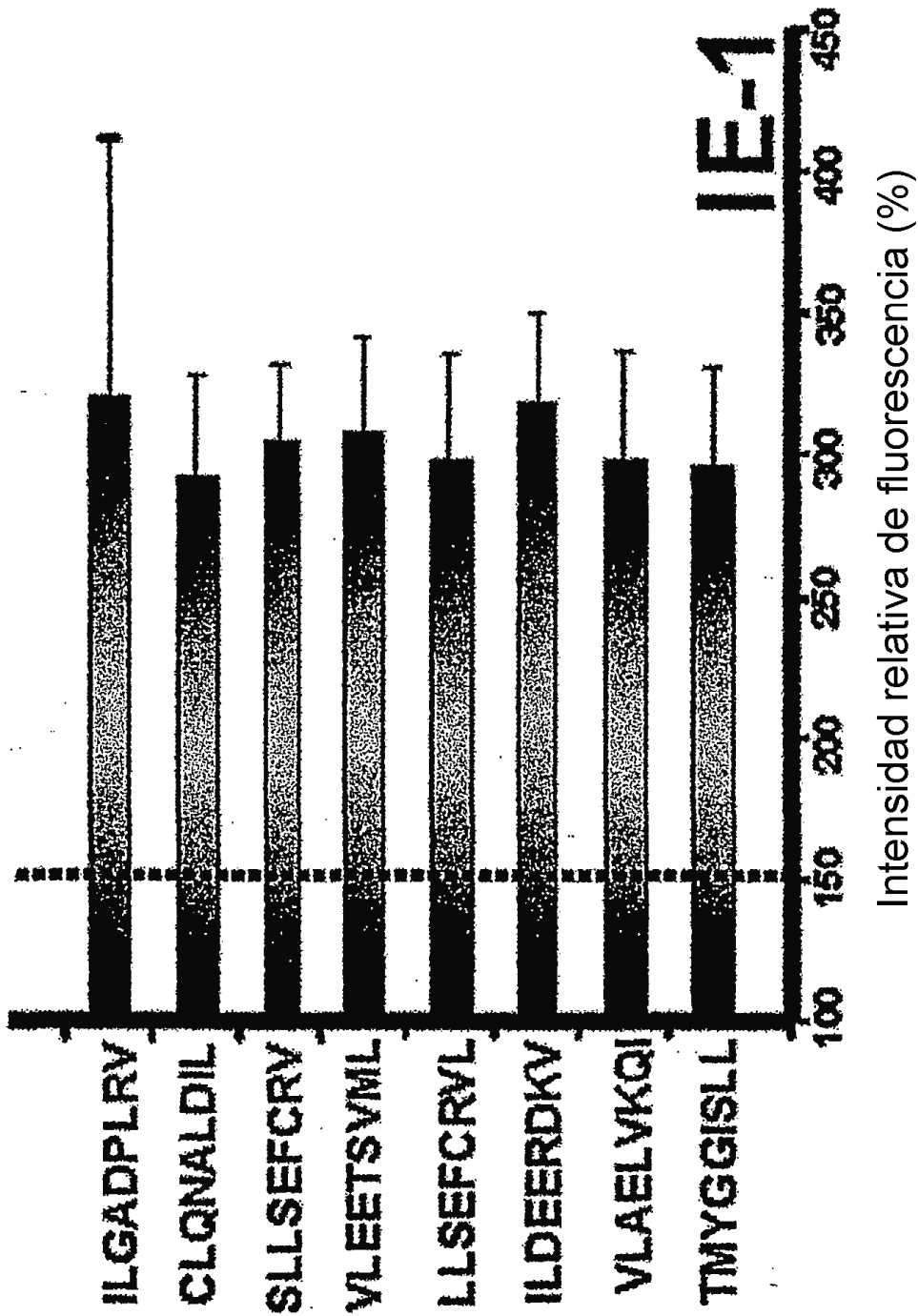


Figura 1d

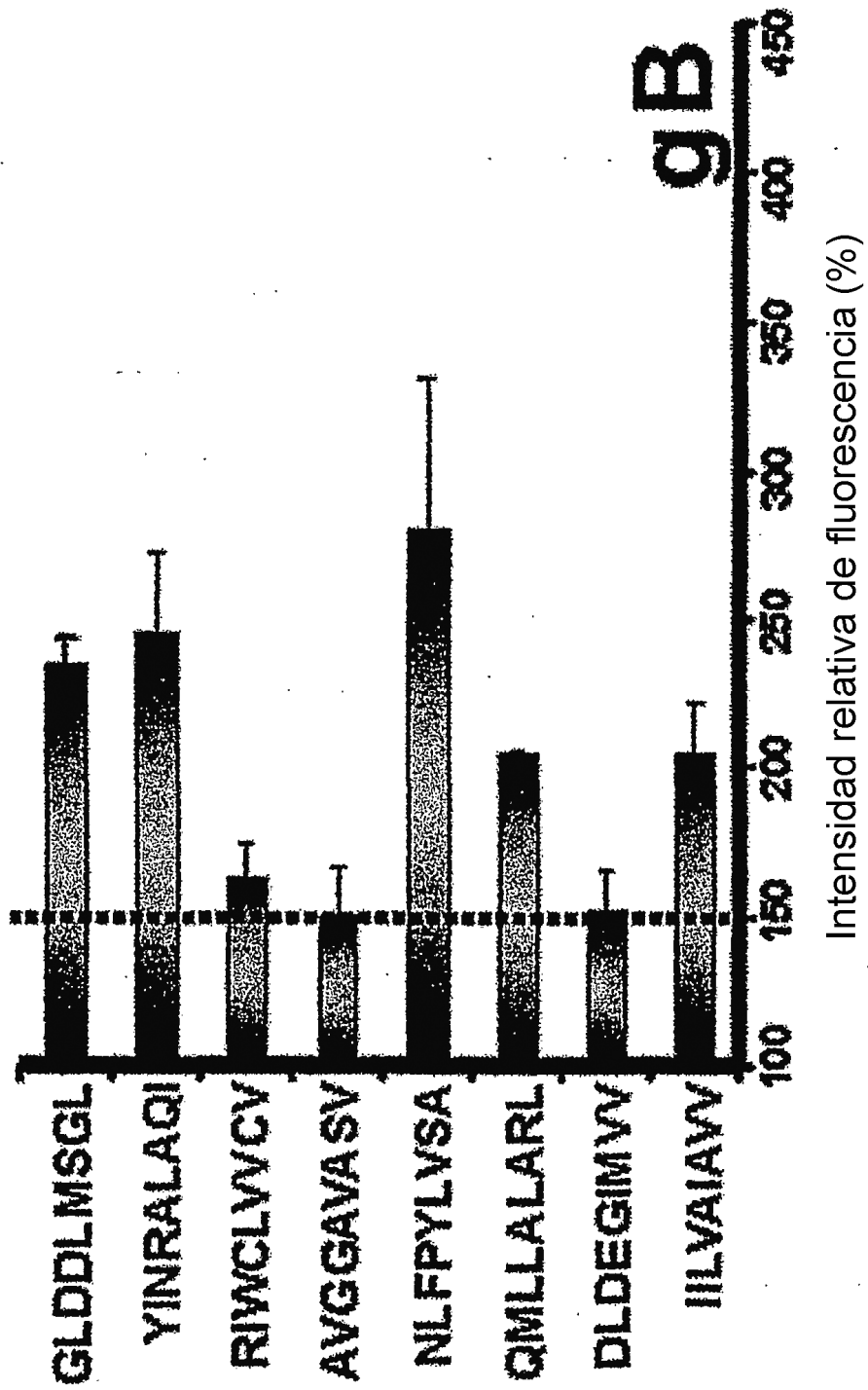


Figura 1e



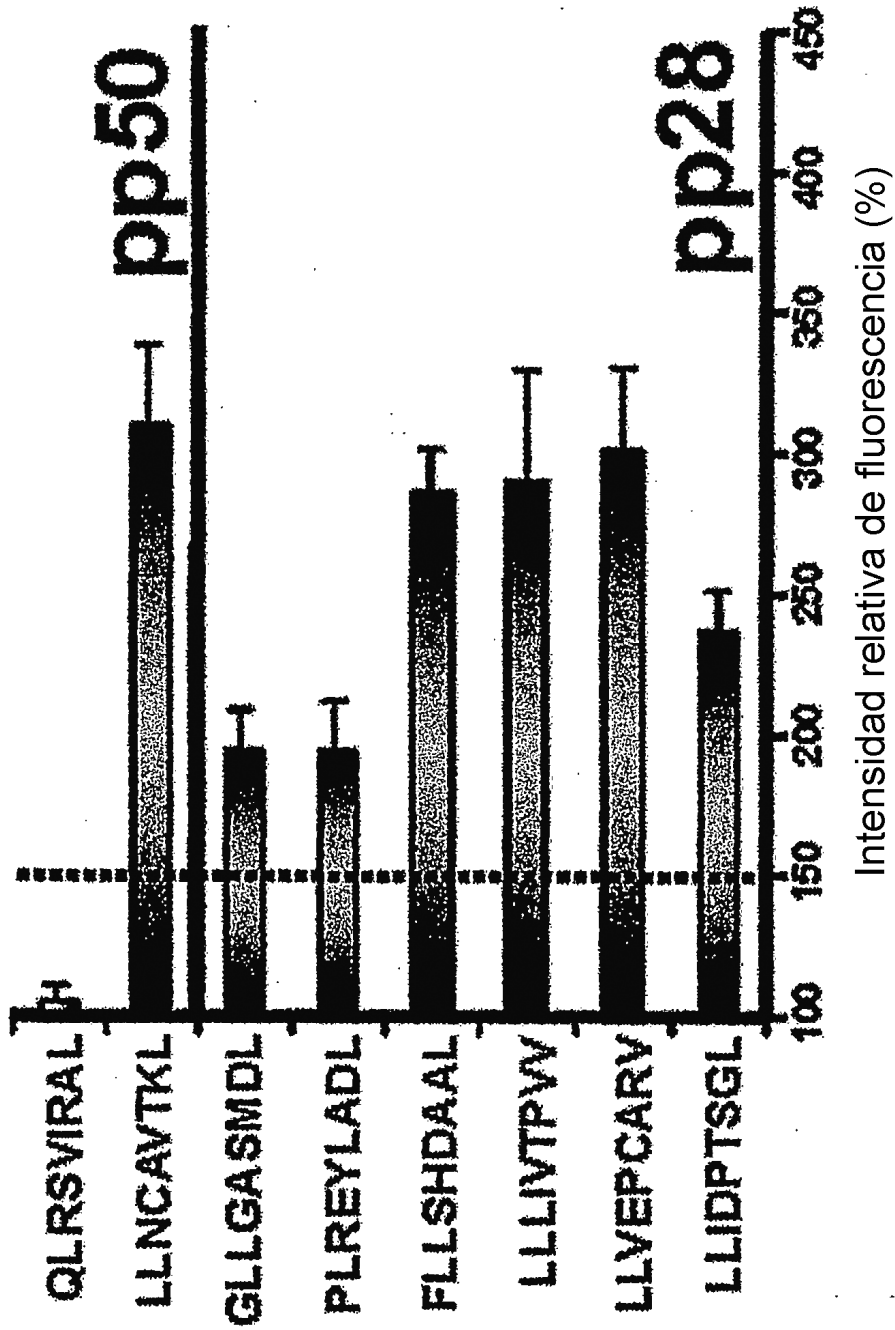


Figura 1f

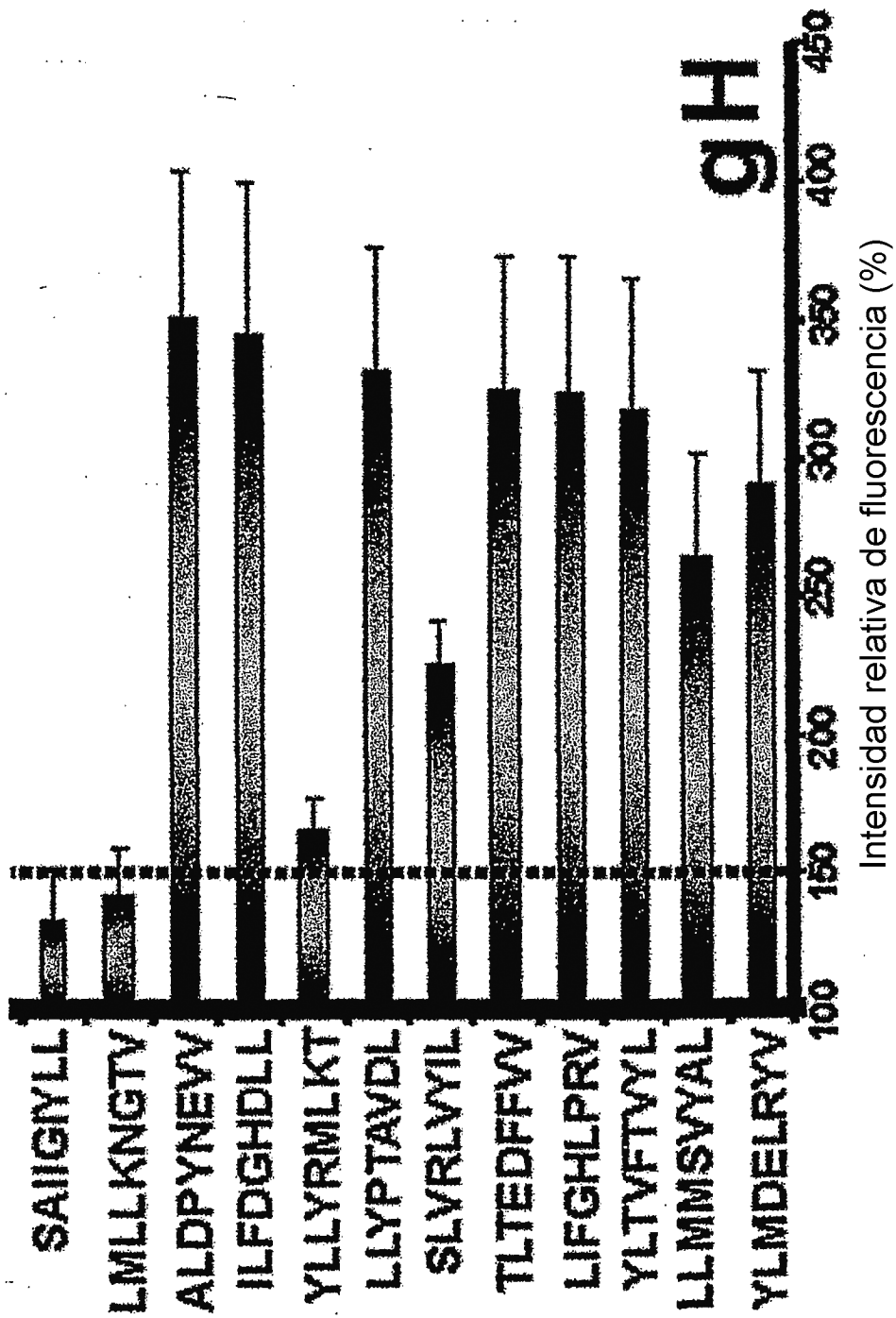


Figura 1g

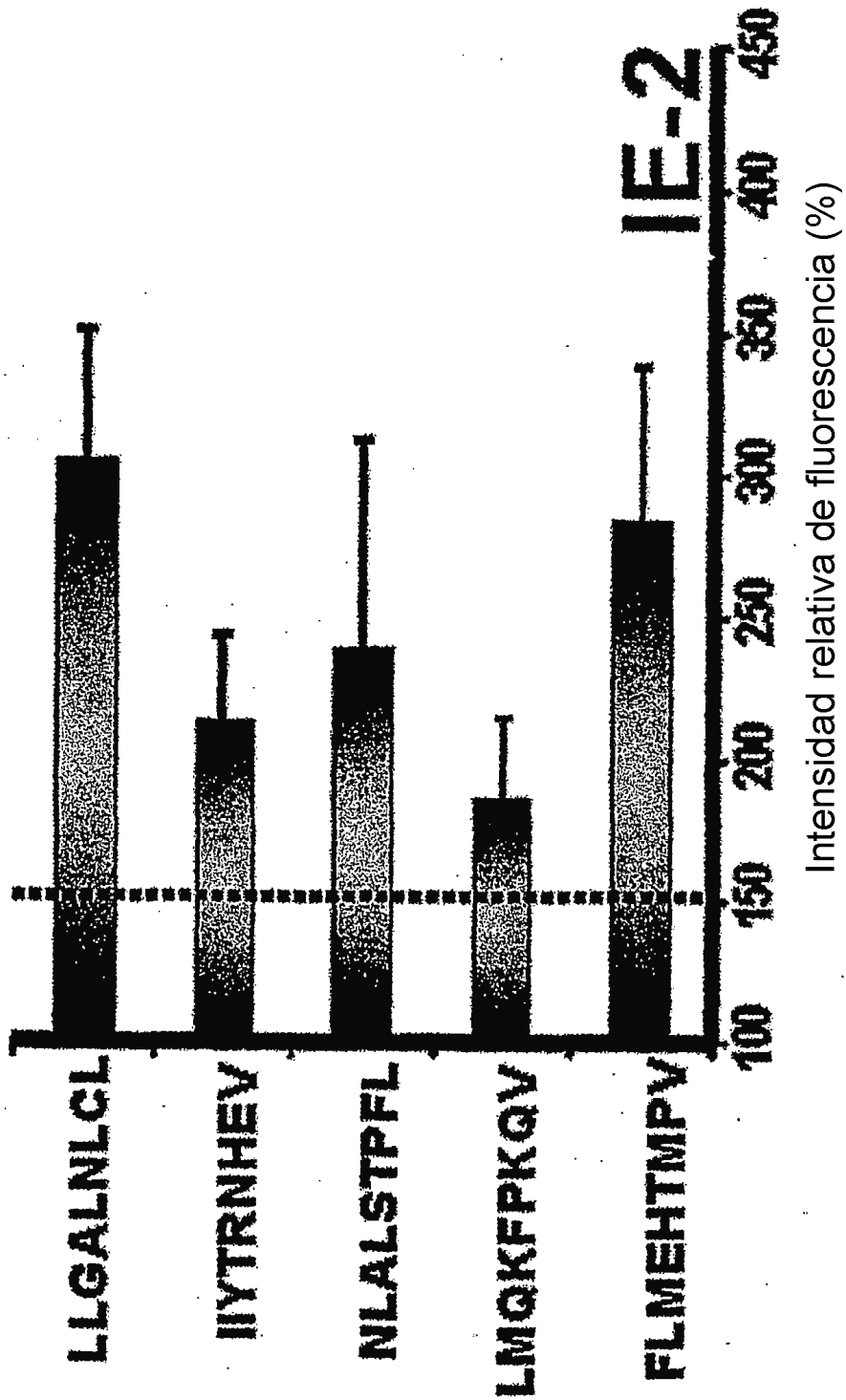


Figura 1h

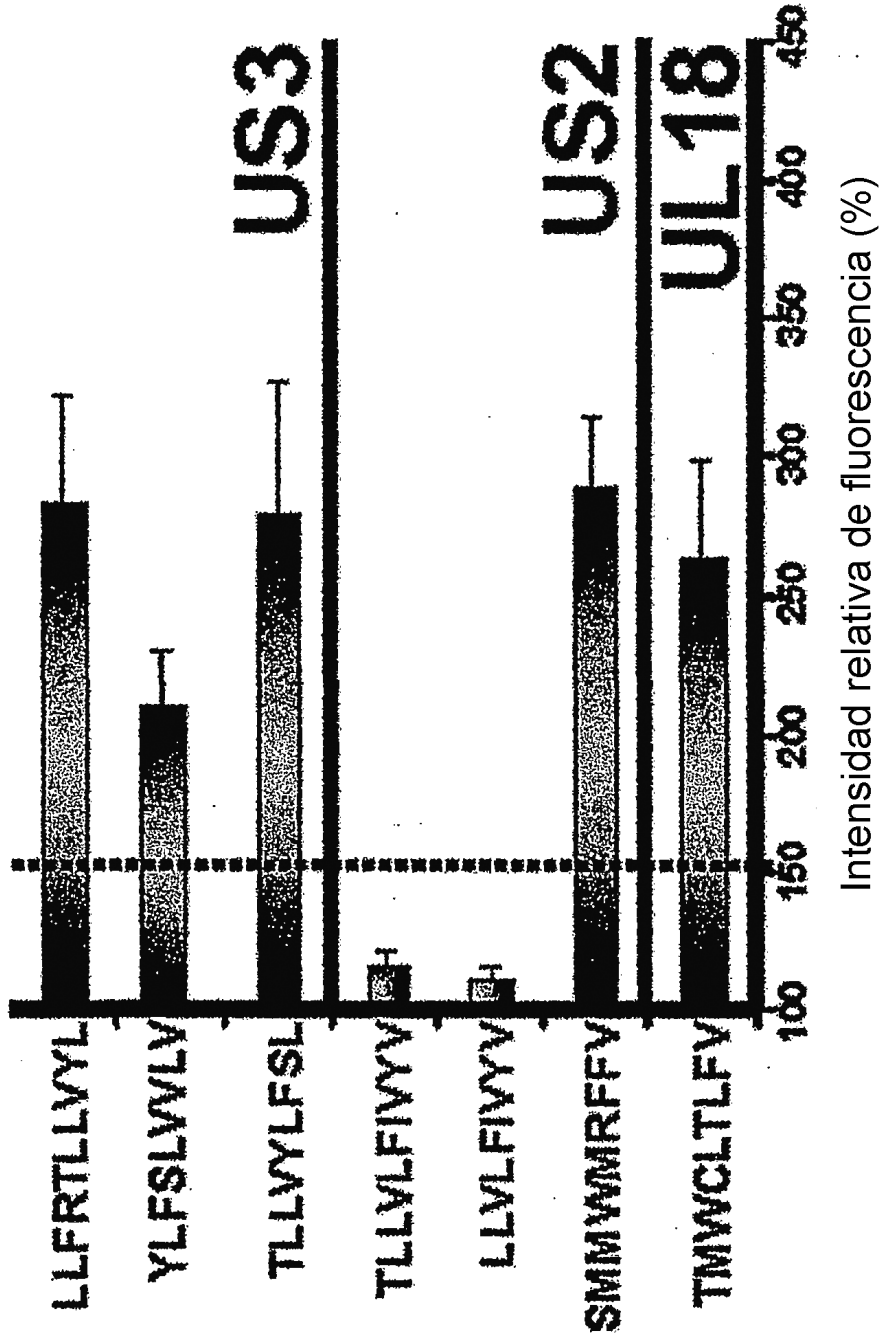


Figura 1i

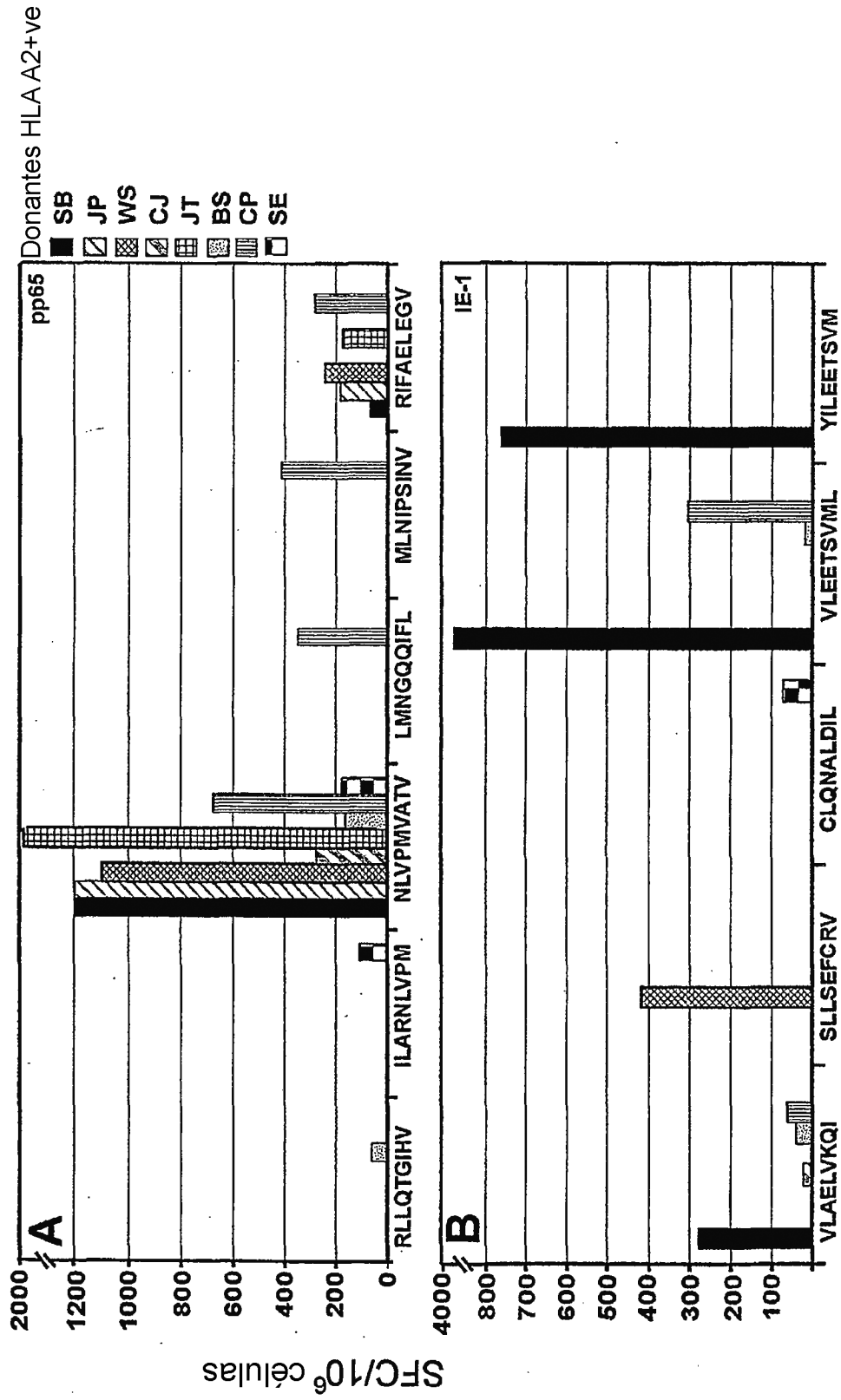


FIGURA 2a

Donantes HLA A2+ve

- SB
- ▨ JP
- ▩ WS
- ▧ CJ
- ▦ JT
- ▥ BS
- ▤ CP
- SE

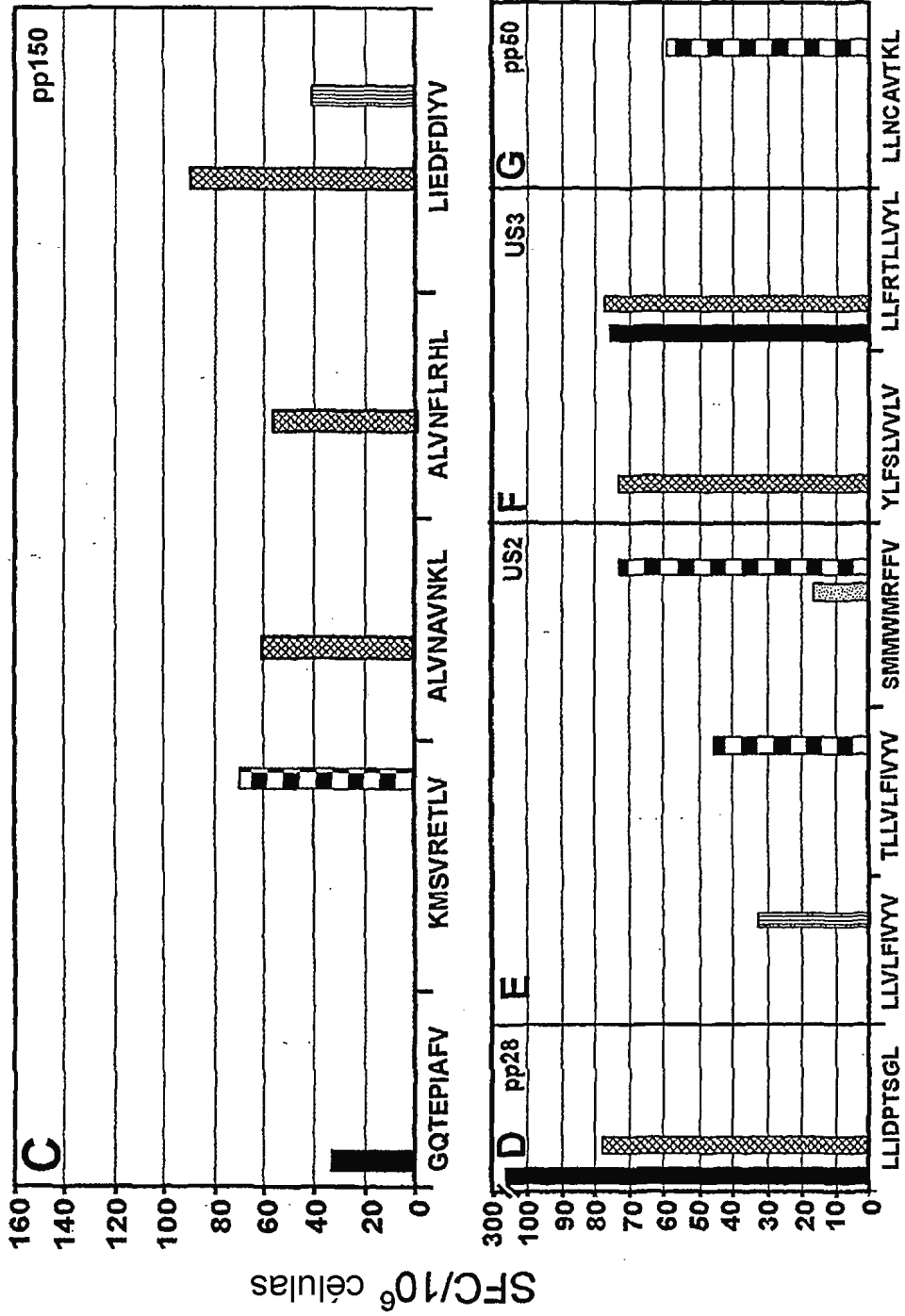


FIGURA 2b

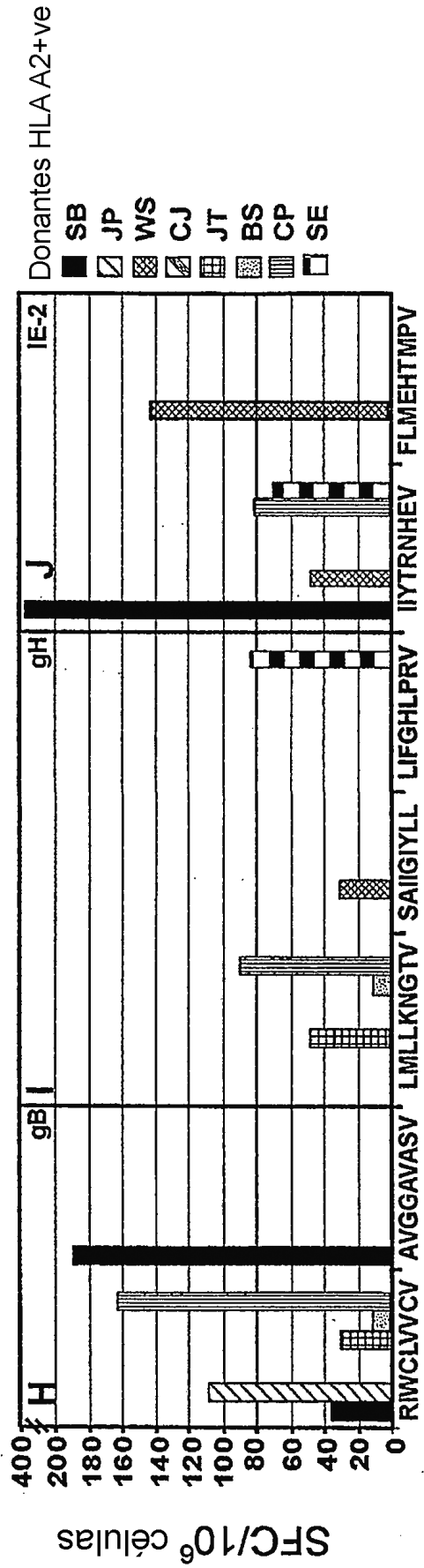


FIGURA 2c

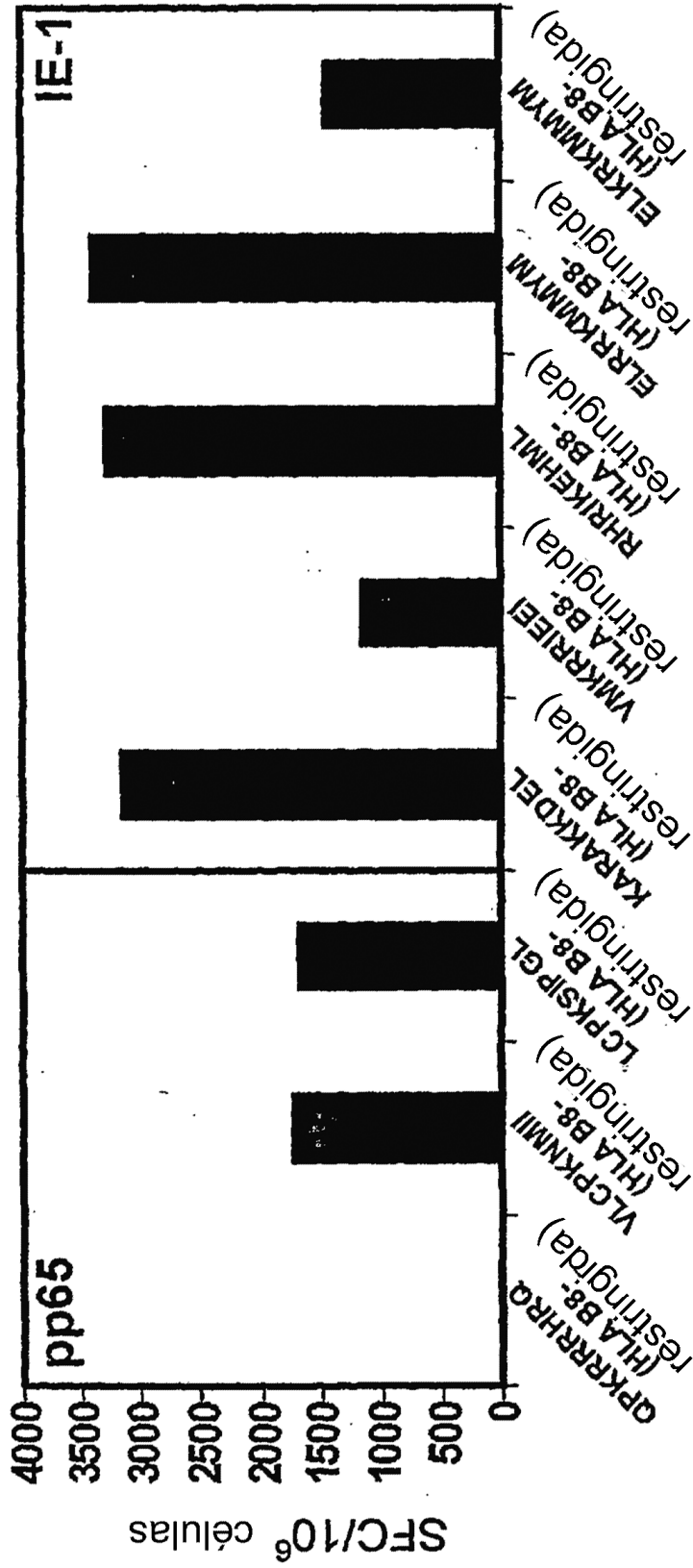


FIGURA 3a



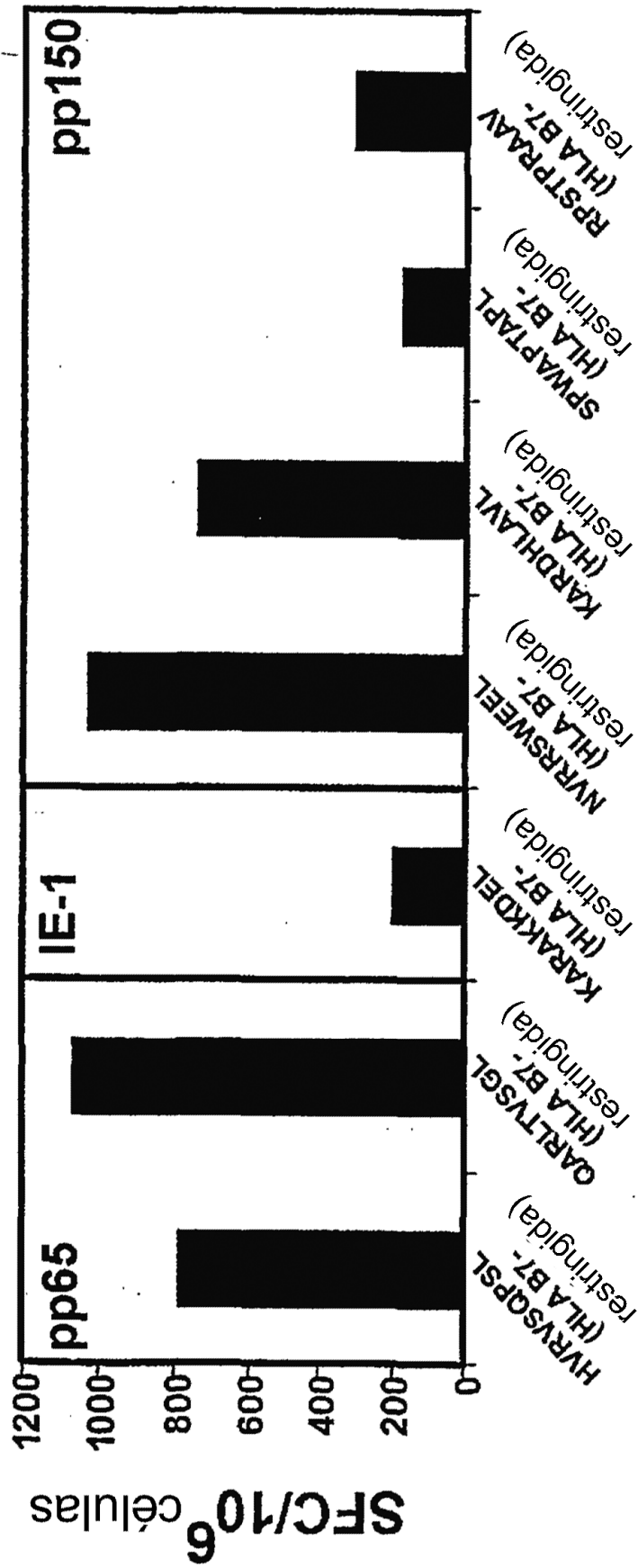


FIGURA 3b

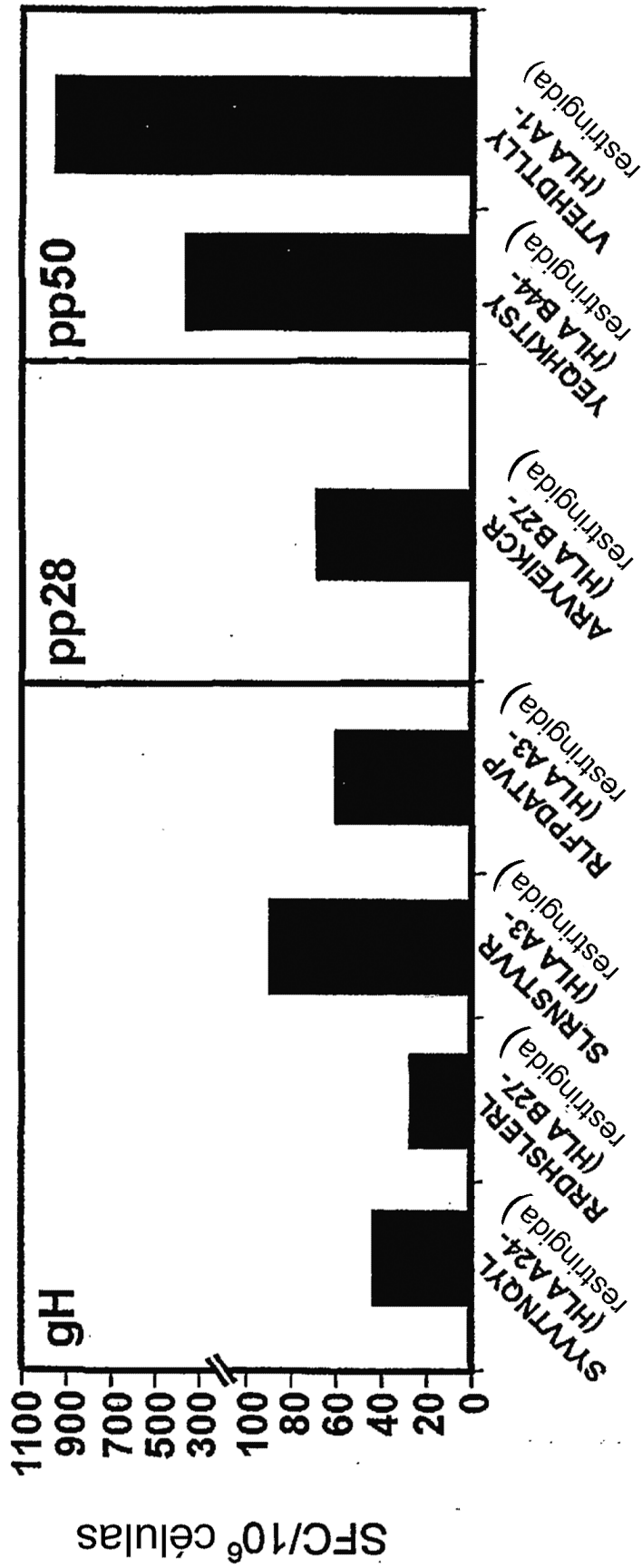


FIGURA 3c

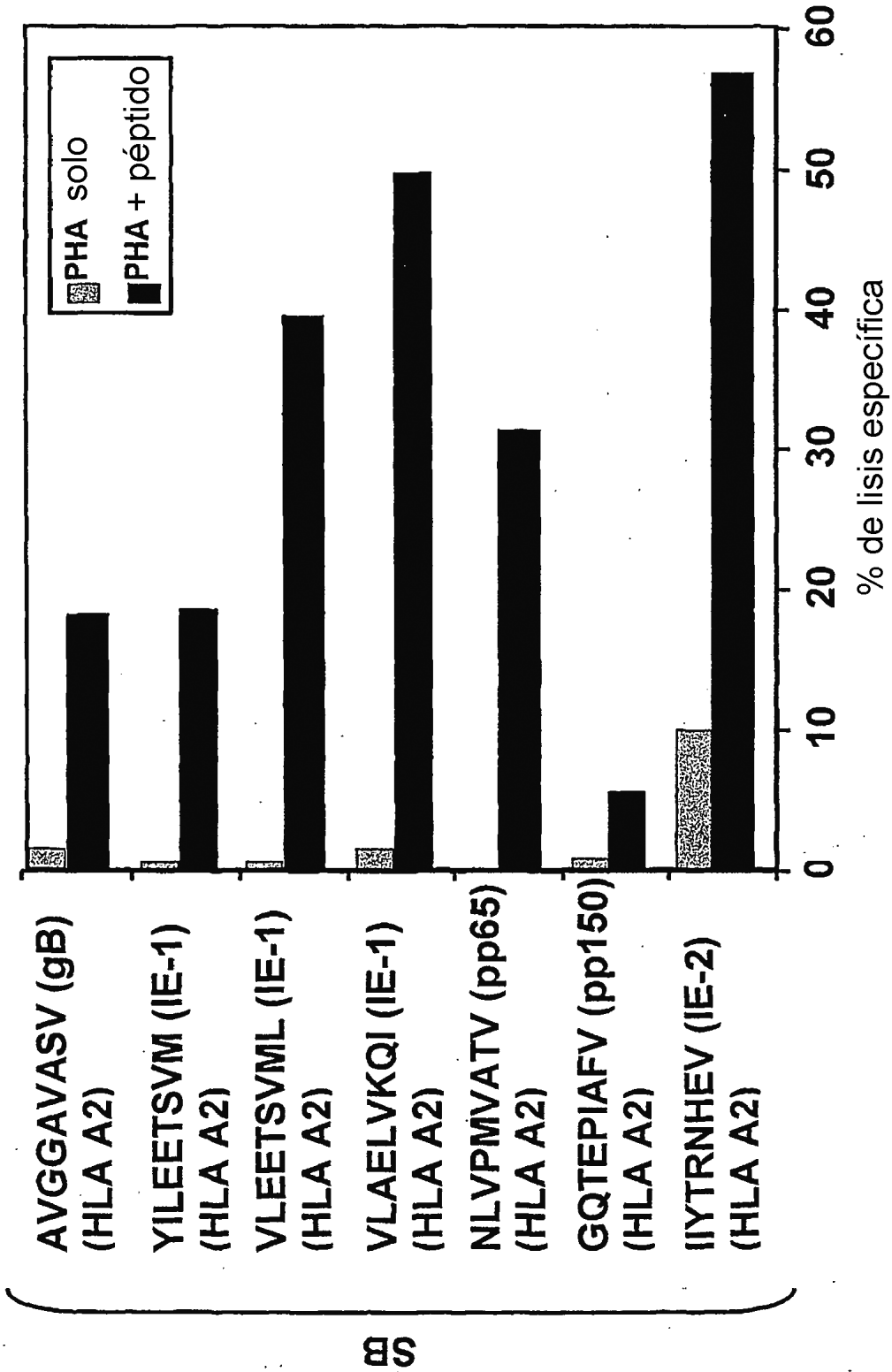


FIGURA 4a

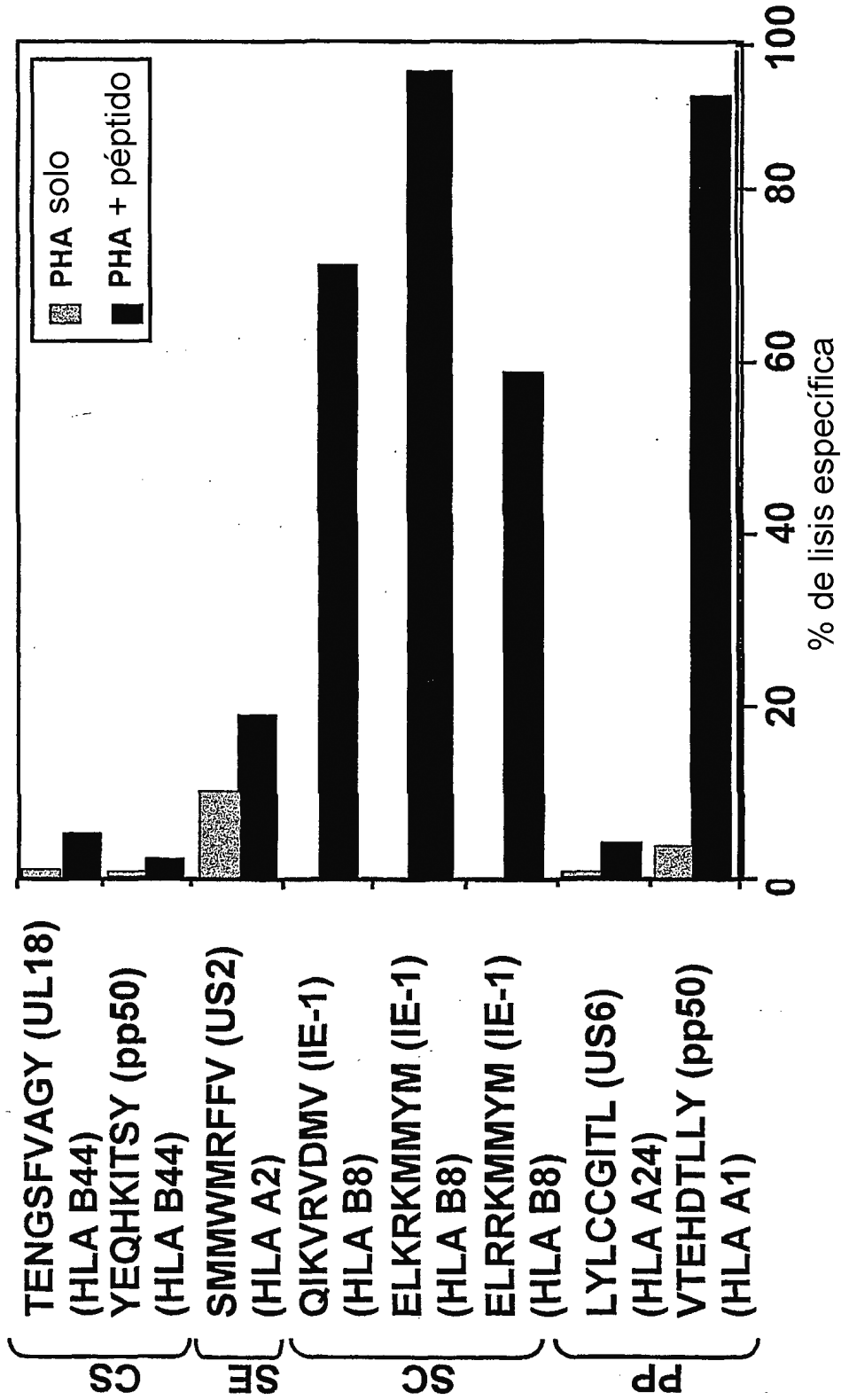


Figura 4b

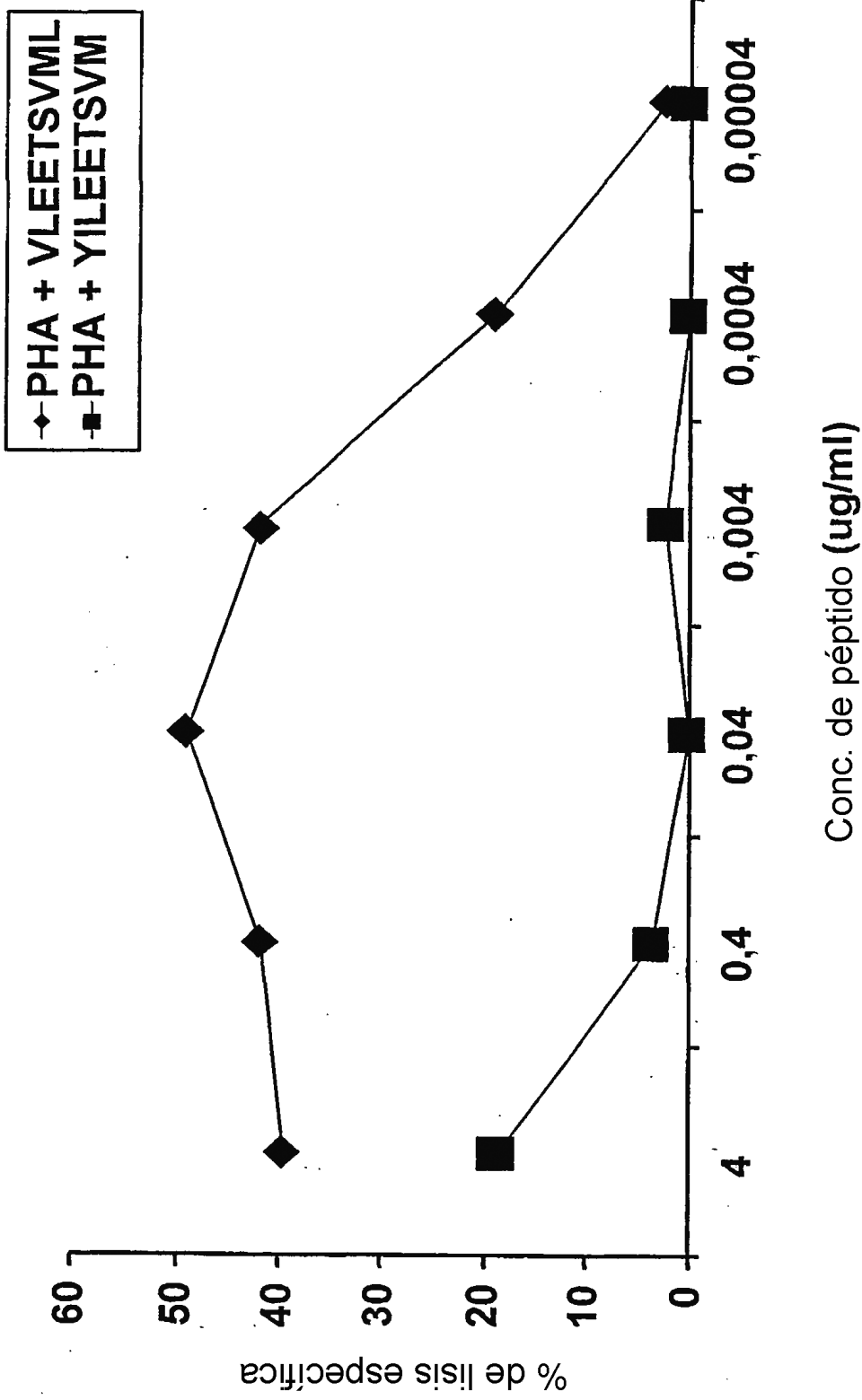


FIGURA 5a

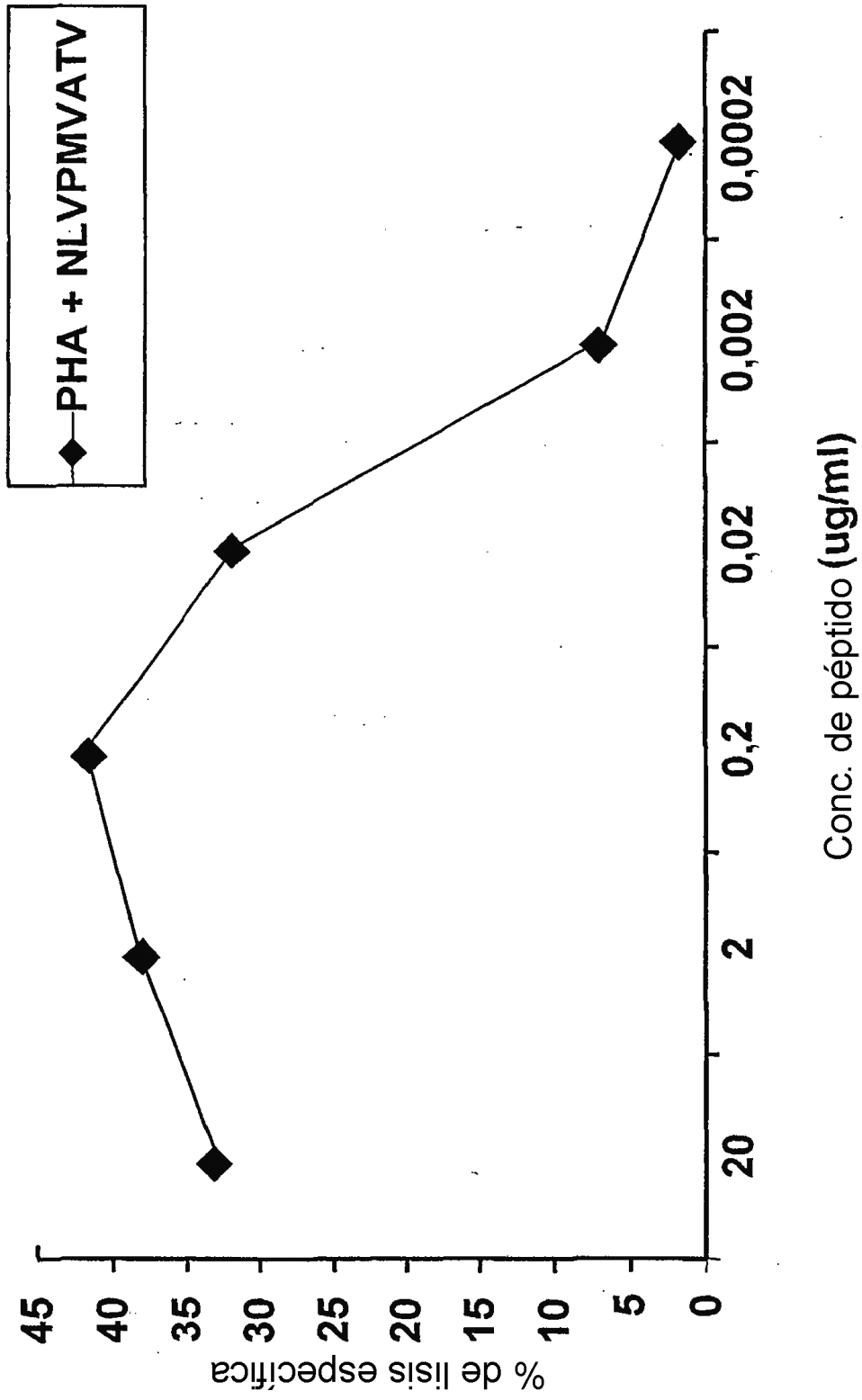


FIGURA 5b

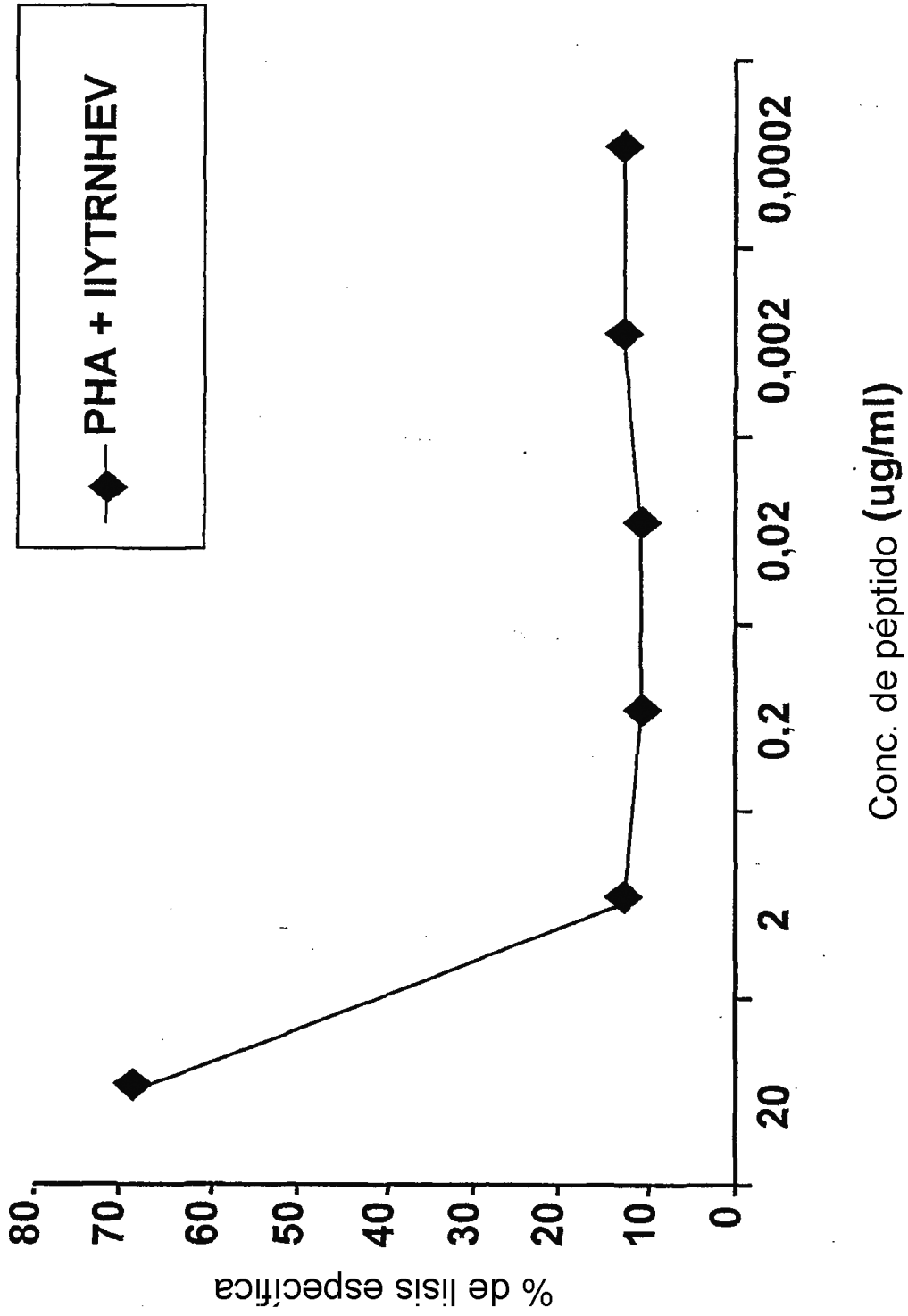


FIGURA 5c

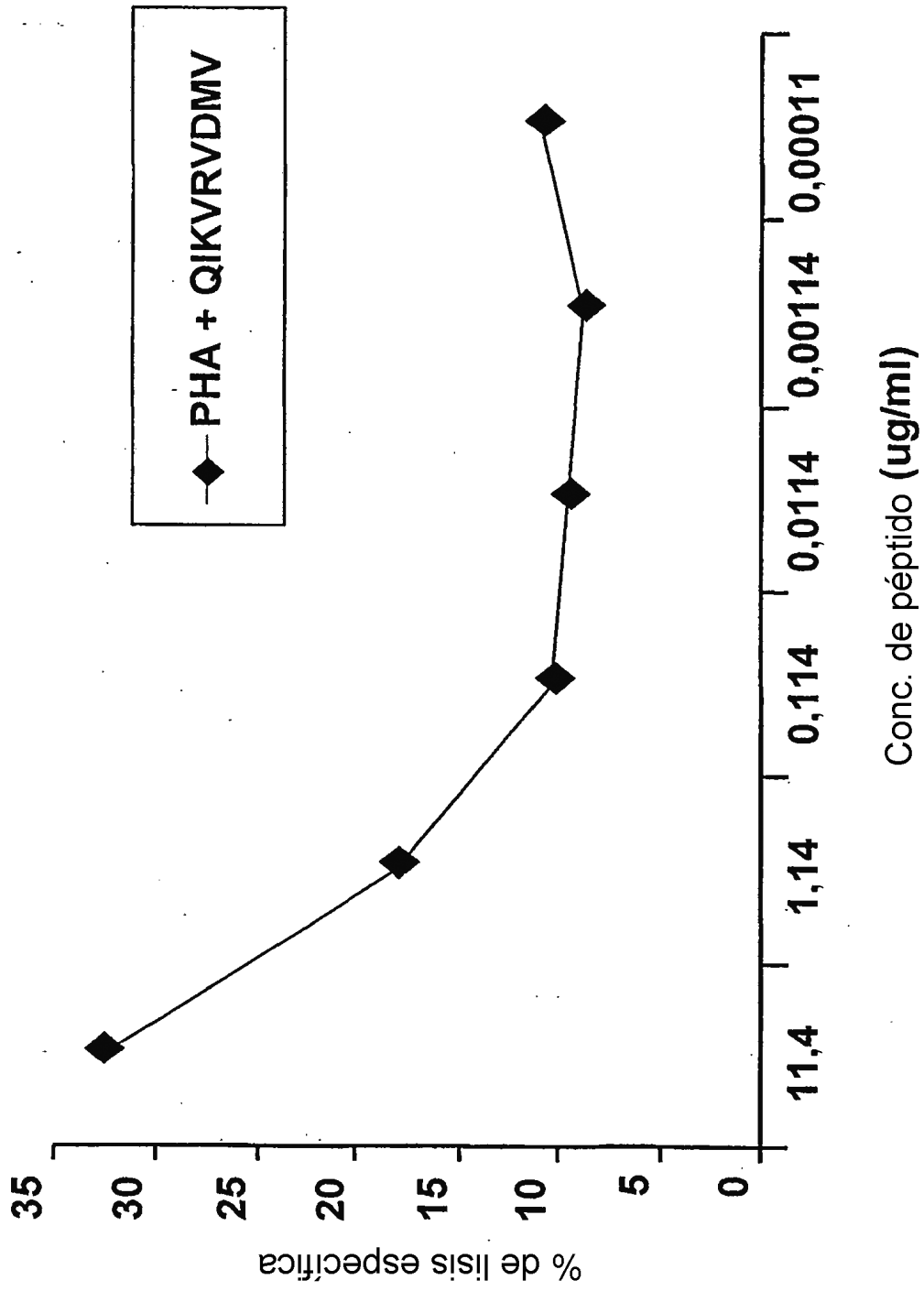


FIGURA 5d



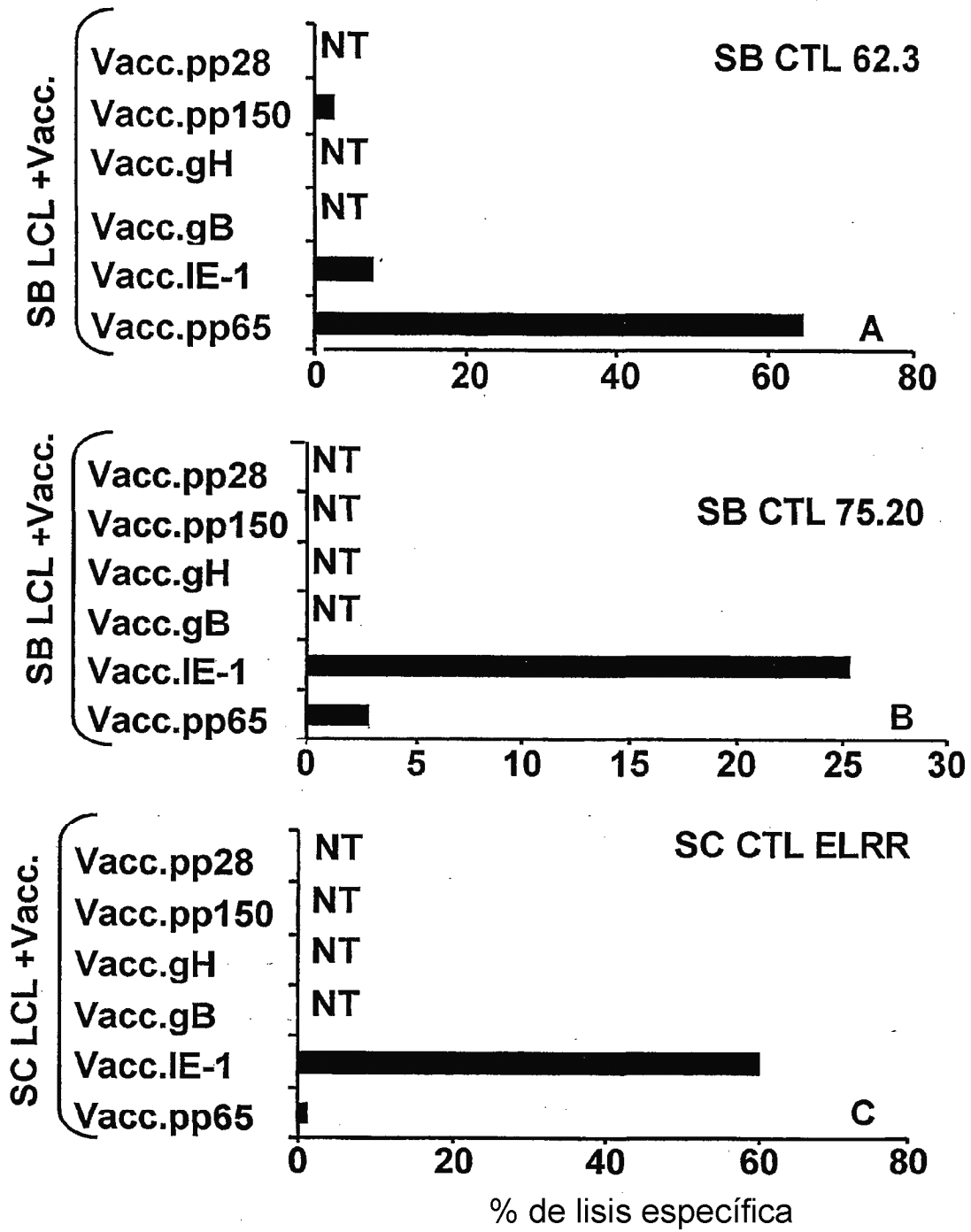


FIGURA 6

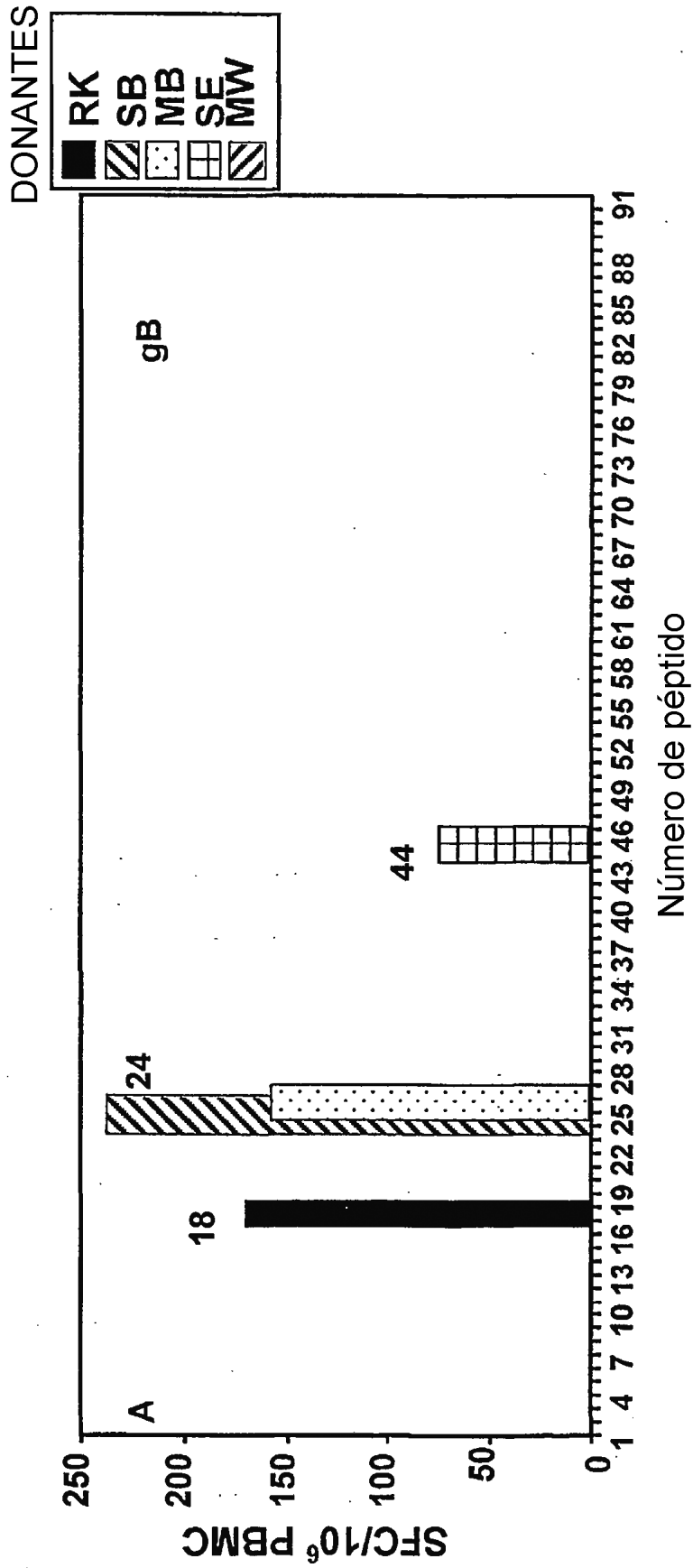


FIGURA 7a

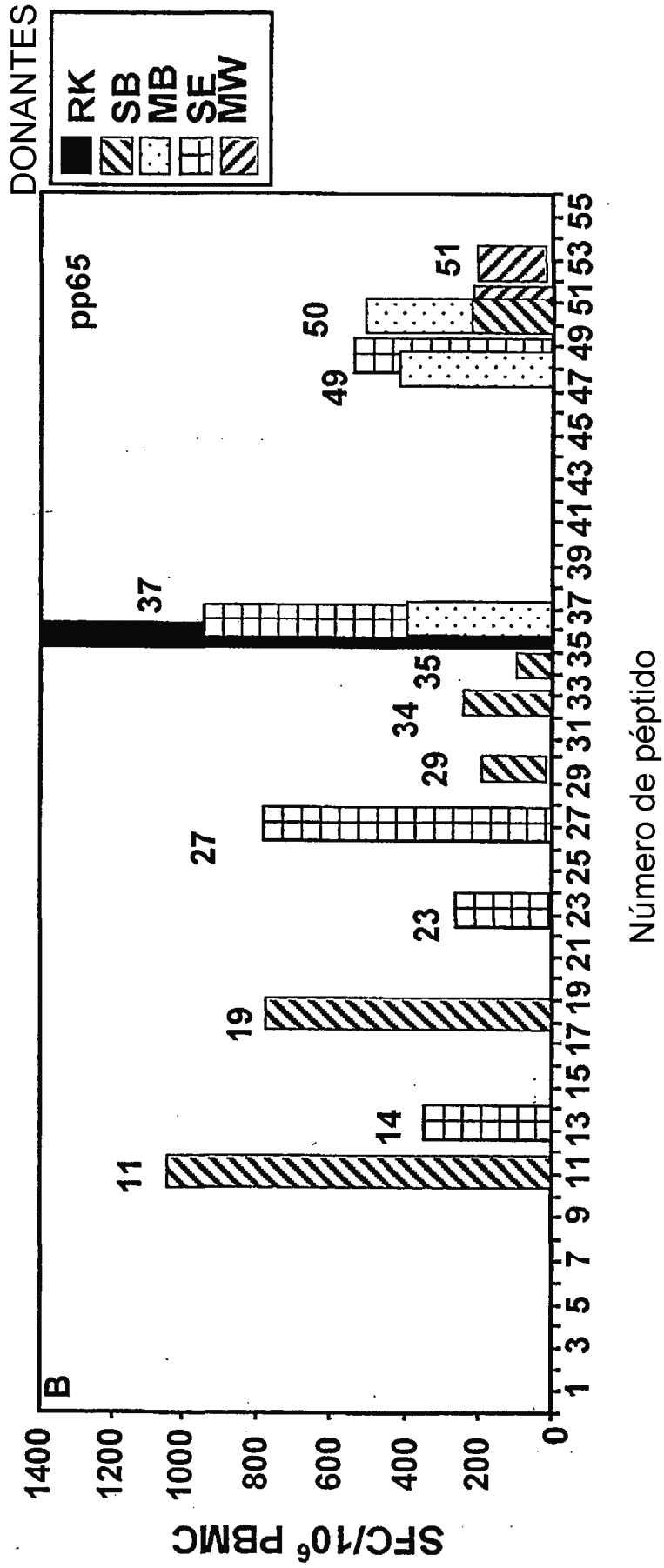


FIGURA 7B

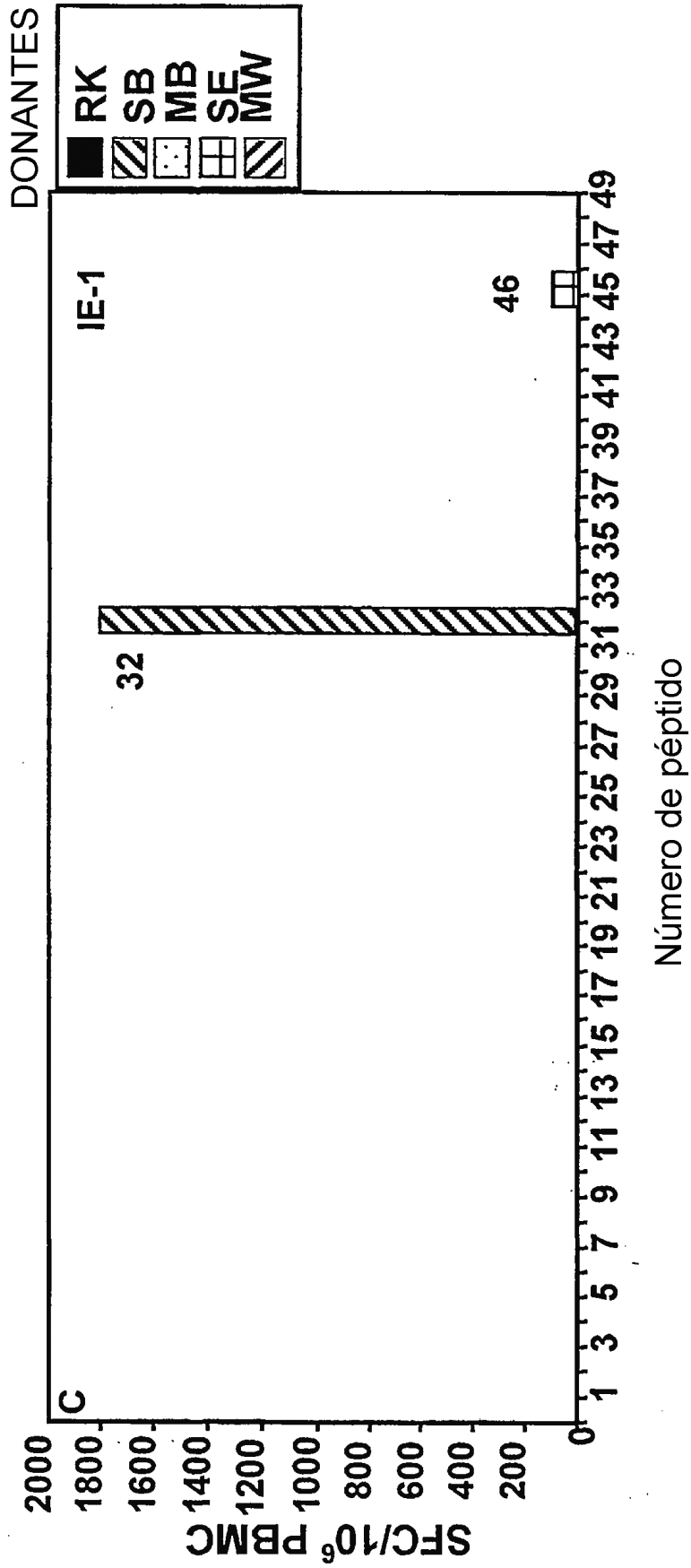


FIGURA 7c

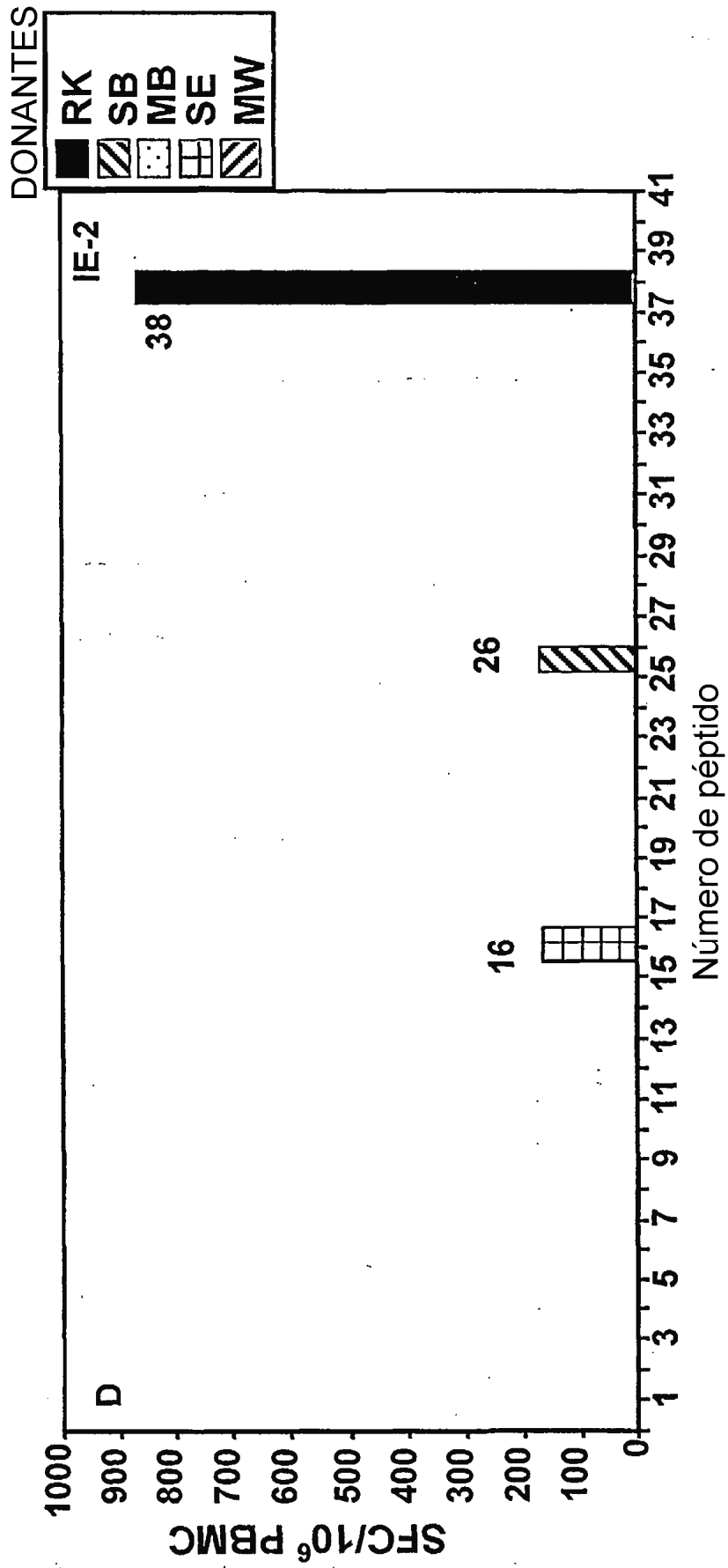


FIGURA 7d

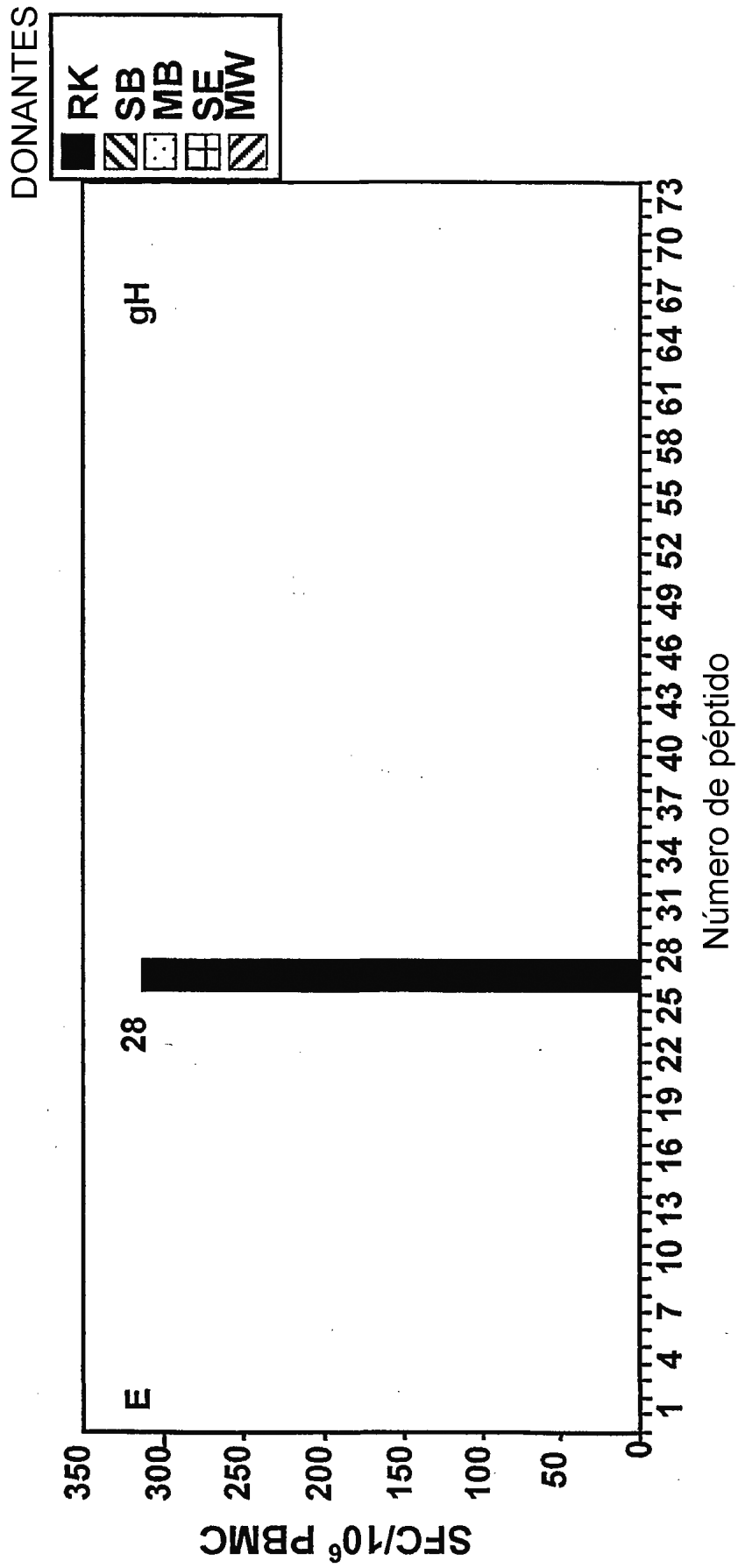


FIGURA 7e

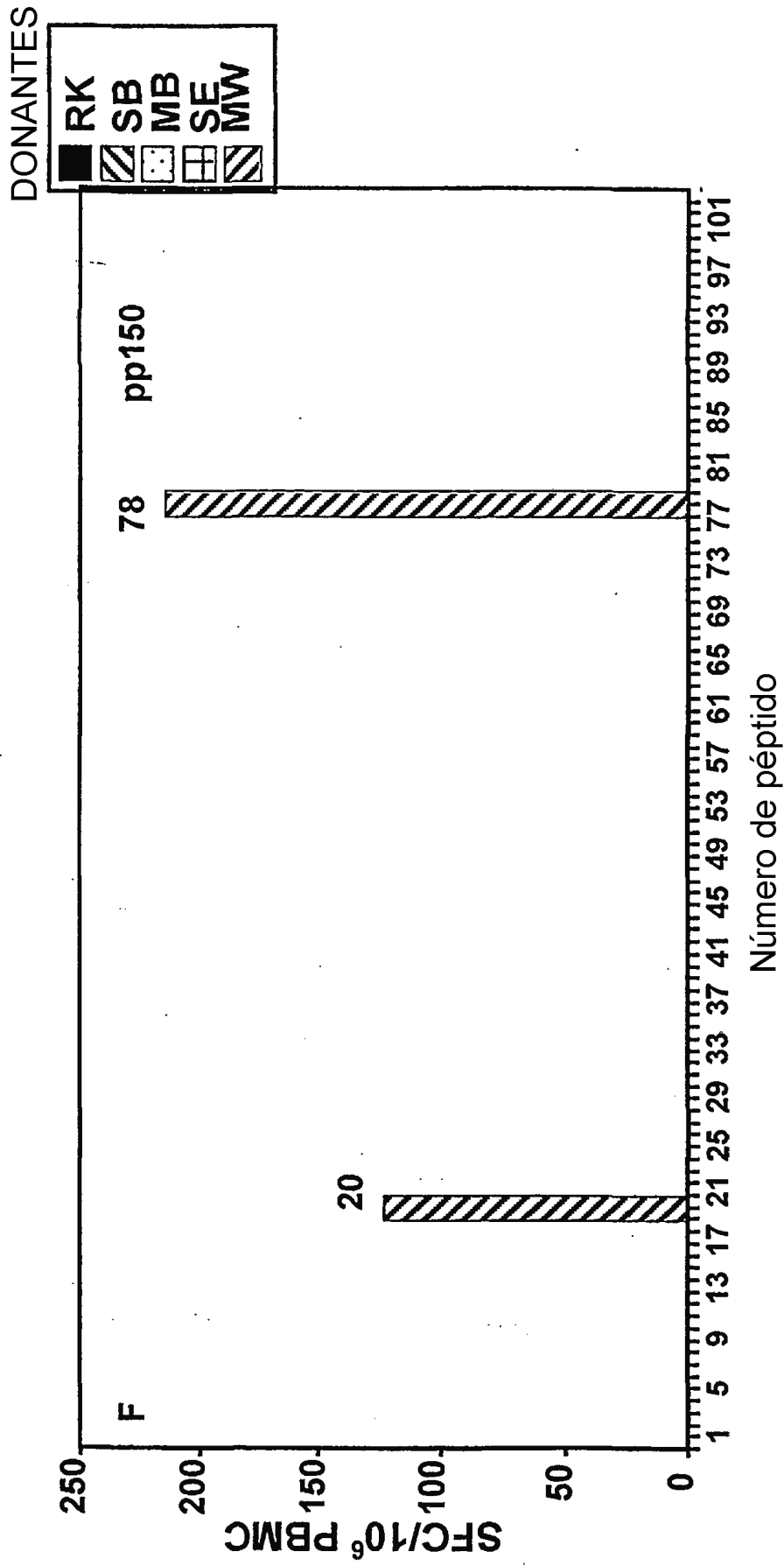


FIGURA 7f

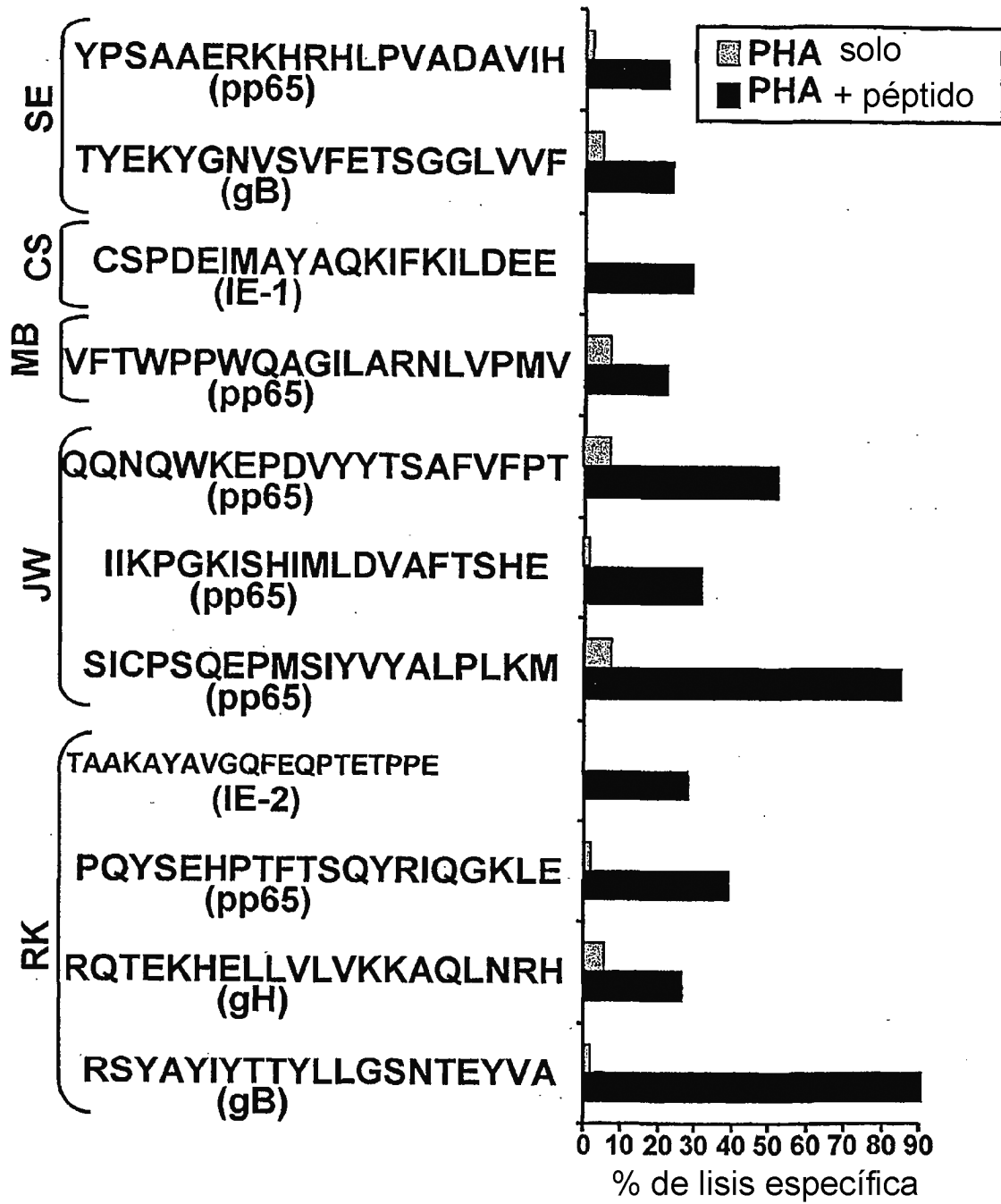


FIGURA 8



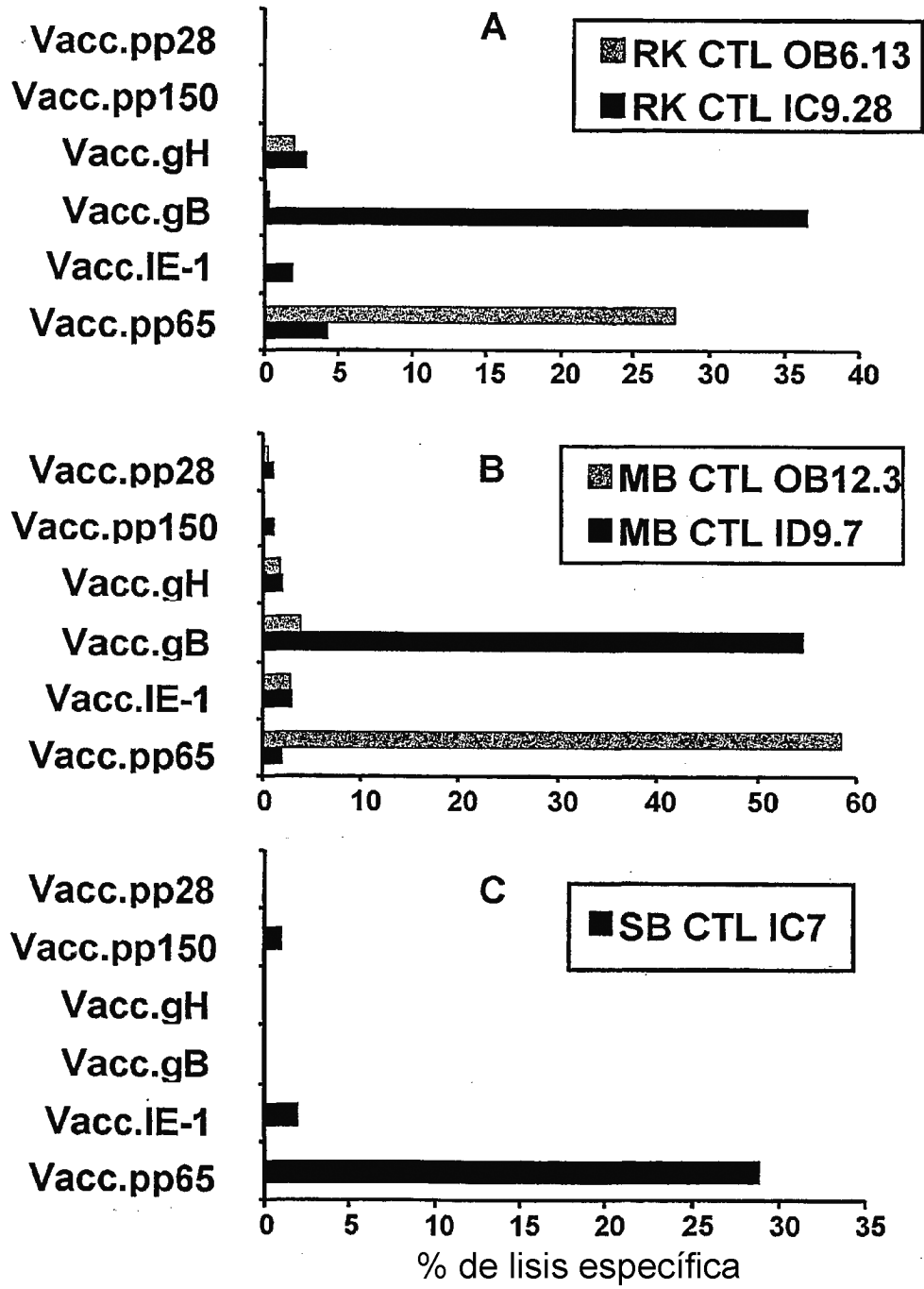


FIGURA 9

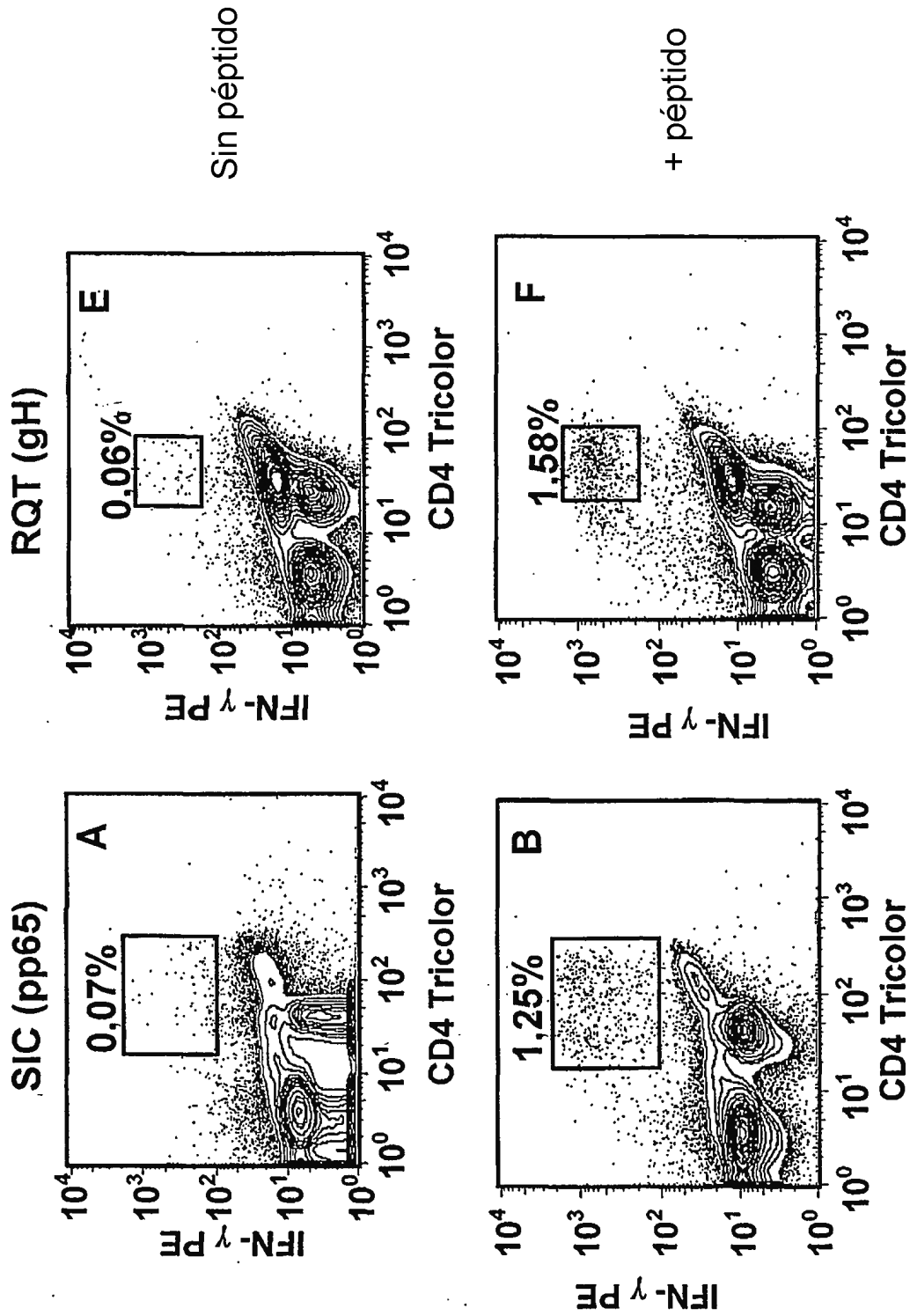


FIGURA 10a

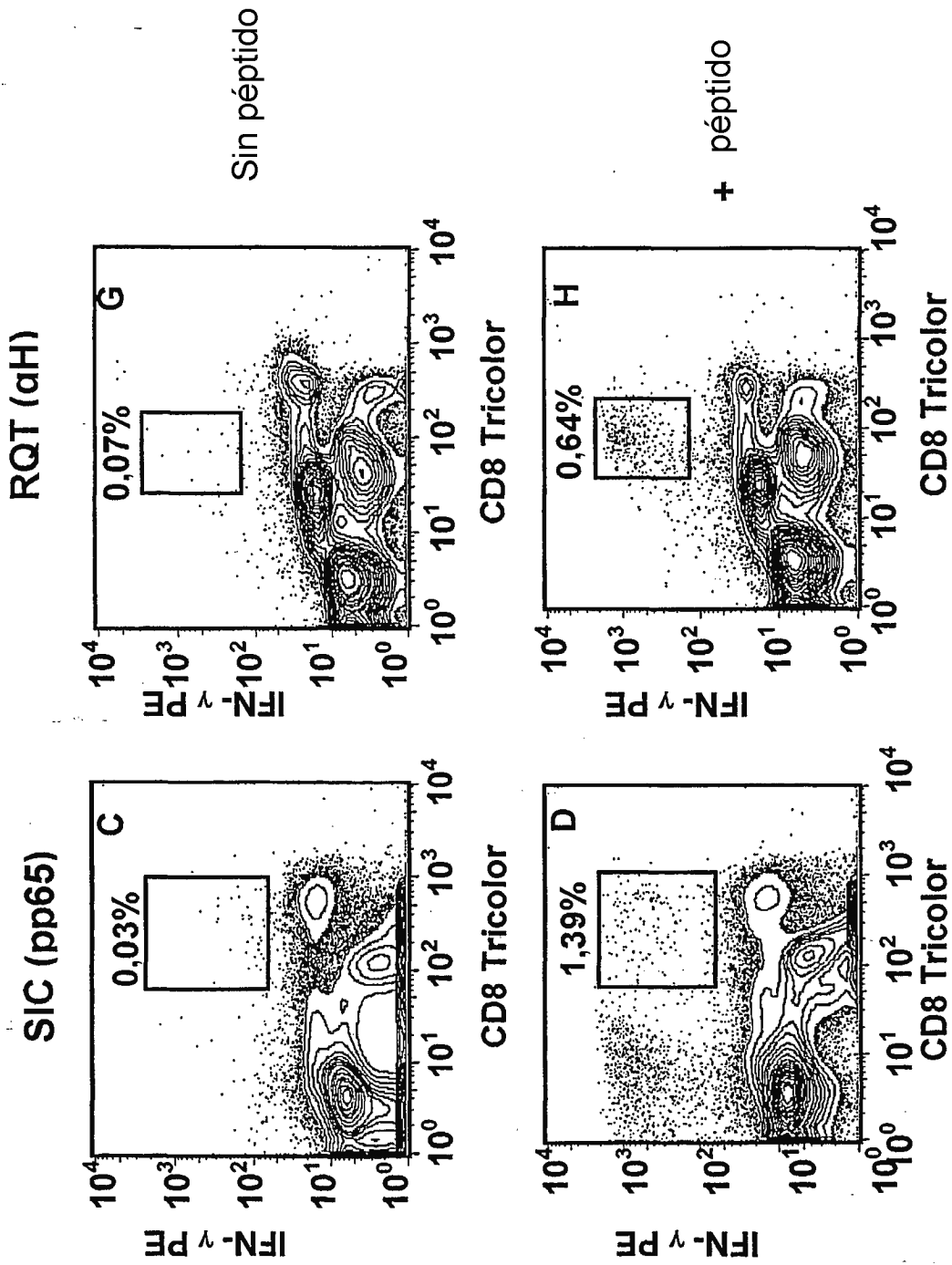


FIGURA 10b

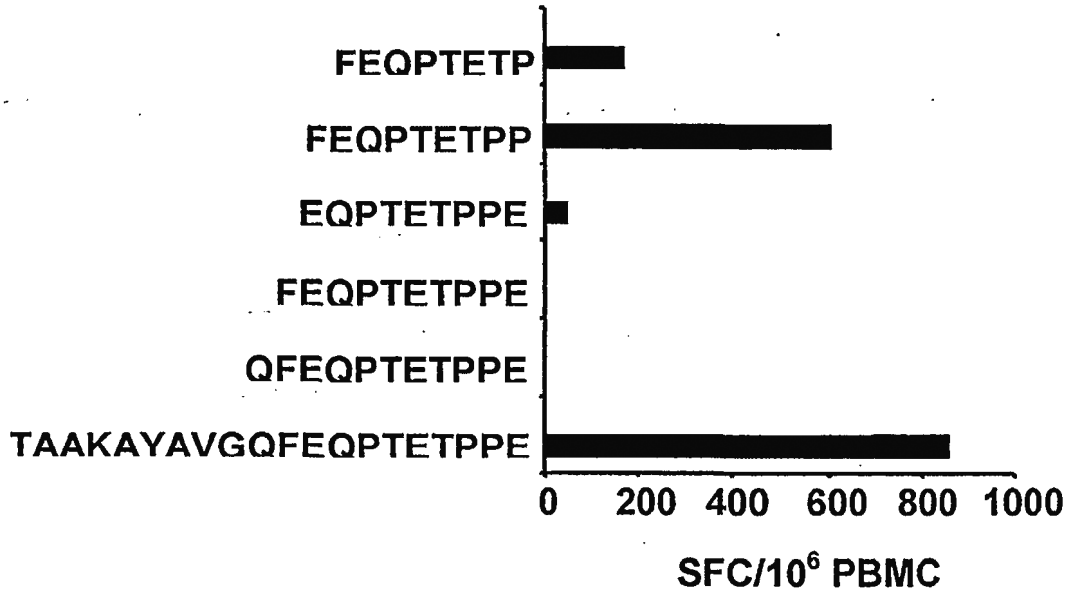


FIGURA 11a

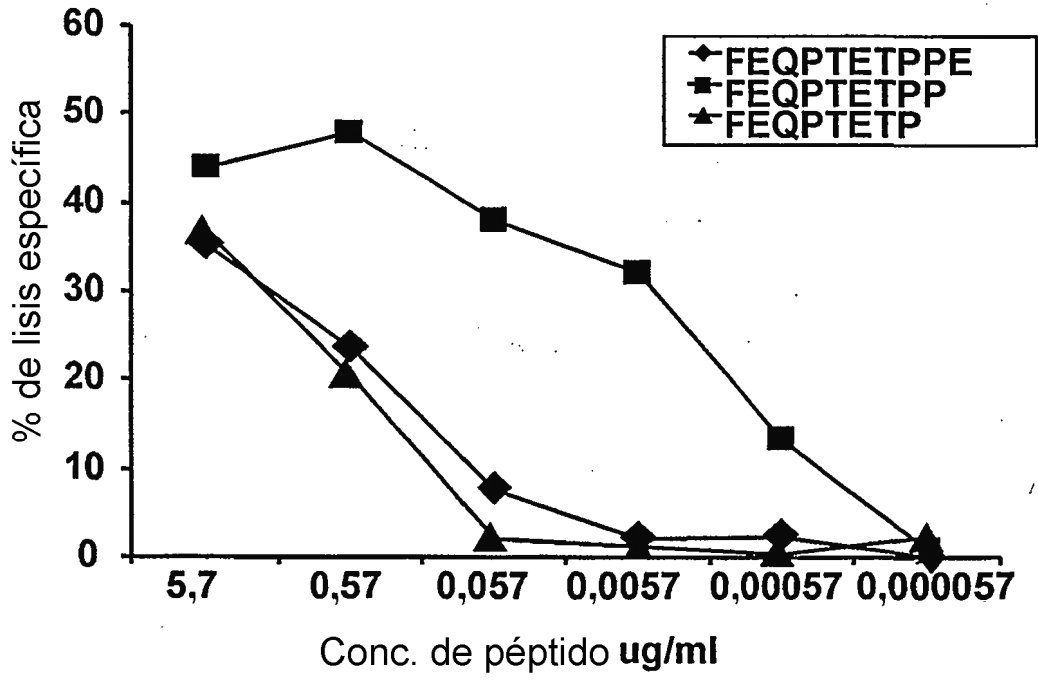


FIGURA 11b

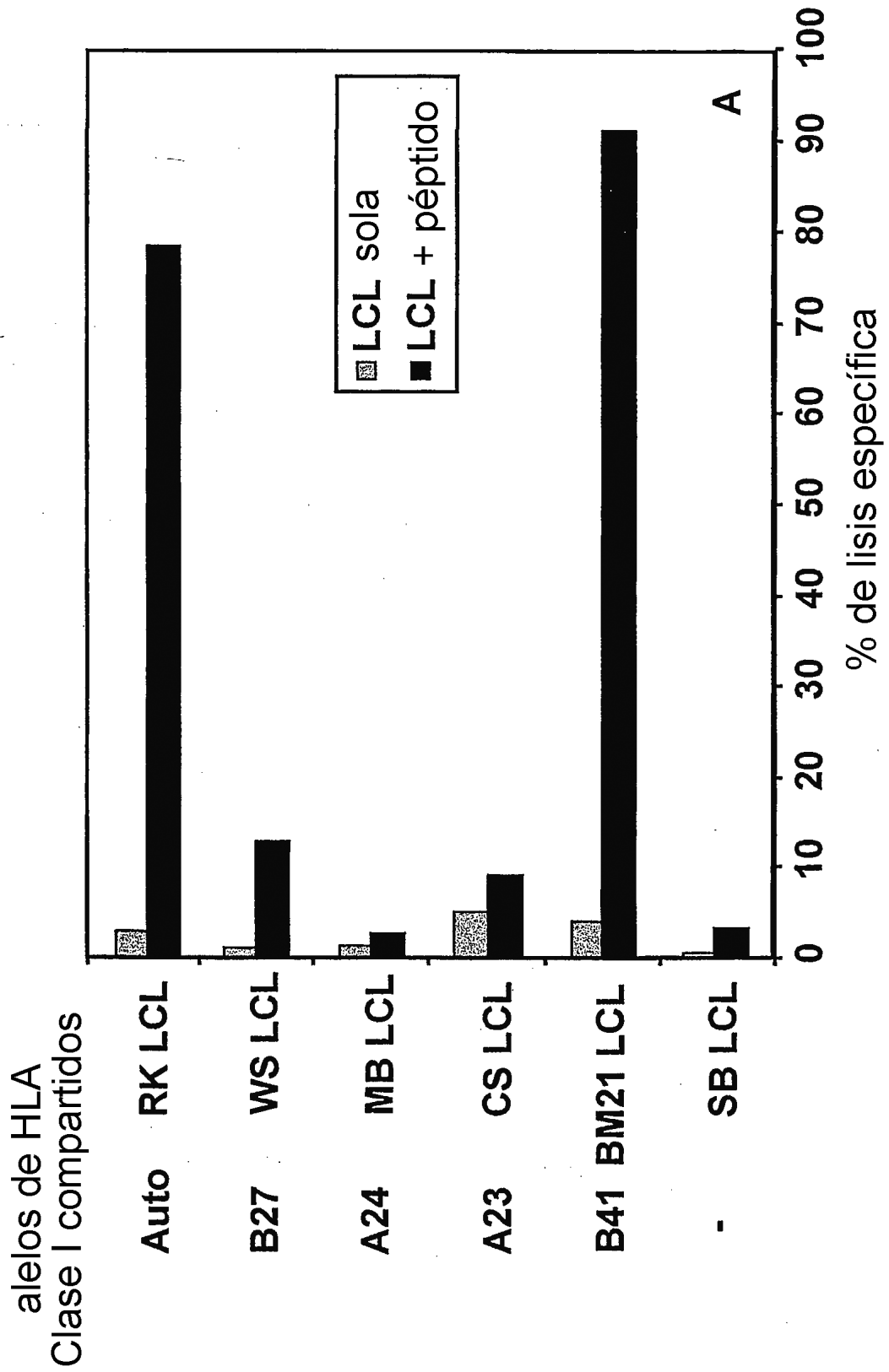


FIGURA 12a

alelos de HLA  
Clase I compartidos

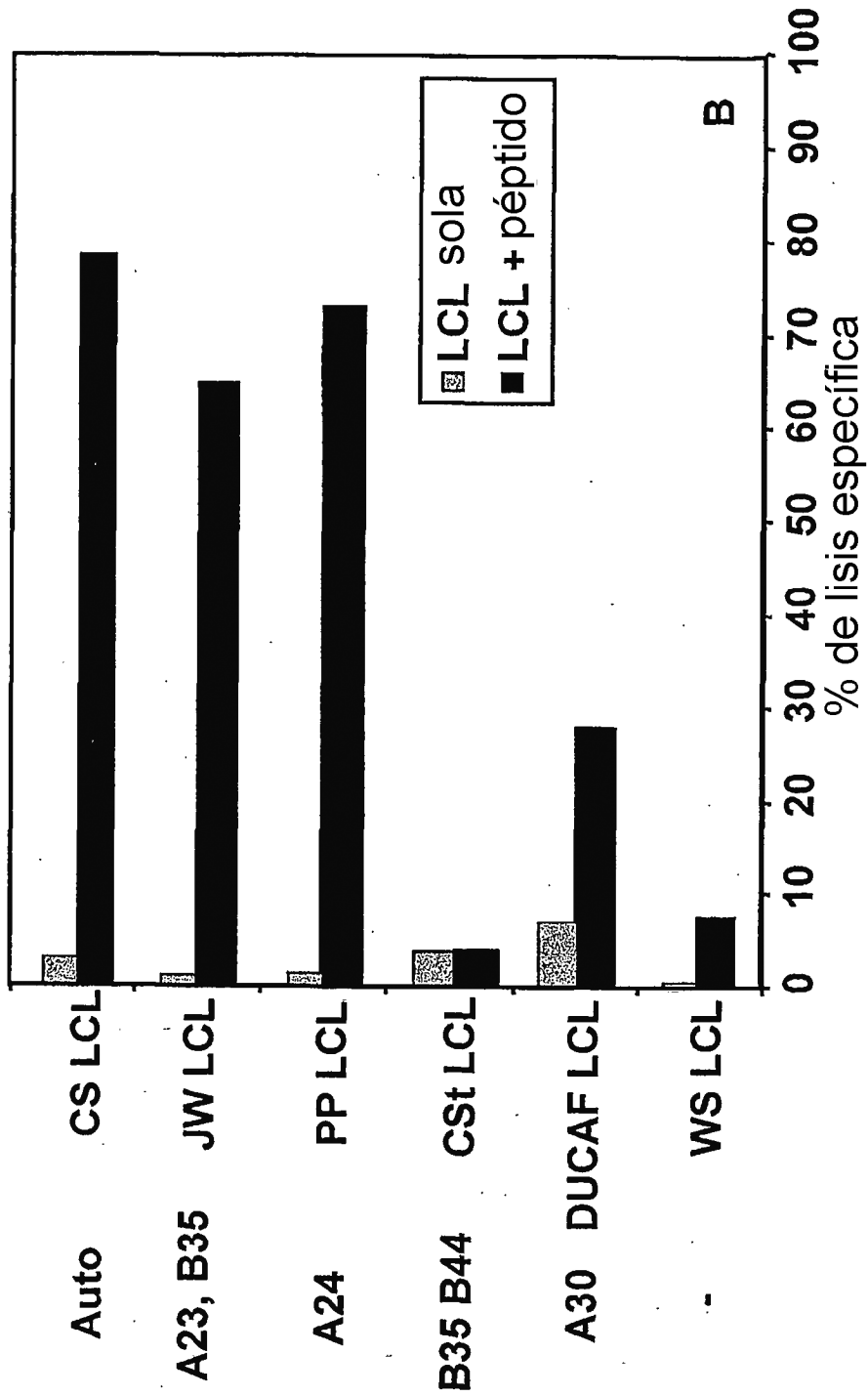


FIGURA 12b