

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 885**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

**C07K 14/075** (2006.01)

**C12N 9/02** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2009 E 09711066 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2252329**

54 Título: **Eliminación de respuestas inmunitarias contra vectores virales**

30 Prioridad:

**14.02.2008 EP 08447008**

**12.03.2008 US 35826 P**

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

**16.09.2015**

73 Titular/es:

**LIFE SCIENCES RESEARCH PARTNERS VZW (50.0%)**

**Herestraat 49, bus 913**

**3000 Leuven, BE y**

**KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SAINT-REMY, JEAN-MARIE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**Observaciones :**

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

**ES 2 545 885 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

Eliminación de respuestas inmunitarias contra vectores virales

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a péptidos inmunogénicos y a su uso en la prevención y/o la supresión de respuestas inmunitarias contra vectores virales tal como los que se usan en terapia génica y en vacunación génica.

10 **Antecedentes de la invención**

Los virus brindan un gran potencial como fuente de vectores para terapia génica y para vacunación génica. Varios virus se utilizan actualmente para terapia génica, tanto experimental como en el ser humano, incluyendo virus de ARN (gamma retrovirus y lentivirus) y virus de ADN (adenovirus, virus adenoasociados, herpes virus y poxvirus). Varios factores determinan la elección del vector viral, tales como el tiempo durante el cual se requiere la expresión transgénica, la célula diana que debe ser transducida, si la célula diana se está dividiendo o no, el riesgo relacionado con eventos multi insercionales y el riesgo de inducir una respuesta inmunitaria orientada al vector. Para una revisión reciente véase, por ejemplo, Flotte (2007), *J. Cell. Physiol.* 213, 301-305.

20 La terapia génica está siendo ahora considerada para el tratamiento de un creciente número de enfermedades. Éstas incluyen: (1) trastornos autosómicos recesivos de un solo gen, tales como la fibrosis quística, la hemofilia A y B, la enfermedad granulomatosa crónica, la inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X, y la hiperlipemia familiar; (2) síndromes autosómicos dominantes; (3) muchas formas de cáncer; (4) enfermedades infecciosas; (5) síndromes inflamatorios crónicos y (6) dolor intratable. En el futuro también podrá ser factible la terapia de enfermedades asociadas con múltiples defectos o con mecanismos patogénicos, tales como la diabetes mellitus.

La vacunación génica se ha desarrollado para hacer frente a la mala protección que confieren las proteínas solubles de diversos patógenos, incluyendo virus tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se pensó que la liberación intracelular de antígenos podría dirigir un procesamiento eficaz en el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tanto de clase I como de clase II para mejorar la activación de células T CD8+ y CD4+, respectivamente.

La respuesta inmunitaria del hospedador contra proteínas de vectores virales se reconoció pronto como un factor limitante en terapia génica. Las células transducidas con vectores virales generan células T específicas, lo que conduce a inflamación y a lisis celular, anulando de este modo la expresión transgénica. Sekaly (2008), *J. Exp. Med.*, 205, 7-12 ha comunicado los resultados de un reciente ensayo de vacunación génica anti VIH utilizando vectores recombinantes de adenovirus que expresaban los genes gag, pol o Net del VIH. Sorprendentemente, se demostró que la presencia de una respuesta inmunitaria preexistente contra las proteínas del vector viral tenía resultados perjudiciales sobre el resultado de la vacunación. De este modo, en ambas situaciones (es decir, ya sea una respuesta inmunitaria preexistente o una respuesta inmunitaria no preexistente) la respuesta inmunitaria contra las proteínas relacionadas con vectores parece ser ominosa.

La respuesta inmunitaria contra adenovirus proporciona uno de los mejores ejemplos de esto, ya que los vectores derivados de adenovirus se utilizan en el contexto tanto en terapia génica como en vacunación génica. El adenovirus es muy inmunogénico en el ser humano y en mamíferos. Tras la inyección, los adenovirus generan una respuesta inmunitaria innata aguda, lo que produce inflamación y citotoxicidad, que es frecuentemente transitoria. Sin embargo, esta respuesta desencadena una respuesta adaptativa que conduce a la activación de células T CD4+ y CDS+. Esto se observa incluso con vectores de los que se han eliminado las proteínas más inmunogénicas.

La respuesta inmunitaria adaptativa contra adenovirus implica varios componentes: anticuerpos específicos, células T CD4+ y CDS+. Las proteínas virales se procesan y presentan por las células presentadoras de antígeno (CPA) del hospedador en forma de péptidos unidos al (CMH) de clase I y II. Por tanto, dicha presentación da como resultado la activación de células T específicas pertenecientes al subtipo CDS+ o CD4+, respectivamente. La función de las células T CDS+ es lisar células que expresan péptidos del CMH de clase I derivados de virus. La función de las células T CD4+ es multifacética: ayudando a las células B a madurar y a transformarse en células formadoras de anticuerpos, ayudando a las células T CDS+ a adquirir una maduración completa y al desarrollo de un ambiente inflamatorio. Como tal, las células T específicas CD4+ juegan un papel importante en la elaboración de una respuesta inmunitaria específica frente a virus.

Hohn H. et al., (1999) *J. Immunol.* 163, 5715-5722, divulgan en la Tabla VI epítomos de células T de la proteína HPV E7 que contiene una secuencia CxxC.

60 El documento US7157089 describe un antígeno gripal fusionado a una proteína de estrés, por ejemplo, a PDI. El documento WO02/00892 describe proteínas de fusión Tiorredoxina-HPV E7.

Sundar et al., (1985) *Int. J. Cancer* 35, 351-357, describen Tregs (células T reguladoras) específicas para antígenos virales.

65 Dobrzynski et al., (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 4592-4597, abordan las respuestas inmunitarias contra un vector de transferencia génica en protocolos de terapia génica, y proponen como solución a este problema una primera introducción del transgén en un vector viral adenoasociado, seguido de la introducción de un vector adenoviral. Este

artículo menciona la activación células T CD4+ reguladoras como un mecanismo para el aumento observado en la expresión transgénica.

Fomenko D. (2003) Biochem. 42, 11214-11225, divulga que no se puede considerar que todos los motivos C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C actúen como motivos de oxidación-reducción (redox). El motivo CxxC es también

5 característico de algunas proteínas de dedos de cinc y de otras citocinas (citocinas CXCR).

Heemskerk et al., (2006) J. Immunol. 177, 8851-8859, describen clones de célula T CD4(+) específicos de adenovirus que reconocen antígenos endógenos e inhiben la replicación viral *in vitro* a través de interacciones afines. El epítipo reconocido por estas células T CD4+ citotóxicas se presentan en las moléculas de CMH de clase II.

10 Carlier et al., (2012) PlosOne 7, e45366, caracterizan adicionalmente células como las divulgadas en la presente solicitud y explican que la citotoxicidad se produce a través de una ruta apoptótica independiente de perforina.

Los adenovirus son ubicuos y se han descrito más de 50 serotipos. De este modo, muchos sujetos ya están inmunizados, lo que limita el uso de vectores derivados de dichos virus.

15 Por consiguiente, en el escenario de la terapia génica así como de la vacunación génica, es muy recomendable encontrar modos para prevenir y/o suprimir respuestas inmunitarias contra proteínas de vectores virales.

### Sumario de la invención

20 La invención, en su más amplio sentido, es como se define en las reivindicaciones independientes.

La presente invención se refiere, en un primer aspecto, a péptidos inmunogénicos aislados, como se detalla en las reivindicaciones, para su uso en la prevención o supresión en un receptor de un vector viral, para terapia génica o vacunación génica, a las respuestas inmunitarias contra dicho vector viral. Más particularmente, la divulgación se

25 refiere al uso de al menos un péptido inmunogénico aislado como se detalla en las reivindicaciones para la elaboración de un medicamento para prevenir o suprimir una respuesta inmunitaria contra un vector viral, en un receptor de dicho vector para terapia génica o vacunación génica.

30 En un aspecto adicional, la invención se refiere a al menos un péptido inmunogénico aislado, como se detalla en las reivindicaciones, para su uso en la prevención, en un receptor de terapia génica o de vacunación génica, de la activación de células T CD4+ efectoras por una proteína de vector viral.

35 En un aspecto adicional, la invención también abarca al menos un péptido inmunogénico aislado como se detalla en las reivindicaciones para su uso en la inducción, en un receptor de terapia génica o de vacunación génica, de células T CD4+ reguladoras que sean citotóxicas contra células que presentan una proteína de vector viral.

40 En un aspecto adicional, la invención también se refiere a al menos un péptido inmunogénico aislado como se detalla en las reivindicaciones para su uso en la prevención, en un receptor de terapia génica o de vacunación génica, de la activación de células T CD8+ efectoras por una proteína de vector viral.

45 Generalmente, la invención proporciona péptidos inmunogénicos como se detalla en las reivindicaciones para su uso en la prevención o supresión en un receptor de vector viral (para terapia génica o vacunación génica) de una respuesta inmunitaria contra el vector viral, previniendo la activación de células T CD4+ y/o CD8+ efectoras de un receptor por una proteína de vector viral e induciendo en un receptor células T CD4+ reguladoras que sean citotóxicas contra células que presentan una proteína de vector viral (o un epítipo de la misma).

50 En cualquiera de lo anterior, dicha proteína de vector viral puede proceder de un adenovirus, de un virus adenoasociado, de un herpesvirus o de un poxvirus o de un vector viral procedente de cualquiera de los mismos. Como alternativa, dicha proteína de vector viral procede de un retrovirus o de un lentivirus o de un vector viral procedente de cualquiera de los mismos.

55 En cualquiera de lo anterior, dicho motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C en dicho péptido inmunogénico está directamente adyacente a dicho epítipo de célula T, o separado de dicho epítipo de célula T por un conector de como mucho 7 aminoácidos.

60 En una realización adicional para el péptido inmunogénico en los usos anteriores, el motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C no se encuentra naturalmente dentro de una región de 11 aminoácidos N- o C-terminal adyacente al epítipo de célula T en dicha proteína de vector viral. En una realización particular, el motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C se posiciona en el N terminal del epítipo de célula T. Además, en realizaciones particulares, al menos una X en dicho motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C es una Gly, Ala, Ser o Thr; adicionalmente o como alternativa al menos una X es His o Pro. En realizaciones particulares al menos una C en el motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C está metilada.

65 En realizaciones particulares del péptido inmunogénico previsto para los usos anteriores, el péptido inmunogénico comprende adicionalmente una secuencia de direccionamiento endosómico. Cualquiera de los péptidos inmunogénicos anteriores puede producirse por síntesis química o por expresión recombinante.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a métodos *in vitro* para obtener una población de células T CD4+ reguladoras específicas contra antígenos de proteínas de vectores virales con propiedades citotóxicas contra células que presentan un epítipo de célula T limitado al CMH de clase II de dicha proteína de vector viral, comprendiendo dichos métodos las etapas de:

- 5
- proporcionar células de sangre periférica
  - poner en contacto estas células con un péptido inmunogénico como se detalla en las reivindicaciones; y
  - expandir estas células en la presencia de IL-2
- 10 También son parte de la invención poblaciones de células T CD4+ reguladoras específicas contra antígenos de proteínas de vectores virales con propiedades citotóxicas contra células que presentan un epítipo de célula T limitado al CMH de clase II de dicha proteína de vector viral y obtenibles por los métodos anteriores, así como dichas células para su uso en la prevención o supresión de respuestas inmunitarias contra dichas proteínas de vectores virales en un receptor de terapia génica o vacunación génica.

15 Un aspecto adicional de la invención se refiere a péptidos inmunogénicos aislados que comprenden un epítipo de célula T limitado al CMH de clase II de una proteína de vector viral y directamente adyacente al epítipo de célula T o separado del epítipo de célula T por conector de hasta 7 aminoácidos, un motivo de óxido-reducción C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C.

20 La invención adicionalmente abarca vectores virales aislados caracterizados por comprender al menos una proteína de vector viral que comprende un epítipo de célula T restringido por el CMH de clase II y directamente adyacente al epítipo de célula T o separado del epítipo de célula T por un conector de hasta 7 aminoácidos, un motivo de óxido-reducción a C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C. Más particularmente la invención proporciona vectores virales

25 aislados caracterizados en que al menos un epítipo de célula T limitado al CMH de clase II presente en al menos una de las proteínas virales del vector, esta modificado por inserción en dicha proteína de vector viral, directamente adyacente a dicho epítipo de célula T o separado de dicho epítipo de célula T, por un conector de hasta 7 aminoácidos, de un motivo de óxido-reducción C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C.

30 La invención adicionalmente abarca el péptido inmunogénico como se detalla en las reivindicaciones, para su uso en la prevención o supresión, en un receptor de terapia génica o vacunación génica, de una respuesta inmunitaria contra dicha proteína de vector viral.

35 La invención adicionalmente abarca la población células T CD4+ reguladoras específicas de antígeno de proteína de vector viral como se detalla en las reivindicaciones, para su uso en la prevención o supresión, en un receptor de terapia génica o vacunación génica, de una respuesta inmunitaria contra dicha proteína de vector viral.

## LEYENDAS DE LA FIGURA

40 **FIGURA 1.** Destrucción de células B esplénicas con una línea de células T específica para adenovirus humano 5 (AdVH-5). Para una descripción detallada, véase el Ejemplo 4.

### Descripción detallada de la invención

45 Definiciones

50 Cuando en el presente documento se usa el término "**péptido**" se refiere a una molécula que comprende una secuencia de aminoácidos de entre 2 y 200 aminoácidos, conectados por enlaces peptídicos, pero que en una realización particular puede comprender estructuras no aminoacídicas (como por ejemplo un compuesto orgánico conector). Los péptidos de acuerdo con la invención pueden contener cualquiera de los 20 aminoácidos convencionales o versiones modificadas de los mismos, o pueden contener aminoácidos que no se encuentran naturalmente, incorporados por síntesis química peptídica o por modificación química o enzimática.

55 Cuando en el presente documento se usa el término "epítipo" se refiere a una o a varias partes (que pueden definir un epítipo conformacional) de una proteína que es/son específicamente reconocidas y unidas por un anticuerpo o una parte del mismo (Fab', Fab2', etc.) o por un receptor presentado en la superficie de la célula de un linfocito B o T y que es capaz, a través de dicha unión, de inducir una respuesta inmunitaria.

60 Cuando en el presente documento se usa el término "antígeno" se refiere a una estructura de una macromolécula que comprende uno o más haptenos (que generan una respuesta inmunitaria solamente cuando están unidos a un transportador) y/o que comprende uno o más epítopos de célula T. Normalmente, dicha macromolécula es una proteína o un péptido (con o sin polisacáridos) o está constituida por una composición proteica y comprende uno o más epítopos; como alternativa, en el presente documento, dicha macromolécula puede recibir el nombre de "**proteína antigénica**" o "**péptido antigénico**".

65 La "**terapia génica**" puede definirse como la inserción, *ex vivo* o *in vivo*, de un gen o genes dentro de células

individuales o grupos de células (como tejidos u órganos), a través de la cual la expresión del gen en las células o grupos de células asegura un efecto terapéutico. En muchos casos la terapia génica se lleva a cabo para proporcionar un gen o alelo perdido o para reemplazar un gen mutante o un alelo mutante por una copia funcional. El "gen terapéutico" se transfiere a través de un transportador denominado vector. El vector más común es un vector viral.

5 Después de la infección de las células diana con el vector viral que porta el gen terapéutico, el vector viral descarga su material genético incluyendo el gen terapéutico en las células diana, seguido de la generación de la proteína (o proteínas) funcional codificada por el gen terapéutico. Las células diana de la terapia génica pueden ser bien células somáticas o células germinales o líneas celulares. Además, la terapia génica se refiere al uso de vectores para transferir, ya sea *ex vivo* o *in vivo*, un gen que requiere la sobreexpresión o expresión ectópica en una célula o grupo de

10 células. El vector puede facilitar la integración de un nuevo gen en el núcleo o puede conducir a la expresión episomal de ese gen.

**La "vacunación génica"** puede definirse como la administración de un gen funcional (es decir, capaz de expresar la proteína codificada por el gen) a un sujeto con el propósito de vacunar a dicho sujeto. Por tanto, la vacunación génica (o vacunación de ADN) es una variante de la vacunación más clásica con péptidos, proteínas, gérmenes atenuados o destruidos, etc. La vacunación génica puede realizarse con ADN desnudo o, de particular interés en el contexto de la presente invención, con vectores virales.

15

Cuando en el presente documento se usa la expresión "**proteína de vector viral**", se refiere a cualquier péptido o proteína derivado de un vector viral. Normalmente, dichas proteínas son antigénicas y comprenden uno o más epítopos tales como epítopos de célula T.

20

En el contexto de la presente invención, la expresión "**epítipo de célula T**" para "**epítipo-célula T**" se refiere a un epítipo de célula T dominante, subdominante o inferior, es decir, una parte de una proteína antigénica que es específicamente reconocida y unida por un receptor en la superficie celular de un linfocito T. El que un epítipo sea dominante, subdominante o inferior depende de la reacción inmunitaria generada contra el epítipo. La dominancia depende de la frecuencia a la que las células T reconocen a dichos epítopos y son capaces de activarlas, entre todos los posibles epítopos de célula T de una proteína. En particular, un epítipo de célula T es un epítipo unido por moléculas de CMH de clase I o de CMH de clase II.

25

El término "**CMH**" se refiere al "antígeno mayor de histocompatibilidad". En seres humanos, los genes del CMH se conocen como genes del ALH ("antígeno leucocitario humano"). Aunque no se sigue un acuerdo regular, parte de la bibliografía utiliza el ALH para referirse a moléculas de proteína de ALH, y el CMH para referirse a los genes que codifican las proteínas del ALH. Como tales, los términos "CMH" y "ALH" son equivalentes cuando se usan en el presente documento. El sistema ALH en el ser humano tiene su equivalente en el ratón, es decir, el sistema H2. Los genes del ALH más intensamente estudiados son los nueve genes del CMH denominados clásicos: ALH-A, ALH-B, ALH-C, ALH-DPA1, ALH-DPB1, ALH-DQA1, ALH-DQB1, ALH-DRA y ALH-DRB1. En seres humanos, el CMH se divide en tres regiones; Clase I, II y III. Los genes A, B y C pertenecen al CMH de clase I, mientras que los seis genes D pertenecen al CMH de clase II. Las moléculas de CMH de clase I están constituidas por una sola cadena polimórfica que contiene 3 dominios (alfa 1, 2 y 3), la cual se asocia a la microglobulina beta 2 en la superficie celular. Las moléculas de clase II están constituidas por 2 cadenas polimórficas, conteniendo cada una de ellas 2 cadenas (alfa 1 y 2, y beta 1 y 2).

30

Las moléculas de CMH de clase I se expresan prácticamente en todas las células nucleadas. Los linfocitos T CD8+ (linfocitos T citotóxicos o CTL) reconocen fragmentos peptídicos que se presentan en el contexto de moléculas de CMH de clase I. Los linfocitos T CD8+ frecuentemente maduran a efectores citotóxicos que pueden lisar células que presentan el antígeno estimulante. Las moléculas de CMH de clase II se expresan principalmente en linfocitos activados y en células presentadoras de antígeno. Los linfocitos T CD4+ (linfocitos T auxiliares o HTL) se activan por el reconocimiento de un único fragmento peptídico presentado por una molécula del CMH de clase II, que normalmente se encuentran en una célula presentadora de antígeno, como un macrófago o una célula dendrítica. Los linfocitos T CD4+ proliferan y secretan citocinas que bien mantienen una respuesta mediada por anticuerpos a través de la producción de IL-4 e IL-10, o mantienen una respuesta mediada por células a través de la producción de IL-2 e IFN-gama.

35

Los ALH funcionales se caracterizan por un surco de unión profundo al que se unen péptidos endógenos así como extraños, posiblemente antigénicos. El surco se caracteriza además por una forma y por unas propiedades físico químicas bien definidas. Los sitios de unión del ALH de clase I son cerrados, en los que los extremos terminales del péptido están inmovilizados en los extremos del surco. También están implicados en una red de enlaces de hidrógeno con restos conservados de ALH. En vista de estas restricciones, la longitud de los péptidos unidos se limita a 8-10 restos. Sin embargo, se ha demostrado que también son capaces de unirse a la molécula de ALH de clase I péptidos de hasta 12 restos de aminoácidos. La superposición de las estructuras de diferentes complejos de ALH confirmó un modo de unión general en el que los péptidos adoptan una conformación relativamente lineal, extendida.

45

A diferencia de los sitios de unión del ALH de clase I, los sitios de la clase II están abiertos por ambos extremos. Esto permite a los péptidos extenderse desde la región de unión real, "colgando" así por ambos extremos. Por tanto, los ALH de clase II pueden unir ligandos peptídicos de longitud variable, que varía de 9 a más de 25 restos de

50

aminoácidos. De forma similar al ALH de clase I, la afinidad de un ligando de clase II se determina por un componente "constante" y por uno "variable". La parte constante es otra vez el resultado de una red de enlaces de hidrógeno formada entre restos conservados en el surco del ALH de clase II y la cadena principal de un péptido unido. Sin embargo, este patrón de enlace de hidrógeno no se confina a los restos N- y C- terminales del péptido, sino que se distribuye por toda la cadena. Lo último es importante porque restringe la conformación de péptidos que forman parte de un complejo a un modo de unión estrictamente lineal. Esto es común para todos los alotipos de clase II. El segundo componente que determina la afinidad de unión de un péptido es variable debido a ciertas posiciones de polimorfismo dentro de los sitios de unión de clase II. Diferentes alotipos forman diferentes bolsillos complementarios dentro del surco, explicando de este modo la selección de péptidos dependiente de subtipo, o su especificidad. Es importante destacar que las restricciones que se mantienen sobre los restos de aminoácidos dentro de los bolsillos de la clase II son en general más "suaves" que las de la clase I. Hay mucha más reactividad cruzada de péptidos entre diferentes alotipos del ALH de clase II. La secuencia de los +/- 9 aminoácidos de un epítipo de célula T del CMH de clase II que encaja en el surco de la molécula de CMH II se numera generalmente de P1 a P9. Los aminoácidos adicionales del N terminal del epítipo se numeran como P-1, P-2 y así sucesivamente, los aminoácidos del C terminal del epítipo se numeran como P+1, P2 y así sucesivamente

Cuando en el presente documento se usa la expresión "**compuesto orgánico que tiene una actividad reductora**" se refiere a compuestos, más particularmente a secuencias de aminoácidos, capaces de reducir enlaces disulfuro en proteínas. Un término de uso alternativo para estas secuencias de aminoácidos es el "motivo de óxido-reducción".

La expresión "**cantidad terapéuticamente eficaz**" se refiere a una cantidad del péptido de la invención o de un derivado del mismo, que produce en un paciente el efecto terapéutico o preventivo deseado. Por ejemplo, en referencia a una enfermedad o a un trastorno, esta es la cantidad que reduce, en cierta medida, uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno, y más particularmente vuelve a la normalidad, ya sea parcial o completamente, los parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados con, o causantes de, la enfermedad o trastorno. De acuerdo con una realización particular de la presente invención, la cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad del péptido de la invención o derivado del mismo que conducirá a una mejora o restablecimiento de la situación fisiológica normal. Por ejemplo, cuando se usa para tratar terapéuticamente a un mamífero afectado por un trastorno inmunitario, esta es la cantidad diaria de péptido/kg de peso corporal de dicho mamífero. Como alternativa, cuando la administración es a través de terapia génica, la cantidad de ADN desnudo o de vectores virales se ajusta para garantizar la producción local de la dosis relevante del péptido de la invención, derivado u homólogo del mismo.

Cuando en el presente documento se usa el término "**natural**" refiriéndose a una secuencia, se refiere al hecho de que la secuencia es idéntica a una secuencia de origen natural o es idéntica a una parte de dicha secuencia de origen natural. A diferencia de esto, el término "**artificial**" se refiere a una secuencia que, como tal, no se produce en la naturaleza. A menos que se especifique lo contrario, los términos natural y artificial se relacionan por tanto exclusivamente con una secuencia de aminoácidos (o de nucleótidos) particular (por ejemplo, la secuencia del péptido inmunogénico, una secuencia comprendida dentro del péptido inmunogénico en la secuencia epitópica) y no se refiere a la naturaleza del péptido inmunogénico como tal. Opcionalmente, una secuencia artificial se obtiene de una secuencia natural por modificaciones limitadas tales como el cambio de uno o más aminoácidos dentro de la secuencia de origen natural o por la adición de aminoácidos al N o C terminal de una secuencia de origen natural. Los aminoácidos se denominan en el presente documento con su nombre completo, con su abreviatura de tres letras o con su abreviatura de una letra.

Los motivos de las secuencias de aminoácidos se escriben en el presente documento de acuerdo con el formato de Prosite (Hulo et al. (2006)) Nucleic Acids Res. 34 (publicación de la base de datos D227-D230). El símbolo X se usa para una posición en la que se acepta cualquier aminoácido. Las alternativas se indican por la enumeración entre corchetes ('[ ]') de los aminoácidos aceptables para una posición dada. Por ejemplo: [CST] representa un aminoácido seleccionado de Cys, Ser o Thr. Los aminoácidos que se excluyen como alternativos se indican por su enumeración entre llaves ('{ }'). Por ejemplo: {AM} representa cualquier aminoácido excepto Ala y Met. Los diferentes elementos en un motivo se separan entre sí por un guión -. La repetición de un elemento idéntico dentro de un motivo puede indicarse colocando detrás del elemento un valor numérico o un intervalo numérico entre paréntesis. Por ejemplo: X(2) corresponde a X-X, X(2, 4) corresponde a X-X o a X-X-X, o a X-X-X, A(3) corresponde a A-A-A.

Cuando en el presente documento se usa el término "**homólogo**" con referencia a los epítipos utilizados en el contexto de la invención, se refiere a moléculas que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 50 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % con la secuencia epitópica de origen natural, manteniendo de este modo la capacidad del epítipo para unir un anticuerpo o un receptor de superficie celular de una célula B y/o T. Realizaciones particulares de homólogos de un epítipo corresponden a la secuencia epitópica natural modificada a lo sumo en tres, más particularmente a lo sumo en dos, en sumo grado particularmente en un aminoácido.

Cuando en el presente documento se usa el término "**derivado**" en referencia a los péptidos de la invención se refiere a moléculas que contienen al menos la parte activa del péptido (es decir, capaz de generar actividad citolítica de células T CD4+) y además de eso comprende una parte complementaria que puede tener diferentes propósitos tales como estabilizar los péptidos o alterar las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas del péptido.

5 Cuando en el presente documento se usa la expresión "**identidad de secuencia**" de dos secuencias se refiere al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido entre el número de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las secuencias, cuando las dos secuencias están alineadas. En realizaciones particulares, dicha identidad de secuencia es del 70 % al 80 %, del 81 % al 85 %, del 86 % al 90 %, del 91 % al 95 %, del 96 % al 100 % o del 100 %.

10 Cuando en el presente documento se usa la expresión "**polinucleótido (o ácido nucleico) codificante de un péptido**" se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa en un contexto adecuado, da como resultado la generación de la secuencia peptídica relevante o de un derivado u homólogo del mismo. Dichos polinucleótidos o ácidos nucleicos incluyen las secuencias normales codificantes del péptido, así como derivados y fragmentos de estos ácidos nucleicos capaces de expresar un péptido con la actividad requerida. De acuerdo con una realización, el ácido nucleico que codifica los péptidos de acuerdo con la invención o fragmentos de los mismos es una secuencia codificante del péptido o de un fragmento del mismo que se origina de un mamífero o que corresponde a un mamífero, más particularmente un fragmento peptídico humano.

15 La presente invención proporciona péptidos para su uso en la prevención y/o supresión de respuestas inmunitarias contra proteínas derivadas de vectores virales, como se usan en terapia génica y vacunación génica, como se detalla en las reivindicaciones. En particular, la divulgación proporciona modos para prevenir el desarrollo de y/o suprimir una respuesta de células T CD4+ efectoras (denominadas, de manera alternativa, células T espectadoras). En cambio, se inducen células T CD4+ reguladoras que son capaces de inducir específicamente la apoptosis de las CPA que presentan epítomos de células T procesados a partir de proteínas de vector viral, impidiendo de este modo la formación de anticuerpos específicos, impidiendo la maduración de células T CD8+ y reduciendo las consecuencias inflamatorias de la proliferación de células T CD4+. Una consecuencia de impedir la maduración completa de células T CD8+ incluye el impedir la citólisis de células transducidas viralmente a través de la presentación del CMH de clase I de péptidos derivados de vectores virales. Los compuestos utilizados para conseguir lo anterior son péptidos inmunogénicos que abarcan la secuencia de un epítomo de célula T derivado del procesamiento de proteínas de vectores virales unidos a un motivo de óxido-reducción tal como C-(X)2-C, como se detalla en las reivindicaciones. El epítomo de célula T modificado de este modo altera el patrón de activación y la función de células T CD4+, ya sea *de novo* a partir de células T intactas en un contexto de prevención, o modificando las propiedades de células T de memoria, dando ambos como resultado una fuerte capacidad para inducir la apoptosis de las CPA. De este modo las respuestas de los anticuerpos y de las células hacia las proteínas de vectores virales se impiden y/o se suprimen. Más específicamente, la eliminación de una CPA (células dendríticas, células B o macrófagos, en el contexto de respuestas inmunitarias primarias o secundarias, respectivamente) que presenta péptidos procesados de proteínas de vectores virales unidos al CMH de clase II, da como resultado la inducción de la tolerancia a proteínas de vectores virales. Por consiguiente, utilizando los compuestos descritos anteriormente, se elimina un obstáculo importante para una terapia génica o vacunación génica eficientes.

20 En un primer aspecto la invención se refiere a péptidos inmunogénicos aislados para su uso en la prevención o supresión, en un receptor de un vector viral, por ejemplo, para terapia génica o vacunación génica, de las respuestas inmunitarias contra dicho vector viral. Más particularmente la divulgación contempla el uso de al menos un péptido inmunogénico aislado tal como se detalla en las reivindicaciones para la elaboración de un medicamento para la prevención o supresión, en un receptor de terapia génica o vacunación génica, de las respuestas inmunitarias contra dicho vector viral. Por lo tanto, dicho péptido inmunogénico o el medicamento que lo comprende puede utilizarse para el tratamiento previo o profiláctico o inmunización de un receptor de terapia génica o vacunación génica con el fin de suprimir, evitar, reducir de forma parcial o total, o eliminar (de forma parcial o total) la respuesta (o respuestas) inmunitaria inducida por la terapia génica o vacunación génica aplicadas posteriormente. Del mismo modo, los péptidos inmunogénicos de acuerdo con la invención o los medicamentos que los comprenden pueden utilizarse para el tratamiento terapéutico o inmunización de un receptor de terapia génica o vacunación génica con el fin de suprimir, reducir parcial o totalmente, o eliminar (parcial o totalmente) la respuesta (o respuestas) inmunitaria en curso contra un vector viral, inducida por dicha terapia génica o vacunación génica.

25 En un aspecto adicional, la invención se refiere a al menos un péptido inmunogénico aislado como se detalla en las reivindicaciones para su uso en la prevención, en un receptor de terapia génica o vacunación génica, activación de células T CD4+ efectoras por una proteína de vector viral.

30 En un aspecto adicional, la invención también incluye al menos un péptido inmunogénico aislado como se detalla en las reivindicaciones, para su uso en la inducción, en un receptor de terapia génica o vacunación génica, de células T CD4+ reguladoras que son citotóxicas contra células que presentan una proteína de vector viral.

35 En un aspecto adicional, la invención se refiere además a al menos un péptido inmunogénico aislado como se detalla en las reivindicaciones, para su uso en la prevención, en un receptor de terapia génica o vacunación génica, activación o maduración (completa) de células T CD8+ efectoras por una proteína de vector viral.

40 En los aspectos anteriores de la invención, los péptidos inmunogénicos de acuerdo con la invención o los medicamentos que los comprenden pueden utilizarse como tratamiento previo o profiláctico o para la inmunización de

un receptor de terapia génica o vacunación génica con el fin de suprimir, evitar, reducir parcial o totalmente, o eliminar (parcial o totalmente) una activación normalmente esperada en el receptor de células T CD4+ efectoras y/o células T CD8+ hacia el vector viral, siguiendo o de forma posterior a la terapia génica o vacunación génica efectiva. Del mismo modo, los péptidos inmunogénicos de acuerdo con la invención o los medicamentos que los comprenden pueden utilizarse para el tratamiento terapéutico o inmunización de un receptor de terapia génica o vacunación génica con el fin de suprimir, reducir parcial o totalmente, o eliminar (parcial o totalmente) la activación en el receptor de células T CD4+ efectoras y/o células T CD8+ hacia el vector viral de forma simultánea con o después de terapia génica o vacunación génica existente. Como alternativa, o de manera simultánea, con cualquiera de los péptidos inmunogénicos anteriores de acuerdo con la invención o los medicamentos que los comprenden pueden utilizarse para el tratamiento previo o profiláctico o inmunización de un receptor de terapia génica o vacunación génica, con el fin de inducir una activación normalmente no esperada en el receptor de células T CD4+ reguladoras específicas de proteínas de vectores virales capaces de destruir células que presentan uno o más antígenos de vectores virales, siguiendo o de forma posterior a la terapia génica o vacunación génica existente. Del mismo modo, los péptidos inmunogénicos de acuerdo con la invención o los medicamentos que los comprenden pueden utilizarse para tratamiento terapéutico o inmunización de un receptor de terapia génica o vacunación génica con el fin de inducir en el receptor la activación de células T CD4+ reguladoras específicas de antígenos de vectores virales, capaces de destruir células que presentan uno o más antígenos de vectores virales. Dicha inducción puede pasar en simultáneo con o después de la terapia génica o vacunación viral efectiva.

En cualquiera de los usos que se describen anteriormente en el presente documento, el receptor es un mamífero, en particular un primate (no humano) o un ser humano.

En cualquiera de los usos anteriores dicha proteína de vector viral puede ser una proteína que deriva de un adenovirus, de un virus adenoasociado, de un herpes virus o poxvirus o de un vector viral que deriva de cualquiera de los mismos. Como alternativa, la proteína de vector viral deriva de retrovirus (tales como gamma retrovirus) o lentivirus o de un vector viral que deriva de cualquiera de los mismos. En realizaciones particulares la proteína de vector viral es una proteína presente en el vector viral. En realizaciones particulares la proteína viral es una proteína viral (codificada por ADN viral)

Las células T citotóxicas reguladoras generadas por los péptidos inmunogénicos de la presente invención pueden suprimir respuestas inmunitarias incluso contra antígenos de vectores virales que forman complejos. Un requisito mínimo para que dichas células se activen es reconocer un péptido afin presentado por determinantes del CMH de clase II, conduciendo a la apoptosis de la CPA, lo que suprime de este modo las respuestas de células T (tanto de células T CD4+ como de CD8+) contra todos los epítomos de células T que presenta la CPA. Un mecanismo adicional por el que las células T citotóxicas reguladoras puede suprimir la respuesta inmunitaria global hacia antígenos complejos es mediante la supresión de la activación de células T espectadoras.

Hay situaciones en las que más de un antígeno de vector viral contribuye a la respuesta inmunitaria contra el vector viral. En dichas circunstancias, la misma CPA puede no presentar todos los antígenos de vector viral relevantes, ya que algunos de dichos antígenos pueden captarse por las CPA potencialmente diferentes. Por lo tanto, se prevé que la combinación de dos o más péptidos inmunogénicos pueda utilizarse para la prevención y supresión de respuestas inmunitarias contra un vector viral.

En cualquiera de los usos y métodos que se describen anteriormente en el presente documento, los péptidos inmunogénicos pueden sustituirse por células T CD4+ reguladoras sensibilizadas con el péptido inmunogénico, o pueden sustituirse por una secuencia de nucleótidos que codifique al péptido inmunogénico (por ejemplo, en forma de ADN desnudo o un vector viral que se administra a un individuo en lugar del péptido inmunogénico). Además, en cualquiera de los anteriores puede usarse una combinación de múltiples péptidos inmunogénicos, es decir, más de 1 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). Estos aspectos de la invención, así como la modificación adicional del péptido inmunogénico, se describen con detalle más adelante.

La presente invención se basa en el hallazgo de que un péptido inmunogénico, que comprende un epítomo de célula T limitado al CMH de clase II derivado de un antígeno de vector viral, y adyacente de forma inmediata a dicho epítomo de célula T o separado de dicho epítomo de célula T por un conector de hasta 7 aminoácidos, una secuencia peptídica C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C que tiene actividad reductora, es capaz de generar una población de células T CD4+ reguladoras, que tienen un efecto citotóxico sobre células presentadoras de antígeno que presentan dicho antígeno como un epítomo limitado al CMH de clase II. Además se basa en el hallazgo de que dicho péptido inmunogénico es capaz de prevenir la activación de células T CD8+ específicas de antígeno de vector viral y/o células T CD4+ efectoras

Por consiguiente, la invención se refiere a péptidos inmunogénicos como se detalla en las reivindicaciones, que comprenden al menos un epítomo de célula T de un antígeno de vector viral con un potencial de desencadenar una reacción inmunitaria, acoplado a un compuesto orgánico que tiene una actividad reductora, tal como un motivo de secuencia tiorreductasa. El epítomo de célula T y el compuesto orgánico se separan de forma opcional por una secuencia conectora como se detalla en la reivindicaciones. En realizaciones opcionales adicionales el péptido inmunogénico comprende de forma adicional una secuencia de direccionamiento endosómico (por ejemplo, una secuencia de direccionamiento endosómico tardío) y/o secuencias "flanqueantes" adicionales.

Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden representarse de forma esquemática como A-L-B o B-L-A, donde A representa un epítipo de célula T de un antígeno (de una proteína de vector viral) con un potencial para desencadenar una reacción inmunitaria, L representa un conector y B representa un compuesto orgánico que tiene una actividad reductora.

La actividad reductora de un compuesto orgánico puede ensayarse por su capacidad para reducir un grupo sulfhidrido tal como en el ensayo de solubilidad de insulina conocido en la técnica, en el que la solubilidad de la insulina se altera tras la reducción, o con una insulina marcada con fluorescencia. El compuesto orgánico reductor se puede acoplar en el lado amino terminal del epítipo de célula T o en el carboxilo terminal del epítipo de célula T.

En general el compuesto orgánico con actividad reductora es una secuencia peptídica. Los fragmentos peptídicos con actividad reductora se encuentran en tiorreductasas, que son enzimas pequeñas reductoras de disulfuro que incluyen glutarredoxinas, nucleorredoxinas, tiorredoxinas y otras oxidorreductasas de tiol/disulfuro. Estos ejercen actividad reductora de enlaces disulfuro sobre proteínas (tales como enzimas) a través de cisteínas con actividad redox dentro de secuencias consenso de dominio activo conservado: C-X(2)-C, C-X(2)-S, C-X(2)-T, S-X(2)-C, T-X(2)-C (Fomenko et al. (2003) *Biochemistry* 42, 11214-11225), en las que X representa cualquier aminoácido. Dichos dominios se encuentran también en proteínas más grandes tales como la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y la fosfolipasa C específica de fosfoinosítidos.

Por consiguiente, los péptidos inmunogénicos de acuerdo con la presente invención comprenden como motivo de óxido-reducción el motivo de secuencia tiorreductasa [C]-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-[C]. En la presente solicitud dicho tetrapéptido se conoce como "el motivo". En realizaciones particulares, los péptidos de la invención contienen el motivo de secuencia [C]-X(2)-[CS] o [CS]-X(2)-[C]. En realizaciones más particulares los péptidos contienen el motivo de secuencia C-X(2)-S, S-X(2)-C o C-X(2)-C.

Como se explica con detalle más adelante, los péptidos inmunogénicos de la presente invención se pueden preparar por síntesis química, lo que permite la incorporación de aminoácidos no naturales. Por consiguiente, en el motivo de compuestos reductores de acuerdo con realizaciones particulares de la presente invención, C representa ya sea cisteína u otros aminoácidos con un grupo tiol tales como mercaptovalina, homocisteína u otros aminoácidos naturales o no naturales con una función tiol. Con el fin de tener actividad reductora, las cisteínas presentes en el motivo no deberían presentarse como parte de un puente disulfuro de cisteína. Sin embargo, el motivo puede comprender cisteínas modificadas tal como cisteína metilada, que se convierte *in vivo* en cisteína con grupos tiol libres.

Cualquiera de los aminoácidos X en el motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C de realizaciones particulares de los péptidos inmunogénicos de la invención puede ser cualquier aminoácido natural, incluyendo S, C o T o puede ser un aminoácido no natural. En realizaciones particulares X es un aminoácido con una cadena lateral pequeña tal como Gly, Ala, Ser y Thr. En realizaciones particulares adicionales, X no es un aminoácido con una cadena lateral voluminosa tal como Tyr. En realizaciones particulares adicionales al menos una X en el motivo [CST]-X(2)-[CST] es His o Pro.

En los péptidos inmunogénicos de la presente invención que comprenden el motivo (redox) descrito anteriormente, el motivo se localiza de tal manera que, cuando el epítipo encaja en el surco del CMH, el motivo se mantiene fuera del surco de unión al CMH. El motivo se localiza ya sea directamente adyacente a la secuencia epitópica dentro del péptido, o está separado del epítipo de célula T por un conector de 7 aminoácidos o menos. De forma más particular, el conector contiene 1, 2, 3 o 4 aminoácidos. Como alternativa, un conector puede comprender 6 aminoácidos. Los aminoácidos típicos usados en conectores son serina y treonina. Son ejemplos de péptidos con conectores de acuerdo con la presente invención CXXC-G-epítipo (SEC ID N°: 1), CXXC-GG-epítipo (SEC ID N°: 2), CXXC-SSS-epítipo (SEC ID N°: 3), CXXC-SGSG-epítipo (SEC ID N°: 4) y similares.

En aquellas realizaciones particulares de los péptidos de la invención en las que la secuencia motivo es adyacente a la secuencia epitópica esto se indica como posición P-4 a P-1 o P+1 a P+4 en comparación a la secuencia epitópica. Además de un conector peptídico pueden usarse otros compuestos orgánicos como conectores para conectar entre sí las partes del péptido inmunogénico.

Los péptidos inmunogénicos de la presente invención pueden comprender además secuencias adicionales cortas de aminoácidos en el extremo N o C de la secuencia (artificial) que comprende el epítipo de célula T y el compuesto (motivo) reductor. Dicha secuencia de aminoácidos se denomina de forma general en el presente documento "secuencia flanqueante". Una secuencia flanqueante se puede ubicar de forma N-terminal y/o C-terminal del motivo de óxido-reducción y/o del epítipo de célula T en el péptido inmunogénico. Cuando el péptido inmunogénico comprende una secuencia de direccionamiento endosómico, una secuencia flanqueante puede estar presente entre el epítipo y una secuencia de direccionamiento endosómico y/o entre el compuesto reductor (por ejemplo, motivo) y una secuencia de direccionamiento endosómico. Más particularmente una secuencia flanqueante es una secuencia de hasta 10 aminoácidos, o de entre 1 y 7 aminoácidos, tal como una secuencia de 2 aminoácidos.

En realizaciones particulares de la invención, el motivo de óxido-reducción en el péptido inmunogénico se encuentra de forma N-terminal respecto al epítipo.

En realizaciones particulares adicionales, cuando el motivo de óxido-reducción presente en el péptido inmunogénico contiene una cisteína, esta cisteína está presente en el motivo en la posición más lejana respecto al epítipo, por tanto el motivo se encuentra como C-X(2)-[ST] o C-X(2)-S de forma N-terminal del epítipo o se encuentra como [ST]-X(2)-C o S-X(2)-C de forma carboxi-terminal del epítipo.

En determinadas realizaciones de la presente invención, se proporcionan péptidos inmunogénicos que comprenden una secuencia epitópica y una secuencia motivo. En realizaciones particulares adicionales, el motivo se encuentra varias veces (1, 2, 3, 4 o incluso más veces) en el péptido, por ejemplo, como repeticiones del motivo que pueden estar espaciadas entre sí por uno o más aminoácidos (por ejemplo, CXXC X CXXC X CXXC; SEC ID N°: 5), como repeticiones que están adyacentes entre sí (CXXC CXXC CXXC; SEC ID N°: 6) o como repeticiones que se solapan entre sí CXXCXXCXXC (SEC ID N°: 7) o CXCCXCCXCC (SEC ID N°: 8). De manera alternativa, se proporcionan uno o más motivos en ambos extremos tanto N como C terminales de la secuencia epitópica de la célula T. Otras variaciones previstas para los péptidos inmunogénicos de la presente invención incluyen péptidos que contienen repeticiones de una secuencia epitópica de célula T o múltiples diferentes epítipos de célula T en los cuales cada epítipo se precede y/o se antecede por el motivo (por ejemplo, repeticiones de "motivo-epítipo" o repeticiones de "motivo-epítipo-motivo"). En el presente documento todos los motivos pueden tener la misma secuencia pero esto no es obligatorio. Se señala que las secuencias repetitivas de péptidos que comprenden un epítipo que en sí mismo comprende el motivo darán también como resultado una secuencia que comprende tanto el 'epítipo' como el 'motivo'. En dichos péptidos, el motivo dentro de una secuencia epitópica funciona como un motivo fuera de una segunda secuencia epitópica. Sin embargo, en realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos de la presente invención comprenden solo un epítipo de célula T.

Como se describe anteriormente, los péptidos inmunogénicos según la invención comprenden, además de un compuesto reductor / motivo, un epítipo de célula T que deriva de un antígeno de vector viral. Un epítipo de célula T en una secuencia proteica puede identificarse mediante ensayos funcionales y/o mediante uno o más ensayos de predicción *in silico*. Los aminoácidos en una secuencia epitópica de célula T están numerados de acuerdo con su posición en el surco de unión de las proteínas del CMH. En realizaciones particulares, el epítipo de célula T presente dentro de los péptidos de la invención consta de entre 8 y 16 aminoácidos, aun de forma más particular consta de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos. En una realización más particular, el epítipo de célula T consta de una secuencia de 9 aminoácidos. El epítipo de célula T es un epítipo, que se presenta a las células T mediante las moléculas de CMH de clase II. En realizaciones particulares de la presente invención, la secuencia epitópica de célula T es una secuencia epitópica que encaja en la hendidura de una proteína del CMH de clase II, de manera más particular un nonapéptido que encaja en la hendidura del CMH II. El epítipo de célula T de los péptidos inmunogénicos de la invención pueden corresponder ya sea a una secuencia epitópica natural de una proteína o puede ser una versión modificada del mismo, siempre que el epítipo de célula T modificado conserve su capacidad de unirse dentro de la hendidura del CMH, similar a la secuencia epitópica natural de célula T. El epítipo de célula T modificado puede tener la misma afinidad de unión por la proteína de CMH que el epítipo natural, pero puede tener también una afinidad disminuida. En realizaciones particulares la afinidad de unión del péptido modificado es no menos que 10 veces menos que el péptido original, más particularmente no menos que 5 veces menos. Es un hallazgo de la presente invención que los péptidos de la presente invención tengan un efecto estabilizante en las proteínas que forman parte de un complejo. Por consiguiente, el efecto estabilizante del complejo péptido-CMH compensa la afinidad disminuida por la molécula de CMH del epítipo modificado.

En realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos de la invención comprenden adicionalmente una secuencia de aminoácidos (u otro compuesto orgánico) que facilita la captación del péptido en endosomas (tardíos) para el procesamiento y presentación dentro de determinantes del CMH de clase II. El direccionamiento endosómico tardío está mediado por señales presentes en la cola citoplasmática de proteínas y corresponden a motivos peptídicos bien identificados tales como el motivo [DE]XXXL[LI] (SEC ID N°: 9) basado en dileucina o el motivo DXXLL (SEC ID N°: 10) (por ejemplo, DXXXLL; SEC ID N°: 11); el motivo YXXØ basado en tirosina o el denominado motivo de racimo ácido. El símbolo Ø representa restos de aminoácidos con una cadena lateral hidrófoba voluminosa tal como Phe, Tyr y Trp. Las secuencias de direccionamiento endosómico tardío permiten el procesamiento y la presentación eficaz del epítipo de células T derivado de antígeno por las moléculas de MHC de clase II. Dichas secuencias de direccionamiento endosómico están contenidas, por ejemplo, dentro de la proteína gp75 (Vijayasradhi *et al.* (1995) J Cell Biol 130, 807-820), la proteína CD3 gamma humana, la HLA-BM β (Copier *et al.* (1996) J. Immunol. 157, 1017-1027), la cola citoplasmática del receptor de DEC205 (Mahnke *et al.* (2000) J Cell Biol 151, 673-683). Otros ejemplos de péptidos que actúan como señales de clasificación en el endosoma se desvelan en la revisión de Bonifacio y Traub (2003) Annu. Rev. Biochem. 72, 395-447. Como alternativa la secuencia puede ser la de un epítipo de célula T subdominante o minoritario de una proteína, que facilita la captación en endosomas tardíos sin superar la respuesta de células T frente al epítipo de células T derivado de proteínas de vectores virales.

Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden generarse por acoplamiento de un motivo reductor como se describe en el presente documento, en el N o C terminal con respecto a un epítipo de células T de la proteína antigénica del vector viral (bien directamente adyacente al mismo o separado por un conector). Además la secuencia epitópica de células T del péptido inmunogénico y/o el motivo de óxido-reducción pueden modificarse y/o pueden modificarse y/o puede introducirse (o modificarse) una o más secuencias flanqueantes y/o una secuencia de

direccionamiento, en comparación con la secuencia epitópica de células T de origen natural. Por consiguiente, la secuencia resultante del péptido inmunogénico diferirá en la mayoría de los casos de la secuencia de la proteína antigénica del vector viral de interés. En este caso, los péptidos inmunogénicos de la invención son péptidos con una secuencia 'artificial', de origen no natural.

5 Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden variar sustancialmente en cuanto a su longitud, por ejemplo, de aproximadamente 12-13 aminoácidos (un epítipo de células T de 8-9 aminoácidos y el motivo de óxido-reducción de 4 aminoácidos) a hasta 50 o más aminoácidos. Por ejemplo, un péptido inmunogénico de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de direccionamiento endosomal de 40 aminoácidos, una secuencia flanqueante de aproximadamente 2 aminoácidos, un motivo de 4 aminoácidos como se describe en el presente documento, un conector de 4 aminoácidos y un péptido epitópico de células T de 9 aminoácidos. En realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos de la invención constan de entre 12 aminoácidos y 20 hasta 25, 30, 50, 75, 100 o 200 aminoácidos. En una realización más particular, los péptidos constan de entre 10 y 20 aminoácidos. Más particularmente, el compuesto reductor es un motivo de óxido-reducción como se describe en el presente documento, la longitud del péptido inmunogénico que comprende el epítipo y el motivo opcionalmente conectado por un conector tiene una longitud de 19 aminoácidos o menor, por ejemplo 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 aminoácidos.

20 Como se detalla anteriormente, los péptidos inmunogénicos de la invención comprenden un motivo reductor como se describe en el presente documento conectado a una secuencia epitópica de célula T. De acuerdo con realizaciones particulares, los epítipos de células T proceden de proteínas de vectores virales que no están comprendidas dentro de su secuencia natural nativa, una secuencia de aminoácidos con propiedades redox dentro de una secuencia de 11 aminoácidos en el N o C terminal adyacente al epítipo de células T de interés. Más particularmente, la invención abarca la generación de péptidos inmunogénicos a partir de proteínas antigénicas de vectores virales que no comprenden una secuencia seleccionada de C-X(2)-S, S-X(2)-C, C-X(2)-C, S-X(2)-S, C-X(2)-T, T-X(2)-C dentro de una secuencia de 11 aminoácidos en el N o C terminal adyacente a la secuencia epitópica. En realizaciones particulares adicionales, la presente invención proporciona péptidos inmunogénicos de proteína antigénicas de vectores virales que no comprenden las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente con propiedades redox dentro de su secuencia.

30 En realizaciones particulares adicionales, los péptidos inmunogénicos de la invención son péptidos que comprenden epítipos de células T, en los que los epítipos de células T no comprenden una secuencia de aminoácidos con propiedades redox dentro de su secuencia natural. Sin embargo, en realizaciones alternativas, un epítipo de células T de unión a la hendidura del MHC puede comprender un motivo de óxido-reducción tal como se describe en el presente documento dentro de su secuencia epitópica; los péptidos inmunogénicos de acuerdo con la invención que comprenden dicho epítipo de células T deben comprender adicionalmente otro motivo de óxido-reducción acoplado (adyacente o separado por un conector) en el N o C terminal con respecto al epítipo de tal manera que el motivo unido puede garantizar la actividad reductora (contrario al motivo presente en el epítipo, que está oculto dentro de la hendidura).

40 Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos para generar péptido inmunogénicos de la presente invención descritos en el presente documento. Dichos métodos incluyen la identificación de epítipos de células T en una proteína antigénica de vector viral de interés; en la técnica se conocen ampliamente modos para identificar *in vitro* e *in silico* epítipos de células y en lo sucesivo se han elaborado algunos aspectos.

45 En realizaciones particulares, los métodos de acuerdo con la invención incluyen la generación de péptidos inmunogénicos de la invención que incluyen el epítipo de células T identificado y un motivo de óxido-reducción (con o sin conector (o conectores), una secuencia (o secuencias) flanqueante o una secuencia de direccionamiento endosómico). Los péptidos inmunogénicos generados pueden evaluarse con respecto a su capacidad para inducir células T reguladoras CD4+ específicas de proteínas de vectores virales que son citotóxicas para células que presentan (partes de) la proteína antigénica del vector viral de interés.

50 Los péptidos inmunogénicos de acuerdo con la invención se generan comenzando a partir del epítipo(o epítipos) de células T de la proteína (o proteínas) del vector viral de interés. En particular, el epítipo de células T usado puede ser un epítipo de células T dominante. Un experto en la técnica saber identificar y seleccionar un epítipo de células T a partir de proteínas de vectores virales, para su uso en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, las secuencias peptídicas aisladas de una proteína de vector viral se ensayan, por ejemplo, mediante técnicas de biológica de células T, para determinar si las secuencias peptídicas generan una respuesta de células T. Aquellas secuencias peptídicas que se descubre que generan una respuesta de células T se definen como que tienen actividad estimuladora de células T. La actividad estimuladora de células T humanas puede ensayarse adicionalmente cultivando células T obtenidas de un individuo sensibilizado contra un antígeno de vector viral con un péptido/epítipo procedente del antígeno del vector viral y la determinación de si la proliferación de células T se produce en respuesta al péptido/epítipo se mide, por ejemplo, mediante la captación celular de timidina tritiada. Los índices de estimulación para respuestas por células T a péptidos/epítipos pueden calcularse como el CPM máximo en respuesta a un péptido/epítipo dividido entre el CPM control. Un índice de estimulación (I. E.) de células T igual o mayor de dos veces el nivel de fondo se considera "positivo." Los resultados positivos se usan para calcular el índice de estimulación medio para cada péptido/epítipo para el grupo de péptidos/epítipos ensayados. Adicionalmente, los epítipos de células T

no naturales (o modificados) pueden ensayarse opcionalmente con respecto a su afinidad de unión a moléculas de MHC de clase II. La unión de epítomos de células T no naturales no naturales (o modificados) con moléculas de MHC de clase II puede realizarse de diferentes maneras. Por ejemplo, moléculas del HLA de clase II solubles se obtienen por lisis de células homocigotas para una molécula de clase II determinada. La última se purifica por cromatografía de afinidad. Las moléculas de clase II solubles se incuban con un péptido de referencia marcado con biotina producido de acuerdo con su fuerte actividad de unión para esa molécula de clase II. Después, los péptidos a evaluar para la unión con la clase II se incuban a diferentes concentraciones y se calcula su capacidad para desplazar el péptido de referencia de su unión con la clase II por la adición de neutravidina. Pueden encontrarse métodos, por ejemplo, en Texier *et al.*, (2000) *J. Immunology* 164, 3177-3184). Los péptidos inmunogénicos de la invención tienen un índice de estimulación medio de células T mayor de o igual a 2,0. Un péptido inmunogénico que tiene un índice de estimulación de células T mayor de o igual a 2,5 se considera útil como un agente profiláctico o terapéutico. Más particularmente, los péptidos inmunogénicos de acuerdo con la invención tienen un índice de estimulación medio de células T de al menos 2,5, al menos 3,5, al menos 4,0, o incluso al menos 5,0. Además, dichos péptidos tienen normalmente un índice de positividad (I.P.) de al menos aproximadamente 100, al menos 150, al menos aproximadamente 200 o al menos aproximadamente 250. El índice de positividad de un péptido se determina multiplicando el índice de estimulación medio de células T por el porcentaje de individuos, en una población de individuos sensible a un antígeno de vector viral (por ejemplo, al menos 9 individuos, al menos 16 individuos, o al menos 29 o 30, o incluso más), que tiene células T que responden contra el péptido (correspondiendo por tanto al IE multiplicado por la naturaleza promiscua del péptido/epítipo). Por tanto, el índice de positividad representa tanto la fuerza de una respuesta de células T contra un péptido (I.E.) como la frecuencia de una respuesta de células T contra un péptido en una población de individuos sensible a un antígeno de vector viral. Para determinar epítomos de células T óptimos, por ejemplo, mediante técnicas de mapeo refinadas, un péptido que tiene actividad estimuladora de células T y por tanto que comprende al menos un epítipo de células T, como se determina mediante técnicas de biología de células T, se modifica por adición o deleción de restos de aminoácidos en el extremo N o C del péptido y se ensaya para determinar un cambio en la reactividad de células T contra el péptido modificado. Si se descubre que dos o más péptidos que comparten un área de solapamiento en la secuencia proteica nativa tienen actividad estimuladora de células T humanas, según se determina mediante técnicas de biología de células T, pueden producirse péptidos adicionales que comprendan toda o una parte de dichos péptidos y estos péptidos adicionales pueden ensayarse mediante un procedimiento similar. Siguiendo esta técnica, los péptidos se seleccionan y se producen de manera recombinante o sintética. Los epítomos de células T o péptidos se seleccionan basándose en diversos factores, incluyendo la fuerza de la respuesta de células T contra el péptido/epítipo (por ejemplo, índice de estimulación) y la frecuencia de la respuesta de células T contra el péptido en una población de individuos.

Los antígenos candidatos pueden explorarse mediante uno más algoritmos *in vitro* para identificar una secuencia epitópica de células T dentro de una proteína antigénica. Se describen algoritmos adecuados, por ejemplo, en Zhang *et al.* (2005) *Nucleic Acids Res* 33, W180-W183 (PREDBALB); Salomon & Flower (2006) *BMC Bioinformatics* 7, 501 (MHCBN); Schuler *et al.* (2007) *Methods Mol Biol.* 409, 75-93 (SYFPEITHI); Dönnies & Kohlbacher (2006) *Nucleic Acids Res.* 34, W194-W197 (SVMHC); Kolaskar & Tongaonkar (1990) *FEBS Lett.* 276, 172-174 y en Guan *et al.* (2003) *Appl Bioinformatics* 2, 63-66 (MHCpred). Más particularmente, dichos algoritmos permiten realizar la predicción dentro de una proteína antigénica de una o más secuencias nonapeptídicas que encajarán en el surco de una molécula de MHC II.

Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden producirse mediante expresión recombinante, por ejemplo, en células bacterianas (por ejemplo, *Escherichia coli*), células de levadura (por ejemplo, especies de *Pichia*, especies de *Hansenula*, especies de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*), células de insecto (por ejemplo de *Spodoptera frugiperda* o *Trichoplusia ni*), células vegetales o células de mamífero (por ejemplo, células CHO, COS). La construcción de ello necesaria para la expresión adecuada de vectores (incluyendo información adicional, tal como secuencias promotoras y de terminación) implican técnicas convencionales de ADN recombinante. Los péptidos inmunogénicos de la invención producidos de manera recombinante pueden proceder de una proteína precursora más grande, por ejemplo, mediante escisión enzimática de sitios de escisión enzimática insertados adyacentes al extremo N y/o C del péptido inmunogénico, seguido de purificación adecuada.

A la vista de la longitud limitada de los péptidos inmunogénicos de la invención, estos pueden prepararse mediante síntesis peptídica química, en la que los péptidos se preparan acoplando entre sí los diferentes aminoácidos. La síntesis química es particularmente adecuada para la inclusión de, por ejemplo, D aminoácidos, aminoácidos con cadenas laterales de origen no natural o aminoácidos naturales con cadenas laterales modificadas tales como cisteína metilada. Los métodos de síntesis peptídica química están bien descritos y pueden solicitarse péptidos a empresas tales como Applied Biosystems y a otras empresas. La síntesis peptídica puede realizarse como síntesis peptídica en fase sólida (SPFS) o por el contrario como síntesis peptídica de fase en solución. Los métodos de SPFS mejor conocidos son la química de fase sólida t-Boc y Fmoc que es muy conocida por el experto en la técnica. Además, los péptidos pueden ligarse entre sí para formar péptidos más largos usando una estrategia de ligamiento (acoplamiento quimioselectivo de dos fragmentos peptídicos no protegidos) como describe originalmente Kent (Schmolzer & Kent (1992) *Int. J. Pept. Protein Res.* 40, 180-193) y se revisa, por ejemplo, en Tam *et al.* (2001) *Biopolymers* 60, 194-205. Esto proporciona un inmenso potencial para conseguir la síntesis de proteínas que está más allá del alcance de la SPFS. Muchas proteínas con un tamaño de 100-300 restos se han sintetizado satisfactoriamente mediante este método. Los péptidos sintéticos han continuado desempeñando un papel crucial en constante aumento en los campos

de investigación de bioquímica, farmacología, neurobiología, enzimología y biología molecular debido a los enormes avances en la SPFS.

5 Las propiedades físicas y químicas de un péptido inmunogénico de interés (por ejemplo, solubilidad, estabilidad) se examinan para determinar si el péptido es/sería adecuado para su uso en composiciones terapéuticas. Normalmente este se optimiza ajustando la secuencia del péptido. Opcionalmente, el péptido puede modificarse después de la síntesis (modificaciones químicas, por ejemplo, por adición/delección de grupos funcionales) usando técnicas conocidas en la materia.

10 Por consiguiente, en un aspecto aún adicional, la presente invención proporciona métodos para generar células T citotóxicas específicas de antígenos de vectores virales (células T reguladoras CD4+ o Tregs) *in vitro* (*ex vivo*). En particular dichas células T son citotóxicas contra cualquier célula que presente un antígeno de vector de viral y pueden obtenerse como una población de células. La invención se extiende a dichas (poblaciones de) Tregs citotóxicas específicas de antígenos de vectores virales que pueden obtenerse mediante los métodos descritos en el presente documento.

15 En realizaciones particulares, se proporcionan métodos que comprenden el aislamiento de células de sangre periférica, la estimulación de la población de células *in vitro* poniendo en contacto un péptido inmunogénico de acuerdo con la invención con las células de sangre periférica aisladas, y la expansión de la población de células estimulada, más particularmente en presencia de IL-2. Los métodos de acuerdo con la invención tienen la ventaja de que se producen mayores cantidades de Tregs y de que pueden generarse Tregs que son específicas para la proteína antigénica del vector viral (usando un péptido que comprende un epítipo específico de antígeno). Como alternativa, las células T citotóxicas específicas de proteínas de vectores virales pueden obtenerse incubando en presencia de las CPA que presentan un péptido inmunogénico específico de proteínas de vectores virales de acuerdo con la invención después de la transducción o transfección de las CPA con una construcción genética capaz de dirigir la expresión de dicho péptido inmunogénico. De hecho, dichas CPA pueden administrarse en sí mismas a un sujeto que necesite desencadenar *in vivo* en dicho sujeto la inducción del subconjunto de células T CD4+ citotóxicas beneficioso.

20 25 En un aspecto alternativo, las Tregs pueden generarse *in vivo*, es decir, administrando a un sujeto un péptido inmunogénico proporcionado en el presente documento y recogiendo las Tregs generadas *in vivo*.

30 Las células T reguladoras específicas de antígeno o de proteínas de vectores virales que pueden obtenerse mediante los métodos anteriores son de particular interés para uso en la prevención o supresión en un receptor de terapia génica o vacunación génica de la respuesta inmunitaria contra un vector viral, es decir, para cualquiera de los usos descritos anteriormente de los péptidos inmunogénicos de la invención, dichos péptidos pueden reemplazarse por dichas Tregs específicas de antígeno o de proteínas de vectores virales. Se contempla el uso de células de células tanto alogénicas como autogénicas. Cualquier método que comprenda la administración de dichas Tregs específicas de antígeno o de proteínas de vectores virales a un sujeto que lo necesite (es decir, para la prevención o supresión de una o más respuestas inmunitarias contra un vector viral) también se conoce como terapia celular adoptiva). Dicha terapia es de particular interés en el caso del tratamiento de reacciones inmunitarias agudas específicas de proteínas de vectores virales y en caso de reincidencia de dichas reacciones. Las Tregs son cruciales en la inmunorregulación y tienen un gran potencial terapéutico. La eficacia de la inmunoterapia basada en Tregs depende de la especificidad Ag de las células T reguladoras. Además, el uso de Treg específica de Ag en lugar de Treg policlonal expandida reduce el número total de Treg necesario para terapia.

35 40 45 La presente divulgación también se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican los péptidos inmunogénicos de la presente invención y a métodos para su uso, por ejemplo, para la expresión recombinante o en terapia génica. En particular, dichas secuencias de ácido nucleico pueden expresar los péptidos inmunogénicos de la invención.

50 55 Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden de hecho administrarse a un sujeto que lo necesite usando cualquier método de terapia génica adecuado. En cualquier uso o método de la divulgación para el tratamiento y/o supresión de la respuesta (o respuestas) inmunitaria contra un vector viral, la inmunización con un péptido inmunogénico de la invención puede combinarse con transferencia de células adoptivas de (una población) de Tregs específica para dicho péptido inmunogénico y/o con terapia génica. Cuando se combinan, dicha inmunización, la transferencia de células adoptivas y la terapia génica pueden usarse simultáneamente, o secuencialmente, en cualquier combinación posible.

60 65 En la terapia génica, las moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican los péptidos inmunogénicos pueden usarse como ADN desnudo o en liposomas u otros sistemas lipídicos para la liberación a las células diana. Otros métodos para la transferencia directa de ADN plasmídico en células son muy conocidos por los expertos en la técnica para su uso en terapia génica humana e implican el direccionamiento del ADN contra receptores en células formando complejos del ADN plasmídico con proteínas. En su forma más sencilla, la transferencia génica puede realizarse inyectando simplemente cantidades minoritarias de ADN en el núcleo de una célula, a través de un proceso de microinyección. Una vez introducidos los genes recombinantes en una célula, estos pueden reconocerse por los mecanismos normales de las células para la transcripción y traducción, y se expresará un producto génico. También se han intentado otros métodos para introducir ADN en grandes cantidades de células. Estos métodos incluyen:

transfección, en la cual el ADN se precipita con fosfato cálcico y se introduce en las células mediante pinocitosis; electroporación, en la cual las células se exponen a impulsos de gran tensión para introducir orificios en la membrana); lipofección/fusión de liposomas, en el que el ADN se empaqueta en vesículas lipófilas que se fusionan con una célula diana; y bombardeo de partículas usando ADN unido a proyectiles pequeños. Otro método para introducir ADN en las células es acoplar el ADN con proteínas químicamente modificadas. Las proteínas de adenovirus son capaces de desestabilizar endosomas y de potenciar la captación de ADN en las células. La mezcla de adenovirus con soluciones que contiene complejos de ADN, o la unión de ADN con polilisina unida covalentemente a adenovirus usando agentes reticulantes de proteínas mejora sustancialmente la captación y la expresión de los genes recombinantes. Los vectores de virus adenoasociados también pueden usarse para la liberación de genes en células vasculares. Como se usa en el presente documento, "transferencia génica" significa el proceso de introducir una molécula de ácido nucleico exógena en una célula, que normalmente se realiza para permitir la expresión de un producto particular codificado por el gen. Dicho producto puede incluir una proteína, polipéptido, ADN o ARN antisentido, o ARN enzimáticamente activo. La transferencia génica puede realizarse en células cultivadas o por administración directa en mamíferos. En otra realización, se proporciona un vector que comprende una secuencia de una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico de acuerdo con la invención. En realizaciones particulares, el vector se genera de tal manera que la secuencia de la molécula de ácido nucleico se expresa solamente en el tejido específico. Los métodos para conseguir la expresión génica específica de tejido son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, colocando la secuencia que codifica un péptido inmunogénico de la invención bajo el control de un promotor, que dirige la expresión del péptido específicamente en uno o más tejidos u órganos. Los vectores de expresión procedentes de virus tales como retrovirus, virus de la vacuna, adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus, virus de ARN o papilomavirus bovino, pueden usarse para la liberación de secuencias de nucleótidos (por ejemplo, ADNc) que codifican péptidos, homólogos o derivados de los mismos de acuerdo con la invención en los tejidos o en la población de células diana. Pueden usarse métodos conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores virales recombinantes que contengan dichas secuencias codificantes. Como alternativa, en terapia génica pueden usarse células modificadas genéticamente que contengan una molécula de ácido nucleico que codifique un péptido inmunogénico de acuerdo con la invención. En realizaciones particulares de la presente invención en la que el péptido inmunogénico se libera a través de transferencia génica, esta puede garantizarse como parte de la terapia génica a la cual se somete el paciente. Por consiguiente, la proteína inmunogénica se libera simultáneamente con el propio vector viral (que se espera que genere la reacción inmunitaria).

Cuando la administración de uno o más péptidos de acuerdo con la invención garantiza a través de transferencia génica (es decir la administración de un ácido nucleico que garantiza la expresión de péptidos de acuerdo con la invención *in vivo* después de la administración), la dosificación apropiada del ácido nucleico puede determinarse basándose en la cantidad de péptido expresado como resultado del ácido nucleico introducido.

El medicamento de la invención es normalmente, aunque no necesariamente, una formulación (farmacéutica) que comprende como ingrediente activo al menos uno de los péptidos inmunogénicos de la invención, una (población de) Tregs específica para dicho péptido inmunogénico o un vector terapéutico génico capaz de expresar dicho péptido inmunogénico. Además del ingrediente (o ingredientes) activo, dicha formulación comprenderá al menos uno de un diluyente, transportador o adyuvante (farmacéuticamente aceptable). Normalmente, los compuestos farmacéuticamente aceptables (tales como diluyentes, transportadores y adyuvantes) pueden encontrarse, por ejemplo, en un manual de la Farmacopea (por ejemplo, Farmacopea de Estados Unidos, europea o internacional). El medicamento o composición farmacéutica de la invención normalmente comprende una cantidad (profiláctica o terapéuticamente) eficaz del ingrediente (o ingredientes) activo en el que la eficacia es relativa con respecto a la afección o trastorno a prevenir o tratar. En particular, las composiciones farmacéuticas de la invención son vacunas para aplicación profiláctica o terapéutica.

Puede ser necesario administrar a un sujeto que lo necesite el medicamento o la composición farmacéutica de la invención como parte de un régimen profiláctico o terapéutico que comprenda administraciones múltiples de dicho medicamento o composición. Dichas administraciones múltiples normalmente se producen secuencialmente y el intervalo de tiempo entre dos administraciones puede variar y se ajustará con respecto a la naturaleza del ingrediente activo y con respecto a la naturaleza de la afección a prevenir o tratar. La cantidad de ingrediente activo proporcionada a un sujeto que lo necesite en una sola administración también puede variar y dependerá de factores tales como el estado físico del sujeto (por ejemplo, peso, edad), el estado de la afección a prevenir o tratar, y de la experiencia del doctor, médico o enfermero tratante.

El término "diluyentes" se refiere, por ejemplo, a soluciones salinas fisiológicas. El término "adyuvante" normalmente se refiere a un agente farmacológico o inmunológico que modifica (preferentemente aumenta) el efecto de otros agentes (por ejemplo, fármacos, vacunas) al mismo tiempo que tiene pocos, si los hubiera, efectos directos cuando se proporcionan por sí mismos. Como un ejemplo de un adyuvante, se proporciona el hidróxido de aluminio (alumbre), en el que un péptido inmunogénico de la invención puede adsorberse. Adicionalmente, en la técnica se conocen muchos otros adyuvantes y pueden usarse siempre que faciliten la presentación del péptido en el CHM de clase II y la activación de células T. La expresión "transportador farmacéuticamente aceptable" significa cualquier material o sustancia con la que se formula el ingrediente activo para facilitar su aplicación o disseminación en el sitio a tratar, por ejemplo, disolviendo, dispersando o difundiendo dicha composición, y/o facilitar su almacenamiento, transporte o manipulación sin afectar a su eficacia. Estos incluyen todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión,

recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, fenol, ácido sórbico, clorobutanol) agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similar. Pueden incluirse ingredientes adicionales para controlar la duración de la acción del ingrediente activo en la composición. El transportador farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido o un líquido o un gas que se ha comprimido para formar un líquido, es decir, las composiciones de la presente invención pueden usarse adecuadamente como concentrados, emulsiones, soluciones, granulados, polvos, pulverizaciones, aerosoles, suspensiones, pomadas, cremas, comprimidos, gránulos o polvos. Los transportadores farmacéuticos adecuados para su uso en dichas composiciones farmacéuticas y su formulación son bien conocidos por los expertos en la técnica y no hay ninguna restricción particular para su selección dentro de la presente invención. También pueden incluir aditivos tales como agentes humectantes, agentes dispersantes, gomas, adhesivos, agentes emulsionantes, disolventes, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similares, siempre que los mismos sean coherentes con la práctica farmacéutica, es decir, transportadores y aditivos que no creen un daño permanente a los mamíferos. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse de cualquier manera conocida, por ejemplo, mezclando, recubriendo y/o moliendo de manera homogénea los ingredientes activos, en un procedimiento de una sola etapa o etapas múltiples, con el material transportador seleccionado y, cuando sea apropiado, con el resto de aditivos tales como agentes tensioactivos. También pueden prepararse por micronización, por ejemplo en vista de obtenerlas en forma de microesferas normalmente con un diámetro de aproximadamente 1 a 10  $\mu\text{m}$ , en concreto para la elaboración de microcápsulas para la liberación controlada o sostenida de los ingredientes activos.

Los péptidos inmunogénicos, homólogos o derivados de los mismos de acuerdo con la invención (y todas sus sales fisiológicamente aceptables o composiciones farmacéuticas incluidas en la expresión "ingredientes activos") pueden administrarse mediante cualquier vía apropiada para la afección a prevenir o tratar y apropiada para los compuestos, en el presente documento las proteínas inmunogénicas a administrar. Las vías posibles incluyen la regional, sistémica, oral (forma sólida o inhalación), rectal, nasal, tópica (incluyendo ocular, bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraarterial, intratecal y epidural). La vía de administración preferida puede variar, por ejemplo, con la afección del receptor o con la afección a prevenir o tratar.

Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Las formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración oral pueden presentarse como unidades separadas tales como cápsulas, obleas o comprimidos, contenido cada uno de ellos, una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como un polvo o gránulos; como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El ingrediente activo también puede presentarse como un bolo, un electuario o una pasta. Un comprimido puede elaborarse por comprensión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos producidos por comprensión pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el ingrediente activo en una forma fluida tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden elaborarse moldeando, en una máquina adecuada, una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Opcionalmente, los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse y pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo en su interior.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a péptidos inmunogénicos aislados que comprenden un epítipo de célula T limitado al MHC del clase II de una proteína de vector viral y, directamente adyacente a dicho epítipo de célula T o separado de dicho epítipo de célula T mediante un conector de hasta 7 aminoácidos, un motivo de óxido-reducción C-(X)<sub>2</sub>-[CST] o [CST]-(X)<sub>2</sub>-C. En realizaciones particulares, la proteína de vector viral es una proteína viral. En realizaciones particulares adicionales la proteína de vector viral es una proteína capsidial.

Los vectores virales destinados a fines de terapia génica o vacunación génica responden muy bien a modificaciones por medios de tecnología de ácidos nucleicos recombinantes. A la vista de lo anterior, un experto en la técnica concebirá también fácilmente que la modificación en el epítipo de células T de vector viral se aplica en los péptidos inmunogénicos y sus usos de acuerdo con la invención pueden introducirse directamente en el propio vector viral. Como tal, la vacunación con los péptidos inmunogénicos que comprenden un epítipo de células T de vector viral y un motivo de óxido-reducción (y/o la vacunación génica correspondiente y/o la transferencia de células adoptivas correspondientes) puede llegar a ser redundante ya que pueden obtenerse los mismos efectos beneficiosos con un vector viral modificado. Por tanto, la invención incluye adicionalmente vectores virales modificados definidos como vectores virales aislados caracterizados por que al menos un epítipo de célula T presente en al menos una de las proteínas de vector viral se modifica por inserción en dicha proteína de vector viral, directamente adyacente a dicho epítipo de célula T limitado al MHC de clase II o separado de dicho epítipo de célula T mediante un conector de hasta 7 aminoácidos, de un motivo de óxido-reducción C-(X)<sub>2</sub>-[CST] o [CST]-(X)<sub>2</sub>-C. El epítipo de célula T se separa del motivo mediante un conector de cómo mucho 7 aminoácidos. En realizaciones particulares, se proporcionan vectores virales aislados que comprenden al menos una proteína de vector viral que comprende un epítipo de célula T directamente adyacente al mismo o separado de dicho epítipo de célula T limitado al MHC de clase II mediante un conector de hasta 7 aminoácidos, un motivo C-(X)<sub>2</sub>-[CST] o [CST]-(X)<sub>2</sub>-C, en el que el motivo no se produce de manera natural dentro de la proteína del vector viral dentro de una secuencia de 11 aminoácidos en el N o C terminal adyacente al epítipo de célula T.

5 Dicho epítipo de célula T modificado es capaz de presentarse mediante un determinante del MHC de clase II. En otra realización, dichos vectores virales aislados se caracterizan adicionalmente en que sus propiedades de transducción celular no están significativamente alteradas en comparación con el mismo vector viral no portador de la modificación del epítipo de célula T.

La presente invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos, que se proporcionan sin ninguna intención limitante.

## 10 Ejemplos

### **EJEMPLO 1. Generación *in vitro* de células T reguladoras citotóxicas a partir de células T de memoria específicas para proteínas de vector viral.**

15 El adenovirus de serotipo 5 (Ad.RR5, E1/E3-deleccionado) es un serotipo normalmente usado para terapia génica y vacunación génica. Tanto en seres humanos como en ratones se induce una fuerte respuesta inmunitaria contra el hexón de la proteína capsidial principal. Esto se usa como un modelo para determinar si las células T reguladoras citotóxicas puede proceder de células obtenidas inmunizando ratones con el vector viral.

20 Por tanto, 5 µl de una solución que contiene  $2 \times 10^{11}$  partículas virales/ml se administran por vía intravenosa a ratones C57Bl/6 de seis semanas de vida. Diez días más tarde, se extrae el bazo de dichos ratones y las células T CD4<sup>+</sup> se purifican mediante separación magnética.

25 Mediante una combinación de algoritmos, se identificó un epítipo de célula T dentro de la secuencia de la proteína capsidial principal. Se seleccionó un epítipo de célula T que abarcaba los restos de aminoácidos 912-921, con la secuencia: PTLLYVLFEV (SEC ID N°: 12; epítipo natural). Se obtuvo un péptido sintético que codificaba esta secuencia epitópica natural. Se sintetizó un segundo péptido que adicionalmente contenía una secuencia consenso tiorreductasa (o motivo de óxido-reducción) y que tenía la secuencia: CHGCPTLLYVLFEV (SEC ID N°: 13; motivo de óxido-reducción subrayado; epítipo modificado).

30 Las células T CD4<sup>+</sup> obtenidas de ratones inmunizados con Ad.RR5 se cultivaron en presencia de células adherentes de bazo usadas como células presentadoras de antígeno previamente incubadas bien con el péptido de SEC ID N°: 12 o con el péptido de SEC ID N°: 13.

35 Después de varios ciclos de reestimulación, las células T CD4<sup>+</sup> se clonaron por dilución limitante y se dejaron en reposo durante 10 días. Los clones expandidos con el péptido de SEC ID N°: 12 se compararon después con clones expandidos con el péptido de SEC ID N°: 13 en un ensayo en el que como células presentadoras de antígeno se usaron células B purificadas de ratones C57Bl/6 sin tratar. Dichas células B se cargaron con péptidos de SEC ID N°: 12 o 13 y se cultivaron en presencia de células T CD4<sup>+</sup> clonadas. Después de una incubación de 18 h, se midió la inducción de la apoptosis en células B, medida a través de la unión de anexina V y análisis Facs.

45 Estos experimentos demuestran que es posible inducir células T CD4<sup>+</sup> a partir de células T de memoria específicas para proteínas de vector viral usando epítipos de células T de vector viral modificados para comprender una secuencia consenso tiorreductasa (motivo de óxido-reducción) en el que las células T CD4<sup>+</sup> inducidas son capaces de generar la apoptosis de las células que presentan bien el epítipo de células T del vector viral natural o modificado.

### **EJEMPLO 2. Preinmunización con un epítipo de células T de vector viral que contiene una secuencia consenso tiorreductasa que impide el desarrollo posterior de células T efectoras CD4<sup>+</sup> frente a proteínas de vector viral.**

50 La preinmunización (antes de cualquier contacto con la proteína de vector viral) se realizó con los péptidos de SEC ID N°: 13 (véase el Ejemplo 1) para impedir el desarrollo de células T efectoras CD4<sup>+</sup> dirigidas contra las proteínas del vector adenoviral.

55 Para esta finalidad, se inmunizó a un grupo de ratones C57Bl/6 con 25 µg de péptido de SEC ID N°: 13 en CFA (adyuvante completo de Freund; primera inmunización) o IFA (adyuvante incompleto de Freund; segunda y tercera inmunización). Las inyecciones se realizaron por vía subcutánea a intervalos de dos semanas. Un grupo de ratones de control recibió inmunización con el péptido de SEC ID N°: 12 y un tercer grupo se inmunizó con un péptido falso. Todos los ratones recibieron después una inyección intravenosa que contenía  $10^9$  partículas adenovirales (Ad.RR5, véase el Ejemplo 1). Diez días más tarde, se extrajo el bazo y las células CD4<sup>+</sup> se purificaron mediante separación sobre perlas magnéticas.

65 Se midió la capacidad de las células T CD4<sup>+</sup> para proliferar en presencia del péptido de SEC ID N°: 12 presentado por células B de animales sin tratar. El mismo experimento se repitió con el vector adenoviral completo en lugar de con el péptido de SEC ID N°: 12.

Este experimento indica que la preinmunización con un epítipo de células T de vector viral modificado para contener una secuencia consenso tiorreductasa (motivo de óxido-reducción) es capaz de impedir el desarrollo posterior de células T efectoras CD4+ contra el epítipo de células T natural (no modificado, que no contiene el motivo de óxido-reducción) presentado como péptido o presentado comprendido en una proteína de vector completo.

5 **EJEMPLO 3. Supresión de células efectoras CD4+ preexistentes contra proteínas de vector viral inmunizando con un epítipo de células T modificado para comprender una secuencia consenso tiorreductasa.**

10 El experimento como se describe en el Ejemplo 2 se repitió en un entorno en el que todos los ratones recibieron primero una inyección intravenosa de Ad.RR5 (véase el Ejemplo 1). Diez días después, grupos de ratones se inmunizaron como se ha indicado anteriormente con el péptido de SEC ID N°: 13 (modificado con el epítipo de células T para comprender un motivo de óxido-reducción; véase el Ejemplo 1), con el péptido de SEC ID N°: 12 (epítipo de células T natural, no modificado; véase el Ejemplo 1), o con un péptido falso.

15 Dos semanas después de la última inmunización con los péptidos, se extrajeron los bazos, las células T CD4+ se prepararon como se ha indicado anteriormente y se midió la capacidad de las células T CD4+ para proliferar en presencia de proteínas adenovirales presentadas por células B.

20 Este experimento indica que la inmunización con un epítipo de célula T de vector viral modificado para comprender una secuencia consenso tiorreductasa (motivo de óxido-reducción) puede suprimir una respuesta de célula T efectora CD4+ ya existente debido a una inmunización anterior con proteínas de vector viral.

**EJEMPLO 4. Destrucción de células B esplénicas con una línea de células T específica para HAdV-5.**

25 Se obtuvieron líneas TCL de ratones inmunizados con la secuencia natural 555-563 (SEC ID N°: 14; YVPFHIQVP) de la Proteína 2 Tardía derivada de adenovirus humano 5 (HAdV-5) (TCL ts) o con la misma secuencia pero modificada por la adición de un motivo tiorreductasa (subrayado) separado del primer resto de anclaje al MHC de clase II mediante dos restos de Gly (SEC ID N°: 15; CGPCGGYVPFHIQVP) (TCL cc). Las células B esplénicas se tiñeron con un marcador de membrana fluorescente, se cargaron con el péptido de SEC ID N°: 14 se cocultivaron con cada una de las  
30 dos líneas de células T por separado. La mortalidad celular dentro de la población de células T se analizó después de 20 horas en un citómetro de flujo. La mortalidad se dedujo a partir de gráficos de puntos por exclusión de tamaño (la mortalidad inicial (22 %) se restó de las muestras de ensayo). Los resultados se presentan en la Figura 1 e ilustran que una respuesta inmunitaria contra el adenovirus puede eliminarse usando un péptido de acuerdo con la invención, proporcionando por tanto la validez de esta tecnología como un medio para contrarrestar respuestas inmunitarias  
35 contra vectores virales como se usa en terapia génica y en vacunación génica.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> Life Sciences Research Partners VZW  
Saint-Remy, Jean-Marie
- <120> Eliminación de respuestas inmunitarias contra vectores virales
- 45 <130> T5210-PCT (045)
- <150> EP 08447008.7  
<151> 14-02-2008
- 50 <150> US 61/035.826  
<151> 12-03-2008
- <160> 15
- 55 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>  
<223> secuencia general del péptido de la invención
- 65 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(3)

ES 2 545 885 T3

<223> Xaa en las posiciones 2 y 3 significa cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 5 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa significa la secuencia de cualquier epítipo de célula T

<400> 1

Cys Xaa Xaa Cys Gly Xaa  
 1 5

10

<210> 2  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia general del péptido de la invención

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(3)  
 <223> Xaa en las posiciones 2 y 3 significa cualquier aminoácido

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa significa una secuencia de cualquier epítipo de célula T

30 <400> 2

Cys Xaa Xaa Cys Gly Gly Xaa  
 1 5

35 <210> 3  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia general del péptido de la invención

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(3)  
 45 <223> Xaa en las posiciones 2 y 3 significa cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 50 <223> Xaa significa una secuencia de cualquier epítipo de célula T

<400> 3

Cys Xaa Xaa Cys Ser Ser Ser Xaa  
 1 5

55 <210> 4  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> secuencia general del péptido de la invención

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 5 <222> (2)..(3)  
 <223> Xaa en las posiciones 2 y 3 significa cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa significa una secuencia de cualquier epítipo de célula T

<400> 4

Cys Xaa Xaa Cys Ser Gly Ser Gly Xaa  
 1 5

15

<210> 5  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> repetición del motivo tiorreductasa

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> Xaa en las posiciones 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, y 13 significa cualquier aminoácido

30 <400> 5

Cys Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa Xaa Cys  
 1 5 10

35 <210> 6  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> repetición del motivo tiorreductasa

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(12)  
 45 <223> Xaa en las posiciones 2, 3, 6, 7, 10, y 11 significa cualquier aminoácido

<400> 6

Cys Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa Cys  
 1 5 10

50 <210> 7  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> repetición del motivo tiorreductasa

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(10)

ES 2 545 885 T3

<223> Xaa en las posiciones 2, 3, 5, 6, 8, y 9 significa cualquier aminoácido

<400> 7

Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys  
1 5 10

5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> repetición del motivo tiorreductasa

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(10)

<223> Xaa en las posiciones 2, 5, y 8 significa cualquier aminoácido

20

<400> 8

Cys Xaa Cys Cys Xaa Cys Cys Xaa Cys Cys  
1 5 10

25

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> señal de direccionamiento endosómico tardío

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

35

<223> Xaa significa aspartato (D o Asp) o glutamato (E o Glu)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(4)

40

<223> Xaa en las posiciones 2, 3 y 4 significa cualquier aminoácido

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

45

<223> Xaa significa leucina (L o Leu) o isoleucina (I o Ile)

<400> 9

Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa  
1 5

50

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> señal de direccionamiento endosómico tardío

<220>

60

<221> MISC\_FEATURE

ES 2 545 885 T3

<222> (2)..(3)  
 <223> Xaa en las posiciones 2 y 3 significa cualquier aminoácido

5 <400> 10

Asp Xaa Xaa Leu Leu  
 1 5

<210> 11  
 <211> 6  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> señal de direccionamiento endosómico tardío

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE.  
 <222> (2)..(5)  
 20 <223> Xaa en las posiciones 2, 3 y 4 significa cualquier aminoácido

<400> 11

Asp Xaa Xaa Xaa Leu Leu  
 1 5

25 <210> 12  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Epítipo de célula T de la proteína principal de la cápside del adenovirus de serotipo 5

<400> 12

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

35 <210> 13  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Epítipo de célula T modificado de la proteína principal de la cápside del adenovirus de serotipo 5

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(4)  
 <223> motivo tiorreductasa

50 <400> 13

Cys His Gly Cys Pro Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val  
 1 5 10

55 <210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 545 885 T3

<223> aminoácidos 555-563 de la proteína tardía 2 del adenovirus humano 5

<400> 14

5 Tyr Val Pro Phe His Ile Gln Val Pro  
1 5

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de célula T modificado

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(4)

<223> motivo tiorreductasa

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(6)

<223> Conector Gly-Gly

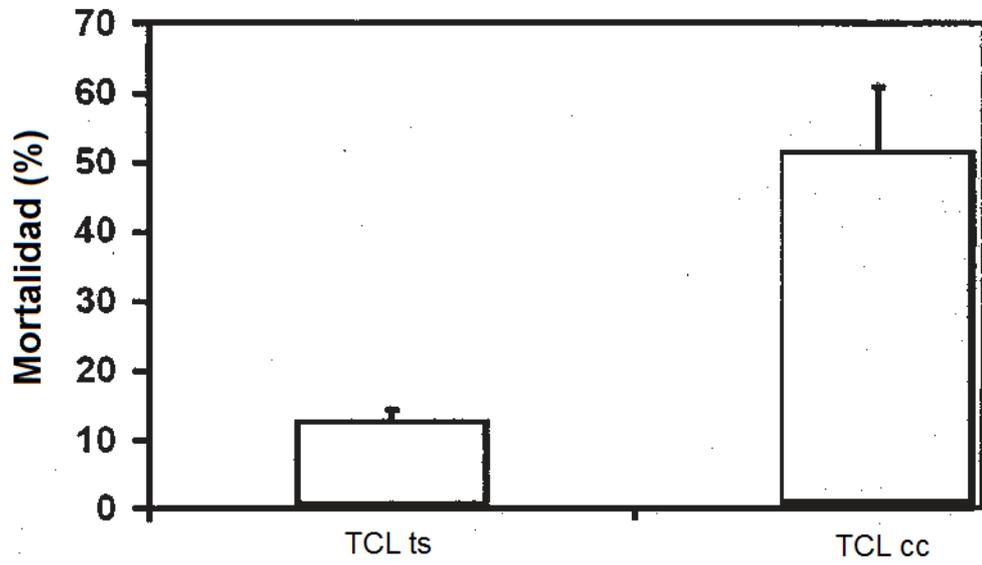
25

<400> 15

Cys Gly Pro Cys Gly Gly Tyr Val Pro Phe His Ile Gln Val Pro  
1 5 10 15

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido inmunogénico aislado que comprende (i) un epítipo de célula T limitado al CMH de clase II de una proteína de un vector viral y (ii) un motivo de óxido-reducción C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, en el que dicho motivo de óxido-reducción está directamente adyacente a dicho epítipo de célula T, o está separado de dicho epítipo de célula T mediante un conector de a lo sumo 7 aminoácidos, para su uso en la prevención o la supresión, en un receptor de terapia génica o de vacunación génica, de una respuesta inmunitaria contra dicha proteína de vector viral.
2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho vector viral es un adenovirus, un virus adenoasociado, un herpesvirus, un poxvirus, un retrovirus o un lentivirus.
3. El péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho motivo de óxido-reducción C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C no se produce de manera natural dentro de una región de 11 aminoácidos en el extremo N- o C-terminal adyacente al epítipo de célula T en dicha proteína de vector viral, o en el que dicho motivo de óxido-reducción C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C está situado en el extremo N del epítipo de célula T.
4. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicho péptido inmunogénico comprende adicionalmente una secuencia de direccionamiento endosómico.
5. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que al menos una X en dicho motivo de óxido-reducción C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C es Gly, Ala, Ser o Thr, o en el que al menos una X en dicho motivo de óxido-reducción C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C es His o Pro, o en el que al menos una C en dicho motivo de óxido-reducción C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C está metilada.
6. Un método *in vitro* para obtener una población de células T CD4+ reguladoras específicas de antígeno de proteína de vector viral que son citotóxicas contra células que presentan un epítipo de célula T limitado al MHC de clase II de dicha proteína de vector viral, comprendiendo el método las etapas de:
- proporcionar células de sangre periférica;
  - poner en contacto dichas células *in vitro* con un péptido inmunogénico que comprende (i) un epítipo de célula T limitado al MHC de clase II de una proteína de vector viral y, directamente adyacente a dicho epítipo de célula T o separado de dicho epítipo de célula T mediante un conector de hasta 7 aminoácidos (ii) un motivo de óxido-reducción C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C; y
  - expandir dichas células en presencia de Interleucina 2 (IL-2).
7. Una población de células T CD4+ reguladoras específicas de antígeno de proteína de vector viral que son citotóxicas contra células que presentan dicho antígeno como un epítipo de célula T limitado al MHC de clase II, que puede obtenerse mediante el método de acuerdo con la reivindicación 6.
8. Una población de células T reguladoras específicas de antígeno de proteína de vector viral que son citotóxicas contra células que presentan dicho antígeno como un epítipo de célula T limitado al MHC de clase II de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso en la prevención o la supresión, en un receptor de terapia génica o vacunación génica, de una respuesta inmunitaria contra dicha proteína de vector viral.
9. Un péptido inmunogénico aislado que comprende un epítipo de célula T limitado al MHC de clase II de una proteína de vector viral y, directamente adyacente a dicho epítipo de célula T o separado de dicho epítipo de células T mediante un conector de hasta 7 aminoácidos, un motivo de óxido-reducción C-(X)2-[CST] o [CST] (X)2-C.
10. Un vector viral aislado **caracterizado por que** comprende al menos una proteína de vector viral que comprende un epítipo de célula T limitado al MHC de clase II y, directamente adyacente a dicho epítipo de célula T o separado de dicho epítipo de célula T mediante un conector de al menos 7 aminoácidos, un motivo de óxido-reducción C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C.



Péptido:	YVPFHIQVP	CGPCGGYVPFHIQVP
	[SEC ID N°:14]	[SEC ID N°:15]

Figura 1