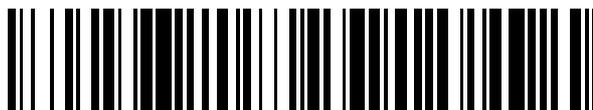


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 451**

51 Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C07K 14/195 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2003 E 03783852 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 1546206**

54 Título: **Nuevos lipopéptidos inmunógenos que comprenden epítomos de linfocitos T auxiliares y de linfocitos T citotóxicos (CTL)**

30 Prioridad:

12.08.2002 US 403328 P

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

11.05.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JACKSON, DAVID y
ZENG, WEIGUANG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 535 451 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 lipopéptidos inmunógenos que comprenden epítomos de linfocitos T auxiliares y de linfocitos T citotóxicos (CTL)

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere en general al campo de la inmunología, y más particularmente a reactivos para generar respuestas celulares contra un inmunógeno peptídico, y a métodos para usar dichos reactivos para potenciar la respuesta inmunitaria de un sujeto, o para la vacunación de un sujeto. Incluso más específicamente, la descripción se refiere a nuevos lipopéptidos que tienen actividad inmunógena potenciada, específicamente una capacidad potenciada para activar una respuesta de linfocito T frente a un epítomo de linfocito T CD8+ para inducir
- 10 inmunidad mediada por células frente a un patógeno invasor o una célula tumoral. También proporciona formulaciones y composiciones de vacuna que comprenden dichos lipopéptidos, tales como, por ejemplo, en combinación con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y métodos para preparar y usar las formulaciones y composiciones de vacuna de la invención.

Antecedentes de la invención

15 1. General

Esta memoria descriptiva contiene información de secuencia de aminoácidos preparada usando PatentIn Versión 3.1, presentada en el presente documento tras el Resumen. Cada secuencia se identifica en el listado de secuencias mediante el indicador numérico <210> seguido del identificador de secuencia (por ejemplo, <210>1, <210>2, etc.). La longitud de cada secuencia y el organismo fuente se indican mediante la información proporcionada en los

20 campos del indicador numérico <211 > y <213>, respectivamente. Las secuencias a las que se hace referencia en la memoria descriptiva se definen mediante la expresión "SEC ID NO:", seguida del identificador de secuencia (por ejemplo, SEC ID NO: 1 se refiere a la secuencia designada como <400>1).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "derivado de" debe tomarse para indicar que puede obtenerse un número entero especificado a partir de una fuente particular, aunque no necesariamente de manera

25 directa de esa fuente.

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

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

- 35 1. Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Segunda Edición (1989), los Vol I, II, y III completos;
2. DNA Cloning: A Practical Approach, Vol. I y II (D. N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, texto completo;
3. Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (M. J. Gait, ed., 1984) IRL Press, Oxford, texto completo, y particularmente los artículos en el mismo de Gait, págs.1-22; Atkinson et al., págs. 35-81; Sproat et al., págs. 83-115; y Wu et al., págs 135-151;
- 40 4. Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, texto completo;
5. Animal Cell Culture: Practical Approach, Tercera Edición (John R.W. Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970, texto completo;
6. Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach (1986) IRL Press, Oxford, texto completo;
- 45 7. Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984);
8. Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), series completas;
9. J.F. Ramalho Ortigão, "The Chemistry of Peptide Synthesis" En: Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website (Interactiva, Alemania);
- 50 10. Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. L y Fenichel, R.L. (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 73 336-342

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

Descripción de la técnica relacionada

La inmunoterapia o vacunación son atractivas para la profilaxis o terapia de una amplia variedad de trastornos, tales como, por ejemplo, ciertas enfermedades infecciosas o cánceres. Sin embargo, la aplicación y el éxito de tales tratamientos están limitados en parte por la escasa inmunogenicidad del epítipo de CTL diana. Los péptidos sintéticos, que representan inmunógenos de linfocitos T, provocan solamente inmunidad débil cuando se suministran aisladamente y, como consecuencia, son muy eficaces en composiciones de vacuna. Las proteínas de longitud completa que contienen epítipos de CTL no entran eficientemente en la ruta de procesamiento del MHC clase I. Adicionalmente, los epítipos de CTL están restringidos para HLA, y un gran grado de polimorfismo de HLA en poblaciones humanas significa que las vacunas a base de CTL pueden no proporcionar cobertura amplia a todos los genotipos en una población.

15

20

Se usan varias técnicas para potenciar la respuesta inmunitaria de un sujeto contra un inmunógeno peptídico.

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

25

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

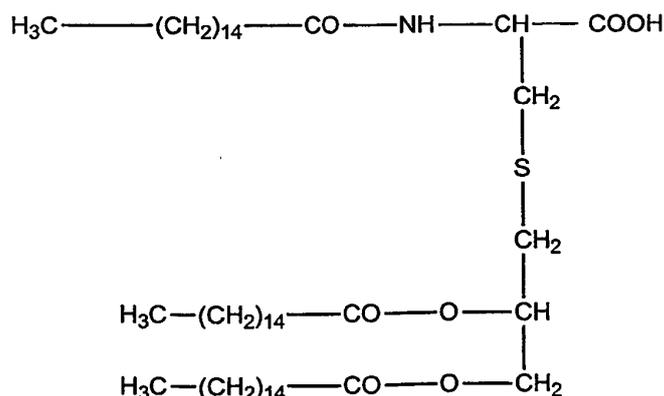
30

35

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

40

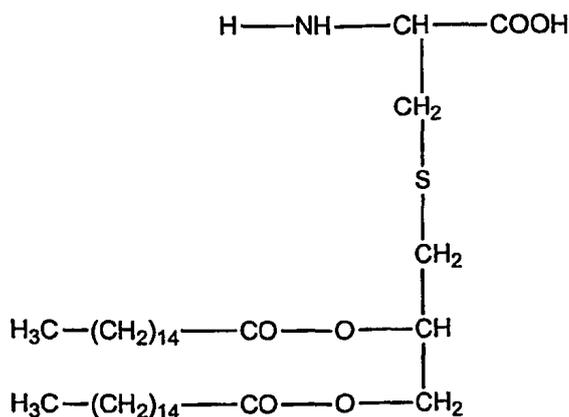
El lipoaminoácido N-palmitoil-S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína, también conocido como Pam₃Cys o Pam₃Cys-OH (Wiesmuller et al., *Z. PhysiolChem.* 364 (1983), p593), es una versión sintética del resto N-terminal de la lipoproteína de Braun que abarca las membranas interna y externa de bacterias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



La patente estadounidense nº 5.700.910 concedida a 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 Pam₃Cys-OH (Wiesmuller et al., Z. Physiol. Chem. 364, pág. 593, 1983), y de lipopéptidos que comprenden estos lipoaminoácidos o un análogo de los mismos en el término N. Los lipopéptidos se preparan acoplando un resto de lipoaminoácido al resto peptídico durante el procedimiento de síntesis.

Se ha mostrado que Pam₃Cys, cuando se acopla a un epítipo de CTL, 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 provocar anticuerpos protectores contra la fiebre aftosa (Wiesmuller et al., Vaccine 7, 29, 1989; patente estadounidense nº 6.024.964 concedida a Jung et al., 15 de febrero de 2000) cuando se acopla al término N de un epítipo de célula B sintético apropiado.

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



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

La generación de una respuesta de linfocitos T CD8⁺ contra un epítipo de CTL dado requiere la generación de una fuerte respuesta de linfocitos T auxiliares. Los linfocitos T auxiliares CD4⁺ funcionan en la inmunidad mediada por células (CMI) segregando citocinas suficientes, tales como, por ejemplo, IL-2, para facilitar de ese modo la expansión de linfocitos T CD8⁺, o interactuando con la célula presentadora de antígeno (APC), haciéndola de ese modo más competente para activar linfocitos T CD8⁺. En consecuencia, es deseable administrar un epítipo de CTL conjuntamente con al menos un epítipo de linfocitos T auxiliares (Vitiello et al., J. Clin. Invest. 95, 341-349, 1995; Livingston et al., J. Immunol. 159, 1383-1392, 1997). Estos epítipos son reconocidos mediante linfocitos T auxiliares en el contexto de las moléculas del MHC clase II sobre la superficie de la APC.

El epítipo de CTL o el epítipo aislado se puede administrar conjuntamente con una gran proteína que tiene un intervalo de epítipos de linfocitos T auxiliares, a fin de alojar la diversidad de alelos de clase II en una población de individuos. Alternativamente, se administran péptidos que contienen epítipos de linfocitos T auxiliares permisivos o promiscuos conjuntamente con el epítipo o epítipos de CTL. Los péptidos que contienen epítipos de linfocitos T auxiliares permisivos o promiscuos se presentan en el contexto de la inmensa mayoría de haplotipos del MHC clase II, de manera que inducen fuertes respuestas de linfocitos T auxiliares CD4⁺ en la mayoría de una población humana no consanguínea. Ejemplos de epítipos de linfocitos T auxiliares permisivos o promiscuos son el péptido del toxoide tetánico, pfg27 de *Plasmodium falciparum*, lactato deshidrogenasa, y gp 120 del VIH (Contreas et al., Infect. Immun, 66, 3579-3590, 1998; 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 n° PCT/AU00/00070 (WO 00/46390) también describen epítipos de linfocitos T auxiliares procedentes de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F). Ciertos epítipos de linfocitos T auxiliares promiscuos promueven fuertes respuestas de CTL contra un epítipo de CTL dado, y pueden evitar ciertas respuestas inmunitarias limitadas por haplotipo (Kaumaya et al., J. Mol. Recog. 6, 81-94, 1993).

De manera habitual, una preparación de vacuna comprenderá una mezcla de polipéptidos que comprenden el epítipo de linfocitos T auxiliares y el epítipo de CTL; sin embargo, también se conoce administrar un único polipéptido que comprende tanto el epítipo de linfocitos T auxiliares como el epítipo de CTL.

Se han descrito inmunógenos sintéticos para provocar respuestas de aclaramiento viral pulmonares que contienen péptidos que representan determinantes para linfocitos T CD4 y CD8 (péptidos TH y CTL, respectivamente) junto con dos o cuatro grupos de ácido palmítico (Pal) (Deliyannis et al, Journal of Virology, 76.9, 4212-4221, 2002). También se describe un epítipo de CTL derivado del virus del sarampión, al que se añadió sintéticamente un resto palmitoílico (Stittelaar, Vaccine, 20, 249-261, 2002).

Sumario de la invención

En el trabajo que condujo a la presente invención, los inventores buscaban métodos para producir lipopéptidos altamente inmunógenos que tengan un resto lipídico y un resto polipeptídico que comprenden tanto un epítipo de linfocitos T auxiliares como un epítipo de CTL contra los que se desea una respuesta inmunitaria. Los inventores mostraron que se puede producir un lipopéptido muy inmunógeno que comprende tanto epítipos de linfocitos T como epítipos de CTL sintetizando una única molécula polipeptídica que comprende dichos epítipos con un resto de lisina interna o un resto de análogo de lisina interna y acoplado entonces el resto lipídico al grupo amino de cadena lateral de dicho resto de lisina interna o dicho resto de análogo de lisina interna, en oposición a las uniones N-terminales descritas previamente. Esto permite que el lipopéptido de la presente invención se sintetice convenientemente usando una única cadena de aminoácido, no requiriendo de ese modo ninguna modificación post-sintética para incorporar ambos epítipos.

Situando dicho uno o más restos de lisina o uno o más restos de análogo de lisina en ubicaciones predeterminadas dentro del polipéptido durante la síntesis del péptido, se especifica fácilmente el sitio de unión del lípido. De este modo, se puede seleccionar la colocación del resto lipídico en el lipopéptido para potenciar la utilidad del producto final para formulaciones de vacuna o adyuvante.

Se ha encontrado que la unión del resto lipídico a través del grupo amino en épsilon de cadena lateral de un resto de lisina interna, o el grupo de cadena lateral terminal de un resto de análogo de lisina interna situado entre las secuencias de aminoácidos del epítipo de linfocitos T auxiliares y el epítipo de CTL, proporciona una potenciación de la maduración de células dendríticas cuando se compara con estructuras lineales obtenidas en las que el lípido se une al término N del péptido.

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

La presente invención engloba claramente la unión de un resto lipídico a través del grupo amino en épsilon de un resto de lisina interna presente entre la secuencia de aminoácidos del epítipo de linfocitos T auxiliares y la secuencia de aminoácidos del epítipo de CTL. Por "interna" se quiere decir una localización distinta del término N o del término C de un polipéptido que comprende un epítipo de linfocitos T auxiliares y un epítipo de CTL. Como conocerá una persona experta, la solubilidad de una vacuna que contiene epítipos de CTL es muy deseable para producir formulaciones de vacuna en una base comercial.

El resto lipídico se une vía el grupo amino en épsilon de un resto de lisina situado entre las secuencias de aminoácidos del epítipo de linfocitos T auxiliares y el epítipo de CTL.

Opcionalmente, se añade uno o más espaciadores de aminoácidos entre el epítipo de linfocitos T auxiliares y el epítipo de CTL, tal como, por ejemplo, en cualquier lado de una lisina interna situada entre dichos epítipos.

También puede añadirse un espaciador de cualquier tipo convencional entre el resto lipídico y el resto polipeptídico. Espaciadores particularmente preferidos en este contexto consisten en dímeros, trímeros tetrámeros, etc., de serina.

También se contemplan para uso en este contexto espaciadores alternativos, tales como, por ejemplo, dímeros, trímeros tetrámeros, de arginina, o ácido 6-aminohexanoico.

Como se ejemplifica aquí, los presentes inventores produjeron el lipopéptido de la invención acoplado el resto lipídico a un grupo amino en épsilon expuesto de un resto de lisina interna en el resto del péptido sintético.

5 Opcionalmente, puede añadirse un espaciador al grupo amino en épsilon expuesto antes de la adición del resto lipídico.

Como será manifiesto a partir de la descripción aquí, un lipoaminoácido de Fórmula (III) o (IV) se puede añadir directamente al grupo amino en épsilon del resto de lisina interna o al grupo de cadena lateral terminal de un resto de amino de lisina interna. También son útiles los lipoaminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: (i) 10 Pam₂Cys (también conocido como dipalmitoil-S-gliceril-cisteína o S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína), (ii) Ste₂Cys (también conocido como diestearoil-S-gliceril-cisteína o S-[2,3-bis(estearoiloxi)propil]cisteína), Lau₂Cys (también conocido como dilauroil-S-gliceril-cisteína o S-[2,3-bis(lauroiloxi)propil]cisteína), y Oct₂Cys (también conocido como dioctanoil-S-gliceril-cisteína o S-[2,3-bis(octanoiloxi)propil]cisteína).

15 Como se ejemplifica aquí, los lipopéptidos de la invención dirigidos contra el virus de la gripe indujeron una respuesta de CTL específica del virus en ausencia de adyuvante externo, como se refleja por su capacidad para inducir potentes respuestas de aclaramiento del virus mediadas por CTL, para inducir migración de linfocitos T CD8+ a los pulmones, y para aumentar la expresión superficial de moléculas del MHC clase II en células dendríticas (DC) inmaduras. La maduración potenciada de las células dendríticas tras la administración de los lipopéptidos sujeto es consistente con la presentación potenciada de epítomos de linfocitos T auxiliares en comparación con lipopéptidos 20 que tienen lípido acoplado N-terminalmente.

Como quedará claro para los expertos en la técnica, la naturaleza de los epítomos de linfocitos T auxiliares y de epítomos de CTL no es crítica en el contexto de la presente invención. El enfoque novedoso de unir el resto lipídico al grupo amino en épsilon de uno o más restos de lisina interna dentro de la porción polipeptídica del constructo tiene una aplicación amplia. En consecuencia, basándose en los resultados presentados aquí, se entenderá que puede 25 usarse un amplio intervalo de epítomos de linfocitos T auxiliares y de epítomos de CTL en los constructos lipopeptídicos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática que muestra la estructura generalizada de los constructos peptídicos y lipopeptídicos usados en este estudio. Las estructuras peptídicas consistieron en un epítomo de linfocitos T 30 auxiliares CD4⁺ [Th] y un epítomo de célula CTL [CTL] ensamblados como secuencias lineales en tándem con un resto de lisina interna enlazante (es decir, [Th]-Lys-[CTL]) o sin ninguna lisina interna (es decir, [Th]-[CTL]). Los lipopéptidos fueron estructuras ramificadas en las que un resto lipídico se unió a través del grupo amino en épsilon de un resto de lisina, Lys, situado entre los dos epítomos en el centro aproximado de la molécula (es decir, [Th]-Lys(Pam₃Cys-Ser-Ser)-[CTL]; [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL]; o [Th]-Lys(Pam₁Cys-Ser-Ser)-[CTL]). En el caso de 35 constructos ramificados, el resto de lisina situado en el centro, al que se une el lípido, está representado en cursiva, Lys. En algunos casos se añadieron dos restos de serina (Ser-Ser) entre el péptido y el resto lipídico. Para el lipopéptido Pal₂LysLys[Th]-[CTL], se unieron dos restos de ácido palmítico a los grupos amino en alfa y en épsilon del resto de lisina N-terminal, y se unió [Th] al grupo amino en épsilon de la penúltima lisina en la secuencia de aminoácidos. En el caso de [Th]-Lys(Chol₂Lys-Ser-Ser)-[CTL], se unieron dos restos de colesterol a un resto de 40 lisina N-terminal.

La Figura 2 es una representación de las secuencias de aminoácidos principales de los restos peptídicos unidos a los restos lipídicos para las estructuras mostradas en la Figura 1. Los péptidos no lipidados que comprenden estas secuencias de aminoácidos se designaron según lo siguiente:

45 (i) [Th] que consiste en un epítomo de linfocitos T auxiliares CD4⁺ procedente de la cadena ligera de hemaglutinina del virus de la gripe como se expone en SEC ID NO: 1;

(ii) [CTL] que consiste en un epítomo de CTL restringido para H-2^d inmunodominante que consiste en los restos de aminoácidos 147-155 de la nucleoproteína de la cepa A/Puerto Rico/8/34 (PR8; H1N1) del virus de la gripe como se expone en SEC ID NO: 2.

50 (iii) [Th]-[CTL] que consiste en un polipéptido que tiene (i) y (ii). La secuencia del péptido ensamblado se muestra en SEC ID NO: 3;

(iv) [Th]-Lys-[CTL] que consiste en un polipéptido que tiene (i) y (ii) separados por un resto de lisina (resto subrayado en negrita). La secuencia del péptido ensamblado se muestra en SEC ID NO: 4;

55 (v) [P25]-Lys-[SIINFEKL] que consiste en un epítomo de linfocitos T auxiliares de la proteína CDV-F denominada P25 (SEC ID NO: 20) y un epítomo de CTL de ovoalbúmina (SEC ID NO: 173) separados por un resto de lisina (resto subrayado en negrita). La secuencia del péptido ensamblado se muestra en SEC ID NO: 174;

(vi) [P25]-Lys-[LLO91-99] que consiste en un epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína CDV-F denominada P25 (SEC ID NO: 20) y un epítipo de CTL de *Listeria monocytogenes* (SEC ID NO: 172) separados por un resto de lisina (resto subrayado en negrita). La secuencia del péptido ensamblado se muestra en SEC ID NO: 175; y

5 (vii) [P25]-Lys-[HCV] que consiste en un epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína CDV-F denominada P25 (SEC ID NO: 20) y un epítipo de CTL de la proteína del núcleo del virus de la hepatitis C (SEC ID NO: 176) separados por un resto de lisina (resto subrayado en negrita). La secuencia del péptido ensamblado se muestra en SEC ID NO: 177.

Los lipopéptidos que comprenden estas secuencias de aminoácidos se designaron según lo siguiente:

10 (i) [Th]-Lys(Pam₃Cys-Ser-Ser)-[CTL] que consiste en el péptido [Th]-Lys-[CTL] (es decir, SEC ID NO: 4) y un lípido de la Fórmula (III) conjugado al grupo amino en épsilon de la lisina interna (resto subrayado en negrita);

(ii) [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL] que consiste en el péptido [Th]-Lys-[CTL] (es decir, SEC ID NO: 4) y un lípido de la Fórmula (IV) conjugado al grupo amino en épsilon de la lisina interna (resto subrayado en negrita);

15 (iii) [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[LLO91-99] que consiste en el péptido [P25]-Lys-[LLO91-99] y un lípido de la Fórmula (IV) conjugado al grupo amino en épsilon de la lisina interna (resto subrayado en negrita) de dicho péptido;

(iv) [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[SIINFEKL] que consiste en el péptido [P25]-Lys-[SIINFEKL] y un lípido de la Fórmula (IV) conjugado al grupo amino en épsilon de la lisina interna (resto subrayado en negrita) de dicho péptido; y

20 (v) [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[HCV] que consiste en el péptido [P25]-Lys-[HCV] y un lípido de la Fórmula (IV) conjugado al grupo amino en épsilon de la lisina interna (resto subrayado en negrita) de dicho péptido.

La Figura 3 es una representación gráfica que muestra la carga viral reducida de ratones sensibilizados con lipopéptidos a los que se ha hecho referencia en la leyenda de la Figura 1 y expuestos subsiguientemente al virus de la gripe. Los ratones se inocularon intranasalmente con 9 nmoles de los lipopéptidos [Th]-Lys(Pam₃Cys-Ser-Ser)-[CTL] y [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL] en 50 µl de PBS (columnas 2 y 3, respectivamente), o para el péptido [Th]-Lys-[CTL] en 50 µl de PBS (columna 1), o con PBS sola (columna 4). Las designaciones de los péptidos y lipopéptidos son las mismas que para la leyenda de la Figura 2. En el día 9 después de la inmunización, los ratones se anestesiaron usando Penthrane y se expusieron intranasalmente a 30.000 unidades formadoras de placas del virus de la gripe subtipo H3N1 conocido como A/Memphis/1/71 (Mem 71). Cinco días más tarde, se retiraron sus pulmones y se estudiaron en busca de la presencia de virus infeccioso mediante ensayo de placa en células MDCK. Cada barra representa el título de la media geométrica de títulos virales de un grupo de cinco ratones BALB/c, y las barras de error representan la desviación estándar de la media. Los números encima de las barras representan el porcentaje de reducción en el título viral del pulmón con respecto al control de PBS.

La Figura 4a es una representación gráfica que muestra el aclaramiento viral potenciado inducido por lipopéptidos en ratones inmunizados que reciben los lipopéptidos citados en la leyenda de la Figura 2. Los ratones se inocularon con 9 nmoles de los lipopéptidos [Th]-Lys(Pam₃Cys-Ser-Ser)-[CTL] y [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL] en 50 µl de PBS (columnas 2 y 3, respectivamente), o para el péptido [Th]-Lys-[CTL] en 50 µl de PBS (columna 1), o con PBS sola (columna 4). En el día 28 tras la inmunización, los ratones se expusieron a 30.000 unidades formadoras de placas del virus Mem 71. Las designaciones de los péptidos y lipopéptidos son las mismas que para la leyenda de la Figura 2. Los datos se expresan como el porcentaje de reducción en el título viral del pulmón en el día 5 después de la exposición. Los datos muestran una reducción potenciada del virus infeccioso en los pulmones de ratones inmunizados con los lipopéptidos [Th]-Lys(Pam₃Cys-Ser-Ser)-[CTL] (columna 2) o [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL] (columna 3) en comparación con el péptido solo (columna 1) o PBS sola (columna 4) a los 5 días después de la exposición.

La Figura 4b es una representación gráfica que muestra la activación potenciada de linfocitos T en ratones inmunizados que reciben los lipopéptidos citados en la leyenda de la Figura 2. Los ratones se inocularon con 9 nmoles de los lipopéptidos [Th]-Lys(Pam₃Cys-Ser-Ser)-[CTL] y [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL] en 50 µl de PBS (columnas 2 y 3, respectivamente), o para el péptido [Th]-Lys-[CTL] en 50 µl de PBS (columna 1), o con PBS sola (columna 4). Los ratones inmunizados se eutanasiaron 9 días después de la inmunización, y se llevó a cabo un lavado bronquialveolar (BAL). Las células adherentes se eliminaron mediante incubación de la muestra de BAL en una cápsula de Petri a 37°C durante 1 hora. Las células no adherentes se recuperaron y se tiñeron para la expresión de CD8 y CD4. Las células se analizaron mediante citometría de flujo. La población linfocítica se identificó basándose en el perfil de dispersión frontal y lateral, y se analizaron 10.000 linfocitos. Los datos se expresan como el porcentaje de células no adherentes en el fluido del BAL que son linfocitos CD8+. Los datos muestran activación potenciada de linfocitos T CD8+ específicos del virus en las muestras del BAL procedentes de ratones inmunizados con los lipopéptidos [Th]-Lys(Pam₃Cys-Ser-Ser)-[CTL] (columna 2) o [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL] (columna 3) en comparación con el péptido solo (columna 1) o PBS sola (columna 4) a 5 días después de la exposición. Las

designaciones de los péptidos y lipopéptidos son las mismas que para la leyenda de la Figura 2.

La Figura 4c es una representación gráfica que muestra la maduración potenciada de células dendríticas en respuesta a los lipopéptidos citados en la leyenda de la Figura 2. Una estirpe de células dendríticas derivadas de bazo de BALB/c (células D1) se incubó toda la noche con 0,45 nmoles/ml del péptido [Th]-Lys-[CTL] (columna 1) o los lipopéptidos [Th]-Lys(Pam₃Cys-Ser-Ser)-[CTL] (columna 2) o [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL] (columna 3), o con medio solo como control negativo (columna 4) o lipopolisacárido como control positivo (LPS; columna 5). El porcentaje de células D1 que expresan niveles elevados de moléculas superficiales del MHC clase II, y por lo tanto en un estado maduro, se determinó mediante citometría de flujo. Las designaciones de los péptidos y lipopéptidos son las mismas que para la leyenda de la Figura 2. Los datos mostraron expresión potenciada de moléculas del MHC clase II sobre la superficie de células dendríticas (es decir, maduración potenciada de células dendríticas) tras la exposición a los péptidos [Th]-Lys(Pam₃Cys-Ser-Ser)-[CTL] o [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL] en comparación con el péptido solo o medio solo.

La Figura 5 es una representación gráfica que muestra la inducción de respuestas de aclaramiento viral pulmonares en ratones inoculados con inmunógenos sintéticos indicados en el eje x, que incluyen cada uno el epítipo de linfocitos T auxiliares CD4⁺ expuesto en SEC ID NO: 1 y el epítipo de CTL restringido para H-2^d expuesto en SEC ID NO: 2. Se inmunizaron intranasalmente grupos de 5 ratones con 9 nmoles de los lipopéptidos especificados en PBS. Los ratones se expusieron 28 días después de la sensibilización a 10^{4,5} PFU del virus de la gripe Mem71 intranasalmente. Los títulos de virus infeccioso en homogenados pulmonares muestreados 5 días tras la exposición se determinaron mediante formación de placas en monocapas de células MDCK. Cada círculo representa el título del virus de un ratón individual, y la recta representa el título de la media geométrica del grupo. El porcentaje de reducción en el título viral medio con respecto al grupo de control de PBS se muestra encima de cada columna de datos.

La Figura 6 es una representación gráfica que muestra el influjo acelerado de linfocitos T CD8⁺ específicos del determinante de CTL en los pulmones de ratones vacunados con lipopéptidos durante la exposición al virus. Los lipopéptidos comprendieron el epítipo de linfocitos T auxiliares CD4⁺ expuesto en SEC ID NO: 1 y el epítipo de CTL restringido para H-2^d expuesto en SEC ID NO: 2. Se inocularon intranasalmente grupos de tres ratones con 9 nmoles de los lipopéptidos indicados. En el día 28 después de la sensibilización, se expusieron intranasalmente a 10^{4,5} PFU del virus de la gripe Mem71 intranasalmente. Las células que segregan IFN-gamma específicas del determinante de CTL se enumeraron en los pulmones de ratones en el día 5 tras la exposición mediante un ensayo de producción de citocinas intracelular. Para cada muestra, se analizaron 10.000 células CD8+. Los datos representan la media y desviación estándar para cada grupo de ratones.

La Figura 7 es una representación gráfica que muestra el influjo acelerado de linfocitos T CD8 específicos del determinante de CTL en los pulmones en ratones inoculados con lipopéptidos tras la exposición viral. Los lipopéptidos comprendieron el epítipo de linfocitos T auxiliares CD4⁺ expuesto en SEC ID NO: 1 y el epítipo de CTL restringido para H-2^d expuesto en SEC ID NO: 2. Los ratones se inocularon intranasalmente con 9 nmoles de los lipopéptidos especificados en PBS. Nueve días después de la inoculación, los ratones se expusieron intranasalmente a 10^{4,5} PFU del virus de la gripe Mem71. En el día 5 después de la infección, los linfocitos T CD8 específicos del determinante de CTL en los pulmones se enumeraron tiñendo los linfocitos de los pulmones con anticuerpo anti-CD8 y con complejos tetrámeros del MHC clase I cargados con el epítipo de CTL. Se analizó un total de 30.000 linfocitos T CD8.

La Figura 8 es una representación gráfica que muestra la actividad de linfocitos T citotóxicos en ratones sin tratamiento previo. La citotoxicidad específica del determinante de CTL *in vivo* se midió usando células de bazo singénicas pulsadas con el determinante de CTL y marcadas con CFSE de alta intensidad. Las células de bazo no pulsadas, marcadas con CFSE de baja intensidad, se usaron como control. Se inyectó intravenosamente una mezcla de 15 x 10⁶ células de cada población de células diana en el día 4 tras la infección en ratones sin tratamiento previo. Los ratones se eutanasiaron 16 h más tarde y los bazos se analizaron en busca de la presencia de poblaciones de células altas en CFSE y bajas en CFSE, mediante citometría de flujo. Para cada muestra, se analizó un total de 1 x 10⁶ linfocitos.

La Figura 9 es una representación gráfica que muestra la actividad de linfocitos T citotóxicos en ratones sensibilizados por lipopéptidos. Un ratón se inoculó intranasalmente con 9 nmoles de [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL] que comprende el epítipo de linfocitos T auxiliares CD4⁺ expuesto en SEC ID NO: 1 y el epítipo de CTL restringido para H-2^d expuesto en SEC ID NO: 2, en PBS. Los ratones se expusieron a Mem71 en el día 28. La citotoxicidad específica del determinante de CTL *in vivo* se midió usando células de bazo singénicas pulsadas con el determinante de CTL y marcadas con CFSE de alta intensidad. Las células de bazo no pulsadas, marcadas con CFSE de baja intensidad, se usaron como control. Se inyectó intravenosamente una mezcla de 15 x 10⁶ células de cada población de células diana en el día 4 después de la infección en ratones expuestos y sensibilizados por lipopéptidos. Los ratones se eutanasiaron 16 h más tarde y los bazos se analizaron en busca de la presencia de poblaciones de células altas en CFSE y bajas en CFSE, mediante citometría de flujo. Para cada muestra, se analizó un total de 1 x 10⁶ linfocitos.

La Figura 10 es una representación gráfica que muestra la capacidad de diversos inmunógenos a base de péptidos

de inducir CTL específico del epítipo. Los lipopéptidos comprendieron el epítipo de linfocitos T auxiliares CD4⁺ expuesto en SEC ID NO: 1 y el epítipo de CTL restringido para H-2^d expuesto en SEC ID NO: 2. Se inocularon intranasalmente grupos de tres ratones con diversos lipopéptidos en PBS, y se expusieron a Mem71 en el día 28. A fin de analizar la citotoxicidad específica del determinante de CTL *in vivo*, células de bazo singénicas se pulsaron con el determinante de CTL y se marcaron con CFSE de alta intensidad. La lisis específica del antígeno se controló coinyectando células de bazo singénicas marcadas con CFSE de baja intensidad. Se inyectó intravenosamente una mezcla de 15×10^6 células de cada población de células diana en el día 4 tras la infección. Los ratones se eutanasiaron 16 h más tarde y los bazos se analizaron en busca de la presencia de poblaciones de células altas en CFSE y bajas en CFSE, mediante citometría de flujo. Para cada muestra se analizó un total de 1×10^6 linfocitos. Los ratones individuales se representan mediante los cuadrados en negro, y las barras representan el título de la media geométrica.

La Figura 11 es una representación gráfica que muestra inducción de células productoras de interferón-gamma por lipopéptido. Para inocular a los ratones, se usó el péptido que comprende un epítipo de linfocitos T auxiliares y un epítipo de CTL de *Listeria monocytogenes* enlazado vía el grupo amino en épsilon de un resto de lisina interna situado entre dichos epítopos a Pam₂Cys (es decir, el péptido [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[LLO91-99] dado en la Figura 2 y basado en SEC ID NO: 175), o el lipopéptido o lipopéptidos basados en esta estructura en la que Pam₂Cys se enlazó a través del grupo amino en épsilon de dicha lisina. Se inocularon intravenosamente cinco ratones BALB/c con bacterias, o subcutáneamente con 9 nmoles de péptido lipidado [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[LLO91-99] o 9 nmoles de péptido no lipidado [P25]-Lys-[LLO91-99] (SEC ID NO: 175; Figura 2) o disolución salina tamponada con fosfato (PBS), como se indica en el eje X. Se obtuvieron esplenocitos de los animales inmunizados y se estimularon *in vitro* con el epítipo de CTL aislado que tiene la secuencia expuesta en SEC ID NO: 172 (barras blancas) o con nada de antígeno (barras sombreadas), y 28 días más tarde se midió el número de células productoras de (IFN-gamma) presentes. La ordenada indica el número de células productoras de IFN-gamma por 1.000.000 esplenocitos. Los datos muestran números potenciados de células productoras de IFN-gamma para ratones inmunizados con lipopéptido, indicando una capacidad potenciada de los lipopéptidos para activar linfocitos T con respecto a péptido no lipidado.

La Figura 12 es una representación gráfica que muestra protección potenciada frente a infección por *L. monocytogenes* para ratones inmunizados con el lipopéptido designado [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[LLO91-99] en la Figura 2 (basado en SEC ID NO: 175). Se inocularon intravenosamente cinco ratones BALB/c con 1.000 bacterias (columna 1), o se inmunizaron subcutáneamente con PBS (columna 2) o 9 nmoles de péptido [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[LLO91-99] (columna 3) o 9 nmoles de péptido [P25]-Lys-[LLO91-99] no lipidado (SEC ID NO: 175; columna 4), como se indica en el eje X. Los ratones se expusieron a bacterias completas, y se midió el número de unidades formadoras de colonias presentes en el hígado, 28 días después de la exposición (ordenada).

La Figura 13 es una representación gráfica que muestra protección frente a melanoma B16 con vacunación de lipopéptido. Se vacunaron ratones C57BL/6 con 20 nmoles de péptido lipidado [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[SIINFEKL] (círculos en blanco), péptido no lipidado [P25]-Lys-[SIINFEKL] (triángulos en blanco) o con PBS (cuadrados en blanco), subcutáneamente en la base de la cola. Los ratones se expusieron entonces s.c. en la espalda 14 días más tarde a 2×10^5 células B16-OVA (n = 6 por grupo), y el crecimiento del tumor se monitorizó como se describió (Anraku, et al., J Virol. 76; 3791-3799, 2002).

La Figura 14 es una representación gráfica que muestra el tratamiento terapéutico de tumor pulmonar de Lewis con un inmunógeno lipopeptídico, según se determina mediante el porcentaje de animales que permanecen libres de tumor tras la inmunización. A los ratones se les inyectaron 3×10^4 células de tumor de pulmonar de Lewis que se habían transfectado con ovoalbúmina y por lo tanto expresaron el epítipo de CTL SIINFEKL [Nelson et al., J Immunol. 166: 5557-5566, 2001]. Cuatro días después de recibir las células tumorales, los animales se inocularon con 20 nmoles de péptido lipidado [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[SIINFEKL] (círculos blancos), péptido no lipidado [P25]-Lys-[SIINFEKL] (triángulos blancos), o con PBS (cuadrados blancos) subcutáneamente en la base de la cola. Once días después de recibir las células tumorales, se administró una segunda dosis similar de inmunógeno. Los animales se monitorizaron en busca de incidencia del tumor; los animales se eutanasiaron cuando el área tumoral superó 100 mm².

La Figura 15 es una representación gráfica que muestra el tratamiento terapéutico de tumor pulmonar de Lewis con un inmunógeno lipopeptídico, según se determina midiendo la supervivencia de animales tras la inmunización. Los ratones se inyectaron con 3×10^4 células de tumor pulmonar de Lewis que se habían transfectado con ovoalbúmina y por lo tanto expresaron el epítipo de CTL SIINFEKL [Nelson et al., J Immunol. 166: 5557-5566, 2001]. Cuatro días después de recibir las células tumorales, los animales se inocularon con 20 nmoles de péptido lipidado [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[SIINFEKL] (círculos blancos), péptido no lipidado [P25]-Lys-[SIINFEKL] (triángulos blancos), o con PBS (cuadrados blancos) subcutáneamente en la base de la cola. Once días después de recibir las células tumorales, se administró una segunda dosis similar de inmunógeno. Los animales se monitorizaron para determinar la supervivencia; los animales se eutanasiaron cuando el área tumoral superó 100 mm².

La Figura 16 es una representación gráfica que muestra la capacidad de los inmunógenos a base de péptidos y lipopéptidos para aumentar la expresión de MHC clase II, CD83 y CD86 en células dendríticas humanas. Células dendríticas humanas derivadas de monocitos se incubaron con medio solo, LPS (5 µg/ml), péptido no lipidado [P25]-

5 Lys-[HCV] (5 µg/ml) o lipopéptido [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[HCV] (5 µg/ml) durante 48 horas antes de la tinción con anticuerpos conjugados con FITC para HLA-DR, CD83 y CD86 antes del análisis mediante citometría de flujo. Los histogramas son representativos de células granulares grandes vivas agrupadas en la gráfica de puntos de dispersión frontal y lateral. Las regiones de histogramas sombreadas en gris y los valores dados corresponden al porcentaje que expresan niveles altos de antígeno en las poblaciones analizadas. El epítipo de linfocitos T auxiliares se identificó a partir de Mobillivirus, y tiene la secuencia de aminoácidos KLIPNASLIENCTKAEL (SEC ID NO: 20); el epítipo de CTL con la secuencia de aminoácidos DLMGYIPLV (SEC ID NO: 176) es un epítipo de CTL restringido para HLA A2 procedente de la proteína central del virus de la hepatitis C.

Descripción detallada de las reivindicaciones preferidas

10 Lipopéptidos

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

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

15 (a) la secuencia de aminoácidos de un epítipo de linfocitos T auxiliares (Th) y la secuencia de aminoácidos de un epítipo de CTL, en el que dichas secuencias de aminoácidos son diferentes; y

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

(ii) cada uno de dicho uno o más restos lipídicos se une covalentemente al polipéptido a través de un grupo amino en épsilon de dicho uno o más restos de lisina interna;

20 en el que el resto de lisina interna al que está unido el resto lipídico está localizado entre el epítipo de Th y el epítipo de CTL.

25 Como se usa aquí, el término "lipopéptido" significa cualquier composición de materia de origen no natural que comprende uno o más restos lipídicos y una o más secuencias de aminoácidos que se conjuga(n) directa o indirectamente, estando dicha composición de materia sustancialmente libre de lípido o proteína no conjugado no específico.

Por "directamente" se quiere decir que un resto lipídico y una secuencia de aminoácidos están yuxtapuestos en dicho lipopéptido (es decir, no están separados por una molécula espaciadora).

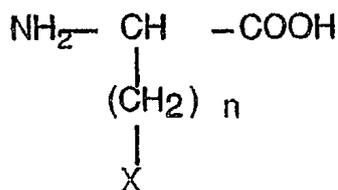
30 Por "indirectamente" se quiere decir que un resto lipídico y una secuencia de aminoácidos están separados por un espaciador que comprende una o más moléculas que contienen carbono, tales como, por ejemplo, uno o más restos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos puede ser de cualquier longitud, limitada por la necesidad de funcionalidad tanto del epítipo de linfocitos T auxiliares como del epítipo de CTL.

35 Como se usa aquí, la expresión "resto de lisina interna" significa un resto de lisina en el polipéptido que comprende tanto el epítipo de linfocitos T auxiliares como el epítipo de CTL, en el que dicha lisina no es el resto de aminoácido N-terminal ni el resto C-terminal de dicho polipéptido. En consecuencia, el resto de lisina interna puede ser un resto C-terminal o N-terminal del epítipo de linfocitos T auxiliares o del epítipo de CTL, con la condición de que esté internalizado en el polipéptido.

El resto de lisina interna también puede ser distinto del epítipo de linfocitos T auxiliares o del epítipo de CTL, en cuyo caso debe ligar estos dos epítipos del polipéptido.

40 De manera similar, la expresión "resto de análogo de lisina interna" significa un resto de análogo de lisina en el polipéptido que comprende tanto el epítipo de linfocitos T auxiliares como el epítipo de CTL, en el que dicho análogo de lisina no es el resto de aminoácido N-terminal ni el resto C-terminal de dicho polipéptido. Los criterios para establecer si un resto de lisina es "interno" o no se aplicarán por analogía para determinar si un análogo de lisina es interno o no.

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



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

Los expertos en la técnica conocerán el significado de la expresión “grupo amino en épsilon”. La expresión “grupo de cadena lateral terminal” significa un sustituyente en la cadena lateral de un análogo de lisina que es distal al carbono en alfa de dicho análogo, tal como, por ejemplo, un beta-amino de Dpr, gamma-amino de Dab, o delta-amino de Orn.

El resto lipídico está unido a través del grupo amino en épsilon de un resto de lisina que está localizado entre las secuencias de aminoácidos del epítipo de linfocitos T auxiliares y el epítipo de CTL.

La capacidad potenciada de los lipopéptidos de la invención para provocar una respuesta de linfocitos T se refleja por su capacidad para aumentar la expresión en superficie de moléculas del MHC clase II en células dendríticas (DC) inmaduras, particularmente en células D1, y por el número potenciado de linfocitos T CD8⁺ en muestras tisulares de animales inmunizados. En el caso de animales inmunizados usando CTLs de un patógeno viral, la capacidad potenciada de los lipopéptidos de la invención para provocar una respuesta de linfocitos T también está indicada por el aclaramiento viral potenciado tras la inmunización de animales.

Preferiblemente, los lipopéptidos son solubles, más preferiblemente muy solubles.

Como conocerán los expertos en la técnica, el grupo amino en épsilon de lisina es el grupo amino terminal de la cadena lateral de este aminoácido. El uso del grupo de cadena lateral terminal de la lisina interna para la reticulación al resto lipídico facilita la síntesis del resto polipeptídico como una secuencia de aminoácidos colineal que incorpora tanto el epítipo de linfocitos T auxiliares como el epítipo de CTL. Existe una clara distinción estructural entre un lipopéptido que tiene lípido unido a través del grupo amino en épsilon de un resto de lisina, y un lipopéptido que tiene el lípido unido a través de un grupo amino en alfa de una lisina en el péptido.

El resto de lisina interna al que se une el resto lipídico está localizado dentro del resto polipeptídico para separar los epítopos inmunológicamente funcionales. Por ejemplo, el resto de lisina interna puede actuar como un resto espaciador y/o ligador entre los epítopos. Naturalmente, cuando la lisina interna se sitúa entre el epítipo de linfocitos T auxiliares y el epítipo de CTL, el resto lipídico se unirá en una posición que también está entre estos epítopos, aunque formando una ramificación desde la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Como se ejemplifica aquí, se usa un único resto de lisina interna para separar epítopos de CTL y de linfocitos T auxiliares (por ejemplo, SEC ID NO: 4).

La presente invención contempla claramente el anidamiento del resto de lisina interna en una tercera secuencia de aminoácidos que no funciona como un epítipo de CTL o un epítipo de linfocitos T auxiliares. Por ejemplo, la lisina interna se puede conjugar a uno o más restos de aminoácidos diferentes.

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

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

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

- 5 Preferiblemente, el epítipo de linfocitos T auxiliares y el epítipo de CTL están separados por al menos uno o dos o tres o cuatro o cinco restos de aminoácidos que incluyen un único residuo de lisina interna.

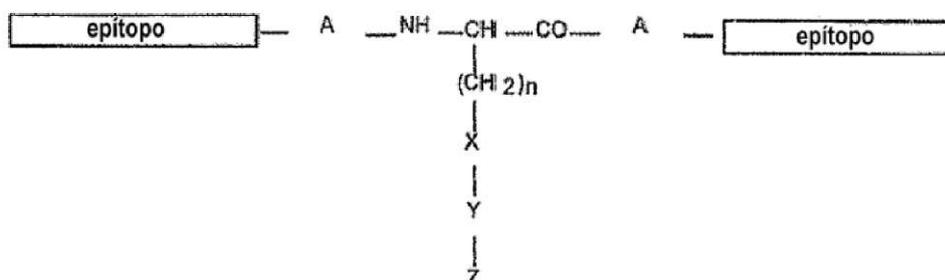
La presente invención contempla claramente la adición de múltiples restos lipídicos al resto polipeptídico. Por ejemplo, el polipéptido puede incluir múltiples restos de lisina interna. Puede producirse un impedimento estérico en la adición del lípido si múltiples restos de lisina interna están situados más cerca entre sí, produciendo de ese modo una mezcla de productos finales, o un rendimiento reducido.

En relación con esta consideración está el hecho de que no es necesario que toda la secuencia de aminoácidos que comprende el epítipo de linfocitos T auxiliares o que toda la secuencia de aminoácidos que comprende el epítipo de CTL tenga una función inmunitaria. En consecuencia, dichas secuencias de aminoácidos, aunque comprenden dichos epítipos, pueden tener una secuencia adicional que no posea actividad de linfocito T auxiliar o un epítipo de CTL. Cuando tales secuencias adicionales incluyen uno o más restos de lisina interna, los grupos de cadena lateral terminales de tales restos pueden servir como sitios de unión para el resto lipídico. Naturalmente, resulta esencial conservar la función tanto de linfocitos T auxiliares como la función de epítipo de CTL.

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

Una forma preferida generalizada del lipopéptido de la invención, en la que la lisina interna se sitúa entre los epítipos de linfocitos T auxiliares y de CTL se proporciona por la Fórmula general (VI)

Fórmula (VI):



25 en la que:

epítipo es un epítipo de linfocitos T auxiliares o epítipo de CTL;

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

N es 4;

30 X es NH;

Y o bien está presente o bien está ausente, y consiste en un espaciador de aminoácidos de alrededor de 1 a alrededor de 6 aminoácidos de longitud, en el que se prefiere que dicho aminoácido sea serina; y

Z es un resto lipídico, preferiblemente un Pam₂Cys o Pam₃Cys.

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

Se prefieren particularmente los epítomos de linfocitos T auxiliares permisivos o promiscuos, ya que se sintetizan fácilmente de manera química y obvian la necesidad de usar polipéptidos más largos que comprenden múltiples epítomos de linfocitos T auxiliares.

5 Ejemplos epítomos de linfocitos T auxiliares permisivos o promiscuos adecuados para uso en los lipopéptidos de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en:

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

(ii) un epítomo de linfocitos T auxiliares de roedor o ser humano de pfg27 de *Plasmodium falciparum*;

(iii) un epítomo de linfocitos T auxiliares de roedor o ser humano de lactato deshidrogenasa;

10 (iv) un epítomo de linfocitos T auxiliares de roedor o ser humano de la proteína de cubierta del VIH o de gp120 del VIH (Berzofsky et al., J. Clin. Invest. 88, 876-884, 1991);

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

15 (vi) un epítomo de linfocitos T auxiliares de roedor o ser humano de la proteína de fusión del virus del sarampión (MV-F; Muller et al., Mol. Immunol. 32, 37-47, 1995; Partidos et al., J. Gen. Virol., 71, 2099-2105, 1990);

(vii) un epítomo de linfocitos T auxiliares que comprende al menos alrededor de 10 restos de aminoácidos de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F), tal como, por ejemplo, de las posiciones de aminoácidos 148-283 de CDV-F (Ghosh et al., Immunol. 104, 58-66, 2001; publicación de patente internacional nº WO 00/46390);

20 (viii) un epítomo de linfocitos T auxiliares humano derivado de la secuencia peptídica del dominio de repetición en tándem extracelular de la mucina MUC1 (solicitud de patente US nº 0020018806);

(ix) un epítomo de linfocitos T auxiliares de roedor o ser humano de la hemaglutinina del virus de la gripe (IV-H) (Jackson et al. Virol. 198, 613-623, 1994); y

25 (x) un epítomo de linfocitos T auxiliares bovino o de camello de la proteína VP3 del virus de la fiebre aftosa (FMDV-0₁ cepa Kaufbeuren), que comprende los restos 173 a 176 de VP3 o los aminoácidos correspondientes de otra cepa del FMDV.

30 Como conocerán los expertos en la técnica, un epítomo de linfocitos T auxiliares puede ser reconocido por uno o más mamíferos de diferentes especies. En consecuencia, la designación de cualquier epítomo de linfocitos T auxiliares aquí no se considera limitativa con respecto al sistema inmunitario de la especie en la que se reconoce el epítomo. Por ejemplo, un epítomo de linfocitos T auxiliares de roedor puede ser reconocido por el sistema inmunitario de un ratón, rata, conejo, cobaya u otro roedor, o un ser humano o perro.

Más preferiblemente, el epítomo de linfocitos T auxiliares comprenderá una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i) ALNNRFQIKGVELKS de IV-H (SEC ID NO: 1);

35 (ii) GALNNRFQIKGVELKS de IV-H (SEC ID NO: 14);

(iii) LSEIKGVIVHRLEGV de MV-F (SEC ID NO: 15);

(iv) TAAQITAGIALHQSNLN de CDV-F (SEC ID NO: 16);

(v) IGTDNVHYKIMTRPSHQ de CDV-F (SEC ID NO: 17);

(vi) YKIMTRPSHQYLVIKLI de CDV-F (SEC ID NO: 18);

40 (vii) SHQYLVIKLIPNASLIE de CDV-F (SEC ID NO: 19);

(viii) KLIPNASLIENCTKAEL de CDV-F (SEC ID NO: 20);

(ix) LIENCTKAELGEYEKLL de CDV-F (SEC ID NO: 21);

(x) AELGEYEKLLNSVLEPI de CDV-F (SEC ID NO: 22);

(xi) KLLNSVLEPINQALTLM de CDV-F (SEC ID NO: 23);

45 (xii) EPINQALTLMTKNVKPL de CDV-F (SEC ID NO: 24);

- (xiii) TLMTKNVKPLQSLGSGR de CDV-F (SEC ID NO: 25);
- (xiv) KPLQSLGSGRRQRRFAG de CDV-F (SEC ID NO: 26);
- (xv) SGRRQRRFAGVVLAVAGVA de CDV-F (SEC ID NO: 27);
- (xvi) FAGVVLAVAGVALGVATAA de CDV-F (SEC ID NO: 28);
- 5 (xvii) GVALGVATAAQITAGIA de CDV-F (SEC ID NO: 29);
- (xviii) GIALHQSNLNAQAIQSL de CDV-F (SEC ID NO: 30);
- (xix) NLNAQAIQSLRTSLEQS de CDV-F (SEC ID NO: 31);
- (xx) QSLRTSLEQSNKAIEEI de CDV-F (SEC ID NO: 32);
- (xxi) EQSNKAIEEIREATQET de CDV-F (SEC ID NO: 33);
- 10 (xxii) SSKTQHTTQDRPPQPS de CDV-F (SEC ID NO: 34);
- (xxiii) QPSTELEETRTSRARHS de CDV-F (SEC ID NO: 35);
- (xxiv) RHSTTSAQRSTHYDPRT de CDV-F (SEC ID NO: 36);
- (xxv) PRTSDRPVSYTMNRTRS de CDV-F (SEC ID NO: 37);
- (xxvi) TRSRKQTSRLKNIPVH de CDV-F (SEC ID NO: 38);
- 15 (xxvii) TELSIFGPSLRDPISA de CDV-F (SEC ID NO: 39);
- (xxviii) PRYIATNGYLISNFDES de CDV-F (SEC ID NO: 40);
- (xxix) CIRGDTSSCARTLVSGT de CDV-F (SEC ID NO: 41);
- (xxx) DESSCVFVSESAICSQN de CDV-F (SEC ID NO: 42);
- (xxxi) TSTIINQSPDKLLTFIA de CDV-F (SEC ID NO: 43);
- 20 (xxxii) SPDKLLTFIASDTCPLV de CDV-F (SEC ID NO: 44);
- (xxxiii) STAPPAHGVTSAPDTRAPGSTAPP de MUC-1 (SEC ID NO: 45);
- (xxxiv) GVTSAPDTRPAPGSTASSL de MUC-1 (SEC ID NO: 46);
- (xxxv) GVTSAPDTRPAPGSTASL de MUC-1 (SEC ID NO: 47);
- (xxxvi) TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPKKG de MUC-1 (SEC ID NO: 48);
- 25 (xxxvii) STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPK de MUC-1 (SEC ID NO: 49);
- (xxxviii) GVAE de la proteína FMDV-VP3 (SEC ID NO: 50);
- (xxxix) TASGVAETTN de FMDV-VP3 (restos 170 a 179) (SEC ID NO: 51); y
- (xl) TAKSKKFPSYTATYQF de FMDV (SEC ID NO: 52).

30 Los epítomos de linfocitos T auxiliares descritos aquí se incluyen para fines de explicación a modo de ejemplo únicamente. Usando técnicas de síntesis peptídica estándar conocidas por el experto en la técnica, los epítomos de linfocitos T auxiliares a los que se hace referencia aquí se sustituyen fácilmente por un epítomo de linfocitos T auxiliares diferente para adaptar el lipopéptido de la invención para su uso en una especie diferente. En consecuencia, no se excluyen epítomos de linfocitos T auxiliares adicionales que el experto sabe que son útiles para provocar o potenciar una respuesta inmunitaria en una especie diana.

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

40 El epítomo de CTL deriva convenientemente de la secuencia de aminoácidos de una proteína, lipoproteína o glicoproteína inmunógena de un virus, organismo procarionta o eucariota, incluyendo pero sin limitarse a un epítomo

de CTL derivado de un sujeto mamífero o una bacteria, hongo, protozoo o parásito que infecta a dicho sujeto. Se incluyen específicamente dentro del alcance de la invención mimetopos de los epítomos de CTL.

El epítomo de CTL será capaz de provocar una respuesta de linfocitos T cuando se administra a un mamífero, preferiblemente activando linfocitos T CD8⁺ específicos para el epítomo o antígeno a partir del que deriva el epítomo, y más preferiblemente, induciendo inmunidad mediada por células frente al patógeno o célula tumoral a partir de la que deriva el epítomo.

Se prefieren los epítomos de CTL más cortos, para facilitar la síntesis de péptidos. Preferiblemente, la longitud del epítomo de CTL no superará alrededor de 30 aminoácidos de longitud. Más preferiblemente, la secuencia del epítomo de CTL consiste en alrededor de 25 restos de aminoácidos o menos, y más preferiblemente menos de 20 restos de aminoácidos, e incluso de manera más preferible alrededor de 8-12 restos de aminoácidos de longitud.

Los epítomos de CTL preferidos procedentes de parásitos son aquellos asociados con leishmaniosis, malaria, tripanosomiasis, babesiosis, o esquistosomiasis, tales como, por ejemplo, un epítomo de CTL de un antígeno de un parásito seleccionado del grupo que consiste en: *Plasmodium falciparum*; *Circumsporozoa*; *Leishmania donovani*; *Toxoplasma gondii*; *Schistosoma mansoni*; *Schistosoma japonicum*; *Schistosoma hematobium*; y *Trypanosoma brucei*.

Los epítomos de CTL particularmente preferidos de *P. falciparum* derivan de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en: proteína del circumsporozoito (CSP), proteína 2 de la superficie del esporozoito (PfSSP2), antígeno 1 de etapa hepática (LSA1), proteína 1 de la superficie del merozoito (MSP1), antígeno de repetición de serina (SERA), y antígeno AMA-1 (Amante, et al. J. Immunol. 159, 5535-5544, 1997; Chaba et al. Int. J. Immunopharm. 20, 259-273, 1998; Shi et al., Proc. Natl Acad. Sci (USA) 96, 1615-1620, 1999; Wang et al. Science 282, 476-479, 1998; y Zevering et al. Immunol. 94, 445-454, 1998). Los epítomos de CTL particularmente preferidos de *L. donovani* derivan del Péptido Repetitivo (Liew et al., J. Exp. Med. 172, 1359 (1990)). Los epítomos de CTL particularmente preferidos de *T. gondii* derivan de la proteína superficial P30 (Darcy et al., J. Immunol. 149, 3636 (1992)). Los epítomos de CTL particularmente preferidos de *S. mansoni* derivan del antígeno Sim-28GST (Wolowxzuk et al., J. Immunol 146:1987 (1991)).

Los epítomos de CTL preferidos específicos de virus derivan de rotavirus, virus del herpes, coronavirus, picornavirus (por ejemplo *Aphovirus*), virus sincitial respiratorio, virus de la gripe, virus de la parainfluenza, adenovirus, poxvirus, virus del herpes bovino tipo I, virus de la diarrea viral bovina, rotavirus bovinos, virus del moquillo canino (CDV), virus de la glosopeda (FMDV), virus del sarampión (MV), virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), virus de Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus humano (HCMV), o virus de la hepatitis, y similares.

Los epítomos de CTL particularmente preferidos de HIV-1 derivan de las proteínas *env*, *gag*, o *pol*. Los epítomos de CTL particularmente preferidos del virus de la gripe derivan de la nucleoproteína (Taylor et al., Immunogenetics 26, 267 (1989); Townsend et al., Nature 348, 674(1983)), proteína de la matriz (Bednarek et al., J. Immunol. 147, 4047 (1991)) o proteína de polimerasa (Jameson et al., J. Virol. 72, 8682-8689, 1998; y Gianfrani et al., Human Immunol. 61, 438-452, 2000). Los epítomos de CTL particularmente preferidos del virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV) derivan del antígeno de glicoproteína-1 (Zinkernagel et al. Nature 248, 701-702, 1974). Los epítomos de CTL particularmente preferidos de citomegalovirus derivan de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en: pp28, pp50, pp65, pp71, pp150, gB, gH, IE-1, IE-2, US2, US3, US6, US11, y UL18 (por ejemplo Diamond, USSN 6.074.645, 13 de junio de 2000; Longmate et al., Immunogenet. 52, 165-173, 2000; Wills et al., J. Virol. 70, 7569-7579, 1996; Solache et al., J. Immunol. 163, 5512-5518, 1999; Diamond et al., Blood 90, 1751-1767, 1997; Kern et al., Nature Med. 4, 975-978, 1998; Weekes et al., J. Virol. 73, 2099-2108, 1999; Retière et al., J. Virol. 74, 3948-3952, 2000; y Salquin et al., Eur. J. Immunol. 30, 2531-2539, 2000). Los epítomos de CTL particularmente preferidos del virus del sarampión derivan de la glicoproteína de fusión (MV-F) y particularmente de sus restos 438-446 (Herberts et al. J. Gen Virol. 82, 2131-2142, 2001). Los epítomos particularmente preferidos del virus de Epstein-Barr (EBV) derivan de un antígeno nuclear latente (EBNA) o proteína de membrana latente (LMP) de EBV, tal como, por ejemplo, EBNA 2A, EBNA 3A, EBNA 4A, o EBNA 14a de EBV tipo A; EBNA 2B, EBNA 3B, EBNA 4B, o EBNA 14b de EBV tipo B; LMP1; o LMP2 (Solicitud de Patente Internacional n° PCT/AU95/00140, publicada el 16 de septiembre de 1995; Solicitud de Patente Internacional n° PCT/AU97/00328, publicada el 24 de noviembre de 1997; y Solicitud de Patente Internacional n° PCT/AU98/00531 publicada el 10 de enero de 1998).

Los epítomos de CTL preferidos específicos de bacterias derivan de *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Shigella*, y similares.

Los epítomos de CTL bacterianos adecuados incluyen, por ejemplo, aquellos epítomos de CTL derivados de la proteína de 65 Kd de *Mycobacterium tuberculosis* (Lamb et al., EMBO J., 6, 1245 (1987)); proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis* (Morten et al., Infect. Immun. 66, 717-723, 1998); proteína de nucleasa de *Staphylococcus aureus* (Finnegan et al., J. Exp. Med. 164, 897 (1986)); enterotoxina estable al calor de *Escherichia coli* (Cardenas et al., Infect. Immunity 61, 4629 (1993)); y enterotoxina lábil al calor de *Escherichia coli* (Clements et al., Infect. Immunity 53, 685 (1986)).

- Los epítomos de CTL preferidos de sujetos mamíferos derivan de y/o son capaces de generar respuesta de linfocitos T frente a un antígeno de CTL tumoral. Los epítomos de CTL específicos de tumores normalmente son epítomos de CTL nativos o extraños, cuya expresión está correlacionada con el desarrollo, crecimiento, presencia o recurrencia de un tumor. Dado que tales epítomos de CTL son útiles en la diferenciación de tejido anómalo de normal, son útiles como una diana para la intervención terapéutica. Tales epítomos de CTL se conocen bien en la técnica. De hecho, varios ejemplos están bien caracterizados y son actualmente el foco de un gran interés en la generación de terapias específicas de tumores. Ejemplos no limitativos de epítomos de CTL tumorales derivan de antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de la próstata (PSA), antígeno de melanoma (MAGE, BAGE, GAGE), y las mucinas, tales como MUC-1.
- Los epítomos de CTL preferidos para administrar a un paciente con cáncer derivan de una proteína que induce cáncer, tal como, por ejemplo, una oncoproteína (por ejemplo p53, ras etc.).
- En una realización particularmente preferida, el epítomo de CTL comprenderá o consistirá en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (i) TYQRTRALV de la NP del virus PR8 (SEC ID NO: 2);
 - (ii) KPKDEL DYENDIEKKICKMEKCS de CSP de *P. falciparum* (SEC ID NO: 53);
 - (iii) DIEKKICKMEKCSSVFNVVNS de CSP de *P. falciparum* (SEC ID NO: 54);
 - (iv) KPIVQYDNF de LSA1 de *P. falciparum* (SEC ID NO: 55);
 - (v) GISYYEKVLAKYKDDLE de MSP1 de *P. falciparum* (SEC ID NO: 56);
 - (vi) EFTYMINFGRGQNYWEHPYQKS de AMA-1 de *P. falciparum* (SEC ID NO: 57);
 - (vii) DQPQYEQHLTDYEKIKEG de AMA-1 de *P. falciparum* (SEC ID NO: 58);
 - (viii) NMWQEVGKAM de la proteína *env* del VIH-1 (SEC ID NO: 59);
 - (ix) APTKAKRRVV de la proteína *env* del VIH-1 (SEC ID NO: 60);
 - (x) CTRPNNNTRK de la proteína *env* del VIH-1 (SEC ID NO: 61);
 - (xi) TVYYGVPVWK de la proteína *env* del VIH-1 (SEC ID NO: 62);
 - (xii) RPVVSTQLL de la proteína *env* del VIH-1 (SEC ID NO: 63);
 - (xiii) SLYNTVATLY de la proteína *gag* del VIH-1 (SEC ID NO: 64);
 - (xiv) ELRSLYNTVA de la proteína *gag* del VIH-1 (SEC ID NO: 65);
 - (xv) KIRLRPGGKK de la proteína *gag* del VIH-1 (SEC ID NO: 66);
 - (xvi) IRLRPGGKKK de la proteína *gag* del VIH-1 (SEC ID NO: 67);
 - (xvii) RLRPGGKKK de la proteína *gag* del VIH-1 (SEC ID NO: 68);
 - (xviii) GPGHKARVLA de la proteína *gag* del VIH-1 (SEC ID NO: 69);
 - (xix) SPIETVPVKL de la proteína *pol* del VIH-1 (SEC ID NO: 70);
 - (xx) ILKEPVHGVY de la proteína *pol* del VIH-1 (SEC ID NO: 71);
 - (xxi) AIFQSSMTK de la proteína *pol* del VIH-1 (SEC ID NO: 72);
 - (xxii) SPAIFQSSMT de la proteína *pol* del VIH-1 (SEC ID NO: 73);
 - (xxiii) QVRDQAEHLK de la proteína *pol* del VIH-1 (SEC ID NO: 74);
 - (xxiv) GPKVKQWPLT de la proteína *pol* del VIH-1 (SEC ID NO: 75);
 - (xxv) TYQRTRALV de la nucleoproteína del virus de la gripe (SEC ID NO: 76);
 - (xxvi) TYQRTRALVRTGMDP de la nucleoproteína de la gripe (SEC ID NO: 77);
 - (xxvii) IASNENMDAMESSTL de la nucleoproteína del virus de la gripe (SEC ID NO: 78);
 - (xxviii) KAVYNFATM de gp1 de LCMV (SEC ID NO: 79);

- (xxix) QVKWRMTTL de EBV (SEC ID NO: 80);
 (xxx) VFSDGRVAC de EBV (SEC ID NO: 81);
 (xxxi) VPAPAGPIV de EBV (SEC ID NO: 82);
 (xxxii) TYSAGIVQI de EBV (SEC ID NO: 83);
 5 (xxxiii) LLDFVRFMGV de EBV (SEC ID NO: 84);
 (xxxiv) QNGALAINTF de EBV (SEC ID NO: 85);
 (xxxv) VSSDGRVAC de EBV (SEC ID NO: 86);
 (xxxvi) VSSEGRVAC de EBV (SEC ID NO: 87);
 (xxxvii) VSSDGRVPC de EBV (SEC ID NO: 88);
 10 (xxxviii) VSSDGLVAC de EBV (SEC ID NO: 89);
 (xxxix) VSSDGQVAC de EBV (SEC ID NO: 90);
 (xi) VSSDGRVVC de EBV (SEC ID NO: 91);
 (xli) VPAPPVGPIV de EBV (SEC ID NO: 92);
 (xlii) VEITPYEPTG de EBV (SEC ID NO: 93);
 15 (xliii) VEITPYEPTW de EBV (SEC ID NO: 94);
 (xliv) VELTPYKPTW de EBV (SEC ID NO: 95);
 (xlv) RRIYDLIKL de EBV (SEC ID NO: 96);
 (xlvii) RKIYDLIEL de EBV (SEC ID NO: 97);
 (xlviii) PYLFWLAGI de EBV (SEC ID NO: 98);
 20 (xlix) TSLYNLRRGTALA de EBV (SEC ID NO: 99);
 (l) DTPLIPLTIF de EBV (SEC ID NO: 100);
 (li) TVFYNIPPMPL de EBV (SEC ID NO: 101);
 (lii) VEITPYKPTW de EBV (SEC ID NO: 102);
 (liii) VSFIEVFGW de EBV (SEC ID NO: 103);
 25 (liiii) FRKAQIQGL de EBV (SEC ID NO: 104);
 (liv) FLRGRAYGL de EBV (SEC ID NO: 105);
 (lv) QAKWRLQTL de EBV (SEC ID NO: 106);
 (lvi) SVRDRLARL de EBV (SEC ID NO: 107);
 (lvii) YPLHEQHGM de EBV (SEC ID NO: 108);
 30 (lviii) HLAAQGMAY de EBV (SEC ID NO: 109);
 (lix) RPPIFIRRL de EBV (SEC ID NO: 110);
 (lx) RLRAEAGVK de EBV (SEC ID NO: 111);
 (lxi) IVTDFSVIK de EBV (SEC ID NO: 112);
 (lxii) AVFDRKSDAK de EBV (SEC ID NO: 113);
 35 (lxiii) NPTQAPVIQLVHAVY de EBV (SEC ID NO: 114);
 (lxiv) LPGPQVTAVLLHEES de EBV (SEC ID NO: 115);
 (lxv) DEPASTEPEVHDQLL de EBV (SEC ID NO: 116);

- (lxvi) RYSIFFDY de EBV (SEC ID NO: 117);
 (lxvii) AVLLHEESM de EBV (SEC ID NO: 118);
 (lxviii) RRARSLAERY de EBV (SEC ID NO: 119);
 (lix) EENLLDFVRF de EBV (SEC ID NO: 120);
 5 (lxx) KEHVIQNAF de EBV (SEC ID NO: 121);
 (lxxi) RRIYDLIEL de EBV (SEC ID NO: 122);
 (lxxii) QPRAPIRPI de EBV (SEC ID NO: 123);
 (lxxiii) EGGVGWRHW de EBV (SEC ID NO: 124);
 (lxxiv) CLGGLTMV de EBV (SEC ID NO: 125);
 10 (lxxv) RRRWRRLTV de EBV (SEC ID NO: 126);
 (lxxvi) RAKFKQLL de EBV (SEC ID NO: 127);
 (lxxvii) RKCCRAKFKQLLQHYR de EBV (SEC ID NO: 128);
 (lxxviii) YLLEMLWRL de EBV (SEC ID NO: 129);
 (lxxix) YFLEILWGL de EBV (SEC ID NO: 130);
 15 (lxxx) YLLEILWRL de EBV (SEC ID NO: 131);
 (lxxxi) YLQQNWWTL de EBV (SEC ID NO: 132);
 (lxxxii) LLLALLFWL de EBV (SEC ID NO: 133);
 (lxxxiii) LLVDLLWLL de EBV (SEC ID NO: 134);
 (lxxxiv) LLLIALWNL de EBV (SEC ID NO: 135);
 20 (lxxxv) WLLLFLAIL de EBV (SEC ID NO: 136);
 (lxxxvi) TLLVDLLWL de EBV (SEC ID NO: 137);
 (lxxxvii) LLWLLLFLA de EBV (SEC ID NO: 138);
 (lxxxviii) ILLIALLYL de EBV (SEC ID NO: 139);
 (lxxxix) VLFIFGCLL de EBV (SEC ID NO: 140);
 25 (xc) RLGATIWQL de EBV (SEC ID NO: 141);
 (xci) ILYFIAFAL de EBV (SEC ID NO: 142);
 (xcii) SLVIVTTFV de EBV (SEC ID NO: 143);
 (xciii) LMIIPLINV de EBV (SEC ID NO: 144);
 (xciv) TLFIGSHVV de EBV (SEC ID NO: 145);
 30 (xcv) LIPETVPYI de EBV (SEC ID NO: 146);
 (xcvi) VLQWASLAV de EBV (SEC ID NO: 147);
 (xcvii) QLTPHTKAV de EBV (SEC ID NO: 148);
 (xcviii) SVLGPISGHVLK de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 149);
 (xcix) FTSQYRIQGKL de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 150);
 35 (c) FVFPTKDVLR de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 151);
 (ci) FPTKDVLR de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 152);
 (cii) NLVPMVATV de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 153);

- (ciii) MLNIPSINV de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 154);
 (civ) RIFAELEGV de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 155);
 (cv) TPRVTGGGGAM de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 156);
 (cvi) RIPHERNGFTVL de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 157);
 5 (cvii) RLLQTGIHV de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 158);
 (cviii) VIGDQYVKV de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 159);
 (cix) ALFFFIDIDL de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 160);
 (cx) YSEHPTFTSQY de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 161);
 (cxi) VLCPKNMII de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 162);
 10 (cxii) DIYRIFAEI de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 163);
 (cxiii) ILARNLVPMV de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 164);
 (cxiv) EFFWDANDIY de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 165);
 (cxv) IPSINVHHY de pp65 de HCMV (SEC ID NO: 166);
 (cxvi) YILEETSVM de IE-1 de HCMV (SEC ID NO: 167);
 15 (cxvii) CVETMCNEY de IE-1 de HCMV (SEC ID NO: 168);
 (cxviii) RRIEEICMK de IE-1 de HCMV (SEC ID NO: 169);
 (cxix) TTVYPPSSTAK de pp150 de HCMV (SEC ID NO: 170);
 (cxx) RRYPDVAVYL de la glicoproteína de fusión del virus del sarampión (SEC ID NO: 171);
 (cxxi) GYKDGNEYI de *Listeria monocytogenes* (SEC ID NO: 172);
 20 (cxxii) SIINFEKL de ovalbumina (SEC ID NO: 173); y
 (cxxiii) DLMGYIPLV de la proteína central del virus de la hepatitis C (SEC ID NO: 176).

25 Será manifiesto de la descripción precedente que el resto polipeptídico del lipopéptido sujeto se sintetiza convenientemente como una cadena de un solo aminoácido, no requiriendo de ese modo ninguna modificación post-sintética para incorporar ambos epítomos. Como se ejemplifica aquí, se prefiere un resto polipeptídico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los siguientes:

- (i) ALNNRFQIKGVELKSTYQRTRALV (SEC ID NO: 3);
 (ii) ALNNRFQIKGVELKSKTYQRTRALV (SEC ID NO: 4);
 (iii) KLIPNASLIENCTKAELKTYQRTRALV (SEC ID NO: 5);
 (iv) KLIPNASLIENCTKAELKNLVPMVATV (SEC ID NO: 6);
 30 (v) AELGEYEKLLNSVLEPIKNLVPMVATV (SEC ID NO: 7);
 (vi) TAAQITAGIALHQSNLNKNLVPMVATV (SEC ID NO: 8);
 (vii) PRYIATNGYLISNFDESKNLVPMVATV (SEC ID NO: 9);
 (viii) KLIPNASLIENCTKAELKYLLEMLWRL (SEC ID NO: 10);
 (ix) AELGEYEKLLNSVLEPIKYLLEMLWRL (SEC ID NO: 11);
 35 (x) TAAQITAGIALHQSNLNKYLLEMLWRL (SEC ID NO: 12);
 (xi) PRYIATNGYLISNFDESKYLLEMLWRL (SEC ID NO: 13);
 (xii) KLIPNASLIENCTKAELKSIINFEKL (SEC ID NO: 174);
 (xiii) KLIPNASLIENCTKAELKGYKDGNEYI (SEC ID NO: 175) y

(xiv) KLIPNASLIENCTKAEKDLMGYIPLV (SEC ID NO: 177).

5 Para los fines de nomenclatura, las SEC ID Nos: 3-4 se refieren a péptidos sintéticos que comprenden un epítipo de linfocitos T procedente de la cadena ligera de hemaglutinina del virus de la gripe (es decir, SEC ID NO: 1) y un epítipo de CTL restringido para *H-2^d* inmunodominante procedente de la nucleoproteína de la cepa PR8 del virus de la gripe (es decir, SEC ID NO: 2), en el que el resto de lisina interna que proporciona un sitio de unión del lípido en su grupo amino en épsilon está indicado en negrita. En SEC ID No: 4, un resto de lisina interna adicional se ha manipulado mediante ingeniería entre el epítipo de linfocitos T y el epítipo de CTL (K16 en SEC ID NO: 4).

10 SEQ ID No: 5 se refiere a un péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T procedente del virus del moquillo canino (CDV-F; SEC ID NO: 20) que es activo en perros, ratones, y seres humanos, y un epítipo de CTL restringido para *H-2^d* inmunodominante procedente de la nucleoproteína de la cepa PR8 del virus de la gripe (es decir, SEC ID NO: 2), en el que el resto de lisina interna que proporciona un sitio de unión del lípido en su grupo amino en épsilon está indicado en negrita. En este péptido, un resto de lisina interna adicional se ha manipulado mediante ingeniería entre el epítipo de linfocitos T y el epítipo de CTL (K18 en SEC ID NO: 5).

15 SEQ ID No: 6 se refiere a un péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T procedente del virus del moquillo canino (CDV-F; SEC ID NO: 20) que es activo en perros, ratones, y seres humanos, y un epítipo de CTL restringido para HLA A2 inmunodominante procedente del antígeno pp65 inmunodominante del citomegalovirus de seres humanos (es decir, antígeno pp65 de HCMV) (es decir, SEC ID NO: 153), en el que el resto de lisina interna que proporciona un sitio de unión del lípido en su grupo amino en épsilon está indicado en negrita. En este péptido, un resto de lisina interna adicional se ha manipulado mediante ingeniería entre el epítipo de linfocitos T y el epítipo de CTL (K18 en SEC ID NO: 6).

25 SEQ ID No: 7 se refiere a un péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T procedente del virus del moquillo canino (CDV-F; SEQ ID NO: 22) que es activo en perros, ratones, y seres humanos, y un epítipo de CTL restringido para HLA A2 inmunodominante procedente del antígeno pp65 de HCMV (es decir, SEC ID NO: 153), en el que el resto de lisina interna que proporciona un sitio de unión del lípido en su grupo amino en épsilon está indicado en negrita. En este péptido, un resto de lisina interna adicional se ha manipulado mediante ingeniería entre el epítipo de linfocitos T y el epítipo de CTL (K18 en SEC ID NO: 7).

30 SEQ ID No: 8 se refiere a un péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T procedente del virus del moquillo canino (CDV-F; SEQ ID NO: 16) que es activo en perros, ratones, y seres humanos, y un epítipo de CTL restringido para HLA A2 inmunodominante procedente del antígeno pp65 de HCMV (es decir, SEC ID NO: 153), en el que el resto de lisina interna que proporciona un sitio de unión del lípido en su grupo amino en épsilon está indicado en negrita. En este péptido, un resto de lisina interna adicional se ha manipulado mediante ingeniería entre el epítipo de linfocitos T y el epítipo de CTL (K18 en SEC ID NO: 8).

35 SEQ ID No: 9 se refiere a un péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T procedente del virus del moquillo canino (CDV-F; SEQ ID NO: 40) que es activo en perros, ratones, y seres humanos, y un epítipo de CTL restringido para HLA A2 inmunodominante procedente del antígeno pp65 de HCMV (es decir, SEC ID NO: 153), en el que el resto de lisina interna que proporciona un sitio de unión del lípido en su grupo amino en épsilon está indicado en negrita. En este péptido, un resto de lisina interna adicional se ha manipulado mediante ingeniería entre el epítipo de linfocitos T y el epítipo de CTL (K18 en SEC ID NO: 9).

40 SEQ ID No: 10 se refiere a un péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T procedente del virus del moquillo canino (CDV-F; SEC ID NO: 20) que es activo en perros, ratones, y seres humanos, y un epítipo de CTL restringido para HLA A2 inmunodominante procedente del antígeno LMP1 del virus de Epstein-Barr (es decir, LMP1 de EBV; SEC ID NO: 129), en el que el resto de lisina interna que proporciona un sitio de unión del lípido en su grupo amino en épsilon está indicado en negrita. En este péptido, un resto de lisina interna adicional se ha manipulado mediante ingeniería entre el epítipo de linfocitos T y el epítipo de CTL (K18 en SEC ID NO: 10).

45 SEQ ID No: 11 se refiere a un péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T procedente del virus del moquillo canino (CDV-F; SEQ ID NO: 22) que es activo en perros, ratones, y seres humanos, y un epítipo de CTL restringido para HLA A2 inmunodominante procedente del LMP1 de EBV (SEC ID NO: 129), en el que el resto de lisina interna que proporciona un sitio de unión del lípido en su grupo amino en épsilon está indicado en negrita. En este péptido, un resto de lisina interna adicional se ha manipulado mediante ingeniería entre el epítipo de linfocitos T y el epítipo de CTL (K18 en SEC ID NO: 11).

55 SEQ ID No: 12 se refiere a un péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T procedente del virus del moquillo canino (CDV-F; SEQ ID NO: 16) que es activo en perros, ratones, y seres humanos, y un epítipo de CTL restringido para HLA A2 inmunodominante procedente del LMP1 de EBV (SEC ID NO: 129), en el que el resto de lisina interna que proporciona un sitio de unión del lípido en su grupo amino en épsilon está indicado en negrita. En este péptido, un resto de lisina interna adicional se ha manipulado mediante ingeniería entre el epítipo de linfocitos T y el epítipo de CTL (K18 en SEC ID NO: 12).

SEQ ID No: 13 se refiere a un péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T procedente del virus del moquillo canino (CDV-F; SEQ ID NO: 40) que es activo en perros, ratones, y seres humanos, y un epítipo de CTL

restringido para HLA A2 inmunodominante procedente del LMP1 de EBV (SEC ID NO: 129), en el que el resto de lisina interna que proporciona un sitio de unión del lípido en su grupo amino en épsilon está indicado en negrita. En este péptido, un resto de lisina interna adicional se ha manipulado mediante ingeniería entre el epítipo de linfocitos T y el epítipo de CTL (K18 en SEC ID NO: 13).

5 SEQ ID No: 174 se refiere a un péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T procedente del virus del moquillo canino (CDV-F; SEC ID NO: 20) que es activo en perros, ratones, y seres humanos, y un epítipo de CTL inmunodominante procedente de ovalbúmina (es decir, SEC ID NO: 173), en el que el resto de lisina interna que proporciona sitios posibles de unión del lípido en su grupo amino en épsilon está indicado en negrita. Preferiblemente, el lípido está unido vía K18 en SEC ID NO: 174, que es un resto de lisina interna adicional que se ha manipulado mediante ingeniería entre el epítipo de linfocitos T y el epítipo de CTL.

10 SEQ ID No: 175 se refiere a un péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T procedente del virus del moquillo canino (CDV-F; SEC ID NO: 20) que es activo en perros, ratones, y seres humanos, y un epítipo de CTL inmunodominante procedente de un antígeno de *Listeria monocytogenes* (es decir, SEC ID NO: 172), en el que el resto de lisina interna que proporciona sitios posibles de unión del lípido en su grupo amino en épsilon está indicado en negrita. Preferiblemente, el lípido está unido vía K18 en SEC ID NO: 175, que es un resto de lisina interna adicional que se ha manipulado mediante ingeniería entre el epítipo de linfocitos T y el epítipo de CTL.

15 SEQ ID No: 177 se refiere a un péptido sintético que comprende un epítipo de linfocitos T procedente del virus del moquillo canino (CDV-F; SEC ID NO: 20) que es activo en perros, ratones, y seres humanos, y un epítipo de CTL inmunodominante procedente de la proteína central del virus de la hepatitis C (SEC ID NO: 176), en el que el resto de lisina interna que proporciona sitios posibles de unión del lípido en su grupo amino en épsilon está indicado en negrita. Preferiblemente, el lípido está unido vía K18 en SEC ID NO: 177.

20 El experto en la técnica será capaz fácilmente de sintetizar restos polipeptídicos adicionales a los mostrados a modo de ejemplo en el presente documento para uso en los lipopéptidos objeto, sustituyendo el epítipo de linfocitos T auxiliares y/o el epítipo de CTL de una cualquiera de SEC ID Nos: 3-13, 174, 175 ó 177 por otro epítipo de linfocitos T auxiliares o epítipo de CTL, tal como, por ejemplo, un epítipo de linfocitos T auxiliares indicado en una cualquiera de SEC ID Nos: 14-52, o un epítipo de CTL indicado en una cualquiera de SEC ID Nos: 53-173 ó 176. Además, la selección de combinaciones apropiadas de epítipo de CTL y epítipo de linfocitos T auxiliares será manifiesta para el experto en la técnica a partir de la descripción proporcionada aquí, según la especie diana y el epítipo de CTL contra el que se busca una respuesta inmunitaria.

25 Las secuencias de aminoácidos de los restos polipeptídicos descritas aquí, incluyendo los polipéptidos mostrados a modo de ejemplo expuestos en SEC ID Nos: 3-13, 174, 175 y 177, pueden modificarse para fines particulares según métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, sin afectar de manera adversa a su función inmunitaria. Por ejemplo, residuos peptídicos particulares pueden derivatizarse o modificarse químicamente con el fin de potenciar la respuesta inmunitaria o permitir el acoplamiento del péptido a otros agentes, particularmente lípidos. También es posible cambiar aminoácidos particulares dentro de los péptidos sin perturbar la estructura global o inmunogenicidad de CTL del péptido. Por tanto, tales cambios se denominan cambios "conservativos", y tienden a basarse en la hidrofilia o polaridad del resto. El tamaño y/o la carga de las cadenas laterales también son factores relevantes en la determinación de qué sustituciones son conservativas.

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

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

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

4,5). Al realizar cambios basándose en el índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de +/-0,2. Más preferiblemente, la sustitución implicará aminoácidos que tienen índices hidropáticos dentro de +/- 0,1, y más preferiblemente dentro de alrededor de +/- 0,05.

5 También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se realiza eficazmente basándose en la hidrofilia, particularmente cuando el péptido o proteína equivalente funcional biológico creado de ese modo está destinado para uso en realizaciones inmunológicas, como en el presente caso (por ejemplo, patente US nº 4.554.101). Tal como se detalla en la patente US nº 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofilia a restos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 +/- 0,1); glutamato (+3,0 +/- 0,1); serina (+0,3);
10 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);
15 triptófano (-3,4). Al realizar cambios basándose en valores de hidrofilia similares, se prefiere sustituir aminoácidos que tienen valores de hidrofilia dentro de alrededor de +/- 0,2 entre sí, más preferiblemente dentro de alrededor de +/- 0,1, e incluso más preferiblemente dentro de alrededor de +/- 0,05.

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

Otro método para determinar la "equivalencia" de péptidos modificados implica un enfoque funcional. Por ejemplo, un péptido variante adecuado comprenderá una secuencia de aminoácidos que interactúa en un nivel significativo con un alelo del MHC clase I según se determina usando un algoritmo predictivo para determinar epítopos que se
25 unen al 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 al Péptido de HLA de la Bioinformatics and Molecular Analysis Section (BIMAS) del National Institutes of Health del Gobierno de los Estados Unidos de América. Tales secuencias variantes también se unirán a y/o estabilizarán una molécula de MHC clase I en la superficie de una APC (por ejemplo, en la fracción de PBMC o en la fracción de la capa leucocitaria del suero), y/o inducirán una respuesta de CTL de memoria o provocarán producción de IFN- γ , y/o estimularán la actividad de CTL en un ensayo de
30 citotoxicidad estándar. La determinación de tales funcionalidades se logra fácilmente por aquellos expertos en la técnica.

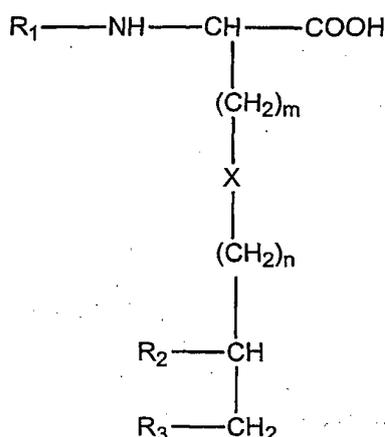
El resto polipeptídico del lipopéptido se sintetiza fácilmente usando técnicas estándar, tales como el método de síntesis de Merrifield (Merrifield, J Am Chem Soc, 85.:2149-2154, 1963) y la miríada de mejoras disponibles sobre esa tecnología (véase, por ejemplo, Synthetic Peptides: A User's Guide, Grant, ed. (1992) W.H. Freeman & Co.,
35 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,
40 Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 25, 449-474.

El resto lipídico puede comprender cualquier grupo acilo graso de C₂ a C₃₀ saturado, monoinsaturado, o poliinsaturado, lineal o ramificado, y preferiblemente un grupo de ácido graso seleccionado del grupo que consiste en: palmitoilo, miristoilo, estearoilo, lauroilo, octanoilo y decanoilo. Lipoaminoácidos son restos lipídicos particularmente preferidos dentro del presente contexto. Tal como se usa aquí, el término "lipoaminoácido" se refiere a una molécula que comprende uno o dos o tres o más lípidos unidos covalentemente a un resto de aminoácido, tal como, por ejemplo, cisteína o serina, lisina o su análogo. En una realización particularmente preferida, el lipoaminoácido comprende cisteína y, opcionalmente, uno o dos o más restos de serina.
45

La estructura del resto lipídico no es esencial para la actividad el lipopéptido resultante y, como se ejemplifica aquí, se puede usar ácido palmítico y/o colesterol y/o Pam₁Cys y/o Pam₂Cys y/o Pam₃Cys. La presente invención contempla claramente un intervalo de otros restos lipídicos para uso en los lipopéptidos, tales como, por ejemplo, ácido láurico, ácido esteárico o ácido octanoico, sin pérdida de inmunogenicidad. En consecuencia, la presente invención no estará limitada por la estructura del resto lipídico, excepto que se especifique de otro modo, o el contexto lo requiera de otro modo.
50

De forma similar, la presente invención no estará limitada por un requisito de un único resto lipídico, excepto que se especifique de otro modo o el contexto lo requiera de otro modo. La adición de múltiples restos lipídicos al resto peptídico, tal como, por ejemplo, a una posición en el epítipo de linfocitos T auxiliares, y a una posición entre el epítipo de linfocitos T auxiliares y el epítipo de células B, está claramente contemplada.
55

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



en la que:

- (i) X se selecciona del grupo que consiste en azufre, oxígeno, disulfuro (-S-S-), y metileno (-CH₂-), y amino (-NH-);
- 5 (ii) m es un número entero que es 1 ó 2;
- (iii) n es un número entero de 0 a 5;
- (iv) R₁ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, carbonilo (-CO-), y R'-CO-, en el que R' se selecciona del grupo que consiste en alquilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono, alquenilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono, y alquinilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono, en el que dicho grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, amino, oxo, acilo o cicloalquilo;
- 10 (v) R₂ se selecciona del grupo que consiste en R'-CO-O-, R'-O-, R'-O-CO-, R'-NH-CO-, y R'-CO-NH-, en los que R' se selecciona del grupo que consiste en alquilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono, alquenilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono, y alquinilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono, en el que dicho grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, amino, oxo, acilo o cicloalquilo; y
- 15 (vi) R₃ se selecciona del grupo que consiste en R'-CO-O-, R'-O-, R'-O-CO-, R'-NH-CO-, y R'-CO-NH-, en los que R' se selecciona del grupo que consiste en alquilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono, alquenilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono, y alquinilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono, en el que dicho grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, amino, oxo, acilo, o cicloalquilo;
- 20

y en la que cada uno de R₁, R₂ y R₃ son iguales o diferentes.

Dependiendo del sustituyente, el resto lipídico de estructura general V puede ser una molécula quiral, en la que los átomos de carbono unidos covalentemente directa o indirectamente a números enteros de R₁ y R₂ son de configuración asimétrica dextrógira o levógira (es decir, R o S).

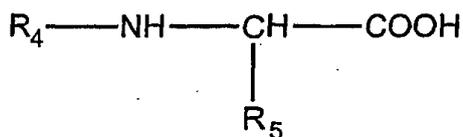
- 25 Preferiblemente, X es azufre; m y n son ambos 1; R₁ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, y R'-CO-, en el que R' es un grupo alquilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono; y R₂ y R₃ se seleccionan del grupo que consiste en R'-CO-O-, R'-O-, R'-O-CO-, R'-NH-CO-, y R'-CO-NH-, en el que R' es un grupo alquilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono.

- 30 Preferiblemente, R' se selecciona del grupo que consiste en: palmitoílo, miristoílo, estearoílo y decanoílo. Más preferiblemente, R' es palmitoílo.

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

En una realización particularmente preferida, X es azufre; m y n son ambos 1; R₁ es hidrógeno o R'-CO-, en el que R' es palmitoílo; y R₂ y R₃ son cada uno R'-CO-O-, en el que R' es palmitoílo. Estos compuestos particularmente preferidos se muestran por la Fórmula (I) y la Fórmula (II) más arriba.

- 35 El resto lipídico también puede tener la siguiente Fórmula General (VIII):



en la que:

5 (i) R_4 se selecciona del grupo que consiste en: (i) un resto de alfa-acil-ácido graso que consiste en entre alrededor de 7 y alrededor de 25 átomos de carbono; (ii) un resto de alfa-alkil-beta-hidroxi-ácido graso; (iii) un beta-hidroxiéster de un resto alfa-alkil-beta-hidroxi-ácido graso, en el que el grupo éster es preferiblemente una cadena lineal o cadena ramificada que comprende más de 8 átomos de carbono; y (iv) un resto de lipoaminoácido; y

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

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

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

15 Preferiblemente, la estructura expuesta en la Fórmula General VIII es un resto lipídico seleccionado del grupo que consiste en: N,N'-diacil-lisina; N,N'-diacilornitina; di(monoalkil)amida o éster de ácido glutámico; di(monoalkil)amida o éster de ácido aspártico; un derivado de N,O-diacílico de serina, homoserina, o treonina; y un derivado de N,S-diacílico de cisteína u homocisteína.

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

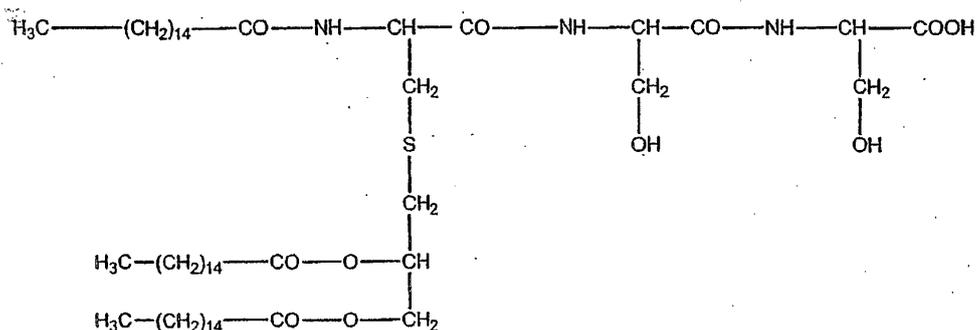
Los restos lipídicos de Fórmula (I), Fórmula (II), Fórmula (VI) o Fórmula (VIII) se modifican adicionalmente durante la síntesis o tras la síntesis, mediante la adición de una o más moléculas espaciadoras, preferiblemente un espaciador que comprende carbono, y más preferiblemente uno o más restos de aminoácido. Se añaden convenientemente a la estructura lipídica vía el grupo carboxilo terminal en una reacción convencional de condensación, adición, sustitución, u oxidación. El efecto de tales moléculas espaciadoras es separar el resto lipídico del resto polipeptídico y aumentar la inmunogenicidad del producto lipopeptídico.

Para este fin, se prefieren particularmente dímeros, trímeros, tetrameros, etc., de serina.

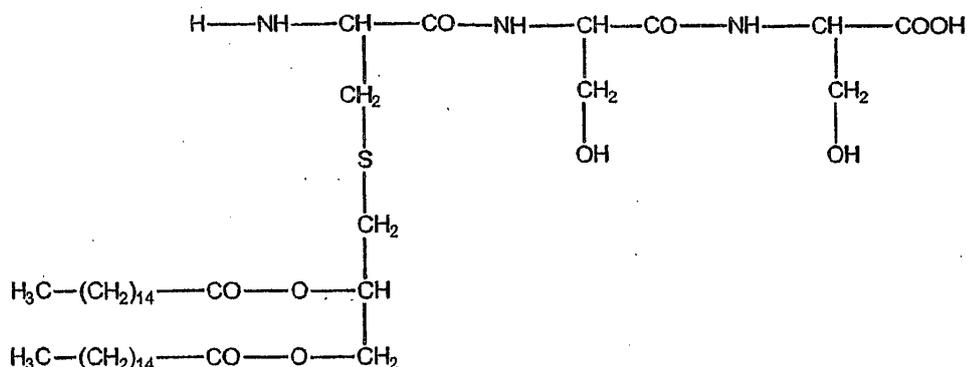
30 Preferiblemente, tales espaciadores incluyen un resto de aminoácido protegido terminal para facilitar la conjugación posterior del lipoaminoácido modificado al polipéptido.

Lipoaminoácidos modificados ejemplares producidos según esta realización se presentan como Fórmula (III) y (IV), que se derivan fácilmente de las Fórmulas (I) y (II), respectivamente, mediante la adición de un homodímero de serina. Como se ejemplifica aquí, para este fin se sintetiza convenientemente Pam₃Cys de Fórmula (I), o Pam₂Cys de Fórmula (II) como los lipoaminoácidos Pam₃Cys-Ser-Ser de Fórmula (III), o Pam₂Cys-Ser-Ser de Fórmula (IV).

35 Fórmula (III)



Fórmula (IV)



5 Como alternativa a la adición de un espaciador al resto lipídico, el espaciador puede añadirse al grupo amino en épsilon del resto de lisina interna en el resto polipeptídico, ya sea como un péptido corto, tal como, por ejemplo, un homodímero, homotrímero, homotetrámero, etc., de serina, o, como alternativa, mediante la adición secuencial de restos de aminoácidos, produciendo de ese modo una cadena polipeptídica ramificada. Este enfoque aprovecha la naturaleza modificada del grupo de cadena lateral terminal en la lisina interna para lograr especificidad en la adición del espaciador. Naturalmente, para evitar la adición de espaciador secuencial, preferiblemente debería protegerse el resto de aminoácido terminal del espaciador, de manera que la desprotección puede facilitar la conjugación del resto lipídico al polipéptido ramificado.

10 Como alternativa, el espaciador puede añadirse a un grupo amino en épsilon no modificado del polipéptido mediante reacción de sustitución nucleófila convencional. Sin embargo, se prefiere seguir este enfoque si el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un único resto de lisina interna y un término N bloqueado.

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

20 También se contemplan combinaciones de diferentes lípidos para uso en los lipopéptidos de la invención. Por ejemplo, uno o dos lipoaminoácidos o lípidos que contienen miristoílo se unen mediante restos de lisina interna o de análogo de lisina al resto polipeptídico, opcionalmente separados del polipéptido por un espaciador, con una o dos moléculas de lipoaminoácidos o lípidos que contienen palmitoílo unidas a los restos de aminoácidos de lisina carboxi terminal. No se excluyen otras combinaciones.

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

30 Como se ejemplifica aquí, se proporcionan lipopéptidos altamente inmunógenos capaces de inducir respuestas de CTL, comprendiendo dichos lipopéptidos Pam₃Cys de Fórmula (I), o Pam₂Cys de Fórmula (II), conjugados vía el grupo amino en épsilon de un resto de lisina situado entre el epítipo de linfocitos T auxiliares CD4⁺ y un epítipo de CTL CD8⁺.

Preparación de lipopéptidos

35 Se describe aquí un método para producir un lipopéptido, que comprende:

- (i) producir un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende:
 - (a) la secuencia de aminoácidos de un epítipo de linfocitos T auxiliares (Th) y la secuencia de aminoácidos de un epítipo de CTL, en el que dichas secuencias de aminoácidos son diferentes; y
 - (b) uno o más restos de lisina interna o restos de análogos de lisina interna; y
- (iii) unir covalentemente cada uno de dicho uno o más restos lipídicos directa o indirectamente a un grupo amino en épsilon de dicho uno o más restos de lisina interna o al grupo de cadena lateral terminal de dicho

40

uno o más restos de análogos de lisina interna, a fin de producir un lipopéptido que tiene el resto lipídico unido al grupo amino en épsilon de dicho resto de lisina interna o que tiene el resto lipídico unido al grupo de cadena lateral terminal de dicho resto de análogo de lisina interna.

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

- 5 Síntesis químicas convencionales a las que se hace referencia aquí son los medios preferidos para producir el resto polipeptídico y el resto lipídico.

Preferiblemente, el resto de lisina interna o el análogo de lisina se modifica mediante eliminación selectiva de un grupo de bloqueo (por ejemplo: Mtt) del grupo de cadena lateral terminal, para permitir la adición de un resto de aminoácido, un resto espaciador o lipídico, incluyendo un lipoaminoácido, en esa posición.

- 10 Para la unión del lípido al polipéptido, resulta conveniente que los grupos funcionales del polipéptido estén protegidos de una manera conocida en la técnica de la síntesis de péptidos, para garantizar que no tienen lugar reacciones indeseables en esos grupos a una velocidad de reacción significativa.

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

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

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

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

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

Los péptidos se lipidan mediante métodos bien conocidos en la técnica. Reacciones estándar de condensación, adición, sustitución u oxidación (por ejemplo, formación de puentes de disulfuro o formación de enlaces de amida

entre un grupo amino terminal en la lisina interna o análogo de lisina con el grupo terminal carboxi de un aminoácido o péptido o lipoaminoácido entrante) dan como resultado la adición de lípido al polipéptido.

5 En una realización alternativa, un péptido de la presente invención para uso como inmunógeno se produce mediante ligación quimioselectiva o conjugación química o química de oxima. Tales métodos se conocen bien en la técnica, y permiten producir componentes peptídicos individuales por medios químicos o recombinantes, seguido de su ligación quimioselectiva en una configuración o conformación u orden apropiado (por ejemplo, Nardin et al., Vaccine 16, 590 (1998); Nardin et al., J. Immunol. 166, 481 (2001); Rose et al., Mol. Immunol. 32, 1031 (1995); Rose et al., Bioconjug. Chem 7, 552 (1996); y Zeng et al., Vaccine 18, 1031 (2000).

Formulaciones de lipopéptido

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

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

Puede ser deseable coadministrar modificadores de la respuesta biológica (BRM) con el lipopéptido, para disminuir la actividad de linfocitos T supresores. Los BRM a modo de ejemplo 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 a dosis baja (CYP; 75, 150 ó 300 mg/m²) (Johnson/Mead, NJ, USA).

30 Uso del lipopéptido en inmunización

Los nuevos lipopéptidos de la invención difieren en aspectos esenciales de conjugados de lipopéptidos conocidos de epítomos de CTL por tener el resto lipídico conjugado exclusivamente a través del grupo de cadena lateral terminal de un resto de lisina interna o análogo de lisina, potenciando de ese modo respuestas de linfocitos T sin la
administración de adyuvante adicional. En consecuencia, una utilidad particular de los lipopéptidos de la presente
35 invención es en los campos de la provocación de una respuesta de linfocitos T, ya sea *in vivo* o *ex vivo*, la preparación de vacunas sintéticas, los métodos de diagnóstico que emplean linfocitos T, y la inmunoterapia para medicina veterinaria y en seres humanos.

Más particularmente, el lipopéptido de la presente invención potencia las respuestas de memoria de CTL frente al resto del epítomo de CTL cuando se administra a un sujeto animal; sin requerir ningún adyuvante para lograr un nivel similar de activación de CTL. Además, se ha observado la maduración potenciada de células dendríticas y otros
40 efectos biológicos, que incluyen la inducción de células CD8⁺ productoras de IFN- γ así como el aclaramiento de células virales, bacterianas y tumorales, tras la administración de vacuna.

Se describe aquí un método para potenciar en un sujeto la inmunidad mediada por células frente al organismo del que deriva el epítomo de CTL, que comprende administrar el lipopéptido de la invención o un derivado o una variante funcionalmente equivalente de dicho lipopéptido, o una composición de vacuna que comprende dicho lipopéptido o
45 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 sobre su superficie y es capaz de proliferar y diferenciarse en un linfocito T de memoria o en un linfocito T efector).

Preferiblemente, el lipopéptido o vacuna se administra profilácticamente a un sujeto que no posee una infección latente o activa por un parásito, bacteria o virus o que sufre un cáncer, o se administra terapéuticamente a un sujeto que posee una infección latente o activa por un parásito, bacteria o virus o que sufre un cáncer. En el presente
55 contexto, el término "activar" significa la capacidad de un linfocito T de reconocer y lisar una célula que posee un antígeno del que deriva el epítomo de CTL, o que la capacidad de un linfocito T para reconocer un epítomo de linfocitos T de dicho antígeno está potenciada, ya sea de manera transitoria o sostenida. El término "activar" también se debe de tomar para que incluya una reactivación de una población de linfocitos T tras la activación de una

infección latente por un parásito, o bacteria o virus, o tras la reinfección con un parásito, o bacteria o virus, o tras la inmunización de un sujeto previamente infectado con un lipopéptido o composición de la invención.

Los expertos en la técnica estarán al tanto de que la activación óptima de linfocitos T requiere el reconocimiento del antígeno/MHC cognado por el receptor de linfocitos 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 coestimuladoras CD28/B7, CD40L/CD40 y OX40/OX40L, pero no son esenciales para la activación de linfocitos T. Pueden funcionar otras rutas de coestimulación.

Para determinar la activación de un CTL o CTL precursor, o el nivel de actividad específica del epítipo, se pueden usar métodos estándar para evaluar el número de linfocitos T CD8⁺ en una muestra. Los formatos de ensayos preferidos incluyen un ensayo de citotoxicidad, tal como, por ejemplo, el ensayo estándar de liberación de cromo, el ensayo para la producción de IFN- γ , tal como, por ejemplo, el ensayo ELISPOT. Estos formatos de ensayos se describen con detalle en los ejemplos que se acompañan.

También se pueden utilizar ensayos de tetrámeros del MHC clase I, particularmente para la cuantificación de linfocitos T CD8⁺ específica del epítipo de CTL (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 del MHC, tal como, por ejemplo, la cadena pesada HLA A2, se asocia con un epítipo o poliepítipo peptídico específico, y se trata para formar un complejo tetramérico 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 después la MHC-péptido biotinilada con avidina desglucosilada que se ha marcado con un fluoróforo, a una relación molar de 4:1. Los tetrámeros producidos se unen a un conjunto distinto de receptores de linfocitos T CD8⁺ (TcRs) en un subconjunto de linfocitos T CD8⁺ derivados del sujeto (por ejemplo, en sangre completa o una muestra de PBMC), para los que el péptido está restringido para 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 tetrámero no unido o tetrámero unido no específicamente, el número de células CD8⁺ que se unen específicamente al tetrámero de HLA-péptido se cuantifica fácilmente mediante métodos de citometría de flujo estándar, tales como, por ejemplo, usando el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). Los tetrámeros también se pueden unir a partículas paramagnéticas o a perlas magnéticas para facilitar la eliminación del informador no unido específicamente y la clasificación de las células. 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 análisis posterior. Los tetrámeros del MHC permiten análisis cuantitativos exactos de respuestas inmunitarias celulares específicas, incluso para sucesos extremadamente raros que ocurren en menos de 1% de linfocitos T CD8⁺ (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⁺ en una muestra también se puede determinar fácilmente, tal como, por ejemplo, incubando la muestra con un anticuerpo monoclonal frente a CD8 conjugado a una molécula informadora diferente a la 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 tanto del número total de células CD8⁺ y linfocitos T unidos al tetrámero como la determinación de la proporción de linfocitos T totales unidos al tetrámero.

Debido a que los linfocitos T auxiliares CD4⁺ funcionan en CMI como productores de citocinas, tales como, por ejemplo, IL-2, para facilitar la expresión de linfocitos T CD8⁺ o para interactuar con la APC haciéndola de ese modo más competente para activar linfocitos T CD8⁺, la producción de citocina es una medida indirecta de la activación de linfocitos T. En consecuencia, los ensayos de citocina también se pueden usar para determinar la activación de un CTL o CTL precursor, o el nivel de inmunidad mediada por células 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 específicos del epítipo.

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

Preferiblemente, el ensayo de citocina se lleva a cabo sobre sangre completa o PBMC o capa leucocitaria.

Preferiblemente, el lipopéptido 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⁺.

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

Por "CMI" se quiere decir que los CTLs activados y clonalmente expandidos están restringidos para MHC y son específicos para un epítipo de CTL. Los CTLs se clasifican en base a la especificidad antigénica y a la restricción para MHC (es decir, CTLs no específicos y CTLs específicos del antígeno, restringidos para MHC). Los CTLs no

- específicos están compuestos de diversos tipos celulares, incluyendo células NK, y pueden funcionar muy tempranamente en la respuesta inmunitaria para disminuir la carga patogénica, mientras que las respuestas específicas del antígeno todavía se están creando. Por el contrario, los CTLs restringidos para MHC logran actividad óptima más tarde que los CTL no específicos, generalmente antes de la producción de anticuerpos. Los CTLs
- 5 específicos del antígeno inhiben o reducen la diseminación de un patógeno y preferiblemente terminan la infección.
- La activación de CTL, la expansión clonal, o CMI puede ser inducida sistémicamente o localizada compartimentalmente. En el caso de efectos localizados compartimentalmente, se prefiere utilizar una composición de vacuna formulada adecuadamente para la administración a ese compartimento. Por otro lado, no hay tales requisitos restrictivos para inducir activación de CTL, expansión o CMI sistémicamente en el sujeto.
- 10 La cantidad eficaz de lipopéptido a administrar, ya sea solo o en una composición de vacuna para provocar activación de CTL, expansión clonal o CMI, variará, dependiendo de la naturaleza del epítipo inmunógeno, la vía de administración, el peso, la edad, el sexo, o la salud general del sujeto inmunizado, y de la naturaleza de la respuesta de CTL buscada. Todas las citadas variables se determinan empíricamente por medios reconocidos en la técnica.
- 15 El lipopéptido, 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 mediante otra vía conocida. Para inyección intravenosa, es deseable incluir uno o más reponedores de fluidos y nutrientes.
- 20 La dosis óptima a administrar y la vía preferida para la administración se establecen usando modelos de animales, tales como, por ejemplo, inyectando a un ratón, rata, conejo, cobaya, perro, caballo, vaca, cabra o cerdo una formulación que comprende el lipopéptido, y monitorizando entonces la respuesta inmunitaria de CTL usando cualquier ensayo convencional.
- 25 El uso de ratones transgénicos HLA A2/K^b que portan un locus del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I quimérico de humano y ratón compuesto de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del alelo HLA A*0201 humano y el dominio $\alpha 3$ de las moléculas H-2K^b clase I de ratón (Vitiello et al., J. Exp. Med. 173, 1007, 1991) es particularmente preferido para ensayar respuestas *in vivo* a un lipopéptido de la invención que comprende un epítipo de CTL restringido para HLA A2, o una composición de vacuna que comprende el mismo.
- 30 Sin estar atados por ninguna teoría o modo de acción, se cree que los efectos biológicos de los lipopéptidos son ejercidos a través de su capacidad para estimular y madurar células dendríticas. Son las células dendríticas las que después activan linfocitos T CD4+ y CD8+ en los ganglios linfáticos que drenan. Por esta razón, no activaríamos o no sería posible activar linfocitos T directamente como se tiene pensado. La siguiente sección se ha modificado por lo tanto en consecuencia para dar cabida a la noción de activación de células dendríticas.
- 35 Se describe aquí un método para potenciar la inmunidad mediada por células de un sujeto, comprendiendo dicho método poner en contacto células *ex vivo*, preferiblemente células dendríticas, obtenidas de un sujeto, con un lipopéptido inmunológicamente activo de la invención, o un derivado o variante del mismo o una composición de vacuna que comprende dicho lipopéptido o derivado o variante, durante un tiempo y en condiciones suficientes para madurar dichas células dendríticas. Dichas células dendríticas son entonces capaces de conferir activación de linfocitos T específica del epítipo.
- También se describe aquí un método para potenciar la inmunidad mediada por células de un sujeto, comprendiendo dicho método:
- 40 (i) poner en contacto células dendríticas *ex vivo* obtenidas de un sujeto con un lipopéptido inmunológicamente activo de la invención, o un derivado o variante del mismo o una composición de vacuna que comprende dicho lipopéptido o derivado o variante, durante un tiempo y en condiciones suficientes para madurar dichas células dendríticas; y
- 45 (ii) introducir autólogamente al sujeto las células dendríticas activadas, o singénicamente a otro sujeto, a fin de que se produzca la activación de linfocitos T.
- El linfocito T puede ser un CTL o una célula precursora de CTL.
- El sujeto del que se obtienen las células dendríticas puede ser el mismo sujeto o un sujeto diferente al sujeto que se esté tratando. El sujeto que se está tratando puede ser cualquier sujeto que porte una infección latente o activa por un patógeno, tal como, por ejemplo, un parásito, bacteria o virus, o un sujeto que de otro modo tiene necesidad de
- 50 obtener vacunación frente a tal patógeno, o está deseoso de obtener tal vacunación. El sujeto que se está tratando también se puede tratar para un tumor que él posee.
- Por "actividad específica del epítipo" se quiere decir que el linfocito T se hace capaz de ser activado como se define aquí anteriormente (es decir, el linfocito T reconocerá y lisará una célula que posee un patógeno del que se deriva el epítipo de CTL, o es capaz de reconocer un epítipo de linfocitos T de un antígeno de un patógeno ya sea
- 55 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 hace capaz de reconocer y lisar una célula que posee el patógeno, o se hace capaz de reconocer un epítipo de linfocitos T de un antígeno del patógeno ya sea transitoriamente o de manera sostenida.

5 Para tal aplicación *ex vivo*, las células dendríticas están contenidas preferiblemente en una muestra biológica obtenida de un sujeto, tal como, por ejemplo, sangre, PBMC o una fracción de capa leucocitaria derivada de aquella.

10 También se describe aquí un método para proporcionar o potenciar inmunidad frente a un patógeno en un sujeto no infectado, que comprende administrar a dicho sujeto un lipopéptido inmunológicamente activo de la invención, o un derivado o variante del mismo o una composición de vacuna que comprende dicho lipopéptido o derivado o variante, durante un tiempo y en condiciones suficientes para proporcionar memoria inmunológica frente a una infección futura por el patógeno. Al igual que con las otras realizaciones descritas aquí, el patógeno puede ser un parásito, virus o bacteria, y es preferiblemente un parásito, virus o bacteria citado aquí anteriormente a partir del que se ha identificado un epítipo de CTL.

15 También se describe aquí un método para potenciar o conferir inmunidad frente a un patógeno en un sujeto no infectado, que comprende poner en contacto *ex vivo* células dendríticas obtenidas de dicho sujeto con un lipopéptido inmunológicamente activo de la invención, o un derivado o variante del mismo o una composición de vacuna que comprende dicho lipopéptido o derivado o variante, durante un tiempo y en condiciones suficientes para conferir actividad específica del epítipo a los linfocitos T.

20 En consecuencia, esta descripción proporciona la administración de una vacuna profiláctica al sujeto, en la que el sustituyente activo de dicha vacuna (es decir, el lipopéptido de la invención) induce memoria inmunológica vía linfocitos T de memoria en un individuo no infectado. Las realizaciones preferidas de protocolos de vacunación descritas aquí para potenciar la inmunidad mediada por células de un sujeto se aplica del mismo modo a la inducción de memoria inmunológica frente al patógeno en un sujeto.

25 La presente invención se describe además con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes y a los dibujos. Los ejemplos proporcionados aquí en ratones son modelos aceptados para enfermedades equivalentes en seres humanos, y la persona experta será capaz fácilmente de extender los hallazgos presentados aquí para tales modelos a un contexto de enfermedad humana sin experimentación innecesaria.

EJEMPLO 1

Materiales y métodos

Productos químicos

30 A menos que se establezca de otro modo, los productos químicos fueron de grado analítico o su equivalente. N,N'-dimetilformamida (DMF), piperidina, ácido trifluoroacético (TFA), hexafluorofosfato de O'benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y diisopropiletilamina (DIPEA) y diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) se obtuvieron de Auspep Pty. Ltd., Melbourne, Australia y Sigma-Aldrich Pty. Ltd., Castle Hill, Australia. Tetrafluoroborato de O'benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) se obtuvo de Bachem, (Bachem AG, Suiza).

35 El diclorometano (DCM) y el éter dietílico fueron de Merck Pty Ltd. (Kilsyth, Australia). El fenol y el triisopropilsilano (TIPS) fueron de Aldrich (Milwaukee, WI), y el ácido trinitrobencilsulfónico (TNBSA) y la diaminopiridina (DMAP) de Fluka; 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) se obtuvo de Sigma, y el ácido palmítico procedía de Fluka.

Virus

40 Los virus de la gripe tipo A usados en este estudio fueron un virus del subtipo H3N1 denominado Mem 71, que derivó mediante redistribución genética de A/Memphis/1/71 (H3N2) X A/Bellamy/42 (H1N1). El virus se hizo crecer durante 2 días en la cavidad alantoidea de huevos de gallina embrionados de 10 días. El fluido alantoideo que contiene virus se almacenó en alícuotas a -70°C. Los títulos de virus infeccioso se obtuvieron mediante ensayo de formación de placas en monocapas de células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) (Tannock et al, Infect. Immun. 43, 457-462, 1984), y se expresan como PFU/mililitro.

Bacteria

Se cultivó *Listeria monocytogenes* EGD toda la noche a 37°C en placas de Agar de Sangre de Caballo (HBA). La bacteria se eliminó de las placas por lavado usando PBS estéril, y la concentración se ajustó a 5×10^3 células de *Listeria*/ml. Ratones Balb/c se infectaron intravenosamente con 1×10^3 células de *Listeria*. La dosis se comprobó retrospectivamente cultivando en placas de HBA diluciones en serie de 10 veces.

Síntesis peptídica

Péptidos que comprenden epítipos de CTL del virus de la gripe

Se sintetizó un panel de inmunógenos que incorporó péptidos que representan un determinante mínimo para linfocitos T CD8+ y/o un determinante para linfocitos T CD4+, ambos del virus de la gripe. El péptido NP (147-155)

5 con la secuencia TYQRTRALV (un determinante de CTL presente en la NP del virus PR8; SEC ID NO: 2) es el determinante de linfocito T CD8+ dominante reconocido por ratones BALB/c y es común a todas las cepas del virus de la gripe tipo A (Bodmer et al, Cell 52, 253-258, 1988; y Sherman et al, J. Exp. Med. 175, 1221-1226, 1992). El péptido HA2 (166-180), con la secuencia ALNNRFQIKGVELKS (SEC ID NO: 1), es un determinante de linfocitos T auxiliares CD4⁺ presente en la cadena HA2 de hemaglutinina del virus de la gripe Mem 71 provoca linfocitos T CD4⁺ que son reactivos de forma cruzada con todos los virus del subtipo H3 (Jackson et al, Virology 198, 153-170, 1994).

Péptidos que comprenden epítomos de CTL de *L. monocytogenes*

10 Se sintetizó un péptido inmunógeno que incorporó un epítomo de CTL mínimo con la secuencia de aminoácidos GYKDGNEYI (restos 91-99 de la proteína listerialisina) de *L. monocytogenes* (es decir, SEC ID NO: 172), y un epítomo de linfocitos T auxiliares procedente de CDV-F (SEC ID NO: 20).

Péptidos que comprenden un epítomo de CTL expresado por la estirpe celular tumoral B16-OVA

Se sintetizó un péptido inmunógeno que incorporó un epítomo de CTL con la secuencia de aminoácidos SIINFEKL (SEC ID NO: 173) y un epítomo de linfocitos T auxiliares procedente de CDV-F (SEC ID NO: 20).

Péptidos que comprenden un epítomo de CTL procedente de la proteína central del virus de la hepatitis C

15 Se sintetizó un péptido inmunógeno que incorporó un epítomo de CTL con la secuencia de aminoácidos DLMGYIPLV (SEC ID NO: 176) y un epítomo de linfocitos T auxiliares procedente de CDV-F (SEC ID NO: 20).

Procedimientos generales

20 Los inmunógenos sintéticos se ensamblaron mediante metodología de fase sólida convencional usando química de Fmoc. El procedimiento general usado para la síntesis peptídica se ha descrito por Jackson et al., Vaccine 18, 355 (1999). Para permitir la unión lipídica entre el epítomo de linfocitos T auxiliares CD4⁺ y el epítomo de CTL, se insertó Fmoc-lisina(Mtt)-OH en un punto entre los dos epítomos en el centro aproximado del péptido unido a resina. Tras la finalización de la síntesis peptídica, se eliminó el grupo Mtt mediante lavado en flujo continuo con TFA al 1% en diclorometano durante un periodo de 30-45 min.

Síntesis de restos lipídicos de Fórmula (I)

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

30 Síntesis de restos lipídicos de Fórmula (II)

Se prepararon Pam₂Cys se adaptó a partir de los métodos descritos previamente como se describe por Jones et al., Xenobiotica 5, 155 (1975) y Metzger et al., Int J Pept Protein Res 38, 545 (1991), con la excepción de que se usó 3-bromo-propan-1,2-diol en lugar de 3-cloro-propan-1,2-diol, y se usó centrifugación y no filtración para recuperar el producto.

35 Síntesis de lipopéptidos

Los lipopéptidos producidos en este estudio tuvieron las estructuras generales mostradas en la Figura 1. En la Figura 2 se muestran las secuencias de aminoácidos de los restos peptídicos incluidos en los diversos lipopéptidos. Pam₂Cys se acopló a péptidos según los métodos descritos por Jones et al., Xenobiotica 5, 155 (1975) y Metzger et al., Int J Pept Protein Res 38, 545 (1991), con las siguientes modificaciones:

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

45 Se añadió trietilamina (6 g, 8,2 ml, 58 mmoles) a hidrócloruro de L-cisteína (3 g, 19 mmoles) y 3-bromopropan-1,2-diol (4,2 g, 2,36 ml, 27 mmoles) en agua, y la disolución homogénea se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 días. La disolución se redujo a vacío a 40°C dando un residuo blanco que se llevó a ebullición con metanol (100 ml), se centrifugó, y el residuo se disolvió en agua (5 ml). Esta disolución acuosa se añadió a acetona (300 ml), y el precipitado se aisló mediante centrifugación. El precipitado se purificó mediante varias precipitaciones en agua con acetona para dar S-(2,3-dihidroxipropil)cisteína como un polvo amorfo blanco (2,4 g, 12,3 mmoles, 64,7%).

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

50 Se disolvió S-(2,3-dihidroxipropil)cisteína (2,45 g, 12,6 mmoles) en carbonato de sodio al 9% (20 ml). Se añadió una disolución de fluorenilmetoxicarbonil-N-hidroxisuccinimida (3,45 g, 10,5 mmoles) en acetonitrilo (20 ml), y la mezcla se agitó durante 2 h, entonces se diluyó con agua (240 ml), y se extrajo con éter dietílico (25 ml x 3). La fase acuosa se acidificó hasta pH 2 con ácido clorhídrico concentrado y entonces se extrajo con acetato de etilo (70 ml x 3). El

extracto se lavó con agua (50 ml x 2) y disolución saturada de cloruro de sodio (50 ml x 2), se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó hasta sequedad. La recristalización en éter y acetato de etilo a -20°C produjo un polvo incoloro (2,8 g, 6,7 mmoles, 63,8%).

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

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

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

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

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

20 La cromatografía de líquidos de alta presión en fase inversa analítica (RP-HPLC) se llevó a cabo usando una columna Vydac C4 (4,6 x 300 mm) instalada en un sistema de HPLC Waters, y se desarrolló a un caudal de 1 ml/min. usando TFA al 0,1% en H₂O y TFA al 0,1% en CH₃CN como el disolvente límite. Todos los productos presentaron un único pico principal en la RP-HPLC analítica y tuvieron la masa esperada cuando se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en un instrumento BIFLEX de Bruker equipado con extracción iónica retardada.

25 En algunos casos se añaden dos restos de serina (Ser-Ser) entre el péptido y el resto lipídico, en cuyo caso se añadieron restos de serina al grupo amino en ϵ del resto de lisina central antes de que se uniera el resto lipídico.

En la Figura 1 se muestra un diagrama esquemático de los péptidos y lipopéptidos usados en este estudio.

Protocolos de inmunización

Péptidos que comprenden epítomos de CTL del virus de la gripe

30 Se inocularon grupos de ratones BALB/c hembra, de 6 a 8 semanas de edad, en el día 0 y de nuevo en el día 28. Para las inoculaciones subcutáneas (s.c.), se prepararon 9 nmoles de constructos lipopeptídicos en un volumen de 100 μ l de disolución salina por dosis, y péptidos no lipidados formulados como una emulsión en un volumen igual de adyuvante completo de Freund (CFA) para la inyección primaria, o adyuvante incompleto de Freund para la inoculación secundaria. Para las inoculaciones intranasales (i.n.), se aplicaron 9 nmoles de péptido en 50 μ l de disolución salina a los orificios nasales de ratones anestesiados con pentrano para inhalación.

Péptidos que comprenden un epítomo de CTL de *L. monocytogenes*

40 Se inocularon 5 ratones BALB/c con 9 nmoles de péptido no lipidado ([P25]-Lys-[LLO91-99]), o péptido lipidado ([P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[LLO91-99]) en el cual el lípido se unió entre los dos epítomos en el centro aproximado de la molécula, o con 1000 bacterias. En el caso de vacuna peptídica, la inoculación fue subcutánea, y en el caso de la inoculación bacteriana fue intravenosa. El número de células productoras de interferón- γ presentes en el bazo se midió en el día 28 tras la estimulación *in vitro* con el epítomo de CTL o sin antígeno. El eje vertical muestra el número de células productoras de interferón- γ por 1.000.000 esplenocitos.

Péptidos que comprenden un epítomo de CTL de ovoalbúmina

45 Cada uno de 9 ratones C57BL/6 (8-10 semanas) se inmunizó subcutáneamente con 20 nmoles de péptido lipidado [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[SIINFEKL] o péptido no lipidado [P25]-Lys-[SIINFEKL] en 100 μ l de volumen de disolución salina. En el caso de péptido lipidado, el lípido se unió entre los dos epítomos en el centro aproximado de la molécula.

Péptidos que comprenden un epítomo de CTL de la proteína central del virus de la hepatitis C

50 Se incubaron células dendríticas derivadas de monocitos humanos con lipopéptido [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[HCV] (5 μ g/ml) durante 48 horas antes de tefir con anticuerpos conjugados a FITC para HLA-DR, CD83 y CD86 antes del análisis mediante citometría de flujo.

Exposición de ratones inmunizados a virus de la gripe

Ratones anestesiados con pentano previamente inmunizados con péptidos que comprenden epítomos de CTL del virus de la gripe se expusieron intranasalmente (i.n.) a $10^{4.5}$ PFU del virus de la gripe Mem 71 infeccioso. Cada ratón recibió 50 μ l de virus en forma de fluido alantoideo diluido en PBS. A los 5 días después de la exposición, los ratones se eutanasiaron mediante dislocación cervical, y los pulmones se retiraron y se transfirieron asépticamente a botellas que contienen 1,5 ml de disolución salina balanceada de Hank suplementada con 100 U de penicilina, 100 μ g de estreptomina, y 30 μ g de gentamicina por ml. Los homogenados pulmonares se prepararon usando un homogeneizador de tejidos, y el material celular se peletizó mediante centrifugación a 300 X g durante 5 min. Los sobrenadantes se eliminaron, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -70°C hasta que se necesitaron. Los títulos de virus infeccioso en los sobrenadantes pulmonares se determinaron mediante ensayo de placas en monocapas de células MDCK (Tannock et al, Infect. Immun. 43, 457-462, 1984).

Exposición de ratones inmunizados a *L. monocytogenes*

Ratones inmunizados s.c. con 9 nmoles de inmunógeno peptídico o PBS, o i.v. con 1000 bacterias, se expusieron mediante inyección i.v. a bacterias 28 días tras la sensibilización, y el número de unidades formadoras de colonia de bacterias presentes en el hígado se determinó 28 días después de la exposición.

Exposición de ratones inmunizados a células tumorales

Exposición a melanoma

14 días después de la inoculación con péptido no lipidado [P25]-Lys-[SIINFEKL] o con péptido lipidado [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[SIINFEKL], 6 ratones de cada grupo se expusieron a 2×10^5 células de melanoma que expresan ovoalbúmina [B16-OVA] y por lo tanto expresaron el epítomo de CTL SIINFEKL (Bellone, et al, J. Immunol. 165:2651-2656). Se eliminó el pelo alrededor del sitio de la inyección con una afeitadora eléctrica antes de la inyección, para facilitar la medida de los tumores emergentes. Se monitorizaron los tumores en crecimiento, y los animales se sacrificaron cuando el tamaño tumoral alcanzó 15 por 15 mm. El área media del tumor se calculó para cada grupo de tratamiento en el número indicado de días tras la exposición al tumor.

Exposición a carcinoma pulmonar de Lewis

Se inyectaron ratones con 3×10^4 células tumorales de pulmón de Lewis que se habían transfectado con ovoalbúmina y por lo tanto expresaron el epítomo de CTL (Nelson et al., J Immunol. 166: 5557-5566, 2001). Cuatro días después de recibir las células tumorales, los animales se inocularon con 20 nmoles de péptido lipidado [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[SIINFEKL], péptido no lipidado [P25]-Lys-[SIINFEKL] o con PBS subcutáneamente en la base de la cola. Se administró una segunda dosis de inmunógeno once días después de recibir las células tumorales. Los animales se monitorizaron para la incidencia tumoral y la supervivencia; los animales se eutanasiaron cuando el área tumoral superó 100 mm².

Tinción con tetramero de linfocitos T CD8+ específicas del péptido

Linfocitos T CD8⁺ específicas para un epítomo de CTL restringido para H-2K^d inmunodominante que consiste en los restos de aminoácidos 147-155 de la nucleoproteína de la cepa A/Puerto Rico/8/34 del virus de la gripe (PR8; H1N1) en el inmunógeno de lipopéptido, como se expone en SEC ID NO: 2, se identificaron usando complejos tetraméricos de la glicoproteína H-2K^d con péptido de CTL unido (TYQRTRALV; SEC ID NO: 2) (Bodmer et al, Cell 52: 253-258, 1988; Sherman et al, J. Exp. Med. 175: 1221-1226, 1992).

El monómero fue un regalo del Profesor Peter Doherty, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad de Melbourne, y se obtuvo en el St. Jude Children's Research Hospital, Memphis TN, USA. El tetramero se obtuvo incubando el monómero con Estreptavidina-ficoeritrina (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) a una relación molar 4:1.

Los linfocitos del pulmón se trataron en primer lugar con 20 μ l de suero de ratón normal (NMS) durante 5 min. a temperatura ambiente, y después se tiñeron durante 60 min. con los complejos tetraméricos a una dilución 1:25. Esto fue seguido de la tinción con anti-CD8 α (53-6,7) conjugado con aloficocianina durante 30 min. en hielo, y se lavó dos veces y se analizó mediante un clasificador celular activado por fluorescencia (FACSort, Becton Dickinson, San José, USA). Los datos se analizaron mediante FlowJo (Tree Star, Inc, CA, USA).

Medio de cultivo de linfocitos T

El medio de cultivo de linfocitos T consistió en RPMI 1640 (CSL Ltd.) suplementado con 10% (vol/vol) de suero fetal de ternera inactivado por calor, 2 mM de L-glutamina, 2 mM de piruvato de sodio, 30 μ g de gentamicina/ml, 100 μ g de estreptomina/ml, 100 UI de penicilina/ml, y 10^{-4} M de 2-mercaptoetanol.

Ensayos de linfocitos T citotóxicos

Se generaron células efectoras secundarias ya sea a partir de ganglios linfáticos inguinales y poplíteos de ratones que se habían inmunizado s.c. 7 días previamente con inmunógenos de lipopéptido, o a partir de esplenocitos de ratones sensibilizados al menos 28 días previamente con los inmunógenos de lipopéptido. Brevemente, 4×10^7 células de ganglios linfáticos o esplenocitos, sin eritrocitos por tratamiento con cloruro de amonio tamponado con Tris (0,15 M de NH_4Cl en 17 mM de Tris-HCl a pH 7,2), se cultivaron con 10^7 esplenocitos singénicos infectados con virus irradiado (2.200 rads, fuente ^{60}Co) o pulsados con lipopéptidos en matraces de cultivo de tejidos de 25 cm^2 (Falcon) que contienen 15 ml de medio de cultivo de linfocitos T. Los esplenocitos infectados con el virus se habían preincubado a 37°C durante 30 min. con 3.000 unidades hemaglutinantes de virus Mem 71 infeccioso o PR8 en 1 ml de RPMI libre de suero, y se lavaron una vez antes de la adición al matraz. Los esplenocitos pulsados con lipopéptidos se habían preincubado a 37°C durante 60 min. con $100 \mu\text{g}$ del lipopéptido de CTL/ml, y también se lavaron una vez antes de la adición al matraz. Después de 5 días de cultivo a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO_2 , las células se lavaron tres veces y se usaron en ensayos de liberación de ^{51}Cr . Los ensayos de liberación de ^{51}Cr se llevaron a cabo por triplicado como se describe previamente (Harling-McNabb et al, Int. Immunol. 11, 1431-1439, 1999), usando como dianas células de mastocitoma P815 (*H-2^d*, DBA/2).

15 Ensayos de linfocitos T citotóxicos *in vivo*

Se determinó *in vivo* la capacidad de diversos inmunógenos a base de péptidos para inducir CTL específicos de epítipo. Se inocularon intranasalmente grupos de tres ratones con diversos lipopéptidos en $50 \mu\text{l}$ de PBS y se expusieron a Mem71 en el día 28. A fin de analizar *in vivo* la citotoxicidad específica del determinante de CTL, se pulsaron esplenocitos singénicos con el determinante de CTL y se marcaron con CFSE de alta intensidad ($2,5 \mu\text{M}$). La lisis específica del antígeno se controló coinyectando esplenocitos singénicos marcados con CFSE de baja intensidad ($0,25 \mu\text{M}$). En el día 4 después de la infección, se inyectó intravenosamente una mezcla de 15×10^6 células de cada población de células diana. Los ratones se sacrificaron 16 h más tarde, y los bazo se analizaron en busca de la presencia de poblaciones de células ricas en CFSE y pobres en CFSE, mediante citometría de flujo. Para cada muestra, se analizó un total de 1×10^6 linfocitos. Los ratones individuales se representaron mediante los cuadrados en negro, y las barras representan el título de la media geométrica.

Ensayo ELISPOT para células que segregan $\text{IFN-}\gamma$

Células que segregan $\text{IFN-}\gamma$ específicas de CTL se enumeraron mediante un ensayo ELISPOT modificado a partir de aquel de Murali-Krishna et al, Immunity 8, 177-187, 1998. Placas de microtitulación de policloruro de vinilo de fondo plano (96 pocillos; Dynatech) se revistieron toda la noche con $50 \mu\text{l}$ de anticuerpo de rata anti- $(\text{IFN-}\gamma)$ de ratón (clon R4-14a2) a $5 \mu\text{g/ml}$ en PBS. Los sitios desocupados en los pocillos se bloquearon entonces mediante incubación durante 1 h con 10 mg de seroalbúmina bovina/ml en PBS, y las placas se lavaron tres veces con PBS que contiene 0,05% de Tween 20 (PBST). Entonces se añadieron a los pocillos diluciones de dos veces de esplenocitos o de células de ganglios linfáticos en medio de linfocitos T, junto con 5×10^5 esplenocitos singénicos irradiados (2.200 rads, fuente ^{60}Co) procedentes de ratones no inmunizados y 10 U de interleucina-2 humana recombinante (Pharmingen, San Diego, Calif.)/pocillo. Las células se incubaron a 37°C en 5% de CO_2 durante 18 h en presencia o ausencia del péptido de CTL a una concentración de $1 \mu\text{g}$ de péptido/ml. Las células se lisaron entonces y se eliminaron enjuagando las placas, inicialmente con agua destilada y después con PBST. Después, se añadieron $50 \mu\text{l}$ de una dilución 1/500 de anticuerpo biotinilado anti- $(\text{IFN-}\gamma)$ de ratón (clone XMG 1.2; Pharmingen), y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. Las placas se lavaron nuevamente, y se añadieron a cada pocillo $50 \mu\text{l}$ de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Pharmingen; dilución 1/400 en 5 mg de seroalbúmina bovina/ml de PBST); las mezclas se incubaron entonces durante otras 2 h. Las placas se lavaron, y se añadieron a cada pocillo $100 \mu\text{l}$ de sustrato ELISPOT (Sedgwick et al, J. Immunol. Methods 57, 301-309, 1983) que contiene 1 mg de BCIP (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo) por ml de tampón de 2-amino-2-metil-1-propinol (Sigma). Cuando se hubieron desarrollado manchas de color azul verdoso, las placas se lavaron con agua y se secaron, y las manchas se contaron con la ayuda de un microscopio invertido.

Cultivo de células dendríticas D1

Células dendríticas (DC) se cultivaron en medio a base de IDDM completo. Éste consistió en Medio de Dulbecco Modificado de Iscove (IMDM) que contiene 25 mM de HEPES y sin alfa-tioglicerol o L-glutamina (JRH Bioscience, Lenexa, USA), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal de ternera inactivado por calor (56°C , 30 min.) (CSL Ltd., Parkville, Victoria, Australia), gentamicina ($24 \mu\text{g/ml}$), glutamina (2 mM), piruvato de sodio (2 mM), penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (180 $\mu\text{g/ml}$) y 2-mercaptoetanol (0,1 mM). Para la generación de DC, IDDM completo se suplementó además con 30% de sobrenadante procedente de células NIH/3T3 cultivadas y 5% de GM-CSF en forma de un sobrenadante procedente de células Ag8653 transfectadas con el gen GM-CSF (medio de DC).

El método de cultivo para células dendríticas inmaduras se adaptó a partir de Winzler et al., J. Exp Med. 185, 317 (1997). Se sembraron esplenocitos procedentes de un ratón BALB/c a $1,5 \times 10^6$ células por cápsula de 55 mm (Techno-Plas, S.A., Australia) en 3 ml de medio de DC, y se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 . Todo el equipo usado para el cultivo estaba libre de pirógenos. El medio se cambió cada 4 días, y todas las células se devolvieron a la cápsula. En el día 12, tanto las células suspendidas como las células débilmente adherentes se recogieron pipeteando energicamente y después aspirando el medio. El procedimiento se repitió con 2 ml de PBS. Las células

fuertemente adherentes que quedan se desecharon. Las células recogidas se peletizaron mediante centrifugación y se volvieron a sembrar en una nueva cápsula. Las células se mantuvieron subsiguientemente en un ciclo alterno de 4 días de cambio de medio y pasada. Tras 1 mes de cultivo continuo, las células flotantes y semiadherentes tuvieron el aspecto y las características de tinción de DC inmaduras, y se denominaron células D1. En estas condiciones de pasada, la mayoría de las células D1 cultivadas mantienen un fenotipo inmaduro caracterizado por un nivel de expresión intermedio de moléculas del MHC clase II de la superficie celular.

Análisis citométrico de flujo de células D1

Células D1 (1×10^5 células por muestra) se sembraron en una nueva cápsula de Petri con 1 ml de medio de DC, y se incubaron con 0,0045 nmoles de lipopéptido, disuelto en medio IMDM completo. Para la maduración de DC, se usó lipopolisacárido (LPS) purificado de *E. coli* serotipo O111:B4 (Difco, Detroit, Michigan, USA, a 5 $\mu\text{g/ml}$ como control positivo. Tras la incubación durante toda la noche, las células se cosecharon y se lavaron una vez con PBS con 1% de FCS. Para evitar la unión no específica a FC γ RII/III, las células se preincubaron con 20 μl de suero de ratón normal durante 5 min. a temperatura ambiente. Las células se expusieron entonces a anticuerpo monoclonal 14-4-4S conjugado con FITC (IgG_{2a}, anti-I-E^{K,d}, Ozato et al., *J. Immunol.*, 124, 533 (1980)) durante 30 min. en hielo. Como control de isotipo, se usó anticuerpo monoclonal 36/1 (Brown et al., *Arch Virol* 114: 1, 1990), que es específico para el antígeno del virus de la gripe a partir del que deriva el epítipo de linfocitos T auxiliares. Todos los anticuerpos se usaron a 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Las muestras se lavaron una vez con PBS que contiene 1% de FCS, y se fijaron con PBS que contiene 4% de paraformaldehído en hielo durante 15 minutos. El análisis de citometría de flujo se llevó a cabo usando un FACSort (Becton Dickinson, San José, USA), y los datos se analizaron usando el software FlowJo (Tree Star, Inc., San Carlos, CA, USA).

Cultivo de células dendríticas humanas

Generación de células dendríticas derivadas de monocitos

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PMBCs) a partir de preparaciones de capa leucocitaria obtenidas de donantes de sangre (Banco de Sangre de la Cruz Roja, Melbourne, Australia) mediante separación por gradiente en Ficoll Paque (Amersham Pharmacia, Suecia). Las células se lavaron tres veces en PBS y se incubaron con cantidades óptimas de sobrenadante de hibridoma anti-CD14 murino (3C10, American Type Culture Collection) durante 45 minutos en hielo. Después de dos lavados, las células se incubaron adicionalmente con microperlas de anti-IgG murino de cabra (Miltenyi Biotech, Alemania) según el protocolo del fabricante. Los monocitos CD14⁺ se seleccionaron entonces positivamente mediante purificación por afinidad usando una columna de clasificación celular activada por imanes (MACS). Las DC inmaduras se generaron cultivando los monocitos en GM-CSF e IL-4 (40 ng/ml y 20 ng/ml, respectivamente [Schering Plough, USA]) suplementado con RPMI-1640 (Gibco, USA) que contiene 10% de FCS (CSL, Australia), 2 mmoles/l de glutamina, 2 mmoles/l de piruvato de sodio, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina, 30 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina y 0,1 mmoles/l de 2-mercaptoetanol. Las células se cultivaron durante 5 días antes del uso con cambios de los medios de mitad del volumen cada 2 días.

Medida de la maduración de DC

La capacidad de inmunógenos a base de péptidos y lipopéptidos para aumentar la expresión de MHC clase II, CD83 y CD86 en células dendríticas derivadas de monocitos humanos se determinó incubando 5×10^5 células por ml durante 2 días en medio suplementado con GM-CSF e IL-4 y LPS (5 $\mu\text{g/ml}$), péptido no lipidado [Th]-Lys-[CTL] (5 $\mu\text{g/ml}$) o lipopéptido [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL] (5 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 horas. El análisis fenotípico de los marcadores de superficie se llevó a cabo mediante tinción con anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromo frente a HLA-DR (G46-6 [L243]), CD83 (HB15e), CD86 (nº de Catálogo 2331 [FUN-1]) y anticuerpos de isotipo emparejado apropiados (MOPC-21 y G155-178) de Becton Dickinson (USA), según los protocolos del fabricante. Las células se lavaron entonces, se fijaron en 1% de formaldehído, y se analizaron en un citómetro de flujo. Los histogramas son representativos de células granulares grandes vivas agrupadas en la gráfica de puntos de dispersión frontal y lateral. Las regiones de sombreadas de los histogramas y los valores numéricos asociados identifican el porcentaje de poblaciones de células que expresan niveles altos de CD83, CD86 o HLA-DR.

EJEMPLO 2

Inmunogenicidad de lipopéptidos que comprenden epítipos de CTL del virus de la gripe

Lipopéptidos que tienen un epítipo de CTL procedente del virus de la gripe, y en particular los lipopéptidos [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL] y [Th]-Lys(Pam₃Cys-Ser-Ser)-[CTL], que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 4, se evaluaron para determinar su capacidad para inducir aclaramiento viral potenciado mediado por CTL y para potenciar la maduración de células dendríticas. Como control negativo, en todos los experimentos se usó un péptido no lipidado que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 4.

Aclaramiento viral

Los lipopéptidos provocaron un mayor nivel de aclaramiento viral que los péptidos no lipidados (Figuras 3, 4a). La carga viral en los pulmones de ratones sensibilizados con los lipopéptidos y expuestos al virus infeccioso Mem 71 9

días más tarde se redujo en un 95% ([Th]-Lys(Pam₃Cys-Ser-Ser)-[CTL]; Figura 3) o 99% ([Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL]; Figura 3) en comparación con las muestras de ratones inmunizados con PBS sola. Por el contrario, el péptido no lipidado logró solamente una reducción del 65% en la carga viral ([Th]-Lys-[CTL]; Figura 3). También se observó aclaramiento viral potenciado en animales inoculados con lipopéptido que se habían expuesto a virus Mem 71 28 días después de la inoculación inicial. Por el contrario, la capacidad para aclarar el virus es significativamente más débil en este punto de tiempo en ratones inoculados con el péptido no lipidado.

Como se muestra en la Figura 4b, también hubo activación potenciada de linfocitos T CD8⁺ en ratones inmunizados que reciben los lipopéptidos citados en la leyenda de la Figura 2, en comparación con ratones que reciben solamente péptido no lipidado o PBS, como se observa por el número de linfocitos T CD8⁺ encontrados en los fluidos de BAL.

Maduración de células dendríticas

La sensibilización de linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ sin tratamiento previo en órganos linfoides secundarios por células dendríticas está precedida por la maduración de DC al exponerlas al epítipo del antígeno. Esta maduración se caracteriza por aumento de productos del MHC y moléculas coestimuladoras en la superficie de las DC. Por lo tanto, se determinó si los diversos péptidos y lipopéptidos podrían activar diferencialmente células dendríticas, en un intento por explicar las diferentes propiedades inmunógenas de estos candidatos a vacuna.

Los resultados de los experimentos en los que una estirpe de DC inmaduras, células D1, se expusieron a péptidos, se tiñeron para la expresión superficial de moléculas del MHC clase II y después se analizaron mediante citometría de flujo, demostraron que hubo maduración potenciada de las células dendríticas tras su exposición a los péptidos [Th]-Lys(Pam₃Cys-Ser-Ser)-[CTL] o [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL] en comparación con el péptido [Th]-Lys-[CTL] o medio solo (Figura 4c).

[Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL] fue el más eficaz, y el péptido no lipidado [Th]-Lys-[CTL] fue el menos eficaz provocando la maduración de DC, siendo [Th]-Lys(Pam₃Cys-Ser-Ser)-[CTL] casi tan eficaz como [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL] (Figura 4c). La capacidad del péptido lipidado [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL] para aumentar la expresión de clase II fue la misma que para el lipopolisacárido bacteriano (LPS). El péptido no lipidado fue incapaz de inducir la maduración de células D1 más de alrededor de 26%, un nivel que se produce espontáneamente en el cultivo. Las capacidades relativas de estos lipopéptidos para inducir maduración de células D1 directamente reflejó su capacidad para inducir respuestas de aclaramiento viral mediado por CTL y linfocitos T CD8⁺ en el BAL.

Efectos de diferentes lípidos sobre la citotoxicidad y proliferación de linfocitos T *in vitro* e *in vivo*

También se determinaron los efectos de conjugar diferentes lípidos, incluyendo Pam₁Cys, Pam₂Cys, Pam₃Cys, ácido palmítico y colesterol, al inmunógeno del péptido.

Como se muestra en la Figura 5, la carga viral en los pulmones de ratones sensibilizados con lipopéptidos que contienen Pam₂Cys fue menor que para ratones sensibilizados con lipopéptidos que comprenden los otros lípidos ensayados, sugiriendo que se prefiere Pam₂Cys para conferir protección frente al virus. Sin embargo, todos los lípidos ofrecieron cierta protección frente al virus. Este efecto también se reflejó en el recuento de linfocitos T CD8⁺ de IFN-gamma (Figura 6). De forma colectiva, estos datos sugieren que es importante unir el lípido al resto glicérico de cisteína, como en la estructura del epítipo [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL], para un efecto citotóxico máximo.

En ensayos de tetrámeros, el número más alto de linfocitos T CD8⁺ positivos a tetrámero por pulmón se observó para lipopéptidos en los que el resto lipídico se añadió al grupo amino en épsilon de un resto de lisina interna (por ejemplo, lipopéptidos [Th]-Lys(Pam₁Cys-Ser-Ser)-[CTL], [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL], [Th]-Lys(Pam₃Cys-Ser-Ser)-[CTL], y [Th]-Lys(Chol₂Lys-Ser-Ser)-[CTL] en la Figura 7) en comparación con el péptido no lipidado o el péptido que tiene lípido añadido al término N del péptido (por ejemplo, constructo Pal₂LysLys[Th]-[CTL] en la Figura 7). Estos datos también confirman que la ubicación del lípido en el interior del péptido, mediante la unión al grupo amino en épsilon de un resto de lisina interna, potencia la actividad citotóxica del epítipo de CTL.

Para analizar *in vivo* la citotoxicidad específica del determinante de CTL, a los ratones se les inocularon intranasalmente 9 nmoles de diversos lipopéptidos en PBS y se expusieron a virus Mem71 en el día 28. La citotoxicidad específica del determinante de CTL *in vivo* se midió usando esplenocitos singénicos pulsados con el determinante de CTL y marcados con CFSE de alta intensidad. Como control, se usaron esplenocitos no pulsados marcados con CFSE de baja intensidad. En el día 4 después de la infección se inyectó intravenosamente una mezcla de células de cada población de células diana. Los ratones se sacrificaron 16 h más tarde, y los bazos se analizaron en busca de la presencia de poblaciones de células ricas en CFSE y pobres de CFSE, mediante citometría de flujo. Para cada muestra se analizó un total de 1 x 10⁶ linfocitos. El dato en la Figura 8 es una representación gráfica que muestra la actividad de linfocitos T citotóxicos en ratones sin tratamiento previo. La Figura 9 indica que el lipopéptido [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL], que comprende el epítipo de linfocitos T auxiliares CD4⁺ expuesto en SEC ID NO: 1 y el epítipo de CTL restringido para H-2^d expuesto en SEC ID NO: 2, indujo citotoxicidad significativa *in vivo*.

Como se muestra en la Figura 10, los lipopéptidos tienen mayor actividad que el péptido no lipidado, proporcionando los lipopéptidos designados [Th]-Lys(Pam₁Cys-Ser-Ser)-[CTL], [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[CTL] y [Th]-Lys(Pam₃Cys-Ser-Ser)-[CTL] un potenciamiento notable de lisis específica *in vivo* en comparación con el péptido no lipidado [Th]-Lys-[CTL] y otros lipopéptidos ensayados. Estos datos confirman nuevamente que la ubicación del lípido en el interior del péptido, mediante unión al grupo amino en épsilon de un resto de lisina interna, potencia la actividad citotóxica del epítipo de CTL *in vivo*

EJEMPLO 3

Inmunogenicidad de lipopéptidos que comprenden un epítipo de CTL procedente de *L. monocytogenes*

Un lipopéptido que tiene un epítipo de CTL procedente de *L. monocytogenes*, y en particular el lipopéptido [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[LLO91-99] que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 175, se ensayó en busca de su capacidad para inducir una respuesta de linfocitos T CD8+, y para proteger frente a una exposición a *L. monocytogenes*. Como control negativo, se usó en todos los experimentos PBS o un péptido no lipidado que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 175. Como control positivo, se usaron bacterias aisladas.

15 Producción de IFN- γ por esplenocitos

El lipopéptido ensayado en este estudio potenció una respuesta de linfocitos T CD8+ específica frente al epítipo de CTL inmunizante, como se evidencia por el número potenciado de esplenocitos productores de IFN- γ presentes en ratones inmunizados con péptido lipidado con respecto a péptido no lipidado. Los ratones inmunizados con 9 nmoles de vacuna de péptido lipidado [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[LLO91-99], que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 175, produjeron alrededor de 15 veces más células productoras de IFN- γ por millón de esplenocitos que los ratones que recibieron péptido no lipidado o un control de PBS, indicando una activación potenciada de linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ en los ratones que reciben el péptido lipidado (Figura 11).

Protección frente a exposición a bacterias aisladas

25 Los datos en la Figura 12 indican que el péptido lipidado [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[LLO91-99] proporciona protección exitosa frente a una exposición subsiguiente a bacterias completas. También se observó una protección significativamente potenciada en ratones inmunizados con el péptido lipidado [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[LLO91-99] con respecto a ratones inmunizados con el péptido no lipidado [P25]-Lys-[LLO91-99] o con PBS (es decir, ratones no inmunizados).

30 EJEMPLO 4

Protección frente a exposición a células tumorales

Protección frente a exposición a células de melanoma

Se evaluó la capacidad de la vacuna de lipopéptido que contiene el epítipo de CTL de ovoalbúmina (SIINFEKL) para inducir protección frente a células de melanoma que expresan este epítipo de CTL (células B16-OVA). La producción de IFN- γ se determinó en ratones inoculados con lipopéptido que comprende un epítipo de linfocitos T auxiliares de CDV-F (P25) y un epítipo de CTL (SIINFEKL) de ovoalbúmina enlazado vía el grupo amino en épsilon de un resto de lisina interna entre dichos epítipos a Pam₂Cys (es decir, el péptido [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[SIINFEKL] dado en la Figura 2 y basado en característica SEQ ID NO: 174). Se vacunaron ratones C57BL/6 con 20 nmoles de péptido lipidado [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[SIINFEKL], péptido no lipidado [P25]-Lys-[SIINFEKL] o con PBS, subcutáneamente en la base de la cola. Los ratones se expusieron entonces subcutáneamente en la espalda 14 días más tarde a células B16-OVA. Se obtuvieron esplenocitos de los animales inoculados y se estimularon *in vitro* con el epítipo de CTL que tiene la secuencia SIINFEKL, y se midió el número de células productoras de IFN- γ por 1.000.000 esplenocitos. Los datos muestran números potenciados de células productoras de IFN- γ para ratones inoculados con lipopéptido (Tabla 1), indicando una capacidad potenciada de los lipopéptidos para activar linfocitos T con respecto a péptido no lipidado.

De forma importante, el control del crecimiento tumoral se provocó mediante inmunización con lipopéptido en comparación con ratones inmunizados con el péptido no lipidado [P25]-Lys-[SIINFEKL] o con PBS sola (Figura 13). No se observó crecimiento tumoral durante un período de 15 días en ratones inmunizados con [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[SIINFEKL]. Por el contrario, se observaron tumores mayores de 75 mm² de diámetro en ratones inmunizados con [P25]-Lys-[SIINFEKL] o con PBS sola. Juntos, estos datos confirman la capacidad protectora del lipopéptido, en comparación con péptido no lipidado, en la protección frente a tumores.

Tabla 1

Números de esplenocitos que segregan IFN- γ en muestras de melanoma representativas que reciben lipopéptido [P25]-Lys(Pam ₂ Cys-Ser-Ser)-[SIINFEKL] en comparación con péptido no lipidado [P25]-Lys-[SIINFEKL] o PBS			
Nº de esplenocitos que segregan IFN- γ por 10 ⁶ esplenocitos	INMUNÓGENO DE PÉPTIDO/LIPOPÉPTIDO		
	[P25]-Lys(Pam ₂ Cys-Ser-Ser)-[SIINFEKL]	[P25]-Lys-[SIINFEKL]	PBS
	284	18	5
	205	14	0
	192	10	0
Promedio	227	14	3
Desviación estándar	49	4	24

Protección frente a exposición a células de tumor pulmonar de Lewis

- 5 También se evaluó la capacidad del lipopéptido para proporcionar protección *in vivo* frente al desarrollo de tumor pulmonar de Lewis en animales. A los ratones se les inyectó 3×10^4 células de tumor pulmonar de Lewis transfectadas con ovoalbúmina y que expresan por lo tanto el epítipo de CTL SIINFEKL (Nelson et al., J Immunol. 166: 5557-5566, 2001). Cuatro días después de recibir las células tumorales, a los animales se les inoculó subcutáneamente en la base de la cola 20 nmoles de péptido lipidado [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[SIINFEKL], o como alternativa, péptido no lipidado [P25]-Lys-[SIINFEKL] o PBS. Se administró una segunda dosis similar de inmunógeno once días después de recibir las células tumorales. Los datos en la Figura 14 indican que el porcentaje de animales con menores lesiones en desarrollo fue significativamente más alto para animales que reciben el lipopéptido en comparación con animales que reciben el péptido no lipidado o PBS. Como se muestra en la Figura 15, los animales que reciben el inmunógeno de lipopéptido también sobrevivieron durante más tiempo que aquellos que recibieron el péptido no lipidado o PBS. Estos datos confirman además la capacidad protectora del lipopéptido, en comparación con el péptido no lipidado, para proteger frente a tumores.

EJEMPLO 5

Expresión potenciada de MHC clase II, CD83 y CD88 en células dendríticas humanas tras la administración de un lipopéptido que comprende un epítipo de linfocitos T auxiliares de CDV-F y un epítipo de CTL procedente del virus de la hepatitis C

El lipopéptido [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[HCV] descrito en la leyenda de la Figura 2 se evaluó para determinar su capacidad para aumentar la expresión de MHC clase II, CD83 y CD86 en células dendríticas humanas. Se incubaron células dendríticas derivadas de monocitos humanos con medio solo, LPS (5 μ g/ml), péptido no lipidado [P25]-Lys-[HCV] (5 μ g/ml) o lipopéptido [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[HCV] (5 μ g/ml) durante 48 horas antes de la tinción con anticuerpos conjugados con FITC para HLA-DR, CD83 y CD86 antes del análisis mediante citometría de flujo. Los datos mostrados en la Figura 16 demuestran que un mayor porcentaje de poblaciones de células dendríticas que expresan los antígenos HLA-DR, CD83 y CD86 sobre su superficie celular está presente tras el tratamiento con péptido lipidado que tras el tratamiento con péptido no lipidado o PBS sola. La capacidad del lipopéptido para inducir maduración de células dendríticas humanas reflejó directamente la capacidad inmunógena del lipopéptido en comparación con el péptido no lipidado, proporcionando un posible mecanismo para la inmunogenicidad.

EJEMPLO 6

Discusión

En este estudio se describe el ensamblaje de una variedad de inmunógenos de lipopéptido compuestos de un epítipo de linfocitos T CD4⁺, un epítipo de CTL CD8⁺ y Pam₃Cys o Pam₂Cys enlazados a ellos vía el grupo amino en épsilon de un resto de lisina interna.

Se mostró que la naturaleza del resto lipídico en la generación de una respuesta inmunitaria no es crítica, debido a que se mostró que un intervalo de lípidos, incluyendo colesterol, ácido palmítico, Pam₁Cys, Pam₂Cys, y Pam₃Cys provocan exitosamente proliferación y citotoxicidad de linfocitos T. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en términos de protección y de producción de IFN-gamma, al menos en el caso de lipopéptidos dirigidos contra el virus de la gripe, sugiriendo que la estructura lipídica puede ser una consideración importante *in vivo*. En particular, al menos para vacunas que incorporan el epítipo de CTL del virus de la gripe, Pam₂Cys

enlazado al grupo amino en épsilon de un resto de lisina interna en el péptido fue el más eficaz a la hora de conferir protección, sugiriendo que se prefiere un enlace al glicerol de glicina.

5 Los lipopéptidos de la invención son eficaces potenciando las respuestas de linfocitos T CD8+ de animales inmunizados frente a patógenos bacterianos y virales, y también frente a células tumorales. Dado el éxito de los péptidos autoadyuvantes ejemplificados aquí para proteger frente a patógenos virales y bacterianos así como frente a células tumorales, es razonable esperar que esta tecnología sea aplicable generalmente a un amplio intervalo de protocolos de vacunación.

La inserción de restos de serina entre el resto lipídico y la secuencia peptídica no afecta de forma adversa la potencia de los inmunógenos resultantes que contienen Pam₂Cys.

10 Los lipopéptidos pueden disparar una respuesta inmunitaria en ausencia de adyuvante adicional, y se pueden suministrar tanto mediante vías parenterales como no parenterales, particularmente de forma intranasal.

15 Tomados en conjunto, los datos proporcionados aquí demuestran que la colocación de un amplio intervalo de lípidos, incluyendo pero sin limitarse a Pam₂Cys y Pam₃Cys, entre el epítipo de CTL y el epítipo de linfocitos T auxiliares, en el centro aproximado de una vacuna peptídica totalmente sintética, incrementa la inmunogenicidad de la vacuna.

LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> Nuevos lipopéptidos inmunógenos que comprenden epítipos de linfocitos T auxiliares y de linfocitos T citotóxicos (CTL)

20 <130> 94947/MRO

<140> PCT/AU03/01019

<141> 12-08-2003

<150> US 60/403328

<151> 12-08-2002

25 <160> 177

<170> Patent In version 3.3

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de hemaglutinina del virus de la gripe (IV-H)

<400> 1

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

35 <210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Epítipo de CTL de nucleoproteína (NP) del virus PR8

<400> 2

ES 2 535 451 T3

Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val
1 5

<210> 3

<211> 24

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que comprende epítipo de linfocitos T auxiliares de IV-H y epítipo de CTL de NP de PR8

<400> 3

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

10 Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val
20

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido que comprende epítipo de linfocitos T auxiliares de IV-H y epítipo de CTL de NP de PR8, en el que esos epítipos están separados por resto de lisina añadido

<400> 4

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

20 Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val
20 25

<210> 5

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Polipéptido que comprende epítipo de linfocitos T auxiliares de CDV-F y epítipo de CTL de NP de PR8, en el que esos epítipos están separados por resto de lisina añadido

<400> 5

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

Leu Lys Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val
20 25

<210> 6

30 <211> 27

<212> PRT

ES 2 535 451 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que comprende epítipo de linfocitos T auxiliares de CDV-F y epítipo de CTL de pp65 de HCMV, en el que esos epítipos están separados por resto de lisina añadido

5 <400> 6

```
Lys Leu Ile Pro Asn Ala Ser Leu Ile Glu Asn Cys Thr Lys Ala Glu
1                               5                               10                               15
Leu Lys Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
                               20                               25
```

<210> 7

<211> 27

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que comprende epítipo de linfocitos T auxiliares de CDV-F y epítipo de CTL de pp65 de HCMV, en el que esos epítipos están separados por resto de lisina añadido

15 <400> 7

```
Ala Glu Leu Gly Glu Tyr Glu Lys Leu Leu Asn Ser Val Leu Glu Pro
1                               5                               10                               15
Ile Lys Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
                               20                               25
```

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que comprende epítipo de linfocitos T auxiliares de CDV-F y epítipo de CTL de pp65 de HCMV, en el que esos epítipos están separados por resto de lisina añadido

<400> 8

```
Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Asn Leu
1                               5                               10                               15
Asn Lys Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
                               20                               25
```

25

<210> 9

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Polipéptido que comprende epítipo de linfocitos T auxiliares de CDV-F y epítipo de CTL de pp65 de HCMV, en el que esos epítipos están separados por resto de lisina añadido

ES 2 535 451 T3

<400> 9

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

Ser Lys Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
20 25

<210> 10

5 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido que comprende epítipo de linfocitos T auxiliares de CDV-F y epítipo de CTL de EBV, en el que esos epítipos están separados por resto de lisina añadido

<400> 10

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

Leu Lys Tyr Leu Leu Glu Met Leu Trp Arg Leu
20 25

<210> 11

<211> 27

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que comprende epítipo de linfocitos T auxiliares de CDV-F y epítipo de CTL de EBV, en el que esos epítipos están separados por resto de lisina añadido

20 <400> 11

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

Ile Lys Tyr Leu Leu Glu Met Leu Trp Arg Leu
20 25

<210> 12

<211> 27

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que comprende epítipo de linfocitos T auxiliares de CDV-F y epítipo de CTL de EBV, en el que esos epítipos están separados por resto de lisina añadido

<400> 12

ES 2 535 451 T3

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

Asn Lys Tyr Leu Leu Glu Met Leu Trp Arg Leu
20 25

<210> 13

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido que comprende epítipo de linfocitos T auxiliares de CDV-F y epítipo de CTL de EBV, en el que esos epítipos están separados por resto de lisina añadido

<400> 13

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

10 Ser Lys Tyr Leu Leu Glu Met Leu Trp Arg Leu
20 25

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de hemaglutinina del virus de la gripe (IV-H)

<400> 14

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

<210> 15

20 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del sarampión (MV-F)

25 <400> 15

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

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 535 451 T3

<223> Epítopo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 16

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

Asn

<210> 17

5 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

10 <400> 17

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

Gln

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 18

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

Ile

20 <210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Epítopo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 19

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

Glu

<210> 20

30 <211> 17

ES 2 535 451 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

5 <400> 20

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

Leu

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 21

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

Leu

15 <210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 22

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

Ile

<210> 23

<211> 17

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 23

ES 2 535 451 T3

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

Met

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 24

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

Leu

10 <210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 25

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

Arg

<210> 26

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 26

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

25 Gly

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

ES 2 535 451 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 27

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

5

Ala

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Epítopo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 28

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

Ala

<210> 29

15

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

20

<400> 29

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

Ala

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 30

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

Leu

ES 2 535 451 T3

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 31

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

Ser

<210> 32

10 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

15 <400> 32

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

Ile

20 <210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 33

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

Thr

<210> 34

<211> 17

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

ES 2 535 451 T3

<400> 34

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

Ser

<210> 35

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítoto de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 35

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

10 Ser

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Epítoto de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 36

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

Thr

<210> 37

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítoto de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

25 <400> 37

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

Ser

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

ES 2 535 451 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 38

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

5 His

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 39

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

Ala

<210> 40

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

20 <400> 40

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

Ser

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 41

ES 2 535 451 T3

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

Thr

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítoto de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 42

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

Asn

10 <210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Epítoto de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 43

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

Ala

<210> 44

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítoto de linfocitos T auxiliares de la proteína de fusión del virus del moquillo canino (CDV-F)

<400> 44

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

25 Val

<210> 45

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 535 451 T3

<220>

<223> Epítoto de linfocitos T auxiliares de mucina MUC1

<400> 45

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg
1 5 10 15
Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro
20

5 <210> 46

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Epítoto de linfocitos T auxiliares de mucina MUC1

<400> 46

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

<210> 47

<211> 18

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítoto de linfocitos T auxiliares de mucina MUC1

<400> 47

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

20 <210> 48

<211> 27

<212> PRT

<213> secuencia artificial

25 <220>

<223> Epítoto de linfocitos T auxiliares de mucina MUC1

<400> 48

ES 2 535 451 T3

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

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

<210> 49

<211> 26

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítoto de linfocitos T auxiliares de mucina MUC1

<400> 49

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

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

10 <210> 50

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Epítoto de linfocitos T auxiliares del virus de la glosopeda VP3

<400> 50

Gly Val Ala Glu
1

<210> 51

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítoto de linfocitos T auxiliares del virus de la glosopeda VP3

<400> 51

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

<210> 52

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

ES 2 535 451 T3

<223> Epítopo de linfocitos T auxiliares del virus de la glosopeda

<400> 52

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

<210> 53

5 <211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL de la proteína del circumsporozoito de Plasmodium falciparum (CSP)

10 <400> 53

Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Glu Asn Asp Ile Glu Lys Lys Ile
1 5 10 15

Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser
20

<210> 54

<211> 21

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL de la proteína del circumsporozoito de Plasmodium falciparum (CSP)

<400> 54

Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe
1 5 10 15

Asn Val Val Asn Ser
20

20 <210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Epítopo de CTL del antígeno 1 de etapa hepática (LSA1) de Plasmodium falciparum

<400> 55

Lys Pro Ile Val Gln Tyr Asp Asn Phe
1 5

<210> 56

<211> 17

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 535 451 T3

<220>

<223> Epítopo de CTL de la proteína 1 de la superficie del merozoito (MSP1) de Plasmodium falciparum

<400> 56

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

Glu

5 <210> 57

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Epítopo de CTL del antígeno AMA1 de Plasmodium falciparum

<400> 57

Glu Phe Thr Tyr Met Ile Asn Phe Gly Arg Gly Gln Asn Tyr Trp Glu
1 5 10 15

His Pro Tyr Gln Lys Ser
20

<210> 58

<211> 19

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del antígeno AMA1 de Plasmodium falciparum

<400> 58

Asp Gln Pro Lys Gln Tyr Glu Gln His Leu Thr Asp Tyr Glu Lys Ile
1 5 10 15

20 Lys Glu Gly

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Epítopo de CTL de la proteína env del VIH-1

<400> 59

Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met
1 5 10

<210> 60

ES 2 535 451 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Epítipo de CTL de la proteína env del VIH-1
 <400> 60

Ala	Pro	Thr	Lys	Ala	Lys	Arg	Arg	Val	Val
1				5					10

<210> 61
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Epítipo de CTL de la proteína env del VIH-1
 <400> 61

Cys	Thr	Arg	Pro	Asn	Asn	Asn	Thr	Arg	Lys
1				5					10

<210> 62
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Epítipo de CTL de la proteína env del VIH-1
 <400> 62

Thr	Val	Tyr	Tyr	Gly	Val	Pro	Val	Trp	Lys
1				5					10

<210> 63
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Epítipo de CTL de la proteína env del VIH-1
 30 <400> 63

Arg	Pro	Val	Val	Ser	Thr	Gln	Leu	Leu
1				5				

<210> 64
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

ES 2 535 451 T3

<220>

<223> Epítipo de CTL de la proteína gag del VIH-1

<400> 64

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

5 <210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Epítipo de CTL de la proteína gag del VIH-1

<400> 65

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

<210> 66

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de CTL de la proteína gag del VIH-1

<400> 66

Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys
1 5 10

20 <210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Epítipo de CTL de la proteína gag del VIH-1

<400> 67

Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys
1 5 10

<210> 68

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de CTL de la proteína gag del VIH-1

35 <400> 68

ES 2 535 451 T3

Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys
1 5

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de CTL de la proteína gag del VIH-1

<400> 69

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

10 <210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Epítipo de CTL de la proteína pol del VIH-1

<400> 70

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

<210> 71

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de CTL de la proteína pol del VIH-1

<400> 71

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr
1 5 10

25 <210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Epítipo de CTL de la proteína pol del VIH-1

<400> 72

Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met Thr Lys
1 5

<210> 73

ES 2 535 451 T3

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Epítipo de CTL de la proteína pol del VIH-1

<400> 73

Ser	Pro	Ala	Ile	Phe	Gln	Ser	Ser	Met	Thr
1				5					10

<210> 74

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de CTL de la proteína pol del VIH-1

<400> 74

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

15

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Epítipo de CTL de la proteína pol del VIH-1

<400> 75

Gly	Pro	Lys	Val	Lys	Gln	Trp	Pro	Leu	Thr
1				5					10

<210> 76

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de CTL de la nucleoproteína del virus de la gripe

30 <400> 76

Thr	Tyr	Gln	Arg	Thr	Arg	Ala	Leu	Val
1				5				

<210> 77

<211> 15

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

ES 2 535 451 T3

<220>

<223> Epítopo de CTL de la nucleoproteína del virus de la gripe

<400> 77

Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp Pro
1 5 10 15

5 <210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Epítopo de CTL de la nucleoproteína del virus de la gripe

<400> 78

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

<210> 79

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del antígeno de la glicoproteína-1 (gp-1) del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)

<400> 79

Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Met
1 5

20 <210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 80

Gln Val Lys Trp Arg Met Thr Thr Leu
1 5

<210> 81

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

35 <400> 81

ES 2 535 451 T3

Val Phe Ser Asp Gly Arg Val Ala Cys
1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 82

Val Pro Ala Pro Ala Gly Pro Ile Val
1 5

10 <210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 83

Thr Tyr Ser Ala Gly Ile Val Gln Ile
1 5

<210> 84

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 84

Leu Leu Asp Phe Val Arg Phe Met Gly Val
1 5 10

25 <210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 85

Gln Asn Gly Ala Leu Ala Ile Asn Thr Phe
1 5 10

<210> 86

ES 2 535 451 T3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 86

Val Ser Ser Asp Gly Arg Val Ala Cys
1 5

<210> 87

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 87

Val Ser Ser Glu Gly Arg Val Ala Cys
1 5

15

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 88

Val Ser Ser Asp Gly Arg Val Pro Cys
1 5

<210> 89

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

30 <400> 89

Val Ser Ser Asp Gly Leu Val Ala Cys
1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

ES 2 535 451 T3

<220>
 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)
 <400> 90

Val Ser Ser Asp Gly Gln Val Ala Cys
 1 5

5 <210> 91
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

10 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)
 <400> 91

Val Ser Ser Asp Gly Arg Val Val Cys
 1 5

<210> 92
 <211> 10

15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)
 <400> 92

Val Pro Ala Pro Pro Val Gly Pro Ile Val
 1 5 10

20 <210> 93
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)
 <400> 93

Val Glu Ile Thr Pro Tyr Glu Pro Thr Gly
 1 5 10

<210> 94

30 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

35 <400> 94

ES 2 535 451 T3

Val Glu Ile Thr Pro Tyr Glu Pro Thr Trp
1 5 10

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 95

Val Glu Leu Thr Pro Tyr Lys Pro Thr Trp
1 5 10

10 <210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 96

Arg Arg Ile Tyr Asp Leu Ile Lys Leu
1 5

<210> 97

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 97

Arg Lys Ile Tyr Asp Leu Ile Glu Leu
1 5

25 <210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 98

Pro Tyr Leu Phe Trp Leu Ala Gly Ile
1 5

<210> 99

ES 2 535 451 T3

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 99

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

<210> 100

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 100

15 Asp Thr Pro Leu Ile Pro Leu Thr Ile Phe
1 5 10

<210> 101

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 101

Thr Val Phe Tyr Asn Ile Pro Pro Met Pro Leu
1 5 10

<210> 102

25 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

30 <400> 102

Val Glu Ile Thr Pro Tyr Lys Pro Thr Trp
1 5 10

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

ES 2 535 451 T3

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 103

Val Ser Phe Ile Glu Phe Val Gly Trp
1 5

5 <210> 104

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 104

Phe Arg Lys Ala Gln Ile Gln Gly Leu
1 5

<210> 105

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 105

Phe Leu Arg Gly Arg Ala Tyr Gly Leu
1 5

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 106

Gln Ala Lys Trp Arg Leu Gln Thr Leu
1 5

<210> 107

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

35 <400> 107

ES 2 535 451 T3

Ser Val Arg Asp Arg Leu Ala Arg Leu

1 5

<210> 108

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 108

Tyr Pro Leu His Glu Gln His Gly Met
1 5

10

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 109

His Leu Ala Ala Gln Gly Met Ala Tyr
1 5

<210> 110

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

25 <400> 110

Arg Pro Pro Ile Phe Ile Arg Arg Leu
1 5

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 111

Arg Leu Arg Ala Glu Ala Gly Val Lys
1 5

35 <210> 112

ES 2 535 451 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)
 <400> 112

Ile Val Thr Asp Phe Ser Val Ile Lys
 1 5

<210> 113
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)
 <400> 113

Ala Val Phe Asp Arg Lys Ser Asp Ala Lys
 1 5 10

<210> 114
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)
 <400> 114

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

<210> 115
 25 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)
 30 <400> 115

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

<210> 116
 <211> 14
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

ES 2 535 451 T3

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 116

Asp Glu Pro Ala Ser Thr Glu Pro Val His Asp Gln Leu Leu
1 5 10

5 <210> 117

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 117

Arg Tyr Ser Ile Phe Phe Asp Tyr
1 5

<210> 118

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 118

Ala Val Leu Leu His Glu Glu Ser Met
1 5

20 <210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 119

Arg Arg Ala Arg Ser Leu Ser Ala Glu Arg Tyr
1 5 10

<210> 120

30 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

35 <400> 120

ES 2 535 451 T3

Glu Glu Asn Leu Leu Asp Phe Val Arg Phe
1 5 10

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 121

Lys Glu His Val Ile Gln Asn Ala Phe
1 5

10 <210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 122

Arg Arg Ile Tyr Asp Leu Ile Glu Leu
1 5

<210> 123

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 123

Gln Pro Arg Ala Pro Ile Arg Pro Ile
1 5

25 <210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 124

Glu Gly Gly Val Gly Trp Arg His Trp
1 5

<210> 125

ES 2 535 451 T3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 125

Cys Leu Gly Gly Leu Leu Thr Met Val
1 5

<210> 126

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 126

Arg Arg Arg Trp Arg Arg Leu Thr Val
1 5

15

<210> 127

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 127

Arg Ala Lys Phe Lys Gln Leu Leu
1 5

<210> 128

25 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

30 <400> 128

Arg Lys Cys Cys Arg Ala Lys Phe Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg
1 5 10 15

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

ES 2 535 451 T3

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 129

Tyr Leu Leu Glu Met Leu Trp Arg Leu
1 5

5 <210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 130

Tyr Phe Leu Glu Ile Leu Trp Gly Leu
1 5

<210> 131

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 131

Tyr Leu Leu Glu Ile Leu Trp Arg Leu
1 5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 132

Tyr Leu Gln Gln Asn Trp Trp Thr Leu
1 5

<210> 133

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

35 <400> 133

ES 2 535 451 T3

Leu Leu Leu Ala Leu Leu Phe Trp Leu
1 5

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 134

Leu Leu Val Asp Leu Leu Trp Leu Leu
1 5

10 <210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 135

Leu Leu Leu Ile Ala Leu Trp Asn Leu
1 5

<210> 136

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 136

Trp Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ile Leu
1 5

25 <210> 137

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 137

Thr Leu Leu Val Asp Leu Leu Trp Leu
1 5

<210> 138

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)
 <400> 138
 Leu Leu Trp Leu Leu Leu Phe Leu Ala
 1 5
 <210> 139
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)
 <400> 139
 Ile Leu Leu Ile Ile Ala Leu Tyr Leu
 1 5
 15 <210> 140
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)
 <400> 140
 Val Leu Phe Ile Phe Gly Cys Leu Leu
 1 5
 <210> 141
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)
 30 <400> 141
 Arg Leu Gly Ala Thr Ile Trp Gln Leu
 1 5
 <210> 142
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

ES 2 535 451 T3

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 142

Ile Leu Tyr Phe Ile Ala Phe Ala Leu
1 5

5 <210> 143

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 143

Ser Leu Val Ile Val Thr Thr Phe Val
1 5

<210> 144

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 144

Leu Met Ile Ile Pro Leu Ile Asn Val
1 5

20 <210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 145

Thr Leu Phe Ile Gly Ser His Val Val
1 5

<210> 146

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

35 <400> 146

ES 2 535 451 T3

Leu Ile Pro Glu Thr Val Pro Tyr Ile
1 5

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 147

Val Leu Gln Trp Ala Ser Leu Ala Val
1 5

10 <210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Epítopo de CTL del virus de Epstein-Barr (EBV)

<400> 148

Gln Leu Thr Pro His Thr Lys Ala Val
1 5

<210> 149

<211> 12

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)

<400> 149

Ser Val Leu Gly Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys
1 5 10

25 <210> 150

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)

<400> 150

Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu
1 5 10

<210> 151

ES 2 535 451 T3

<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)
<400> 151
Phe Val Phe Pro Thr Lys Asp Val Ala Leu Arg
1 5 10
<210> 152
<211> 8
10 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)
<400> 152
Phe Pro Thr Lys Asp Val Ala Leu
15 1 5
<210> 153
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)
<400> 153
Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
1 5
<210> 154
25 <211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)
30 <400> 154
Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val
1 5
<210> 155
<211> 9
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial

ES 2 535 451 T3

<220>

<223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)

<400> 155

Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val
1 5

5 <210> 156

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)

<400> 156

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

<210> 157

<211> 11

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)

<400> 157

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

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)

<400> 158

Arg Leu Leu Gln Thr Gly Ile His Val
1 5

<210> 159

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)

35 <400> 159

ES 2 535 451 T3

Val Ile Gly Asp Gln Tyr Val Lys Val
1 5

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)

<400> 160

Ala Leu Phe Phe Phe Asp Ile Asp Leu
1 5

10 <210> 161

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)

<400> 161

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

<210> 162

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)

<400> 162

Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile
1 5

25 <210> 163

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)

<400> 163

Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu
1 5

<210> 164

ES 2 535 451 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)
 <400> 164

Ile	Leu	Ala	Arg	Asn	Leu	Val	Pro	Met	Val
1				5					10

<210> 165
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)
 <400> 165

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

<210> 166
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Epítopo de CTL de pp65 de citomegalovirus humano (HCMV)
 <400> 166

Ile	Pro	Ser	Ile	Asn	Val	His	His	Tyr
1				5				

<210> 167
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Epítopo de CTL de IE-1 de citomegalovirus humano (HCMV)
 30 <400> 167

Tyr	Ile	Leu	Glu	Glu	Thr	Ser	Val	Met
1				5				

<210> 168
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

ES 2 535 451 T3

<220>

<223> Epítopo de CTL de IE-1 de citomegalovirus humano (HCMV)

<400> 168

Cys Val Glu Thr Met Cys Asn Glu Tyr

5 1 5

<210> 169

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Epítopo de CTL de IE-1 de citomegalovirus humano (HCMV)

<400> 169

Arg Arg Ile Glu Glu Ile Cys Met Lys

1 5

<210> 170

15 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL de pp150 de citomegalovirus humano (HCMV)

20 <400> 170

Thr Thr Val Tyr Pro Pro Ser Ser Thr Ala Lys

1 5 10

<210> 171

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL de la glicoproteína de fusión del virus del sarampión

<400> 171

Arg Arg Tyr Pro Asp Ala Val Tyr Leu

1 5

30 <210> 172

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Epítopo de CTL de Listeria monocytogenes

ES 2 535 451 T3

<400> 172

Gly Tyr Lys Asp Gly Asn Glu Tyr Ile
1 5

<210> 173

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL de ovoalbúmina

<400> 173

10 Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5

<210> 174

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido que comprende epítopo de linfocitos T auxiliares de CDV-F y epítopo de CTL de ovoalbúmina, en el que esos epítopos están separados por resto de lisina añadido

<400> 174

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

Leu Lys Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
20 25

20 <210> 175

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Polipéptido que comprende epítopo de linfocitos T auxiliares de CDV-F y epítopo de CTL de Listeria monocytogenes, en el que esos epítopos están separados por resto de lisina añadido

<400> 175

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

Leu Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn Glu Tyr Ile
20 25

<210> 176

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 535 451 T3

<220>

<223> Epítipo de CTL de la proteína central del virus de la hepatitis C

<400> 176

Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val
1 5

5 <210> 177

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido que comprende epítipo de linfocitos T auxiliares de CDV-F y CTL epítipo de la proteína central del HCV, en el que esos epítipos están separados por resto de lisina añadido

<400> 177

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

Leu Lys Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val
20 25

REIVINDICACIONES

1. Un lipopéptido que comprende un polipéptido conjugado a uno o más restos lipídicos, en el que:

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

(a) la secuencia de aminoácidos de un epítipo de linfocitos T auxiliares (Th) y la secuencia de aminoácidos de un epítipo de linfocitos T citotóxicos (CTL), en el que dichas secuencias de aminoácidos son diferentes; y

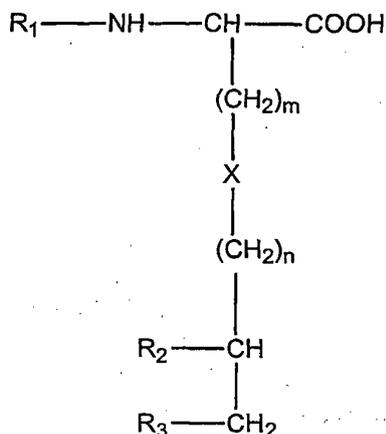
(b) uno o más restos de lisina interna para la unión covalente de cada uno de dichos restos lipídicos a través del grupo amino en épsilon de dicha lisina; y

(ii) cada uno de dicho uno o más restos lipídicos se une covalentemente al polipéptido a través de un grupo amino en épsilon de dicho uno o más restos de lisina interna;

en el que el resto de lisina interna al que está unido el resto lipídico está localizado entre el epítipo de Th y el epítipo de CTL.

2. El lipopéptido según la reivindicación 1, en el que el resto lipídico tiene una estructura de Fórmula General (VII):

Fórmula (VII)



en la que:

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

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

(iii) n es un número entero de 0 a 5;

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

(v) R₂ se selecciona del grupo que consiste en R'-CO-O-, R'-O-, R'-O-CO-, R'-NH-CO-, y R'-CO-NH-, en los que R' se selecciona del grupo que consiste en alquilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono, alquenilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono, y alquinilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono, en el que dicho grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, amino, oxo, acilo o cicloalquilo; y

(vi) R₃ se selecciona del grupo que consiste en R'-CO-O-, R'-O-, R'-O-CO-, R'-NH-CO-, y R'-CO-NH-, en los que R' se selecciona del grupo que consiste en alquilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono, alquenilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono, y alquinilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono, en el que dicho grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, amino, oxo, acilo, o cicloalquilo;

y en la que cada uno de R₁, R₂ y R₃ son iguales o diferentes.

3. El lipopéptido según la reivindicación 2, en el que X es azufre; m y n son ambos 1; R₁ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, y R'-CO-, en el que R' es un grupo alquilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono; y R₂ y R₃ se

seleccionan del grupo que consiste en R'-CO-O-, R'-O-, R'-O-CO-, R'-NH-CO-, y R'-CO-NH-, en el que R' es un grupo alquilo que tiene 7 a 25 átomos de carbono.

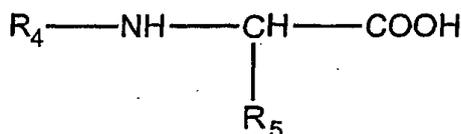
4. El lipopéptido según la reivindicación 3, en el que R' se selecciona del grupo que consiste en: palmitoílo, miristoílo, estearoílo, lauroílo, octanoílo, decanoílo, y colesterol.

5. El lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el lípido está contenido dentro de un resto de lipoaminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Pam₁Cys, Pam₂Cys, Pam₃Cys, Chol₂Lys, Ste₂Cys, Lau₂Cys, y Oct₂Cys.

6. El lipopéptido según la reivindicación 5, en el que el resto de lipoaminoácido es Pam₂Cys.

7. El lipopéptido según la reivindicación 1, en el que el resto lipídico tiene la siguiente Fórmula General (VIII):

10 Fórmula (VIII)



en la que:

15 (i) R₄ se selecciona del grupo que consiste en: (i) un resto de alfa-acil-ácido graso que consiste en entre alrededor de 7 y alrededor de 25 átomos de carbono; (ii) un resto de alfa-alquil-beta-hidroxi-ácido graso; (iii) un beta-hidroxiéster de un resto alfa-alquil-beta-hidroxi-ácido graso; y (iv) un resto de lipoaminoácido; y

(ii) R₅ es hidrógeno o la cadena lateral de un resto de aminoácido.

8. El lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el resto lipídico está separado del resto peptídico por un espaciador.

20 9. El lipopéptido de la reivindicación 8, en el que el espaciador comprende arginina, serina o ácido 6-aminohexanoico.

10. El lipopéptido de la reivindicación 9 ó 10, en el que el espaciador consiste en un homodímero de serina.

11. El lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el resto de lisina interna está anidado dentro de una secuencia de aminoácidos sintética que tiene baja inmunogenicidad.

25 12. El lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el epítipo de linfocitos T auxiliares es un epítipo de linfocitos T auxiliares de hemaglutinina del virus de la gripe, o un epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína F del virus del moquillo canino (CDV-F).

13. El lipopéptido de la reivindicación 12, en el que el epítipo de linfocitos T auxiliares de hemaglutinina del virus de la gripe comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1.

30 14. El lipopéptido de la reivindicación 12, en el que el epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína CDV-F comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 20.

15. El lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el epítipo de CTL procede de una proteína inmunógena, lipoproteína, o glicoproteína de un virus.

16. El lipopéptido según la reivindicación 15, en el que el virus es el virus de la gripe.

35 17. El lipopéptido de la reivindicación 16, en el que el epítipo de CTL comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 2.

18. El lipopéptido según la reivindicación 15, en el que el virus es el virus de la hepatitis C.

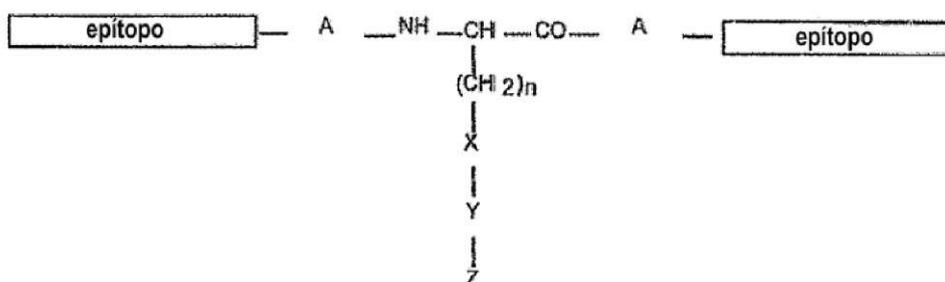
19. El lipopéptido de la reivindicación 18, en el que el epítipo de CTL comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 176.

40 20. El lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el epítipo de CTL procede de una proteína inmunógena, lipoproteína, o glicoproteína de un organismo procariota.

21. El lipopéptido según la reivindicación 20, en el que el epítipo de CTL procede de *Listeria monocytogenes*.

22. El lipopéptido de la reivindicación 21, en el que el epítipo de CTL comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 172.
23. El lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el epítipo de CTL procede de una proteína inmunógena, lipoproteína, o glicoproteína de un organismo eucariota.
- 5 24. El lipopéptido según la reivindicación 23, en el que el organismo eucariota es un parásito.
25. El lipopéptido según la reivindicación 23, en el que el organismo eucariota es un mamífero.
26. El lipopéptido según la reivindicación 25, en el que el epítipo de CTL procede de una proteína de ovoalbúmina de un mamífero o de una célula tumoral.
27. El lipopéptido según la reivindicación 26, en el que el epítipo de CTL comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 173.
- 10 28. El lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 174, SEC ID NO: 175 y SEC ID NO: 177.
29. El lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, capaz de aumentar la expresión superficial de moléculas del MHC clase II en células dendríticas (DC) inmaduras.
- 15 30. El lipopéptido de la reivindicación 29, en el que DC son células D1.
31. Un lipopéptido que comprende un polipéptido conjugado con uno o más restos lipídicos, en el que:
- (i) dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que comprende:
- (a) la secuencia de aminoácidos de un epítipo de linfocitos T auxiliares (Th) y la secuencia de aminoácidos de un epítipo de CTL, en el que dichas secuencias de aminoácidos son diferentes; y
- 20 (b) un resto de lisina interna para la unión covalente de cada uno de dichos restos lipídicos a través del grupo amino en épsilon de dicho resto de lisina;
- (ii) cada uno de dicho uno o más restos lipídicos se une covalentemente al polipéptido a través de un grupo amino en épsilon de dicho resto de lisina interna; en el que el resto de lisina interna al que se une el resto lipídico está localizado entre el epítipo de Th y el epítipo de CTL; y
- 25 (iii) dicho lipopéptido tiene la Fórmula General (VI):

Fórmula (VI):



- en la que:
- epítipo es un epítipo de linfocitos T auxiliares o epítipo de CTL;
- 30 A o bien está presente o bien está ausente, y consiste en un espaciador de aminoácidos de alrededor de 1 a alrededor de 6 aminoácidos de longitud;
- n es 4;
- X es NH;
- Y o bien está presente o bien está ausente, y consiste en un espaciador de aminoácidos de alrededor de 1 a alrededor de 6 aminoácidos de longitud; y
- 35

Z es un resto lipídico.

32. El lipopéptido de la reivindicación 31, en el que A está ausente.
33. El lipopéptido de la reivindicación 31 ó 32, en el que Y está presente, y consiste en un homodímero de serina.
- 5 34. El lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33, en el que Z se selecciona del grupo que consiste en: Pam₁Cys, Pam₂Cys, Pam₃Cys, Chol₂Lys, Ste₂Cys, Lau₂Cys, y Oct₂Cys.
35. El lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, capaz de aumentar la expresión superficial de moléculas del MHC clase II en células dendríticas (DC) inmaduras.
36. El lipopéptido de la reivindicación 35, en el que DC son células D1.
- 10 37. Una composición farmacéutica para provocar una respuesta de linfocitos T citotóxicos frente a un epítipo de CTL en un sujeto, comprendiendo la composición un lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36.
38. La composición farmacéutica según la reivindicación 37, en la que el lipopéptido es para administración intranasal al sujeto.
39. La composición farmacéutica según la reivindicación 37, en la que el lipopéptido es para administración mediante inyección al sujeto.
- 15 40. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39, en la que el epítipo de CTL es un epítipo de CTL de una proteína del virus de la gripe.
41. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39, en la que el epítipo de CTL es un epítipo de CTL de una proteína del virus de la hepatitis C.
- 20 42. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39, en la que el epítipo de CTL es un epítipo de CTL de una proteína de *Listeria monocytogenes*.
43. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39, en la que el epítipo de CTL es un epítipo de CTL específico de tumor.
44. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 43, en la que la composición comprende además un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 25 45. Una vacuna que comprende el lipopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36.

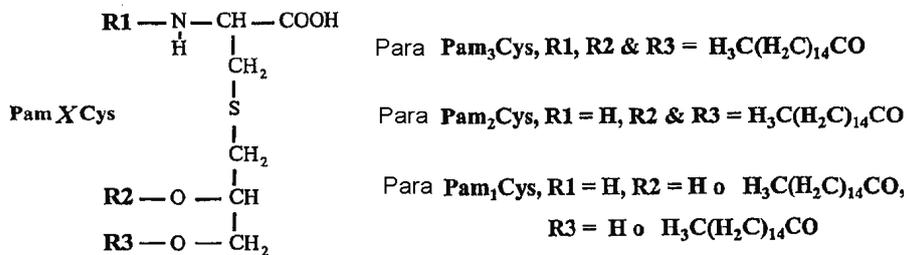
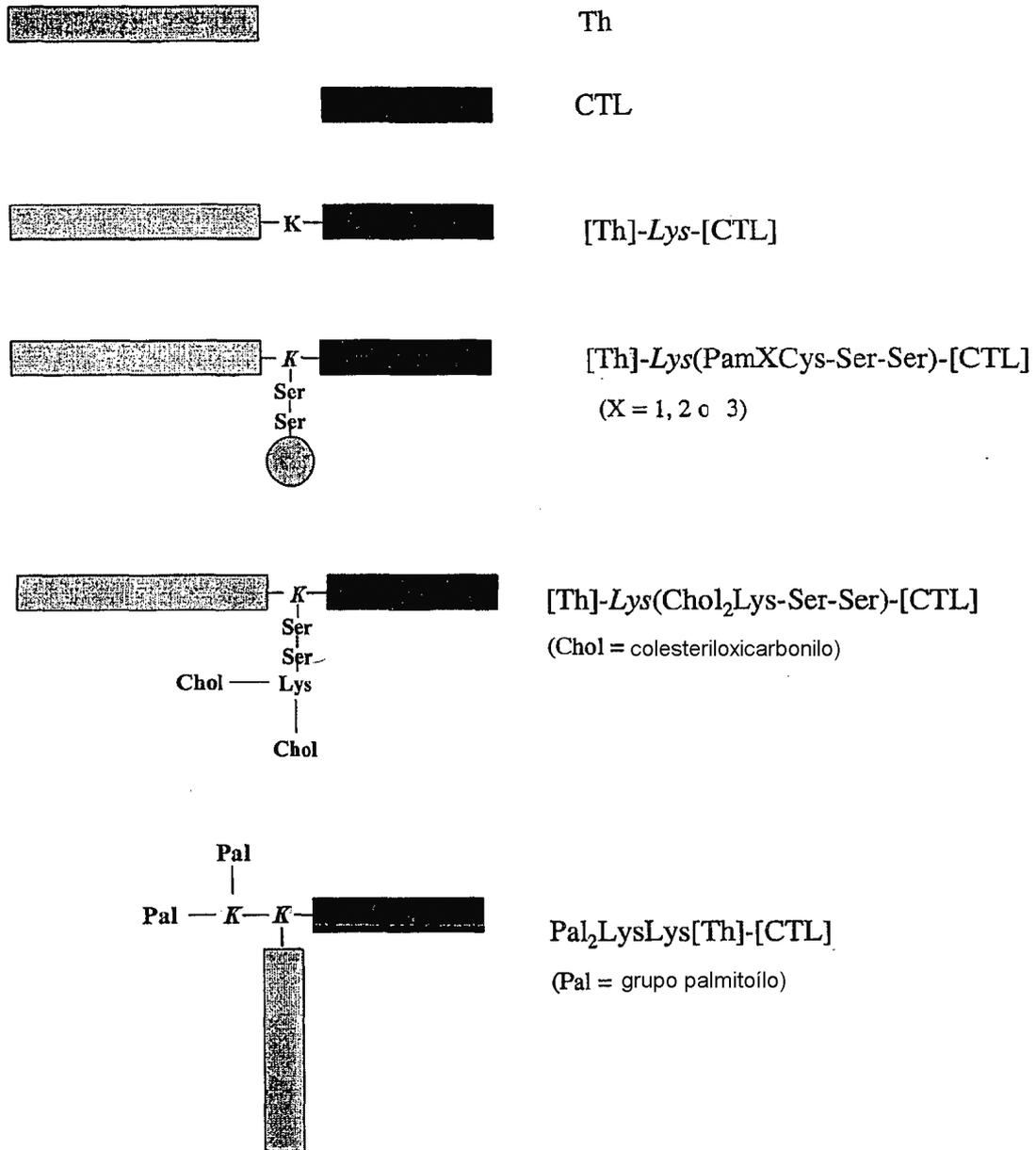


Figura 1

PÉPTIDO	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
[Th]	ALNNRFQIKGVELKS
[CTL]	TYQRTRALV
[Th]-[CTL]	ALNNRFQIKGVELKSTYQRTRALV
[Th]-Lys-[CTL]	ALNNRFQIKGVELKSKTYQRTRALV
[P25]-Lys-[LLO91-99]	KLIPNASLIENCTKAELKGYKDGNEYI
[P25]-Lys-[SIINFEKL]	KLIPNASLIENCTKAELKSIINFEKL
[P25]-Lys-[HCV]	KLIPNASLIENCTKAELKDLMGYIPLV
[Th]-Lys(Pam ₃ Cys-Ser-Ser)-[CTL]	ALNNRFQIKGVELKSKTYQRTRALV
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys-Ser-Ser)-[CTL]	ALNNRFQIKGVELKSKTYQRTRALV
[P25]-Lys(Pam ₂ Cys-Ser-Ser)-[LLO91-99]	KLIPNASLIENCTKAELKGYKDGNEYI
[P25]-Lys(Pam ₂ Cys-Ser-Ser)-[SIINFEKL]	KLIPNASLIENCTKAELKSIINFEKL
[P25]-Lys(Pam ₂ Cys-Ser-Ser)-[HCV]	KLIPNASLIENCTKAELKDLMGYIPLV

Figura 2

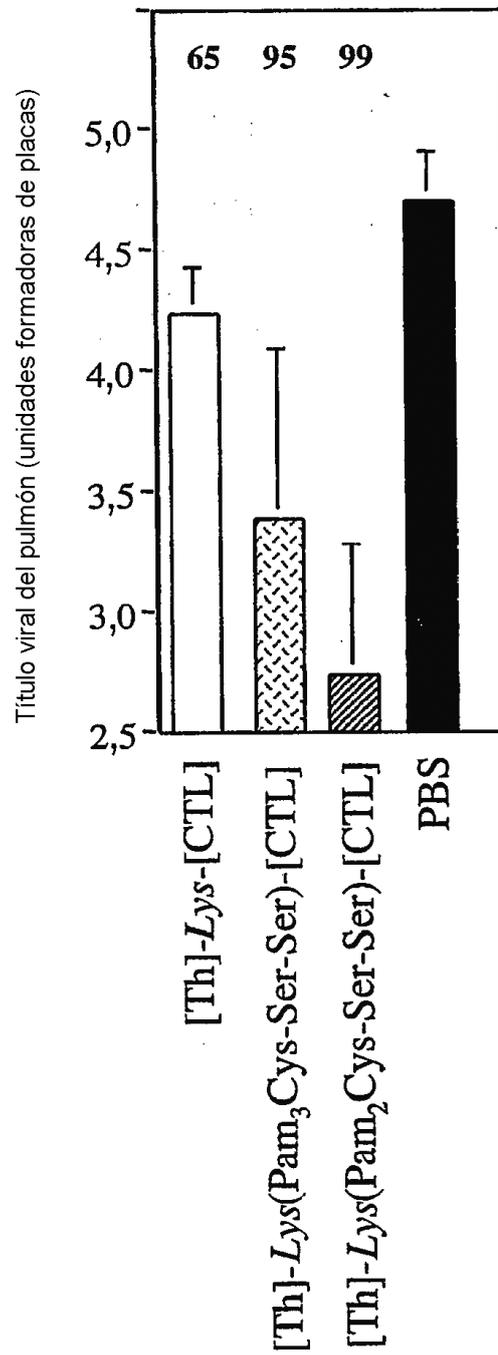


Figura 3

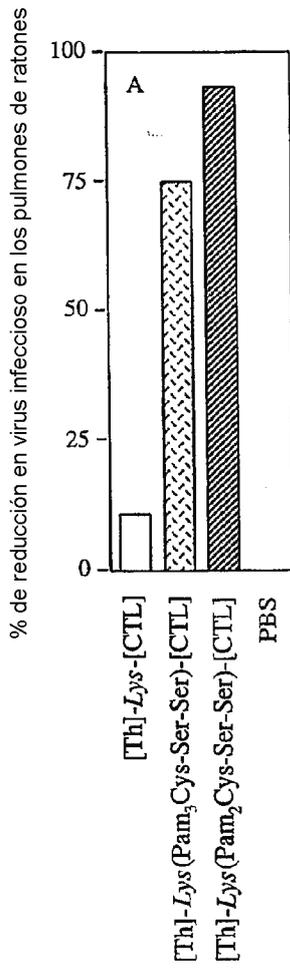


Figura 4a

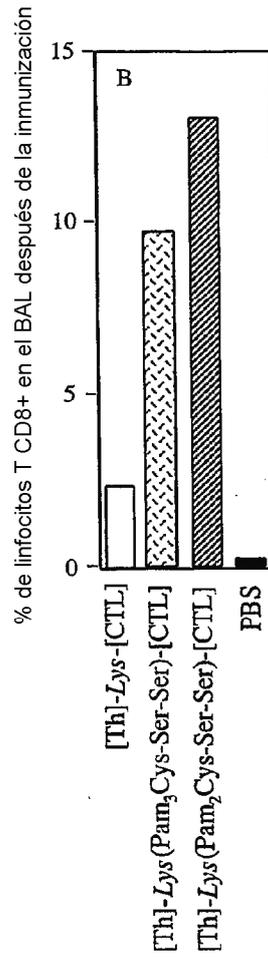


Figura 4b

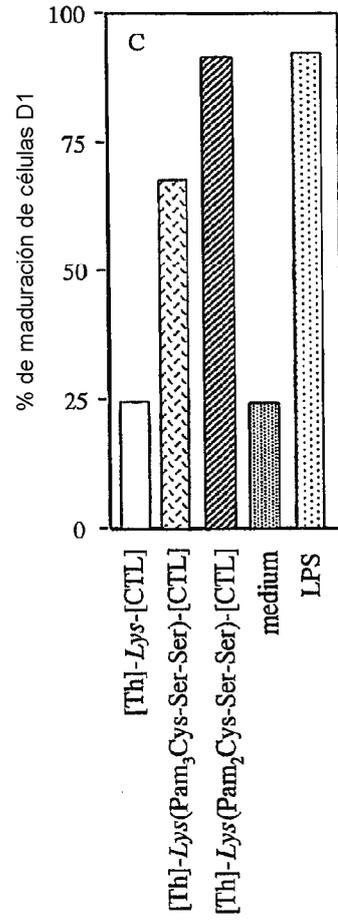


Figura 4c

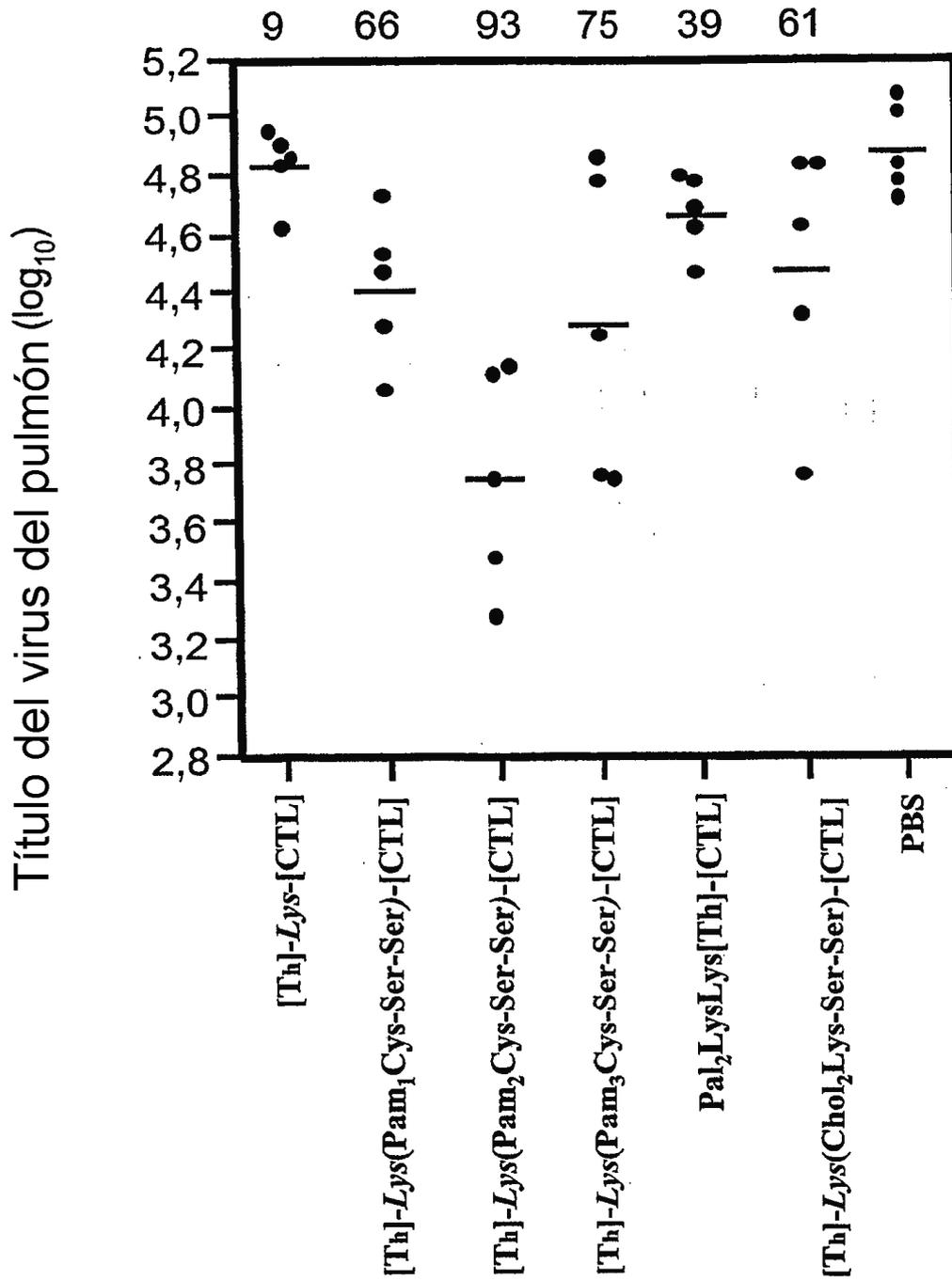


Figura 5

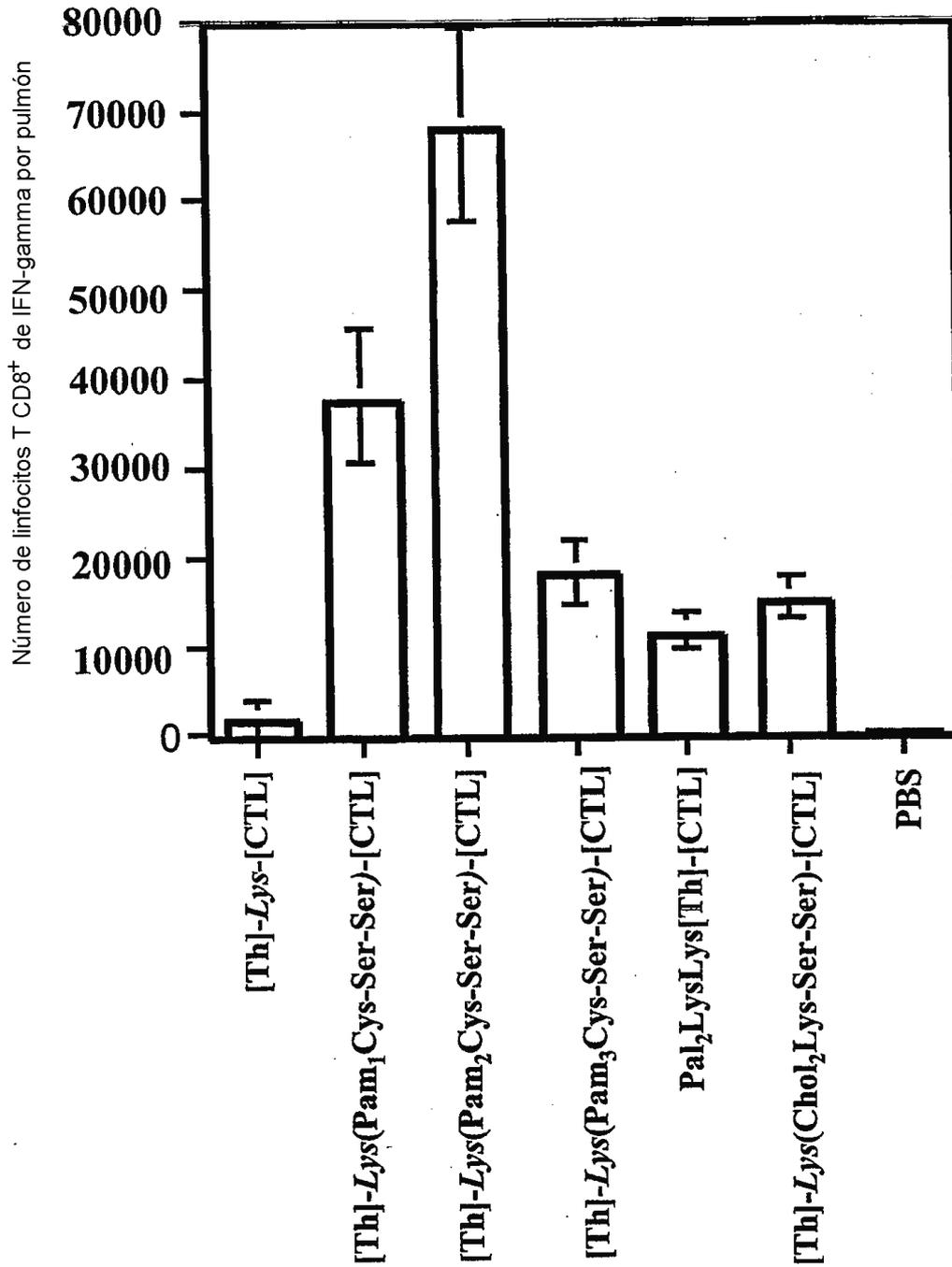


Figura 6

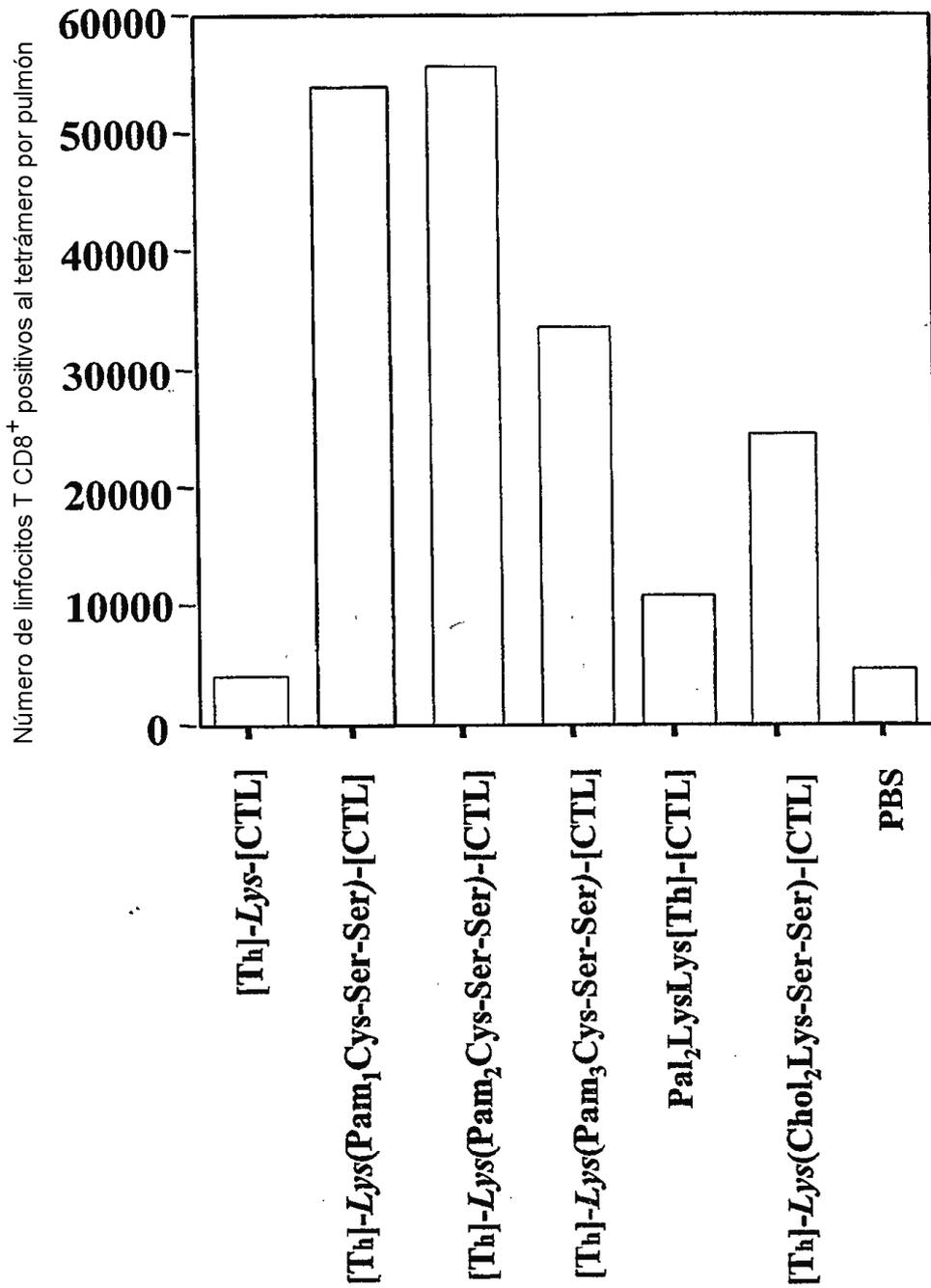


Figura 7

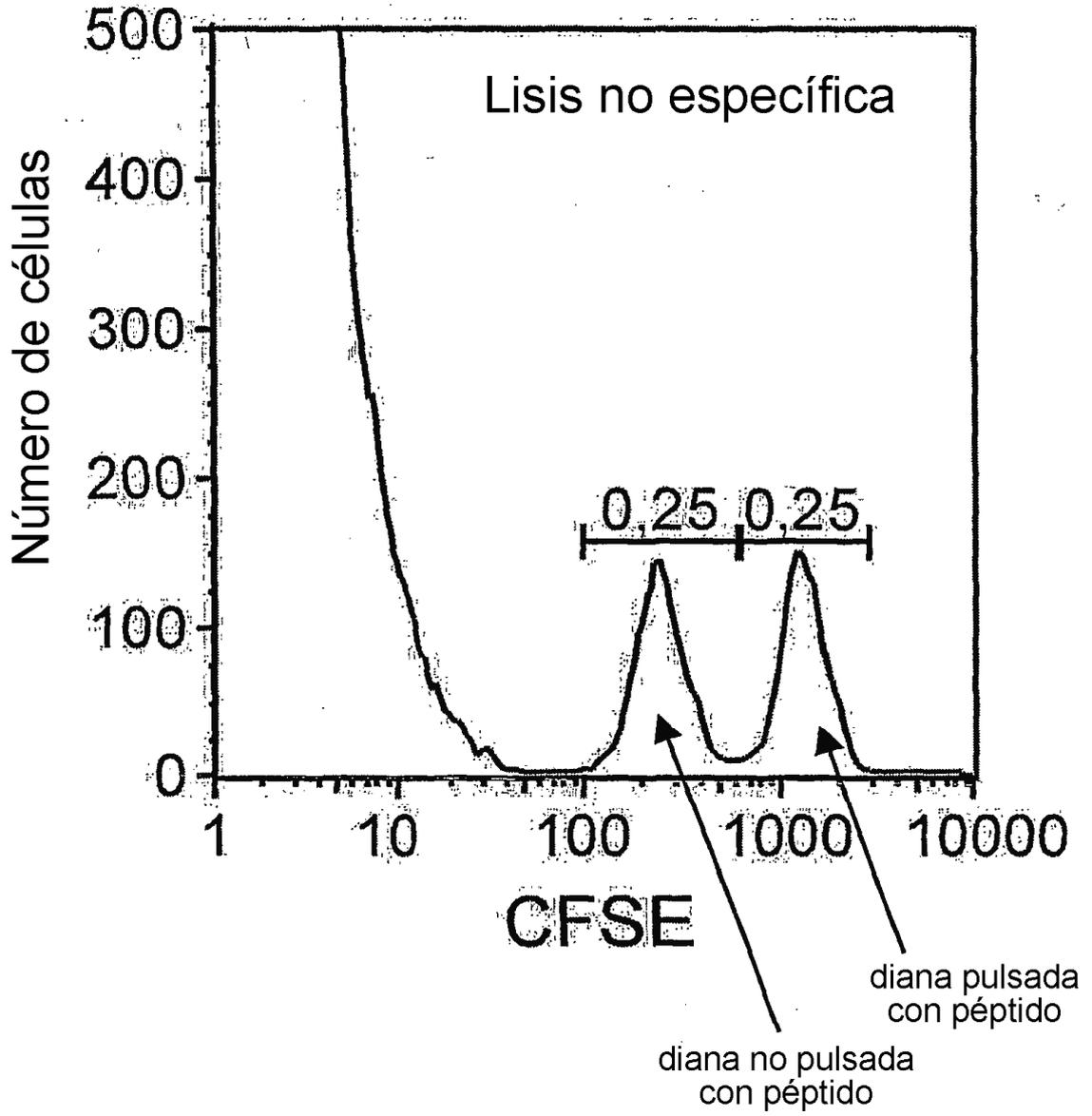


Figura 8

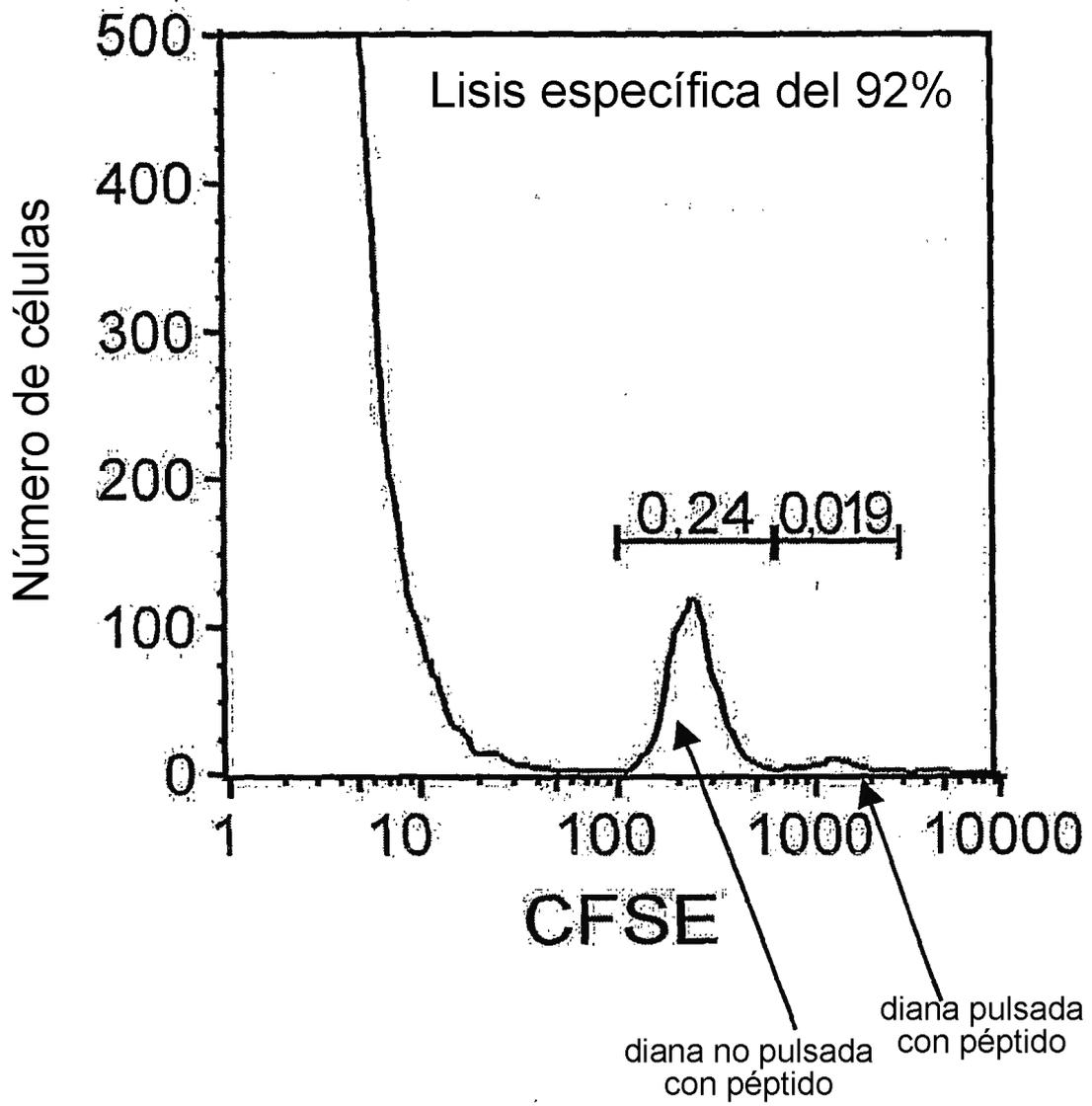


Figura 9

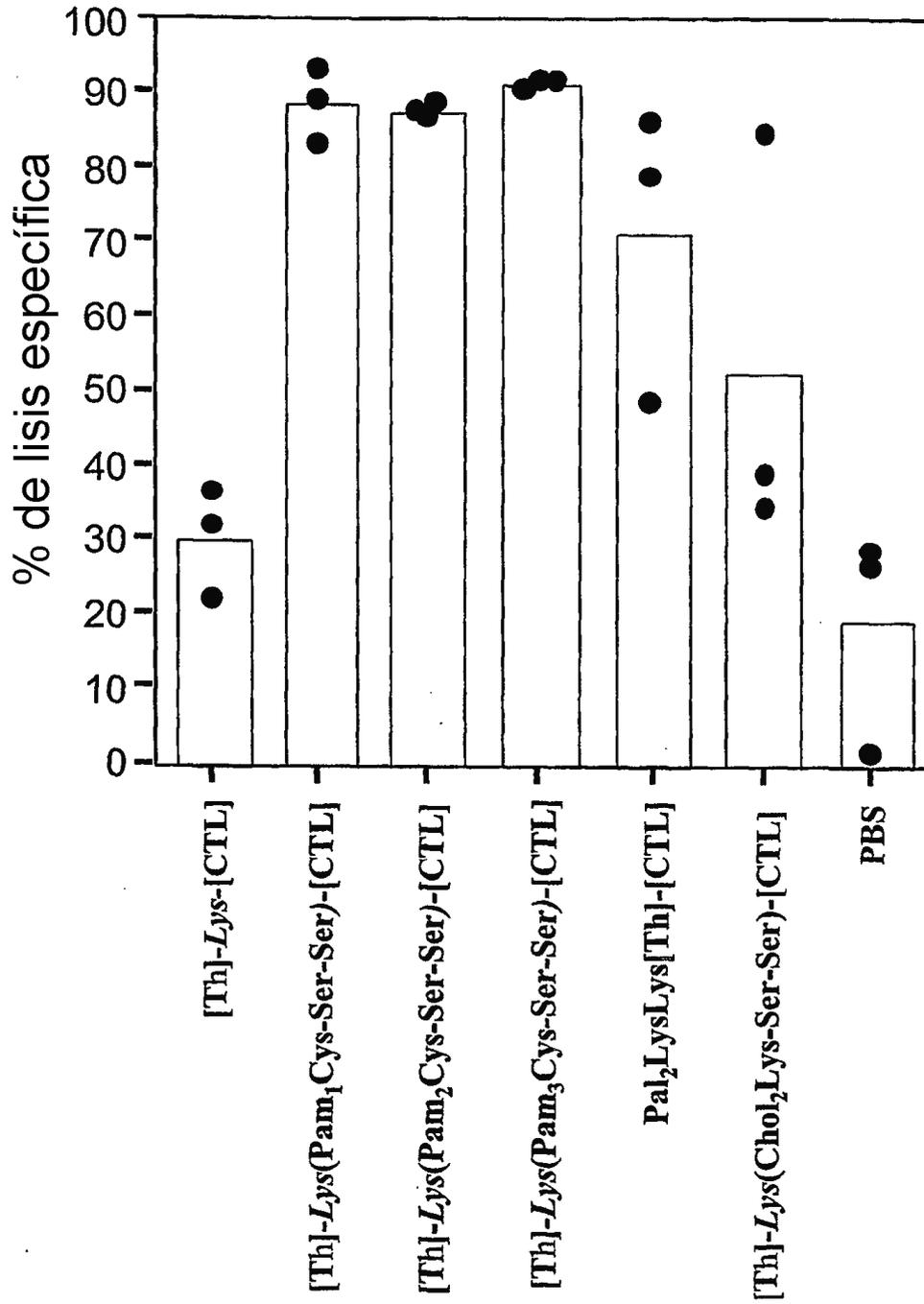


Figura 10

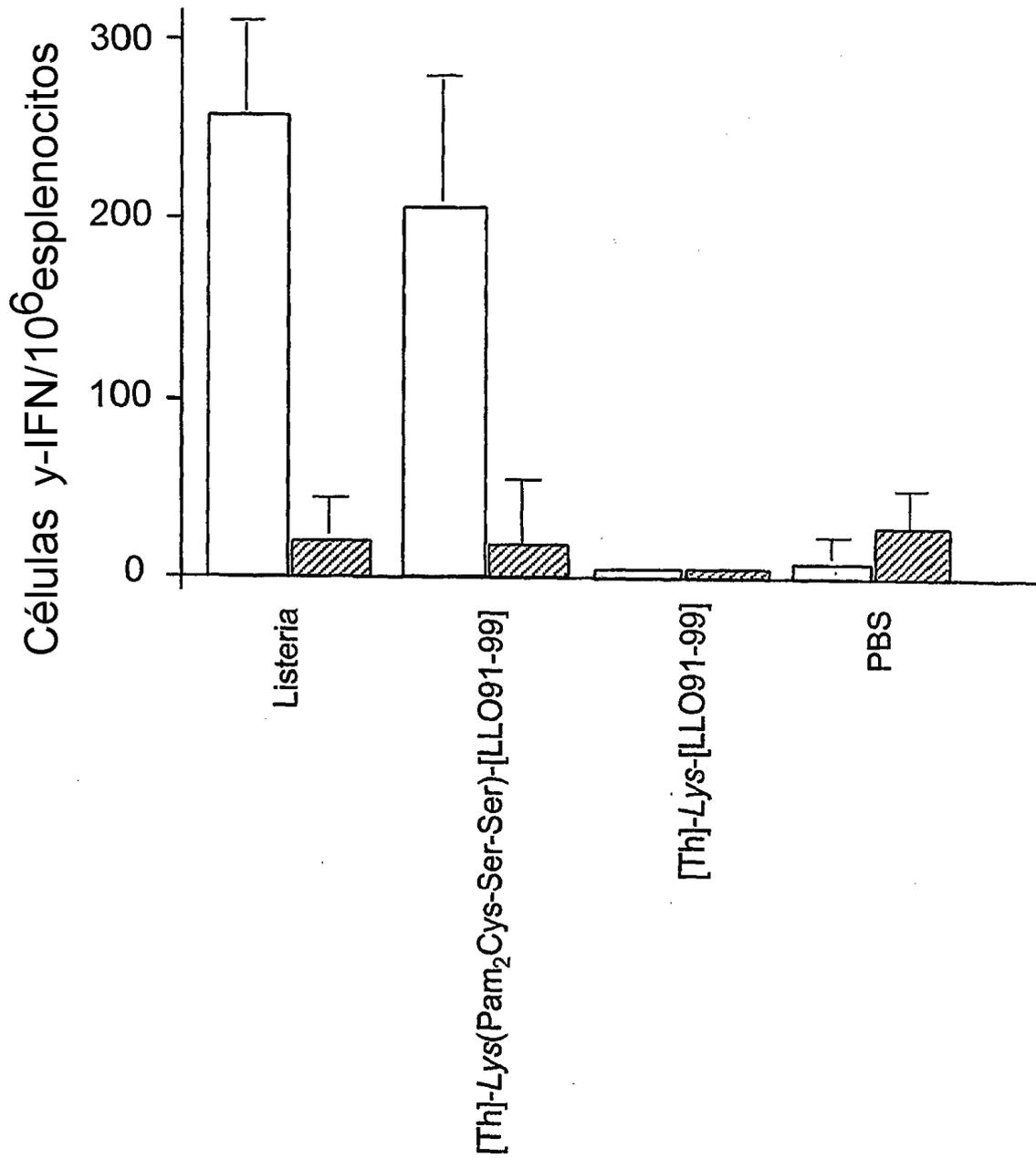


Figura 11

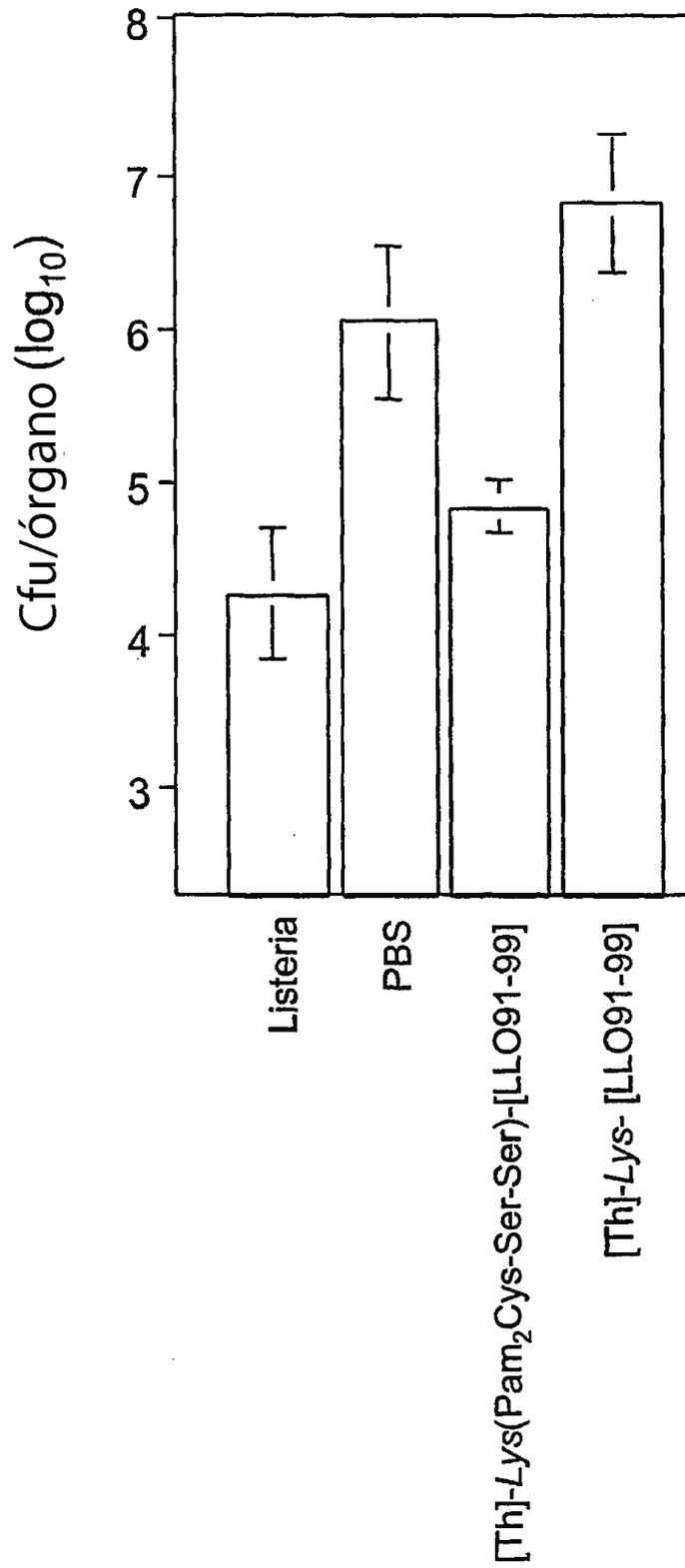


Figura 12

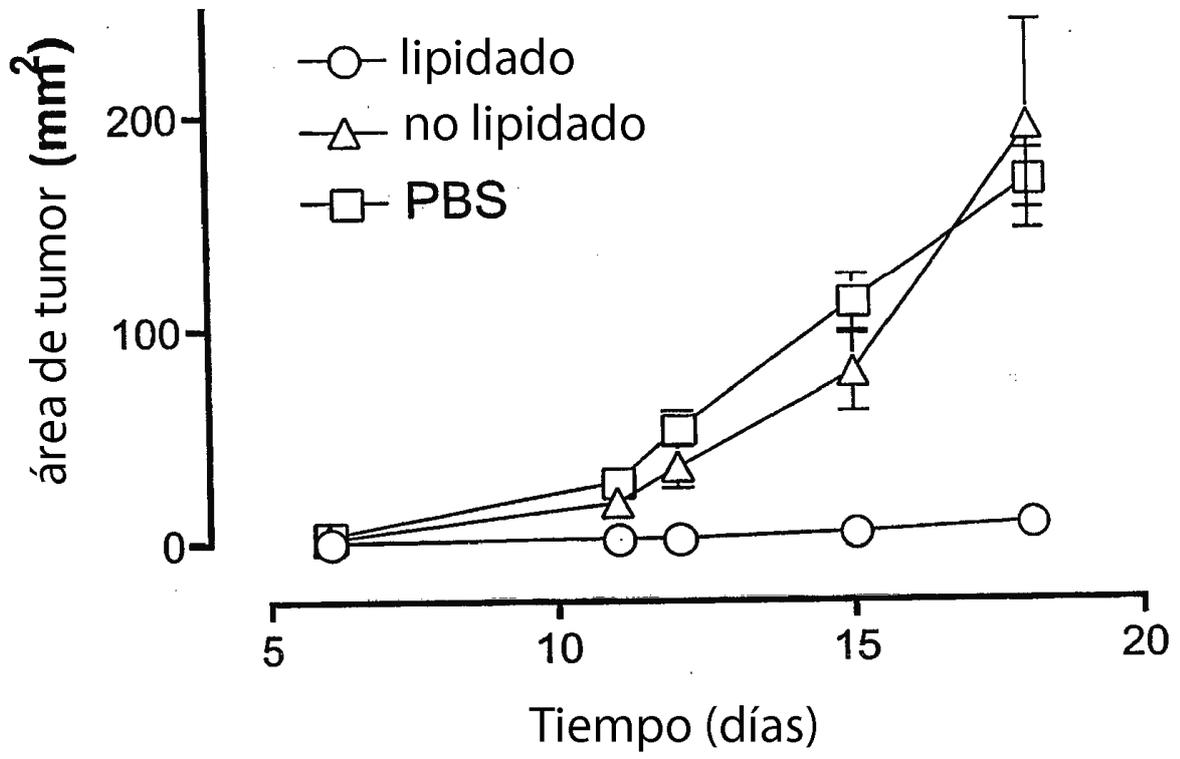


Figura 13

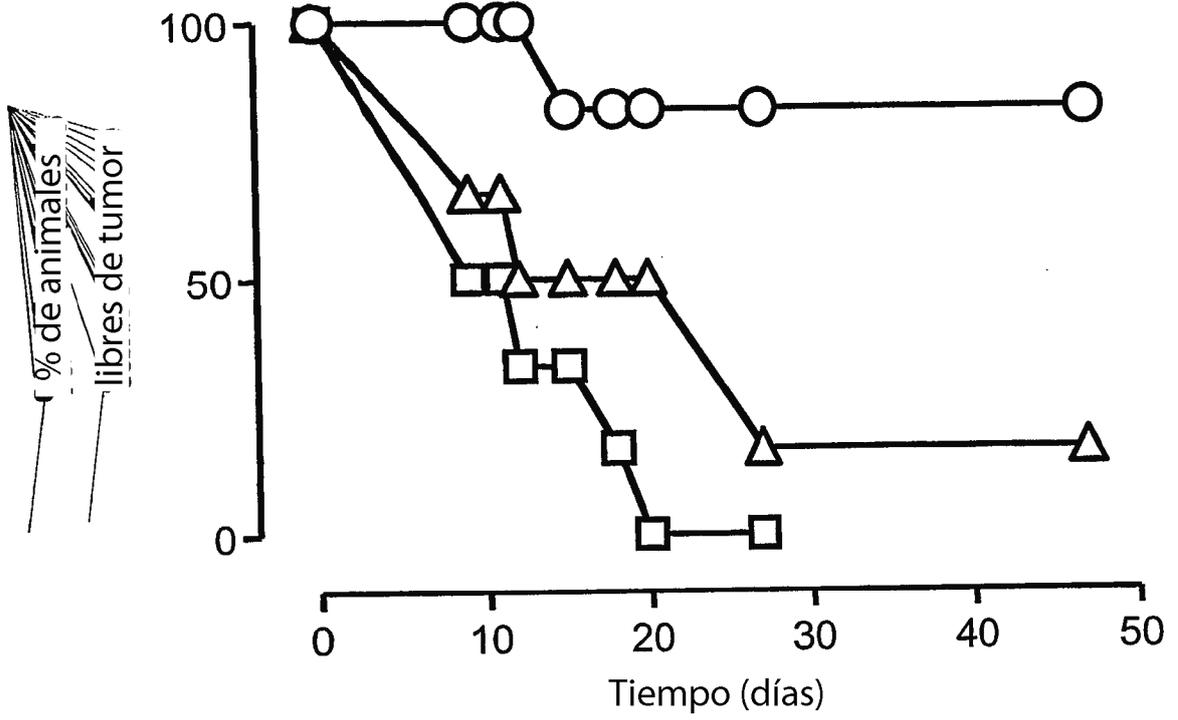


Figura 14

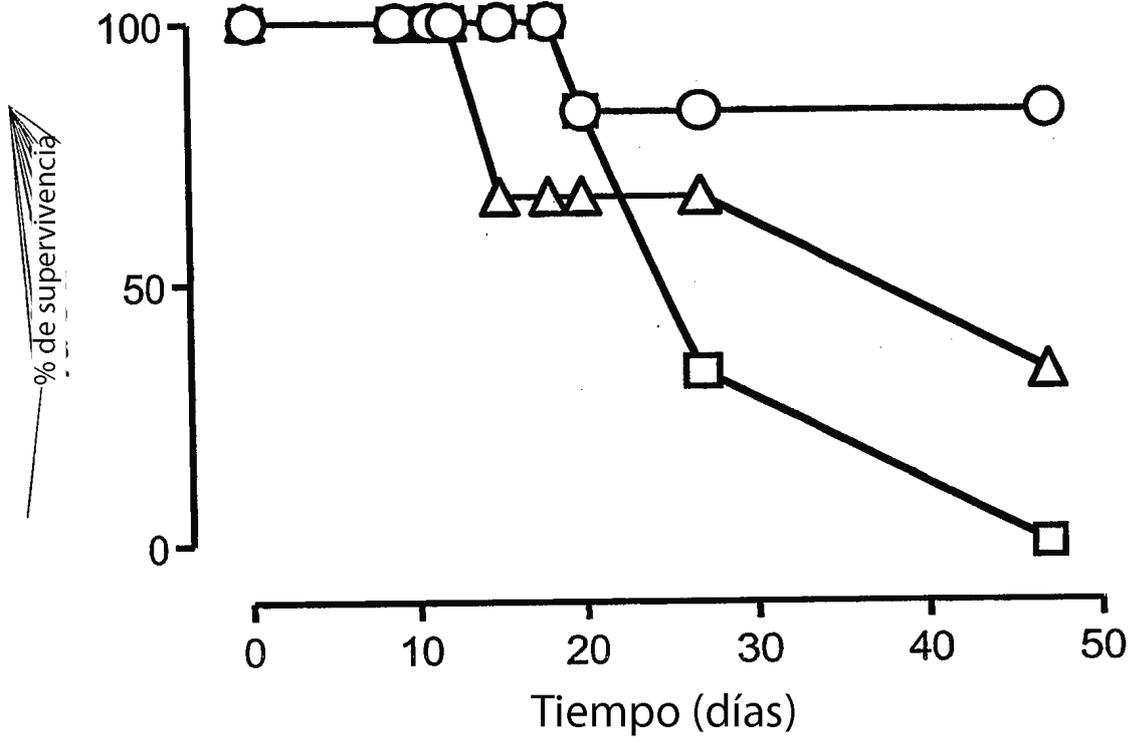


Figura 15

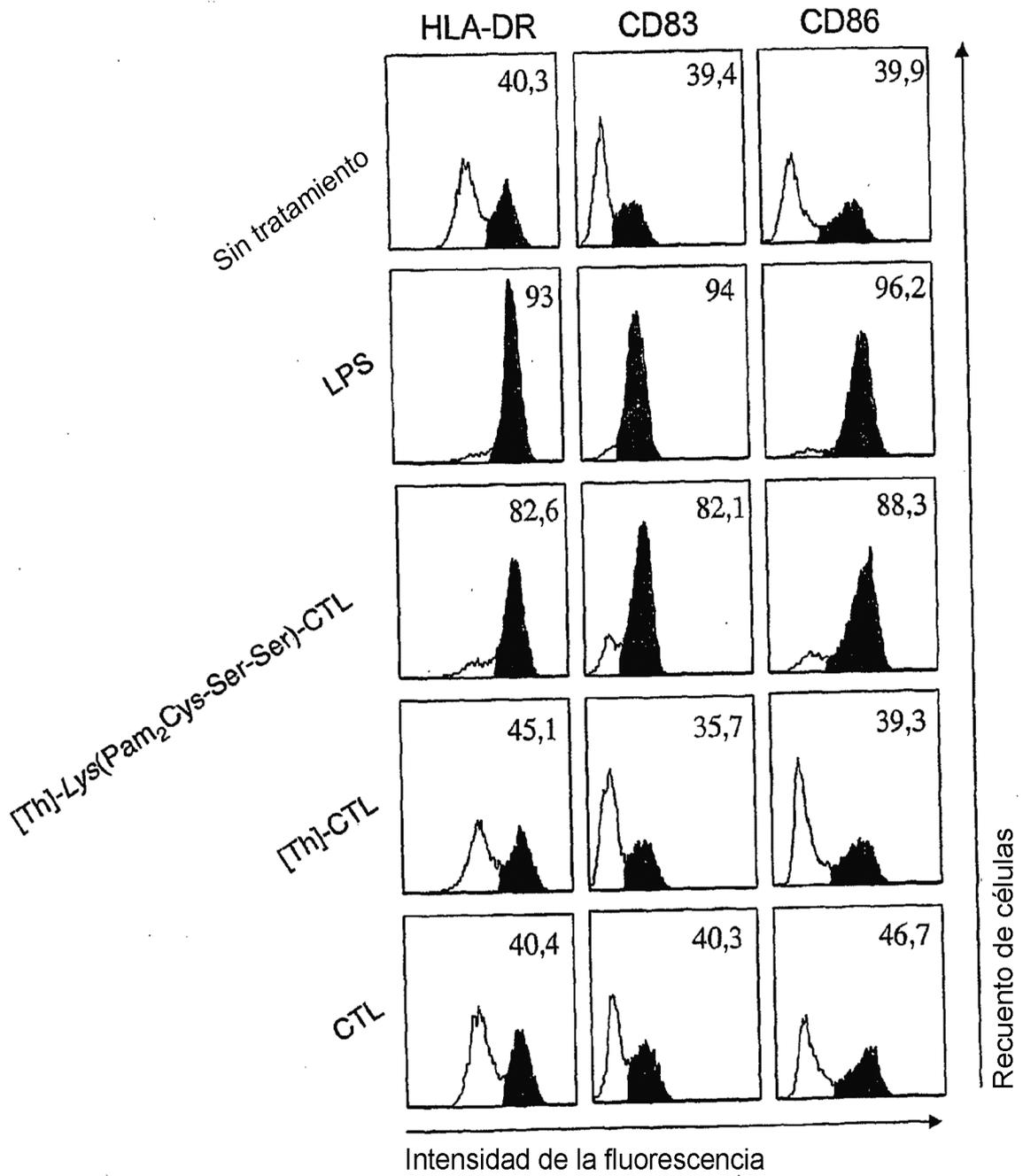


FIGURA 16