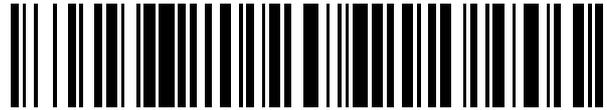


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 886**

51 Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2009 E 09711135 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2244733**

54 Título: **Inmunoterapia dirigida a patógenos intracelulares**

30 Prioridad:

14.02.2008 EP 08447009
12.03.2008 US 35890 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 2 545 886 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

Inmunoterapia dirigida a patógenos intracelulares

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a péptidos inmunogénicos y a su uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones con patógenos intracelulares.

10 **Antecedentes de la invención**

Numerosas enfermedades infecciosas se deben a microorganismos con un ciclo de vida esencialmente intracelular. Son ejemplos las enfermedades virales tales como la gripe, infecciones por *Mycobacterium* tales como la tuberculosis, infecciones bacterianas tales como *Mycoplasma* y enfermedades parasitarias tales como la *Leishmania* y la malaria. Los procedimientos de vacunación actuales destinados a patógenos intracelulares, cuando están disponibles, generan principalmente células T CD4+ que son eficaces ayudando a las células B a producir anticuerpos específicos, pero no producen, o producen muy poca, actividad citolítica. Por lo tanto, la eficacia de la vacuna se mantiene limitada.

Debido a su localización intracelular, estos microorganismos solo se ven afectados marginalmente por la inmunidad humoral y anticuerpos específicos. Una defensa eficaz frente a las infecciones intracelulares depende de la generación de la inmunidad celular, es decir, de que las células reconozcan a las células infectadas en virtud de la presentación de los antígenos derivados del microorganismo en el contexto de los antígenos del MHC de clase I y de clase II. Después del reconocimiento, las células inmunocompetentes se activan y destruyen células infectadas usando diversos mecanismos que incluyen la exocitosis de enzimas citolíticas y la inducción de IFN-gamma de la óxido nítrico sintasa (NOS). El IFN-gamma activa la formación de productos intermedios de oxígeno reactivo y de nitrógeno reactivo, e induce la transcripción de la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) con la posterior privación del triptófano. La privación del triptófano puede afectar severamente a la supervivencia intracelular de los patógenos bacterianos tales como *Chlamydiae*. En las infecciones con *Candida*, la morfología fúngica y la sensibilidad a los agentes antifúngicos está profundamente afectada por las concentraciones de triptófano intracelular (Bozza et al. (2005) J. Immunol. 174:2910-2918).

Los productos intermedios de oxígeno reactivo se generan mediante la activación de la NADPH oxidasa producida por productos bacterianos e IFN-gamma o IL-8. Esta activación produce la formación de superóxido (O_2^-), que se convierte en H_2O_2 y anión hidroxilo (OH^-). Tras la activación de la mieloperoxidasa, se forman ácido hipocloroso (HClO) y cloramina. Todos estos productos intermedios tienen fuertes actividades antimicrobianas y tumorocidas.

La óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), cuando se induce por el IFN-gamma o el TNF-alfa genera radicales NO, que pueden convertirse en peroxinitrilo (ONOO-) o en nitrotioles. Los radicales NO ejercen potentes efectos microbicidas. La iNOS está bajo control transcripcional por factores tales como NFk-B y el complejo Jak/STAT. El NO influencia directa o indirectamente el ciclo de vida de los virus, de las bacterias y de los parásitos. De esta manera, por ejemplo, la S-nitrosilación de la cisteína proteasa 3C del virus *Coxsackie* interrumpe el ciclo de vida viral (Saura et al. (1999) *Immunity* 10:21-28). La producción de O_2^- por *Helicobacter pylori* da lugar a peroxinitrilo microbicida por la interacción con el NO del huésped (Nagata et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:14071-14073). A la inversa, la ausencia de enzima participando en la elaboración de productos intermedios reactivos, tal como por el defecto en la mieloperoxidasa, da lugar al desarrollo de infecciones fúngicas crónicas, tales como *Candida albicans* (Nguyen y Katner (1997) *Clin. Infect. Dis.* 24:258-260).

Las rutas anteriores convergen hacia la eliminación de patógenos tanto extracelulares como intracelulares y se desencadenan por el IFN-gamma. Una fuente de IFN-gamma que proporciona altas concentraciones en los sitios de la infección por lo tanto proporciona un posible beneficio en la eliminación de tales patógenos. Una estrategia más óptima para luchar contra los patógenos intracelulares podría ser combinar mecanismos microbicidas intracelulares no específicos con la inmunidad específica adaptativa. Un ejemplo podría ser diseñar un sistema por el que se enviarían altas concentraciones de IFN-gamma de forma precisa en los sitios de la infección, de tal manera que se eviten los efectos secundarios sistémicos de las citocinas pro-inflamatorias.

El documento WO2008/017517 se presentó el 13.08.2017 y se publicó el 14.02.2008. Este documento desvela péptidos que comprenden un epítipo de un célula T de un antígeno (tales como alérgenos y autoantígenos) y un motivo redox, y el uso de estos péptidos como un medicamento, para por ejemplo alergias y enfermedades autoinmunitarias. El documento WO2009/100505 se presentó el 14.02.2008 y se publicó el 20.08.2009 sin reivindicar prioridad. Este documento desvela péptidos que comprenden un epítipo de un célula T de una proteína aloantigénica de un aloinjerto y un motivo redox, y el uso de estos péptidos previniendo el rechazo del trasplante.

Los documentos WO2009/101204, WO2009/101205, WO2009/101206 y WO 2009/101207 se presentan el 16.02.2009 y se publican el 20.08.2009 y reivindican una fecha de prioridad del 14.02.2008. Los tres primeros documentos desvelan péptidos que comprenden un epítipo de una célula T de un antígeno (respectivamente proteínas de vector viral, antígenos asociados a tumores y alofactores solubles) y un motivo redox, y su uso como un medicamento. El documento WO 2009/101207 proporciona métodos para identificar células T citotóxicas específicas

de antígeno.

De La Cruz et al. (1989) J. Inmunol. 142, 3568-3575 y el documento US4886782 desvelan péptidos de antígenos de la malaria que comprenden un epítipo de una célula T y una secuencia de un motivo redox.

- 5 Tindle et al. (1991) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 88, 5887-5891 desvelan péptidos del virus del papiloma humano que comprenden un epítipo de una célula T y un motivo redox. El documento US2003152581 desvela un péptido de fusión con un epítipo de una célula T de la toxina tetánica y un epítipo de una célula B del alérgeno Der p1.

Sumario de la invención

- 10 La presente invención se refiere al uso de péptidos inmunogénicos aislados para prevenir o para tratar un sujeto que padece una infección con un patógeno intracelular y para inducir en dicho sujeto células T reguladoras CD4+ que estimulen los mecanismos microbicidas intracelulares no específicos en las células del sujeto infectadas con el patógeno intracelular.

- 15 La presente invención se refiere en un aspecto a al menos un péptido inmunogénico aislado que comprende (i) un epítipo de una célula T derivado de un antígeno asociado a un patógeno intracelular no viral y (ii) un motivo C-(X)2-[CT] o [CT]-(X)2-C, para prevenir o tratar, en un sujeto, la infección por dicho patógeno intracelular no viral.

- 20 En cualquiera de los usos anteriores dicho antígeno asociado a un patógeno intracelular puede ser un antígeno derivado de bacterias, micobacterias o parásitos con un ciclo de vida intracelular.

- 25 En cualquiera de los usos anteriores, dicho motivo C-(X)2-[CT] o [CT]-(X)2-C en dicho péptido inmunogénico puede estar adyacente a dicho epítipo del célula T, o separado de dicho epítipo del célula T por un conector. En particular, dicho conector consta como mucho de 7 aminoácidos, o como mucho de 4 aminoácidos.

- 30 En particular dicho motivo C-(X)2-[CT] o [CT]-(X)2-C se posiciona en el N terminal en el epítipo del célula T. Además en particular, al menos una X en dicho motivo [CT]-(X)2-[CT] es Gly, Ala, Ser o Thr; adicional o como alternativa al menos una X es His o Pro. En realizaciones particulares al menos una C en dicho motivo C-(X)2-[CT] o [CT]-(X)2-C está metilada.

- 35 En realizaciones específicas los péptidos tienen una longitud de entre 12 y 50, o entre 12 y 30 aminoácidos.

En realizaciones específicas, el motivo redox es CxxC.

- 40 En realizaciones específicas, el epítipo es un epítipo del MHC de clase II.

En realizaciones particulares del péptido inmunogénico para usar en las aplicaciones anteriores, dicho péptido inmunogénico comprende además una secuencia de direccionamiento endosómico.

- 45 Un aspecto adicional de la invención se refiere a métodos para obtener una población de células T citotóxicas específicas de antígeno asociado al patógeno intracelular no viral, comprendiendo dichos métodos las etapas de:

- proporcionar células de sangre periférica;
- poner en contacto dichas células con un péptido inmunogénico que comprende (i) un epítipo de un célula T derivado de un antígeno asociado a un patógeno intracelular y (ii) un motivo [CT]-(X)2-[CT], más particularmente uno C-(X)2-[CT] o [CT]-(X)2-C; y
- expandir dichas células en presencia de IL-2.

- 50 Las poblaciones de células T citotóxicas específicas de antígeno asociado al patógeno intracelular obtenibles por los métodos anteriores también son parte de la invención, así como su uso para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar, en un sujeto, la infección con dicho patógeno intracelular. Estas células tienen la capacidad de inducir la apoptosis en las células presentadoras de antígeno, de producir IFN-gamma y de expresar CTLA-4.

- 55 Un aspecto adicional de la invención se refiere a péptidos inmunogénicos aislados que comprenden un epítipo de un célula T de un antígeno asociado a un patógeno intracelular no viral y, adyacente a dicho epítipo de un célula T o separado de dicho epítipo de un célula T por un conector, un motivo [CT]-(X)2-[CT], más particularmente un motivo C-(X)2-[CT] o [CT]-(X)2-C.

- 60 En realizaciones específicas de estos péptidos el epítipo y la secuencia están separados como mucho por 7, o como mucho por 4 aminoácidos.

En realizaciones específicas, estos péptidos tienen una longitud de entre 12 y 50, más específicamente tienen una longitud de entre 12 y 30 aminoácidos.

- 65 En realizaciones específicas, el motivo en estos péptidos es CxxC.

En realizaciones específicas, el epítipo es un epítipo del MHC de clase II.

LEYENDA DE LA FIGURA

- 5 La **Figura 1** muestra especies reactivas de oxígeno producidas por las células dendríticas después de la administración de células T incubadas con epítipos de células T naturales y modificados. Las barras en esta Figura ilustran el cambio en la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROI) de las células dendríticas incubadas en diferentes condiciones y evaluadas por análisis FACS de oxidación CDFDA (“IFM delta” = IFM = intensidad de fluorescencia media).
- 10
- CD + T (ts-pep): células dendríticas incubadas con células T expandidas con epítipo de célula T natural (tipo silvestre, ts) [SEC ID N°: 1] derivado de adenovirus;
 - CD + T (cc-pep): células dendríticas incubadas con células T expandidas con epítipo de célula T derivado de adenovirus, en las que dicho epítipo de célula T se modifica anclando los aminoácidos CHGC al N-terminal del epítipo [SEC ID N°: 2];
 - 15 - CD (ts-pep) + T (ts-pep): células dendríticas incubadas con epítipo natural de célula T [SEC ID N°: 1] derivado de adenovirus y con células T expandidas con epítipo de célula T natural [SEC ID N°: 1].
 - CD (ts-pep) + T (cc-pep): células dendríticas incubadas con epítipo natural de célula T [SEC ID N°: 1] derivado de adenovirus y con células T expandidas con epítipo de célula T modificado [SEC ID N°: 2], (modificación como en “DC+T (cc-pep)”);
- 20

Véase el Ejemplo 1 para los detalles de los epítipos de células T.

Descripción detallada de la invención

25 Definiciones

El término “**péptido**” cuando se usa en el presente documento se refiere a una molécula que comprende una secuencia de aminoácidos de entre 2 y 200 aminoácidos, conectados por enlaces peptídicos, pero que pueden en una realización particular comprender estructuras no aminoacídicas (como por ejemplo un compuesto de unión orgánico). 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 no de origen natural incorporados por síntesis química de péptidos o por modificación química o enzimática.

35 El término “**epítipo**” cuando se usa en el presente documento se refiere a una o varias partes (que pueden definir un epítipo conformacional) de una proteína o un factor que es/son específicamente reconocidos y unidos por un anticuerpo o una parte del mismo (Fab’, Fab2’, etc.) o un receptor presentado en la superficie celular de una célula B o T, y que es capaz, por dicha unión, de inducir una respuesta inmunitaria.

40 El término “**antígeno**” cuando se usa en el presente documento se refiere a una estructura de una macromolécula que comprende uno o más hapteno o haptenos (que provocan una respuesta inmunitaria solamente cuando se unen a un vehículo) y/o que comprenden uno o más epítipos de células T. Normalmente, dicha macromolécula es una proteína o un péptido (con o sin polisacáridos) o está hecho de una composición proteica y comprende uno o más epítipos; dicha macromolécula puede denominarse como alternativa en el presente documento “**proteína antigénica**” o “**péptido antigénico**”.

La frase “**epítipo de célula T**” o “**epítipo-célula T**” en el contexto de la presente invención se refiere a un epítipo de célula T dominante, subdominante o inferior, es decir, una parte de una proteína o un factor antigénico que se reconoce específicamente y que se une por un receptor en la superficie celular de una célula T. Si un epítipo es dominante, subdominante o menor depende de la reacción inmunitaria provocada frente al epítipo. La dominancia depende de la frecuencia a la que tales epítipos se reconocen por las células T y son capaces de activarlos, entre todos los posibles epítipos de célula T de una proteína. En particular, un epítipo de célula T es un epítipo unido por las moléculas del CMH de clase I o del CMH de clase II.

55 El término “**CMH**” se refiere a “antígeno mayor de histocompatibilidad”. En seres humanos, los genes del CMH se conocen como genes HLA (“antígeno leucocitario humano”). Aunque no hay una convención seguida consistentemente, algunas referencias bibliográficas usan HLA para referirse a las moléculas de proteínas de HLA, y CMH para referirse a los genes que codifican las proteínas de HLA. Como tal los términos “CMH” y “HLA” son equivalentes cuando se usan en el presente documento. El sistema HLA en el hombre tiene su equivalente en el ratón, es decir, el sistema H2. Los genes de HLA más intensamente estudiados son los nueve denominados genes clásicos del CMH: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA y HLA-DRB1. En humanos, el CMH está dividido 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 a la clase II. Las moléculas del CMH de clase I están hechas de una única cadena polimórfica que contiene 3 dominios (alfa 1, 2 y 3), que se asocia con la beta 2 microglobulina en la superficie celular. Las moléculas de clase II están hechas de 2 cadenas polimórficas, conteniendo cada una 2 cadenas (alfa 1 y 2 y beta 1 y 2).

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

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

Por el contrario a los sitios de unión del HLA 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, de esta manera "colgando" de ambos extremos. Los HLA de clase II pueden por lo tanto unir ligandos peptídicos de longitud variable, que varía de 9 a más de 25 restos de aminoácidos. Similar al HLA de clase I, la afinidad de un ligando de clase II se determina por un componente "constante" y uno "variable". La parte constante de nuevo resulta de una red de enlaces de hidrógeno formados entre restos conservados en la hendidura del HLA de clase II y la cadena principal de un péptido de unión. Sin embargo, este patrón de enlaces de hidrógeno no está confinado a los restos N- y C-terminales del péptido sino que se distribuye a lo largo de la cadena entera. Lo último es importante porque restringe la conformación de los péptidos que forman complejos en 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 de la hendidura, de esta manera contando para la selección dependiente de subtipos de los péptidos, o la especificidad. De manera importante, las restricciones en los restos de aminoácidos retenidos dentro de los bolsillos de clase II son en general más "suaves" que las de la clase I. Hay mucha más reactividad cruzada de los péptidos entre diferentes alotipos del HLA de clase II. La secuencia de los +/- 9 aminoácidos de un epítipo de célula T del CMH de clase II que se ajustan a la hendidura de la molécula de CMH II se numeran normalmente de P1 a P9. Los aminoácidos N-terminales adicionales del epítipo se numeran P-1, P-2 y así sucesivamente, los aminoácidos C-terminales del epítipo se numeran P+1, P+2 y así sucesivamente.

La frase "**compuesto orgánico que tiene una actividad reductora**" cuando se usa en el presente documento se refiere a compuestos, más en particular a secuencias de aminoácidos, capaces de reducir enlaces disulfuro en las proteínas. Una frase como alternativa usada para estas secuencias de aminoácidos es "motivo redox".

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

El término "**natural**" cuando se usa en el presente documento se refiere a una secuencia con respecto al hecho de que la secuencia es idéntica a una secuencia de origen natural o es idéntica a parte de tal secuencia de origen natural. Por el contrario a ello el término "**artificial**" se refiere a una secuencia que no se da en la naturaleza. Salvo que se especifique de otra manera, los términos natural y artificial refiriéndose a una secuencia de esta manera se refieren exclusivamente a una secuencia de aminoácidos (o nucleótidos) particular (por ejemplo la secuencia del péptido inmunogénico, una secuencia que comprende dentro del péptido inmunogénico una secuencia de epítipo) 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 cambiar uno o más aminoácidos dentro de la secuencia de origen natural o añadiendo aminoácidos en el N o C terminal a una secuencia de origen natural. Los aminoácidos se denominan en el presente documento con su nombre completo, su abreviación de tres letras o su

abreviación de una letra. Los motivos de las secuencias de aminoácidos se escriben en el presente documento de acuerdo con el formato de Prosite (Hula et al. (2006) Nucleic Acids Res. 34 (número de base de datos D227-D230). El símbolo X se usa para una posición donde se acepta cualquier aminoácido. Las alternativas se indican listando los aminoácidos aceptables para una posición dada, entre corchetes ('[]'). Por ejemplo: [CTS] significa un aminoácido seleccionado de Cys, Ser o Thr. Los aminoácidos que se excluyen como alternativas se indican listándolos entre llaves ('{ }'). Por ejemplo: {AM} significa cualquier aminoácido excepto Ala y Met. Los diferentes elementos en un motivo se separan entre sí por un guion -. La repetición de un elemento idéntico en un motivo puede indicarse colocando detrás de ese 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 X-X-X o X-X-X-X, A(3) corresponde a A-A-A.

El término "**homólogo**" cuando se usa en el presente documento con referencia a los epítomos usados en el contexto de la invención, se refiere a moléculas que tienen al menos un 50 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 % de identidad de la secuencia de aminoácidos con el epítomo de origen natural, de esta manera manteniendo la capacidad del epítomo de unirse a un anticuerpo o a un receptor de la superficie celular de una célula B y/o T. Las realizaciones particulares de los homólogos de un epítomo corresponden al epítomo natural modificado a lo sumo en tres, más particularmente a lo sumo en dos, más particularmente en un aminoácido.

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

La frase "**identidad de secuencia**" de dos secuencias cuando se usa en el presente documento se refiere al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido por el número de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las secuencias, cuando las dos secuencias se alinean. 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 %.

Las frases "**polinucleótido (o ácido nucleico) que codifica un péptido**" y "**péptido que codifica un polinucleótido (o ácido nucleico)**" cuando se usan en el presente documento se refieren a una secuencia de nucleótidos, que, cuando se expresa en un medio apropiado, da como resultado la generación de la secuencia del péptido relevante o un derivado u homólogo del mismo. Tales polinucleótidos o ácidos nucleicos incluyen las secuencias normales que codifican para el péptido, así como los derivados y los 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 el fragmento del mismo es una secuencia que codifica el péptido o un fragmento del mismo originario de un mamífero o que corresponde a un mamífero, más particularmente un fragmento peptídico humano.

40 Descripción detallada

La invención se basa en el descubrimiento inesperado de que la estimulación de los células T CD4+ específicos de patógenos con péptidos que abarcan un epítomo de célula T y una secuencia consenso con actividad tiorreductasa provocan la maduración y la expansión de un nuevo subconjunto de células T CD4+. Tales células tienen la capacidad de inducir la apoptosis en las células presentadoras de antígeno (CPA) solo cuando se activan por interacción afín con los péptidos presentados por el CMH de clase II. Además, las células T CD4+ producen grandes cantidades de IFN-gamma, con la activación de la formación de productos intermedios reactivos de oxígeno y reactivos de nitrógeno en las CPA, así como la activación de laIDO (indolamina-2,3-dioxigenasa). El nuevo subconjunto de CD4+ también se caracteriza por alta expresión en la superficie de CTLA-4, dotado con una capacidad adicional de inducir laIDO.

La invención por lo tanto proporciona compuestos y métodos para producir y usar tales compuestos en el contexto de las infecciones causadas por patógenos intracelulares. La administración local de altas concentraciones de IFN-gamma maximiza los mecanismos microbicidas no específicos mientras que se evitan los efectos secundarios sistémicos. En particular se prevé una metodología por la que los células T CD4+ específicos se vuelvan potentes células citolíticas, mientras que mantienen una especificidad completa para el antígeno derivado del microorganismo. La consecuencia es doble:

(1) inducción de la actividad microbicida intracelular a través de la producción de IFN-gamma y señalización inversa mediada por la interacción entre el CTLA 4 en los células T CD4+ y el B7 en la superficie de la CPA, dando como resultado una inducción de radicales oxidantes y de nitrógeno tóxicos para el microorganismo y la privación del triptófano a través de la inducción de laIDO.

(2) eliminación rápida de las células por la inducción de apoptosis en una etapa temprana después de la infección, abortando de esta manera la infección.

De esta manera, en un aspecto la invención se refiere al uso de al menos un péptido inmunogénico aislado que

comprende (i) un epítipo de un célula T derivado de un antígeno asociado a un patógeno intracelular no viral y (ii) un motivo C-(X)2-[CT] o [CT]-(X)2-C, para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar, en un sujeto, la infección con dicho patógeno intracelular. Por lo tanto, el péptido o péptidos inmunogénicos o el medicamento que los comprende pueden usarse para el tratamiento anterior o profiláctico o la inmunización de un sujeto para evitar/abortar la infección posterior/*de novo* con un patógeno intracelular. De forma análoga, los péptidos inmunogénicos o los medicamentos que los comprenden pueden usarse para tratamiento terapéutico o inmunización de un sujeto infectado con un patógeno intracelular. El tratamiento no debe dar como resultado necesariamente la “esterilización” del sujeto inmunizado, es decir, la erradicación/eliminación completa del patógeno del sujeto. Por lo tanto, se acepta que para algunas enfermedades es deseable evitar el desarrollo de un estado crónico y se acepta que la fase aguda de esa enfermedad lo más probable no se pueda evitar. De forma análoga, en un sujeto ya infectado, el objetivo del tratamiento puede ser conseguir una disminución/bajada sustancial de la carga patogénica en ese sujeto.

Se desvela adicionalmente el uso de al menos un péptido inmunogénico aislado que comprende (i) un epítipo de célula T derivado de un antígeno asociado a un patógeno intracelular y (ii) un motivo C-(X)2-[CT] o [CT]-(X)2-C, para la fabricación de un medicamento para inducir en un sujeto células T reguladores CD4+ que estimulen los mecanismos microbicidas intracelulares no específicos en las células de dicho sujeto infectado con dicho patógeno intracelular.

En los usos anteriores, el péptido o péptidos inmunogénicos o el medicamento que los comprende puede usarse para tratamiento anterior o profiláctico o inmunización de un sujeto para inducir una activación normalmente inesperada en las células T reguladoras CD4+ en el sujeto inmunizado que estimulan mecanismos microbicidas intracelulares no específicos en las células de dicho sujeto que se infectan *de novo*/posteriormente con el patógeno intracelular. De forma análoga, los péptidos inmunogénicos o los medicamentos que los comprenden pueden usarse para el tratamiento terapéutico o la inmunización de un sujeto para inducir una activación normalmente inesperada en las células T reguladoras CD4+ en el sujeto inmunizado que estimulan mecanismos microbicidas intracelulares no específicos en las células de dicho sujeto infectado con el patógeno intracelular. En particular, tales mecanismos microbicidas intracelulares no específicos incluyen la inducción de los productos intermedios reactivos de oxígeno y de nitrógeno, la inducción de la IDO y la privación de los aminoácidos esenciales para la supervivencia del patógeno tales como el triptófano. Además, dichas células T reguladoras CD4+ muestran una transcripción aumentada del IFN-gamma y de granzimas (que contribuyen a sus propiedades citotóxicas microbicidas) y una sobreexpresión del CTLA-4 de la superficie. La producción de IFN-gamma provoca en la célula diana la producción de productos intermedios reactivos de oxígeno y reactivos de nitrógeno. La señalización inversa inducida por el contacto celular entre el CTLA-4 en las células T reguladoras CD4+ y las moléculas B7 en la superficie de las células diana induce, junto con el IFN-gamma, una producción aumentada de la IDO con la posterior degradación de triptófano.

Además, las anteriores células T reguladoras CD4+ adquieren propiedades citotóxicas para la célula que presenta un epítipo de célula T derivado de un antígeno asociado al patógeno intracelular. Las células presentadoras de antígeno pueden ser células convencionales tales como células dendríticas, macrófagos o linfocitos B, pero también células T activadas u otras células que tras la activación expresan determinantes del CMH de clase II.

Es importante darse cuenta de que las cinéticas de inducción de la actividad microbicida intracelular son rápidas y tardan de unos pocos minutos a unas pocas horas. Por el contrario, la inducción de la apoptosis de las células diana tarda de 6 a 24 horas. Estos dos mecanismos de eliminación de patógenos actúan por lo tanto en secuencia más que juntos.

En cualquiera de los usos descritos anteriormente en el presente documento, el sujeto o receptor es un mamífero no humano, en particular un primate no humano.

En cualquiera de los usos anteriores el antígeno asociado al patógeno intracelular puede ser cualquier antígeno derivado de bacterias, micobacterias o parásitos con un ciclo de vida intracelular. Las bacterias y las micobacterias incluyen *Mycobacterium tuberculosis* y otras micobacterias patógenas para seres humanos o animales tales como *Yersiniae*, *Brucellae*, *Chlamydiae*, *Mycoplasmae*, *Rickettsiae*, *Salmonellae* y *Shigellae*. Los parásitos incluyen plasmidios, leishmanias, tripanosomas, *Toxoplasma gondii*, *Listeria* sp., *Histoplasma* sp.

Los células T reguladores CD4+ provocados por los péptidos inmunogénicos de la presente invención pueden suprimir las respuestas inmunitarias incluso para formar complejos de los antígenos asociados al patógeno intracelular. Un requisito mínimo para que se activen tales células es reconocer un péptido aún presentado por los determinantes del CMH de clase II, dando lugar a la apoptosis de la CPA, de esta manera suprimiendo las respuestas de los células T (tanto células T CD4+ como CD8+) a todos los epítopos de células T presentados por la CPA.

Hay situaciones en que más de un antígeno asociado al patógeno intracelular está presente en un sujeto. Bajo tales circunstancias, la misma CPA puede no presentar todos los antígenos asociados al patógeno intracelular relevantes, ya que algunos de tales antígenos pueden tomarse por diferentes CPA posibles. Se anticipa por lo tanto que puede usarse la combinación de dos o más péptidos inmunogénicos para la prevención o el tratamiento de la infección con un patógeno intracelular.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a los métodos y usos como se describe anteriormente en el presente documento en los que dicho uno o más péptidos inmunogénicos se reemplazan por poblaciones de células T reguladores CD4+ cebados con los péptidos inmunogénicos, o por una o más secuencias de nucleótidos que codifican para el péptido inmunogénico (por ejemplo en la forma de ADN desnudo o un vector viral a administrarse a un individuo en lugar del péptido inmunogénico.

En realizaciones particulares, puede usarse una combinación de múltiples péptidos inmunogénicos (o poblaciones de células T), es decir más de 1 (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) en cualquiera de los anteriores.

Estos aspectos de la invención, así como la modificación adicional del péptido inmunogénico se describen con detalle en lo sucesivo.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que un péptido inmunogénico, que comprende un epítipo de célula T derivado de un antígeno asociado a un patógeno intracelular y una secuencia peptídica que tiene actividad reducida es capaz de generar una población de células T reguladores CD4+, que tienen un efecto citotóxico en las células presentadoras de antígeno.

En consecuencia, la invención se refiere a péptidos inmunogénicos, que comprenden al menos un epítipo de célula T de un antígeno asociado a un patógeno intracelular con una posibilidad de activar una reacción inmunitaria, acoplado a un compuesto orgánico que tiene una actividad reducida, tal como un péptido con una secuencia motivo de tiorreductasa. El epítipo de célula T y el compuesto orgánico se separan opcionalmente por un conector (por ejemplo una molécula espaciadora orgánica o una secuencia peptídica). En realizaciones adicionales opcionales el péptido inmunogénico comprende adicionalmente una secuencia de direccionamiento endosómico (por ejemplo secuencia de direccionamiento endosómico tardío) y/o secuencias "flanqueantes" adicionales.

Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden representarse esquemáticamente como ALB o BLA, donde A representa un epítipo de célula T de un antígeno (propio o no propio) con un potencial para generar 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 para su capacidad para reducir un grupo sulfhidrido tal como en el ensayo de solubilidad de la 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 puede acoplarse al lado amino-terminal del epítipo de célula T o en el carboxi-terminal del epítipo de célula T.

Generalmente el compuesto orgánico con actividad reductora es un péptido. Los fragmentos peptídicos con actividad reductora se encuentran en las tiorreductasas que son pequeñas enzimas reductoras de disulfuro que incluyen glutarredoxinas, nucleorredoxinas, tiorredoxinas y otras oxidorreductasas tiorredoxinas. Ejercen actividad reductora para los enlaces disulfuro de las proteínas (tales como enzimas) a través de las cisteínas activas redox dentro de las secuencias consenso de dominio activas conservadas: 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 significa cualquier aminoácido. Tales dominios también se encuentran en proteínas más grandes tales como la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y la fosfolipasa C específica de fosfoinositida.

En consecuencia, en realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos para usar de acuerdo con la presente invención comprenden como motivo redox la secuencia motivo de tiorreductasa C-(X)2-[CT] o [CT]-(X)2-C. En una realización adicional, el motivo C-(X)2-[CT] o [CT]-(X)2-C se posiciona en el N terminal en el epítipo de célula T. Más específicamente, en dicho motivo redox al menos una de las posiciones [CT] está ocupada por una Cys; de esta manera el motivo es C-(X)2-[CT] o bien [CT]-(X)2-C. En la presente solicitud un tetrapéptido tal se denominará "el motivo". En realizaciones más particulares los péptidos contienen la secuencia motivo C-X(2)-C.

Como se explica en detalle más adelante, los péptidos inmunogénicos de la presente invención pueden fabricarse por síntesis química, que permite la incorporación de aminoácidos no naturales. En consecuencia, en el motivo para reducir compuestos de acuerdo con realizaciones particulares de la presente invención, C representa cisteína o bien otros aminoácidos con un grupo tiorredoxina tales como mercaptovalina, homocisteína u otros aminoácidos naturales o no naturales con una función tiorredoxina. Para tener actividad reductora, las cisteínas presentes en el motivo deberían no estar como parte de un puente disulfuro de cisteínas. No obstante, el motivo puede comprender cisteínas modificadas tales como cisteína metilada, que se convierte en cisteína con grupos tiorredoxina libres *in vivo*.

Cada uno de los aminoácidos X en el motivo [C]-(X)2-[CT] o [CT]-(X)2-[C] de las 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, con lo que los dos aminoácidos X son el mismo o bien diferentes. En realizaciones particulares X es un aminoácido con una pequeña cadena lateral tal como Gly, Ala, Ser o 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 [CT]-(X)2-[CT] 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 se ajusta en la hendidura del CMH, el motivo se mantiene

fuera del hendidura de unión del CMH. El motivo se localiza inmediatamente adyacente a la secuencia epitópica con el péptido inmunogénico o bien se separa del epítipo de célula T por un conector. Más particularmente, el conector comprende una secuencia de aminoácidos de 7 aminoácidos o menos. Más particularmente, el conector comprende 1, 2, 3 o 4 aminoácidos. De forma alternativa, un conector puede comprender 6, 8 o 10 aminoácidos. Los aminoácidos típicos usados en los conectores son serina y treonina. Los ejemplos de péptidos con conectores de acuerdo con la presente invención son CXXC-G-epítipo (SEC ID N°: 15), CXXC-GG-epítipo (SEC ID N°: 16), CXX-SSS-epítipo (SEC ID N°: 17), CXXC-SGSG-epítipo (SEC ID N°: 18) y similares.

En esas realizaciones particulares de los péptidos de la invención cuando la secuencia motivo está adyacente a la secuencia epitópica esto se indica como posición de P-4 a P-1 o de P+1 a P+4 en comparación con 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 secuencias de aminoácidos cortas adicionales en el N o C terminal de la secuencia (artificial) que comprende el epítipo de célula T y el compuesto reductor (motivo). Una secuencia de aminoácidos tal se denomina generalmente en el presente documento una "secuencia flanqueante". Una secuencia flanqueante puede posicionarse en el N y/o C terminal del motivo redox y/o del epítipo de célula T en el péptido inmunogénico. Cuando el péptido inmunogénico comprende una secuencia de direccionamiento endosómico, puede estar presente una secuencia flanqueante entre el epítipo y la secuencia de direccionamiento endosómico y/o entre el compuesto reductor (por ejemplo el 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 redox en el péptido inmunogénico se localiza en el N terminal del epítipo.

En realizaciones particulares adicionales, donde el motivo redox presente en el péptido inmunogénico contiene una cisteína, esta cisteína está presente en el motivo en la posición más remota del epítipo, de esta manera el motivo se da como C-X(2)-[T] en el N terminal del epítipo o se da como [T]-X(2)-C en el carboxilo terminal del epítipo.

En ciertas realizaciones de la presente invención, los péptidos inmunogénicos se proporcionan comprendiendo una secuencia epitópica y una secuencia motivo. En realizaciones particulares adicionales, el motivo se da varias veces (1, 2, 3, 4 o incluso más veces) en el péptido, por ejemplo como repeticiones del motivo que pueden espaciarse entre sí por uno o más aminoácidos (por ejemplo CXXC X CXXC X CXXC; SEC ID N°: 19), como repeticiones que están adyacentes entre sí (CXXC CXXC CXXC; SEC ID N°: 20) o como repeticiones que se solapan entre sí CXXCXXCXXC (SEC ID N°: 21) o CXCCXCCXCC (SEC ID N°: 22). De forma alternativa, uno o más motivos se proporcionan tanto en el N como en el C terminal de la secuencia epitópica de célula T. Otras variaciones previstas para los péptidos inmunogénicos de la presente invención incluyen péptidos que contienen repeticiones de una secuencia de un epítipo de célula T o múltiples epítipos de célula T diferentes en los que cada epítipo se precede y/o se sigue 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 observa que las secuencias repetitivas de los péptidos que comprenden un epítipo que por sí mismo comprende el motivo también dará como resultado una secuencia que comprende tanto el 'epítipo' como un 'motivo'. En tales péptidos, el motivo dentro de una secuencia epitópica funciona como un motivo fuera de una segunda secuencia de epítipo. En realizaciones particulares sin embargo, los péptidos inmunogénicos de la presente invención comprenden solamente un epítipo de célula T.

Como se describe anteriormente los péptidos inmunogénicos de acuerdo con la invención comprenden, además de un compuesto/motivo reductor, un epítipo de célula T derivado de un antígeno asociado a un patógeno intracelular no viral. Un epítipo de célula T en una secuencia proteica puede identificarse por ensayos funcionales y/o uno o más ensayos de predicción *in silico*. Los aminoácidos en una secuencia de un epítipo de célula T se numeran de acuerdo con su posición en la hendidura de unión de las proteínas del CMH. En realizaciones particulares, el epítipo de célula T presente en los péptidos de la invención consiste en entre 8 y 25 aminoácidos, todavía más particularmente en entre 8 y 16 aminoácidos, todavía más particularmente consiste en 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos. En una realización más particular, el epítipo de célula T consiste en una secuencia de 9 aminoácidos. En una realización particular adicional, el epítipo de célula T es un epítipo, que se presenta a las células T por las moléculas del CMH de clase II. En realizaciones particulares de la presente invención, la secuencia epitópica de célula T es una secuencia epitópica que se ajusta en la hendidura de una proteína del CMH II, más particularmente un nonapéptido que encaja en la hendidura del CMH II. El epítipo de célula T de los péptidos inmunogénicos de la invención puede corresponder a una secuencia de un epítipo natural de una proteína o bien puede ser una versión modificada de la misma, con la condición de que el epítipo de célula T modificado conserve su capacidad para unirse dentro de la hendidura del CMH, parecido a la secuencia epitópica de célula T natural. El epítipo de célula T modificado puede tener la misma afinidad de unión por la proteína del CMH que el epítipo natural, pero puede tener también una afinidad disminuida. En realizaciones particulares la afinidad de unión del péptido modificado no es menor a 10 veces menos que el péptido original, más particularmente no menor a 5 veces menos. Es un descubrimiento de la presente invención que los péptidos de la presente invención tengan un efecto

estabilizante en los complejos proteicos. En consecuencia, el efecto estabilizante del complejo péptido CMH compensa la afinidad disminuida del epítipo modificado por la molécula del CMH.

5 En realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos de la invención comprenden adicionalmente una secuencia de aminoácidos (u otro compuesto orgánico) que facilitan la toma del péptido en endosomas (tardíos) para procesar y la presentación dentro de los determinantes del CMH de clase II. El direccionamiento endosómico tardío se media por señales presentes en la cola citoplasmática de las proteínas y corresponde con los motivos peptídicos bien identificados tales como el motivo basado en dileucina [DE]XXXL[LI] (SEC ID N°: 23) o DXXLL (SEC ID N°: 24) (por ejemplo DXXXLL; SEC ID N°: 25), el motivo basado en tirosina YXXØ o el denominado motivo de grupo ácido. El símbolo Ø representa restos de aminoácidos con unas cadenas laterales hidrófobas voluminosas tales como Phe, Tyr y Trp. Las secuencias de direccionamiento endosómico tardío permiten el procesamiento y la presentación eficaz del epítipo de célula T derivado de antígeno por las moléculas del CMH de clase II. Tales secuencias de direccionamiento endosómico se incluyen, por ejemplo, dentro de la proteína gp75 (Vijayasradhi et al. (1995) J Cell Biol 130, 807-820), la proteína gamma CD3 humana, el 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 funcionan como señales de clasificación se desvelan en la revisión de Bonifacio y Traub (2003) Annu. Rev. Biochem. 72, 395-447. De manera alternativa, la secuencia puede ser la de un epítipo de célula T subdominante o inferior de una proteína, que facilita la captación en un endosoma tardío sin superar la respuesta del célula T frente al epítipo de célula T derivado de antígeno asociado al patógeno intracelular.

20 Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden generarse acoplando un motivo reductor como se ha descrito anteriormente, en el N o C terminal a un epítipo de célula T de un antígeno asociado a un patógeno intracelular (directamente adyacente al mismo o bien separado por un conector). Además la secuencia epitópica del célula T del péptido inmunogénico y/o del motivo redox puede modificarse y/o una o más secuencias flanqueantes y/o una secuencia diana pueden introducirse (o modificarse), en comparación con la secuencia epitópica de célula T de origen natural. En consecuencia, la secuencia resultante del péptido inmunogénico diferirá en muchos casos de la secuencia del antígeno/proteína de interés asociado al patógeno intracelular. En este caso, los péptidos inmunogénicos de la invención son péptidos con una secuencia artificial, que no es de origen natural.

30 Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden variar sustancialmente en longitud, por ejemplo de aproximadamente 12-13 aminoácidos (un epítipo de célula T de 8-9 aminoácidos y el motivo redox 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 endosómico de 40 aminoácidos, una secuencia flanqueante de aproximadamente 2 aminoácidos, un motivo como se describe en el presente documento de 4 aminoácidos, un conector de 4 aminoácidos y un péptido de epítipo de célula T de 9 aminoácidos. En realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos de la invención consisten en entre 12 aminoácidos y 20 hasta 25, 30, 50, 75, 100 o 200 aminoácidos. En una realización más particular, los péptidos consisten en entre 10 y 20 aminoácidos. Más particularmente, cuando el compuesto reductor es un motivo redox como se describe en el presente documento, la longitud del péptido inmunogénico que comprende el epítipo y el motivo opcionalmente conectado por un conector es de 19 aminoácidos o menos, por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 aminoácidos.

45 Como se ha detallado anteriormente, los péptidos inmunogénicos para usar en el direccionamiento de patógenos intracelulares de acuerdo con la invención comprenden un motivo reductor como se describe en el presente documento unido a una secuencia de un epítipo de célula T. De acuerdo con una realización particular los epítipos de célula T derivan de antígenos asociados a patógenos intracelulares que no comprenden 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 célula T de interés. Más particularmente, la invención abarca generar péptidos inmunogénicos a partir de antígenos asociados a patógenos intracelulares 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 50 11 aminoácidos en el N o C terminal adyacente a la secuencia epitópica. En realizaciones particulares adicionales, la presente invención proporciona péptidos inmunogénicos de antígenos asociados a patógenos intracelulares que no comprenden las secuencias de aminoácidos anteriormente descritas con propiedades redox en su secuencia.

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

65 Otro aspecto de la presente invención se refiere a los métodos para generar péptidos inmunogénicos de la presente invención descritos en el presente documento. Tales métodos incluyen la identificación de epítipos de células T en un antígeno de interés asociado al patógeno intracelular; las vías para la identificación *in vitro* e *in silico* de epítipos de células T se conocen ampliamente en la técnica y algunos aspectos se elaboran después en lo sucesivo. Los

péptidos inmunogénicos generados pueden evaluarse para la capacidad de inducir células T reguladoras CD4+ específicas de antígeno asociado al patógeno intracelular que son citotóxicas para (parte de) las células presentadoras de antígeno de interés asociado al patógeno intracelular.

5 Los péptidos inmunogénicos de acuerdo con la invención se generan partiendo de un epítipo o epítipos de células T del antígeno o antígenos de interés asociado al patógeno intracelular. En particular, el epítipo de célula T usado puede ser un epítipo de célula T dominante. La identificación y la selección de un epítipo de célula T de un antígeno asociado al patógeno intracelular, para usar en el contexto de la presente invención se conoce por un experto en la materia. Por ejemplo, las secuencias peptídicas aisladas de un antígeno asociado al patógeno intracelular se ensayan por, por ejemplo, técnicas de biología de células T, para determinar si las secuencias del péptido provocan una respuesta de células T. Esas secuencias peptídicas que se encontró que provocan una respuesta de las células T se definen como que tienen actividad estimulante de las células T. La actividad estimulante de los células T humanos puede ensayarse adicionalmente cultivando células T obtenidos de un individuo sensibilizado a un antígeno asociado al patógeno intracelular con un péptido/epítipo derivado del antígeno asociado al patógeno intracelular y determinando si la proliferación de los células T se da en respuesta al péptido/epítipo como se mide, por ejemplo, por la toma celular de timidina tritiada. Los índices de estimulación para las respuestas por los células T a los 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 un célula T igual a 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 ensayado. Los epítipos de células T no naturales (modificadas) además pueden ensayarse opcionalmente para su afinidad de unión a las moléculas del CMH de clase II. La unión de los epítipos de células T no naturales (o modificadas) a las moléculas del CMH de clase II puede realizarse de diferentes formas. Por ejemplo, las moléculas de HLA de clase II solubles se obtienen por lisis de células homocigotas para una molécula de clase II dada. 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 afinidad de unión por esa molécula de clase II. Los péptidos a evaluarse para la unión a la clase II se incuban después a diferentes concentraciones y se calcula su capacidad de desplazar el péptido de referencia de su unión a la clase II por la adición de neutravidina. Los métodos pueden encontrarse en por ejemplo Texier et al., (2000) J. Immunology 164, 3177-3184. Los péptidos inmunogénicos de la invención tienen un índice de estimulación de células T medio mayor de o igual a 2,0. Un péptido inmunogénico que tiene un índice de estimulación de células T de más de o igual a 2,0 se considera útil como agente profiláctico o terapéutico. Más particularmente, los péptidos inmunogénicos de acuerdo con la invención tienen un índice de estimulación de células T medio de al menos 2,5, al menos 3,5, al menos 4,0 o incluso al menos 5,0. Además, tales péptidos tendrán 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 para un péptido se determina multiplicando el índice de estimulación por el porcentaje de individuos, en una población de individuos sensibles a un antígeno asociado al patógeno intracelular (por ejemplo, al menos 9 individuos, al menos 16 individuos o al menos 29 o 30, o incluso más), que tienen células T que responden al péptido (de esta manera correspondiendo al SI multiplicado por la naturaleza promiscua del péptido/epítipo). De esta manera, el índice de positividad representa tanto la fuerza de una respuesta de células T a un péptido (I.E.) como la frecuencia de una respuesta de células T a un péptido en una población de individuos sensible a un antígeno asociado al patógeno intracelular. Para determinar los epítipos de células T óptimos por, por ejemplo, técnicas de mapeo refinadas, un péptido que tiene actividad estimulante de los células T y por lo tanto que comprenden al menos un epítipo de célula T como se determina por técnicas de biología de células T se modifica por la adición o la delección de restos de aminoácidos en el N- o bien en el C-terminal del péptido y se ensayan para determinar un cambio en la reactividad de los células T al péptido modificado. Si dos o más péptidos que comparten un área de solapamiento en la secuencia de la proteína nativa se encuentra que tienen actividad estimulante de los células T humanos, como se determina por técnicas de biología de células T, pueden producirse péptidos adicionales que comprenden todo o una parte de tales péptidos y estos péptidos adicionales pueden ensayarse por un procedimiento similar. Siguiendo esta técnica, los péptidos se seleccionan y se producen recombinante o sintéticamente. Los epítipos o péptidos de células T se seleccionan basándose en diversos factores, incluyendo la fuerza de la respuesta de los células T al péptido/epítipo (por ejemplo, índice de estimulación) y la frecuencia de la respuesta de los células T al péptido en una población de individuos.

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

65 Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden producirse por 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 de *Schizosaccharomyces*), células de insecto (por ejemplo de

Spodoptera frugiperda o *Trichoplusia ni*), células vegetales o células de mamíferos (por ejemplo, células CHO, COS). La construcción de los vectores de expresión (incluyendo información adicional tal como secuencias promotoras y de terminación) adecuados por lo tanto requeridos implica técnicas convencionales de ADN recombinante. Los péptidos inmunogénicos producidos recombinantemente de la invención pueden derivarse de una proteína precursora más grande, por ejemplo, a través de rotura enzimática de sitios de corte de enzimas insertados adyacentes a los N- y/o C-terminales del péptido inmunogénico, seguido de purificación adecuada.

En vista de la longitud limitada de los péptidos inmunogénicos de la invención, pueden prepararse por síntesis química de péptidos, en la que los péptidos se preparan acoplando los diferentes aminoácidos entre sí. La síntesis química es particularmente adecuada para la inclusión de por ejemplo D-aminoácidos, aminoácidos con cadenas laterales no de origen natural o aminoácidos naturales con cadenas laterales modificadas tales como cisteína metilada. Los métodos de síntesis química de péptidos están bien descritos y los péptidos pueden pedirse de compañías tales como Applied Biosystems y otras compañías. La síntesis de péptidos puede realizarse como síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) o bien síntesis de péptidos en fase contraria a solución. Los métodos de SPPS mejor conocidos son química en fase sólida t-Boc y Fmoc que se conocen ampliamente por los expertos en la materia. Además, los péptidos pueden unirse entre sí para formar péptidos más largos usando una estrategia de ligación (acoplamiento químico selectivo de dos fragmentos peptídicos sin proteger) como describió originalmente Kent (Schmolzer y Kent (1992) *Int. J. Pept. Protein Res.* 40, 180-193) y revisado por ejemplo en Tam et al. (2001) *Biopolymers* 60, 194-205. Esto proporciona la tremenda posibilidad de conseguir una síntesis de proteínas que está junto al alcance de la SPPS. Muchas proteínas con el tamaño de 100-300 restos se han sintetizado satisfactoriamente por este método. Los péptidos sintéticos han continuado jugando un papel crucial en aumento en los campos de investigación de la bioquímica, la farmacología, la neurobiología, la enzimología y la biología molecular debido a los enormes avances en la SPPS.

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 usar en composiciones terapéuticas. Normalmente esto se optimiza ajustando la secuencia peptídica. Opcionalmente, el péptido puede modificarse después de la síntesis (modificaciones químicas por ejemplo añadir/eliminar grupos funcionales) usando técnicas conocidas en la técnica.

Todavía en un aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos para generar células T citotóxicas específicas de antígeno asociado al patógeno intracelular (Treg o células T reguladoras CD4+) *in vivo* o bien *in vitro* (*ex vivo*). En particular las células T que se proporcionan son citotóxicas frente a cualquier célula que presente un antígeno asociado a un patógeno intracelular y son obtenibles como una población celular. La invención se extiende a (poblaciones de) Treg citotóxicas específicas de antígeno asociado a un patógeno intracelular obtenibles por los métodos descritos en el presente documento.

En realizaciones particulares, se proporcionan métodos que comprenden el aislamiento de células de sangre periférica, la estimulación de la población celular *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 celular estimulada, más particularmente en presencia de IL-2. Los métodos de acuerdo con la invención tienen la ventaja de que se producen números más altos de Tregs y las Tregs que pueden generarse son específicas para el antígeno asociado a un patógeno intracelular (usando un péptido que comprende un epítipo específico de antígeno). De manera alternativa, las células T citotóxicas específicas de antígeno asociado a un patógeno intracelular pueden obtenerse por incubación en presencia de CPA que presentan un péptido inmunogénico específico del patógeno intracelular de acuerdo con la infección después de la transducción o la transfección de las CPA con una construcción genética capaz de dirigir la expresión de tal péptido inmunogénico. Tales CPA pueden de hecho administrarse por sí mismas a un sujeto que necesite desencadenar *in vivo* en dicho sujeto la inducción del subconjunto de células T CD4+ citotóxicas beneficioso que también son capaces de estimular mecanismos microbicidas intracelulares no específicos en las células de dicho sujeto infectado con un patógeno intracelular.

En una realización alternativa, las Treg pueden generarse *in vivo*, es decir por la administración de un péptido inmunogénico proporcionado en el presente documento a un sujeto y la recogida de las Treg generadas *in vivo*.

Las células T reguladoras específicas de antígeno asociado a un patógeno intracelular obtenibles por los métodos anteriores son de interés particular para usar en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar la infección con un antígeno intracelular. Para cualquiera de los usos anteriormente descritos de los péptidos inmunogénicos de la invención, dichos péptidos pueden reemplazarse por dichas Treg específicas de antígeno asociado a un patógeno intracelular. Se prevé el uso de células tanto alogénicas como autogénicas. Cualquier método que comprenda la administración de dichas Treg específicas de antígeno asociado a un patógeno intracelular a un sujeto que lo necesite (es decir, para prevenir o tratar una infección con un patógeno intracelular) también se conoce como terapia celular adoptiva. Las Tregs son cruciales en la inmunorregulación y tienen un gran potencial terapéutico. La eficacia de la inmunoterapia basada en Treg depende de la especificidad del Ag de las células T reguladoras. Además, el uso de Treg específico de Ag opuesto al Treg expandido policlonal reduce el número total de Treg necesarias para la terapia.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los péptidos inmunogénicos de la presente invención y a los métodos para su uso, por ejemplo, para la expresión recombinante o en terapia génica. En particular, dichas secuencias de ácidos nucleicos son capaces de expresar los péptidos inmunogénicos de la invención.

5 Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden ciertamente administrarse a un sujeto que lo necesite usando cualquier método de terapia génica adecuado. En cualquier uso o método de la invención para la prevención y/o el tratamiento de una infección con un patógeno intracelular, puede combinarse la inmunización con un péptido inmunogénico de la invención con la transferencia celular adoptiva de (una población de) Treg específica para dicho péptido inmunogénico y/o con terapia génica. Cuando se combinan, dicha inmunización, la transferencia celular adoptiva y la terapia génica pueden usarse simultánea o secuencialmente en cualquier combinación posible.

En terapia génica, las moléculas de ácido nucleico recombinantes que codifican para los péptidos inmunogénicos pueden usarse como ADN desnudo o en liposomas o en otros sistemas lipídicos para liberarlos a las células diana. Otros métodos para la transferencia directa de ADN plasmídico en las células se conocen bien por los expertos en la materia para usar en terapia génica humana y que implica marcar el ADN en los receptores en las células formando complejos del ADN plasmídico con las proteínas. En su forma más sencilla, la transferencia de genes puede realizarse simplemente inyectando cantidades minoritarias de ADN dentro del núcleo de una célula, a través de un proceso de microinyección. Una vez que los genes recombinantes se introducen en una célula, pueden reconocerse por los mecanismos normales de las células para la transcripción y la traducción y se expresará el producto génico. Otros métodos también se han descrito para introducir ADN en gran número de células. Estos métodos incluyen: transfección, en la que el ADN se precipita con fosfato cálcico y se introduce en las células por pinocitosis; electroporación, en la que las células se exponen a grandes impulsos de tensión para introducir orificios en la membrana; lipofección/fusión liposomal, en la que el ADN se empaqueta en vesículas lipófilas que se fusionan con una célula diana; y bombardeo de partículas usando ADN unido a pequeños proyectiles. Otro método para introducir ADN en las células es acoplar el ADN a proteínas químicamente modificadas. Las proteínas de adenovirus son capaces de desestabilizar los endosomas y potenciar la introducción del ADN en las células. La mezcla de adenovirus en soluciones que contienen complejos de ADN, o la unión del ADN a la polilisina unida covalentemente al adenovirus usando agentes de reticulación de proteínas mejora sustancialmente la captación y la expresión del gen recombinante. Los vectores virales adenoasociados pueden usarse para el envío génico en las células vasculares. Como se usa en el presente documento, "transferencia génica" significa el proceso de introducir una molécula de ácido nucleico extraña dentro de una célula, que se realiza comúnmente para habilitar la expresión de un producto particular codificado por el gen. El dicho producto puede incluir una proteína, un polipéptido, un ADN o ARN anti-sentido o un ARN enzimáticamente activo. La transferencia génica puede realizarse en células cultivadas o por la 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 un tejido específico. Los métodos para conseguir la expresión génica específica de tejido se conocen bien 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 tejido o tejidos u órgano u órganos. Los vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus de la vacuna, adenovirus, virus adenoasociados, virus de ARN o virus del papiloma bovino pueden usarse para liberar 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 celular diana. Pueden usarse métodos bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores virales recombinantes que contengan tales secuencias codificantes. De manera alternativa, en la terapia génica pueden usarse células modificadas por ingeniería genética que contienen una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico de acuerdo con la invención.

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

De acuerdo con la presente invención los medicamentos se prevén entre otros para el tratamiento de una infección con patógenos intracelulares. El medicamento de la invención es normalmente, pero no necesariamente, una formulación (farmacéutica) que comprende como principio activo al menos uno de los péptidos inmunogénicos de la invención, unos (población de) Treg específicos para dicho péptido inmunogénico o un vector de terapia génica capaz de expresar dicho péptido inmunogénico. Aparte del principio o principios activos, tal formulación comprenderá al menos uno de un diluyente), vehículo o adyuvante (farmacéuticamente aceptables). Normalmente, los compuestos farmacéuticamente aceptables (tales como diluyentes, vehículos y adyuvantes) pueden encontrarse en, por ejemplo, un manual de farmacopea (por ejemplo, Farmacopea europea o internacional). El medicamento o la composición farmacéutica de la invención normalmente comprenden una cantidad (profiláctica o terapéuticamente) eficaz del principio o principios activos en el que la eficacia es respecto a la afección o trastorno a prevenir o a 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. Tales administraciones múltiples normalmente se proporcionan secuencialmente y el intervalo de tiempo entre dos administraciones puede variar y se ajustará a la naturaleza del principio activo y a la naturaleza de la afección a prevenir o a tratar. La cantidad de principio activo proporcionada a un sujeto que lo necesite en una administración única puede variar también y dependerá de factores tales como el estado físico del sujeto (por ejemplo, peso, edad), del estado de la afección a prevenir o a tratar y de la experiencia del doctor, médico o enfermera tratante.
- El término “diluyentes” se refiere, por ejemplo, a soluciones salinas fisiológicas. El término “adyuvante” se refiere normalmente a un agente farmacológico o inmunológico que modifica (preferentemente aumenta) el efecto de otros agentes (por ejemplo, fármacos, vacunas) mientras que tiene pocos, si los tuviera, efectos directos cuando se dan por sí mismos. Como un ejemplo de un adyuvante se da el hidróxido de aluminio (alumbre), en el que puede adsorberse un péptido inmunogénico de la invención. Además, muchos otros adyuvantes se conocen en la técnica y pueden usarse con la condición de que faciliten la presentación de péptidos en la presentación del MHC de clase II y la activación de las células T. La frase “vehículo farmacéuticamente aceptable” significa cualquier material o sustancia con la que el principio activo se formula para facilitar su aplicación o su diseminación al lugar a tratar, por ejemplo, disolviendo, dispersando o difundiendo dicha composición y/o facilita su almacenamiento, su transporte o su manipulación sin dañar su eficacia. Se incluyen cualquiera y todos los disolventes, los medios de dispersión, los recubrimientos, los agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo fenol, ácido sórbico, clorobutanol), los agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro sódico) y similares. Pueden incluirse ingredientes adicionales para controlar la duración de la acción del principio activo en la composición. El vehículo 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 esta invención pueden usarse adecuadamente como concentrados, emulsiones, soluciones, granulados, polvos, pulverizadores, aerosoles, suspensiones, pomadas, cremas, comprimidos, gránulos o polvos. Los vehículos farmacéuticamente adecuados para usar en dichas composiciones farmacéuticas y su formulación son bien conocidas por los expertos en la materia y no hay restricción particular para su selección dentro de la presente invención. También pueden incluir aditivos tales como agentes humectantes, agentes de dispersión, aglutinantes, adhesivos, agentes emulsionantes, disolventes, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro sódico) y similares, con la condición de que los mismos sean coherentes con la práctica farmacéutica, es decir, vehículos y aditivos que no crean un daño permanente a los mamíferos. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse de cualquier manera conocida, por ejemplo, mezclando homogéneamente, recubriendo y/o moliendo los principios activos, en un procedimiento de una etapa o multi-etapa, con el material vehículo seleccionado y, cuando sea apropiado, los otros aditivos tales como los agentes tensioactivos. También pueden prepararse por micronización, por ejemplo, en vista de obtenerlos en forma de microesferas que tienen normalmente un diámetro de aproximadamente 1 a 10 μm , a saber para la fabricación de microcápsulas para la liberación controlada o sostenida de los principios activos.
- Los péptidos inmunogénicos, los homólogos o los derivados de los mismos de acuerdo con la invención (y sus sales fisiológicamente aceptables o las composiciones farmacéuticas todas incluidas en la frase “principios activos”) pueden administrarse por cualquier vía apropiada para la afección a prevenir o a tratar y apropiada para los compuestos, aquí las proteínas inmunogénicas a administrarse. Las vías posibles incluyen regional, sistémica, oral (en 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 el estado del receptor o con la afección a prevenir o a tratar.
- Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la materia de la farmacia. Las formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, obleas o comprimidos conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo; como un polvo o gránulos; como solución o una suspensión en un líquido acuoso o en un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también puede presentarse como un bolo, un electuario o una pasta. Un comprimido puede fabricarse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos que se han comprimido pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en una forma libre de fluidez tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con un aglutinante, un lubricante, un diluyente inerte, un conservante, un tensioactivo o un agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto pulverizado humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse o marcarse opcionalmente y pueden formularse de tal manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del principio activo en los mismos.
- Un aspecto adicional de la invención se refiere a péptidos inmunogénicos aislados que comprenden un epítipo de célula T de un antígeno asociado a un patógeno intracelular y, adyacente a dicho epítipo de célula T o separado de dicho epítipo de célula T por un conector, un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C. En realizaciones particulares el antígeno asociado al patógeno intracelular es un antígeno de un virus, más particularmente una proteína de la

cápside.

La presente invención se ilustrará ahora por medio de los siguientes ejemplos, que se proporcionan sin ninguna intención de limitación.

5

Ejemplos

EJEMPLO 1. Las células T reguladoras citotóxicas a los adenovirus provocan una generación aumentada de los productos intermedios reactivos de oxígeno en las células dendríticas que presentan el péptido afín.

10

Se usó el adenovirus de serotipo 5 (Ad. RR5, E1/E3-eliminado) en estos experimentos. De esta manera, se administraron 5 µl de una solución que contiene 2×10^{11} partículas virales/ml por vía intravenosa a ratones C57Bl/6 de 6 semanas de edad. Diez días después, el bazo de tales ratones se recuperó y se purificaron las células T CD4+ por separación magnética.

15

Un epítipo de célula T se identificó dentro de la secuencia de la proteína principal de la cápside, por una combinación de algoritmos. Se seleccionó un epítipo de célula T que abarca los restos de aminoácidos 912-921, con la secuencia: PTLLYVLFEV (SEC ID N°: 1; epítipo natural). Se obtuvo un péptido sintético que codifica esta secuencia epitópica natural. Se sintetizó un segundo péptido que contenía adicionalmente una secuencia consenso de tiorreductasa (o motivo redox) y tiene la secuencia: CHGCPTLLYVLFEV (SEC ID N°: 2; motivo redox subrayado; epítipo modificado).

20

Las células T CD4+ obtenidas de los ratones inmunizados Ad. RR5 se cultivaron en presencia de células adherentes de bazo empobrecido en células T usadas como células presentadoras de antígeno pre-incubadas con el péptido de SEC ID N°: 1 o bien con el péptido de SEC ID N°: 2. Después de dos ciclos de reestimulación, las líneas celulares de células T CD4+ se dejaron descansar durante 10 días. Las líneas celulares expandidas con el péptido de SEC ID N°: 1 se compararon con las líneas celulares expandidas con el péptido de SEC ID N°: 2 en un ensayo en que las células dendríticas de ratones C57Bl/6 vírgenes se usaron para la presentación de antígenos. Después, la generación de productos intermedios reactivos de oxígeno (ROI) por las células dendríticas se evaluó después de 2 h de co-cultivo. Las células dendríticas se prepararon a partir del bazo de ratones C57Bl/6 por clasificación en perlas magnéticas recubiertas con un anticuerpo específico anti-CD11c.

25

30

De esta manera, se incubaron 10^5 células dendríticas durante 1 h con 10 µl de DCFDA, un derivado de la fluoresceína usado como un indicador de la generación de ROI. En un experimento control, no se usó péptido para cargar las células dendríticas, que se incubaron después durante 18 h con 2×10^5 de una línea celular obtenida por expansión con el péptido de SEC ID N°: 1 o de SEC ID N°: 2 para establecer un valor de fondo para la generación de ROI. En experimentos paralelos se cargaron 10^5 células dendríticas con 10 µl de DCFDA durante 1 h junto con 10 µg del péptido de SEC ID N°: 1 (secuencia natural). Estas células dendríticas cargadas se co-cultivaron después durante 2 h a 37 °C con 2×10^5 de una línea celular obtenida por expansión con el péptido de SEC ID N°: 1 o bien de SEC ID N°: 2. Se mostró que la producción de ROI por las células dendríticas se inducía en las células presentadoras de antígeno usando análisis Facs. Los aumentos de fluorescencia generados por la oxidación de DCFDA por los productos intermedios reactivos de oxígeno se leen en un Facs cerrado en células CD11c(+).

35

40

La Figura 1 muestra que las células dendríticas cargadas con el péptido de SEC ID N°: 1 producían significativamente más ROI cuando se co-cultivaban con una línea celular T expandida con el péptido de SEC ID N°: 2. Estos experimentos mostraron que, en comparación con los epítipos de células T derivados de patógenos intracelulares naturales, tales epítipos modificados por la unión de un motivo de tiorreductasa desencadenan una generación aumentada de los productos intermedios reactivos de oxígeno en las células que presentan el epítipo de célula T natural.

45

50

EJEMPLO 2. *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis es responsable de cientos de muertes cada año. La única vacunación disponible, la vacuna basada en *Mycobacterium bovis* de Calmette-Guérin (BCG), no es eficaz. Además, muchas cepas de *Mycobacterium* muestran resistencia a la quimioterapia convencional. Se sabe que se dan células CD4+ específicas de antígeno en la tuberculosis (Winslow et al. (2003) J. Immunol. 170:2046-2052), que pueden ser protectores (Khader et al. (2007) Nature Immunol. 8:369-377).

55

El antígeno secretor temprano (AST) producido por *M. tuberculosis* es uno de los principales antígenos reconocidos tanto por seres humanos como por animales tales como ratones. Un epítipo de célula T dominante, denominado ESAT-6, que corresponde a la secuencia de aminoácidos 1-20, se ha mapeado y se ha mostrado que es promiscuo, ya que activa los células T CD4+ en las cepas principales de ratones y en seres humanos. Se ha identificado un epítipo de célula T (natural) que contiene los aminoácidos 3-17, con la secuencia: FAGIEAAAS (SEC ID N°: 3). La adición de una secuencia consenso CGHC con actividad tiorreductasa (acortado: motivo redox) en el extremo amino terminal del péptido genera un epítipo de célula T modificado con la secuencia: CGHCFAGIEAAAS (SEC ID N°: 4, motivo subrayado).

60

65

Los ratones C57Bl/6 se inmunizan con el péptido de SEC ID N°: 3 junto con un adyuvante tal como el alumbré. Se realizan tres inyecciones de 50 µg del péptido en intervalos de quincenas. Dos semanas después de la última inmunización, los ratones se sacrifican y las células T CD4+ se preparan a partir del bazo por una combinación de centrifugación en gradiente de densidad y selección en perlas magnéticas recubiertas de anticuerpos. Las células T CD4+ se activan después y se expanden *in vitro* usando células presentadoras de antígeno cargadas con el péptido de SEC ID N°: 4 y se clonan por dilución limitante.

Se muestra que la producción de productos intermedios reactivos de oxígeno y reactivos de nitrógeno se induce en las células presentadoras de antígeno usando análisis Facs y RT-PCR, respectivamente, de la siguiente manera. Las células dendríticas se preparan a partir del bazo de ratones C57Bl/6 por clasificación en perlas magnéticas recubiertas con un anticuerpo específico anti-CD11c. Las células dendríticas se pre-incuban durante 1 h tanto con DCFDA 10 µM, un derivado de la fluoresceína usado como un indicador de la generación de intermedios reactivos de oxígeno, como con 10 µg del péptido de SEC ID N°: 3. Después de esto, se co-cultivan 10⁵ células dendríticas con 2x10⁵ células T CD4+ durante 2 h a 37 °C. El aumento de fluorescencia generado por la oxidación de DCFDA por los productos intermedios reactivos de oxígeno se lee en un Facs cerrado en células CD11c(+). La producción de especies reactivas de nitrógeno se evalúa por la transcripción aumentada de óxido nítrico sintasa inducida. De esta manera, 5x10⁵ células dendríticas preparadas como se indica anteriormente a partir del bazo de ratones C57Bl/6 se co-cultivan durante 6 h con 10⁶ células T CD4+ y el péptido de SEC ID N°: 4. Las células se tratan después con EDTA 2 mM en solución salina con tampón fosfato enfriado para disociar las células T CD4+ de las células dendríticas. Las células dendríticas se purifican después usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos anti-CD11c y se analizan por RT-PCR para detectar presencia de transcritos de óxido nítrico sintasa.

Además, las células dendríticas y las células T CD4+ preparadas como se describe anteriormente se co-cultivan durante 12 h en presencia del péptido de SEC ID N°: 4. Después se añade diacetato de DAF-FM 5 µM (diacetato de amino-metilamino difluoresceína) durante 30 minutos seguido de lavado de las células. Las células se analizan después por citometría de flujo cerrada en las células CD11c(+). La presencia de productos intermedios reactivos de nitrógeno aumenta la fluorescencia generada por el DAF-FM.

Para evaluar las propiedades citolíticas de los clones de las células T CD4+ activadas por el péptido de SEC ID N°: 4, las células dendríticas se cargan con el péptido de SEC ID N°: 3 y se mezclan en una relación 1/1 con las células T CD4+.

Después de un periodo de incubación de 18 h, las células dendríticas se analizan por citometría de flujo para la expresión de marcadores de apoptosis. De esta manera, se detecta la anexina V unida a la superficie de las células apoptóticas por la adición de una anexina V marcada con fluorescencia.

EJEMPLO 3. *Plasmodium falciparum*

El *Plasmodium falciparum* es un parásito responsable de la malaria. La enfermedad se desarrolla después de una picadura de mosquito. Los mosquitos infectados inyectan los esporozoitos de *Plasmodium* en la corriente sanguínea, que se toman por los hepatocitos en los que se transforman en la forma de merozoito. Tras la lisis de los hepatocitos los merozoitos se toman por los eritrocitos, que da como resultado una hemólisis masiva.

No hay una vacuna satisfactoria disponible y la malaria es responsable de ± 1 millón de muertes al año, a pesar del uso de los productos químicos a los que el parásito normalmente se vuelve resistente, tales como nivaquina.

Hay dos etapas en las que podría preverse la vacunación (De Groot et al. (1989) J. Immunol. 142:4000-4005; Reece et al. (2004) Nature Med. 10:406-410). La prevención podría obtenerse mejor si la forma de esporozoito del parásito se previniera de invadir los hepatocitos. La atenuación de la enfermedad en curso se conseguiría haciendo diana la forma de merozoito para prevenir la entrada a los eritrocitos. Los esfuerzos actuales en el desarrollo de vacunas se centran esencialmente en la prevención. De esta manera, se ha considerado un número de antígenos de la forma de esporozoito para el diseño de la vacunación específica (Good et al. (1988) J. Immunol. 140:1645-1650).

El antígeno CSP (proteína del circumsporozoito) es la proteína predominante en la superficie del parásito. Es una proteína que tiene una longitud de 120 restos de aminoácidos con una masa molecular de 58 kDa.

Se han identificado dos regiones que contienen epítomos de célula T promiscuos en el extremo carboxi-terminal de la proteína. El epítomo (natural) Th2R se ha mapeado para los restos de aminoácidos 328-336 y corresponde a DKHIEQYLK (SEC ID N°: 5) que es un epítomo de célula T promiscuo reconocido por muchas cepas de ratón incluyendo ratones H2d y ± el 50 % de los seres humanos. Este epítomo de célula T se modifica por la adición de una secuencia de 4 aminoácidos que llevan un motivo consenso tiorredox del tipo CGHC, que genera un péptido de secuencia: CGHCDKHIEQYLK (SEC ID N°: 6; motivo consenso subrayado; epítomo de célula T modificado).

Un segundo epítomo de célula T (natural), que ofrece mucho menos polimorfismo aunque mantiene la promiscuidad, abarca los restos 380-388 dentro de la misma región del antígeno CSP, la secuencia del cual es:

EKKICKMEK (SEC ID N°: 7). La adición de un motivo consenso del tipo CGHC en el extremo amino-terminal de este epítipo de célula T genera un nuevo péptido de secuencia: CGHCEEKKICKMEK (SEC ID N°: 8; motivo consenso subrayado; epítipo de célula T modificado).

5 En un ajuste experimental similar al descrito anteriormente para *Mycobacterium tuberculosis* (véase el Ejemplo 1), los clones de células T CD4+ generados por la inmunización de BALB/c con el péptido de SEC ID N°: 6 u 8, o ambos, se analizan por su capacidad de inducir la apoptosis de las células presentadoras de antígeno que presentan el péptido natural de SEC ID N°: 5 o 7, o los dos juntos.

10 Los experimentos paralelos demuestran que el contacto entre los células T citolíticas CD4+ y las células dendríticas induce una señalización inversa que da lugar a la expresión deIDO. De esta manera, se co-cultivan 10⁶ células dendríticas pre-cargadas con el péptido de SEC ID N°: 5 o 7 con 2x10⁶ células T CD4+ obtenidos a partir del bazo de ratones inmunizados con el péptido de SEC ID N°: 6 u 8, respectivamente. Después de 8 h de incubación, las células dendríticas se separan de los células T CD4+ por tratamiento con solución salina con tampón fosfato fría que
15 contiene 2 mM de EDTA. Las células dendríticas se separan de las células T CD4+ por clasificación en perlas magnéticas recubiertas con un anticuerpo específico anti-CD11c. Las células dendríticas se analizan después por transferencia Western para detectar la presencia deIDO (indolamina-2,3-dioxigenasa).

20 Para evaluar los papeles respectivos del IFN-gamma y del CTLA-4 en la inducción de laIDO, se realizan experimentos en presencia de 20 µg/ml de un anticuerpo anti-IFN-gamma o bien en presencia de CD80 y CD86 recombinantes solubles (10 ng/ml).

EJEMPLO 4. Virus de la gripe

25 El virus de la gripe, como cualquier otro virus, es un patógeno intracelular obligado. Se sabe bien que afecta a tres millones de personas cada año por razones que se relacionan con su alto grado de contagio y su capacidad de mutar rápidamente, presentando inmunidad adquirida no operativa de un año para otro. El virus lleva una morbilidad y una mortalidad muy significativas. Las estrategias de vacunación actuales hacen uso de las proteínas de superficie tales como la hemaglutinina y la neuraminidasa, que inducen altos títulos de anticuerpos específicos pero son
30 bastante ineficaces produciendo células T citolíticas que eliminarían las células infectadas.

El antígeno de la hemaglutinina lleva un número de epítopos de células T que se presentan en el contexto de los determinantes del MHC de clase II y activan células T efectoras, que proporcionan ayuda para la producción de anticuerpos específicos.

35 De esta manera el péptido KYVKQNTLK (SEC ID N°: 9) abarca un epítipo (natural) de célula T CD4+ reconocido tanto por cepas de ratón como por seres humanos. Este epítipo de célula T se modifica por la adición de una secuencia de 4 aminoácidos que llevan un motivo consenso tiorredox del tipo CGHC, que genera un péptido de secuencia: CGHCKYVKQNTLK (SEC ID N°: 10; motivo consenso subrayado, epítipo de célula T modificada).

40 La administración del péptido de SEC ID N°: 10 en la forma de una vacuna junto con un adyuvante tal como el alumbre se evalúa para su capacidad de expandir las células T CD4+ que han adquirido propiedades citolíticas para las células infectadas por el virus de la gripe. Se analiza el efecto de los clones de células T CD4+ obtenidos por inmunización de ratones con el péptido de la SEC ID N°: 10 en la inducción de la apoptosis de las células presentadoras de antígeno que presenta el péptido procesado de forma natural que corresponde a la SEC ID N°: 9.
45

Se usan métodos similares a los descritos anteriormente para *Mycobacterium tuberculosis* o para *Plasmodium falciparum* (Ejemplos 1-2) para analizar la inducción de la apoptosis de las células dendríticas cargadas con el péptido de SEC ID N°: 9.

50

EJEMPLO 5. Leishmaniosis

Las infecciones por *Leishmania* son frecuentes y pueden adoptar diferentes formas, desde la forma cutánea benigna que se cura espontáneamente hasta formas viscerales tales como el kala azar. La enfermedad la causan
55 flebotomos, que inyectan la forma de promastigoto bajo la piel. Éste se toma por los macrófagos, en los que se multiplican en amastigotos, que pueden dispersarse por todo el cuerpo si no se desarrolla una inmunidad eficaz. La respuesta inmunitaria incluye la formación de anticuerpos, pero éstos no son protectores. La inmunidad eficaz depende de las respuestas celulares fuertes (Pingel et al. (1999) J. Exp. Med. 189:1111-1120; Gumy et al. (2004) Int. J. Parasitol. 34:433-444).

60 Los experimentos animales han ilustrado claramente la dependencia de la eliminación del patógeno en la respuesta celular, al menos para *Leishmania major*. De esta manera, los ratones C57Bl/6 (H2b) desarrollan una fuerte respuesta Th1 y son resistentes a la enfermedad, mientras que los ratones BALB/c (H2d) desarrollan una respuesta Th2 y son susceptibles a la enfermedad. El antígeno LACK (quinasa c activada por *Leishmania*) de *Leishmania major* es central dirigiendo la respuesta inmunitaria. De esta manera, LACK posee 2 epítopos de célula T principales,
65 que aparentemente provocan una respuesta inmunitaria celular Th1 (en la cepa C57Bl) o bien una respuesta Th2

(en la cepa BALB/c)

- De esta manera, la inmunización de los ratones BALB/c con un epítipo de célula T (natural) que abarca los restos de aminoácidos de LACK 163-171, es decir, un péptido con la secuencia EHPIVVS_{GS} (SEC ID N°: 11), da como resultado la expansión clonotípica de células Th2 CD4+, produciendo IL-4, IL-13 e IL-5 junto con anticuerpos específicos y no respuesta celular Th1. La modificación del péptido de SEC ID N°: 11 por la adición de una secuencia consenso tiorreodox de 4 aminoácidos del tipo CGHC da como resultado un nuevo péptido de secuencia: CGHCEHPIVVS_{GS} (SEC ID N°: 12; secuencia consenso subrayada; epítipo de célula T modificado).
- La administración de tal péptido en la forma de una vacuna junto con un adyuvante tal como el alumbre se evalúa para su capacidad de expandir células T CD4+ que han adquirido propiedades citolíticas para las células infectadas por *Leishmania major*. De esta manera, Los ratones BALB/c se inmunizan con el péptido de SEC ID N°: 12 usando un protocolo similar al descrito anteriormente para *Mycobacterium tuberculosis* o *Plasmodium falciparum* (Ejemplos 1-2). Se analiza el efecto de los clones de células T CD4+ provocados por la inmunización de ratones con el péptido de SEC ID N°: 12 en la inducción de la apoptosis de las células presentadoras de antígeno que presentan el péptido procesado de manera natural que corresponde a la SEC ID N°: 11.

EJEMPLO 6. Virus de la inmunodeficiencia

- La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se sigue por la rápida activación de las células T CD4+ seguido de la reducción progresiva de tales células. Durante esta etapa activa, las células T CD4+ sobreexpresan marcadores de activación de superficie tales como determinantes del MHC de clase II. Los péptidos derivados de los virus se procesan y se presentan en los determinantes del MHC de clase II.
- La subunidad gp120 de la proteína Env del VIH contiene epítopos que se presentan en los determinantes del MHC de clase II (Harari et al. (2008) J. Exp. Med. 205:63-77). De esta manera, se construye un epítipo (natural) de célula T que corresponde a los aminoácidos 437 a 445 de la subunidad gp 120 y tiene la secuencia: RAMYAPPIA (SEC ID N°: 13). Modificar el epítipo de célula T de SEC ID N°: 11 por la adición de una secuencia consenso tiorreodox de 4 aminoácidos del tipo CGHC da como resultado un nuevo péptido de secuencia: CGHCRAMYAPPIA (SEC ID N°: 14; secuencia consenso subrayada; epítipo de célula T modificado).
- Para establecer la profundidad del concepto de que los células T que presentan un antígeno por los determinantes del MHC de clase II de la superficie pueden eliminarse por los células T citolíticas de la presente invención, los ratones C57Bl/6 se inmunizan con el péptido de SEC ID N°: 14 por 3 inyecciones de 25 µg de péptido emulsionado CFA/IFA producidas en la huella plantar a intervalos de quincenas. Las células T CD4+ de tales ratones se preparan después como se describe anteriormente por una combinación de centrifugación en gradiente de densidad y adsorción de perlas magnéticas. Las células T CD4+ se expanden después en cultivo en presencia de CPA, el péptido de SEC ID N°: 14 e IL-2.
- En experimentos paralelos, las células T CD4+ del bazo de ratones C57Bl/6 vírgenes se preparan y se transducen con una construcción de lentivirus que contiene la secuencia que corresponde a un péptido de SEC ID N°: 13 junto con una secuencia de direccionamiento endosómico tardío. Esos métodos se conocen en la técnica (véase Janssens et al. (2003) Human Gene Therapy 14:263-276). Las células T transducidas se co-cultivan después con células T CD4+ obtenidas de animales inmunizados con un péptido de SEC ID N°: 14. Se analiza el efecto de las células T CD4+ en la inducción de la apoptosis de las células T transducidas.

- Como los roedores, y el ratón en particular, no son permisivos al VIH, se usan ratones humanizados. De esta manera, se humanizan ratones NOD-SCID (diabéticos no obesos, inmunodeficiencia combinada severa) por reconstitución con células madre hematopoyéticas humanas que producen todas las líneas linfoides humanas, hígado fetal autólogo y timo. Tales ratones se han descrito con el nombre ratones humanizados BLT (médula ósea/hígado/timo) (Melkus et al. (2006) Nature Medicine 12:1316-1322). Los ratones BLC por lo tanto muestran células T funcionales de MHC restringido y se sabe que son susceptibles a la infección con VIH (Sun et al. (2007) J. Exp. Med. 204:705-714).
- Los ratones BLT se inmunizan primero con el péptido de SEC ID N°: 14 por 3 inyecciones en la almohadilla plantar de 25 µg de péptido emulsionado en CFA/IFA. La administración intrarrectal de una única dosis de VIH-1 libre de células se sabe que da como resultado una pérdida progresiva de las células T CD4+. Se analiza el efecto de la inmunización con un péptido de SEC ID N°: 14 ocho semanas después de la inoculación del VIH-1 en el número de células T CD4+ en la sangre periférica.

60

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Life Sciences Research Partners VZW Saint-Remy, Jean-Marie
- 5 <120> Inmunoterapia dirigida a patógenos intracelulares
- <130> T5214-PCT (046)
- 10 <150> EP 08447009.5
<151> 14-02-2008
- <150> US 61/035,890
<151> 12-03-2008
- 15 <160> 25
- <170> PatentIn versión 3.3
- 20 <210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> aminoácidos 912-921 de la proteína de la cápside del serotipo 5 de adenovirus
- <400> 1
- Pro Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val
1 5 10
- 30 <210> 2
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> epítipo de célula T modificado de la proteína de la cápside del serotipo 5 de adenovirus
- 40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(4)
<223> motivo tiorreductasa
- <400> 2
- 45 Cys His Gly Cys Pro Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val
1 5 10
- 50 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>
<223> epítipo de célula T ESAT6 de *Mycobacterium tuberculosis*
- <400> 3
- Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser
1 5
- 60 <210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

ES 2 545 886 T3

<220>
<223> epítipo de célula T ESAT6 modificado

5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(4)
<223> motivo tiorreductasa

10 <400> 4

Cys Gly His Cys Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser
1 5 10

15 <210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> epítipo de célula T Th2R *Plasmodium falciparum*

<400> 5

Asp Lys His Ile Glu Gln Tyr Leu Lys
1 5

25 <210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> epítipo de célula T Th2R modificado

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(4)
<223> motivo tiorreductasa

40 <400> 6

Cys Gly His Cys Asp Lys His Ile Glu Gln Tyr Leu Lys
1 5 10

45 <210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> aminoácidos 380-388 del antígeno CSP de *Plasmodium falciparum*

<400> 7

Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys
1 5

55 <210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> epítipo de célula T modificado del antígeno CSP de *Plasmodium falciparum*

ES 2 545 886 T3

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

<400> 22

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

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> señal de direccionamiento endosómico tardía

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

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

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(4)

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

25 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

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

30 <400> 23

Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa
1 5

<210> 24

35 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> señal de direccionamiento endosómico tardío

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(3)

45 <223> Xaa en las posiciones 2 y 3 significa cualquier aminoácido

<400> 24

Asp Xaa Xaa Leu Leu
1 5

50 <210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> señal de direccionamiento endosómico tardío

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(5)

60 <223> Xaa en las posiciones 2, 3 y 4 significa cualquier aminoácido

ES 2 545 886 T3

<400> 25

Asp Xaa Xaa Xaa Leu Leu
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido inmunogénico que comprende (i) un epítipo de célula T derivado de un antígeno asociado a un patógeno intracelular no viral y (ii) un motivo C-(X)₂-[CT] o [CT]-(X)₂-C, en el que dicho motivo está adyacente a dicho epítipo de célula T o está separado de dicho epítipo de célula T por un conector, para su uso en la prevención o en el tratamiento de una infección con dicho patógeno intracelular no viral.
2. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho antígeno asociado al patógeno intracelular no viral es una bacteria, una micobacteria o un parásito.
3. El péptido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho conector consta como mucho de 7 aminoácidos.
4. El péptido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho conector consta como mucho de 4 aminoácidos.
5. El péptido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho péptido tiene una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos.
6. El péptido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho péptido tiene una longitud de entre 12 y 30 aminoácidos.
7. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho péptido inmunogénico comprende adicionalmente una secuencia de direccionamiento endosómico.
8. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho motivo está situado en el extremo N terminal del epítipo de célula T.
9. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que:
 - al menos una X en dicho motivo es Gly, Ala, Ser o Thr, o
 - en el que al menos una X en dicho motivo es His o Pro, o
 - en el que al menos una C en dicho motivo está metilada.
10. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el motivo es C-X(2)-C.
11. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el epítipo es un epítipo de célula T del MHC de clase II.
12. Un método para obtener una población de células T citotóxicas específicas de antígeno asociado a un patógeno intracelular no 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 derivado de un antígeno asociado a un patógeno intracelular no viral y (ii) un motivo C-(X)₂-[CT] o [CT]-(X)₂-C que está adyacente a dicho epítipo de célula T o está separado de dicho epítipo de célula T por un conector; y
 - expandir dichas células en presencia de Interleucina 2 (IL-2).
13. Un método para obtener una población de células T citotóxicas específicas de antígeno asociado a un patógeno intracelular no viral, comprendiendo el método las etapas de:
 - proporcionar un péptido inmunogénico que comprende (i) un epítipo de célula T derivado de un antígeno asociado a un patógeno intracelular no viral y (ii) un motivo C-(X)₂-[CT] o [CT]-(X)₂-C, estando el motivo adyacente a dicho epítipo de célula T o separado de dicho epítipo de célula T por un conector;
 - administrar dicho péptido inmunogénico a un sujeto no humano; y
 - obtener dicha población de células T específicas de antígeno asociado a un patógeno intracelular no viral de dicho sujeto no humano.
14. Una población de células T citotóxicas específicas de antígeno asociado a un patógeno intracelular no viral obtenible por el método de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13, en la que dichas células tienen la capacidad de inducir apoptosis en las células que presentan antígeno (CPA), de producir IFN-gamma y de expresar CTLA-4.
15. Una población de células T citotóxicas específicas de antígeno asociado a un patógeno intracelular no viral de acuerdo con la reivindicación 14, para usar en la prevención o en el tratamiento de una infección con dicho patógeno intracelular no viral.

ES 2 545 886 T3

16. Un péptido inmunogénico aislado que comprende un epítipo de célula T de un antígeno asociado a un patógeno intracelular no viral y, adyacente a dicho epítipo de célula T o separado de dicho epítipo de célula T por un conector, un motivo C-(X)₂-[CT] o [CT]-(X)₂-C.
- 5 17. El péptido de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho conector consiste como mucho en 7 aminoácidos.
18. El péptido de acuerdo con las reivindicaciones 16 o 17, en el que dicho conector consta como mucho de 4 aminoácidos.
- 10 19. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde dicho péptido tiene una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos.
20. El péptido de acuerdo con las reivindicaciones 16 a 19, en donde dicho péptido tiene una longitud de entre 12 y 30 aminoácidos.
- 15 21. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que el motivo es C-(X)₂-C.
22. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en el que el epítipo es un epítipo de célula T del MHC de clase II.
- 20

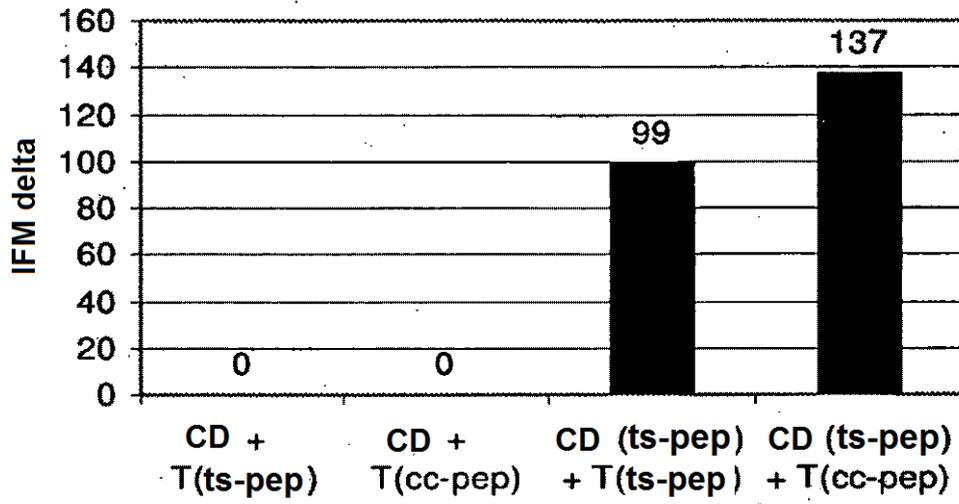


Figura 1