

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 258**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/385** (2006.01)  
**A61K 39/40** (2006.01)  
**C07K 14/33** (2006.01)  
**C07K 16/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2011 PCT/NL2011/050180**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011 WO2011115483**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2011 E 11712343 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2547364**

54 Título: **Péptidos, conjugados y métodos para aumentar la inmunogenicidad de una vacuna**

30 Prioridad:

**26.03.2010 US 317930 P**  
**15.03.2010 EP 10156505**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.06.2017**

73 Titular/es:

**ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN H.O.D.N.**  
**LUMC (50.0%)**  
**Albinusdreef 2**  
**2333 ZA Leiden, NL y**  
**STICHTING VOOR DE TECHNISCHE**  
**WETENSCHAPPEN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**OSSENDORP, FERDINAND, ANTONIUS;**  
**MELIEF, CORNELIS, JOSEPH, MARIA y**  
**DRIJFHOUT, JAN, WOUTER**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 616 258 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

Péptidos, conjugados y métodos para aumentar la inmunogenicidad de una vacuna

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de las vacunas, tales como vacunas contra el cáncer o una enfermedad infecciosa. En particular, la presente invención proporciona un inmunógeno que comprende un péptido derivado de  
10 sujeta que tienen anticuerpos contra toxina del tétanos.

## Antecedentes de la invención

15 Casi todas las vacunas nuevas son menos eficaces que lo que se requiere, particularmente cuando ya se ha establecido la infección en sí misma. Las mejores vacunas se basan en observaciones empíricas. Estas son, por ejemplo, microorganismos muertos o atenuados. En general dichas vacunas comprenden todos los componentes requeridos para la inducción de respuestas inmunitarias eficaces y protectoras. Sin embargo, estas vacunas están habitualmente escasamente definidas. Además, contienen muchos componentes desconocidos, el mecanismo de acción es habitualmente en gran medida desconocido, no pueden producirse de forma reproducible y por lo tanto no  
20 cumplen los criterios para fármacos modernos. Solamente se aplican porque no está disponible nada mejor en la actualidad. En el caso de vacunas contra el cáncer las cosas son aún más complicadas, porque la utilización de material de la naturaleza, es decir de células cancerosas, es inaceptable.

25 Para que las vacunas induzcan una respuesta inmunitaria protectora contra patógenos microbianos se requiere una eficacia suficiente de captación de vacuna por células presentadoras de antígenos (APC) tales como células dendríticas y macrófagos. Las APC tienen que internalizar los antígenos y transportarlos a los ganglios linfáticos de drenaje regionales donde procesan y presentan los péptidos antigénicos en moléculas del MHC de clase I y clase II para la activación de linfocitos T CD8+ y CD4+, respectivamente (Zinkernagel *et al.* (1999) *Immunol Rev* 156: 199-209; Banchereau y Steinman (1998) *Nature* 392: 245-252).

30 Sin embargo, debido a la escasa captación por APC, varias vacunas tienen inmunogenicidad limitada, incluso aunque estén comprendidas por proteínas que son antigénicas en seres humanos. La escasa captación probablemente se deba a que muchas proteínas de vacunación en solución, así como vacunas en partículas, carecen de marcadores que las identifican para internalización y procesamiento por APC, y por lo tanto la captación de dicha vacuna está mediada solamente por endocitosis aleatoria en APC y por lo tanto es mínima (Abdel-Motal *et al.* (2009) *Vaccine* 27: 3072-3082).

35 Se ha mostrado que la inmunogenicidad de vacunas microbianas, tales como toxoide del tétanos, mejora cuando las vacunas se administran como complejo inmunitario con su anticuerpo IgG correspondiente (Raveth y Clynes (1998) *Annu Rev Immunol* 16: 421-432; Schuurhuis *et al.* (2002) *J Immunol* 168:2240-2246; Gosselin *et al.* (1992) *J Immunol* 149: 3477-3481). Sin embargo, una desventaja es que el complejo inmunitario tiene que formarse con un anticuerpo que tiene un dominio Fc que se une eficazmente con el receptor de Fc-gamma en APC, mientras que el dominio Fc de muchos anticuerpos monoclonales tiene escasa interacción con el receptor de Fc-gamma en APC. Una desventaja adicional es que en el complejo pueden enmascararse epítopos peptídicos inmunodominantes, y por  
45 lo tanto dar como resultado escasa inmunogenicidad.

Otra estrategia para mejorar la inmunogenicidad de vacunas se presenta en el documento WO 2008/118487, en el que se desvela un virus de la gripe que porta epítopos de  $\alpha$ -gal (Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4(3)GlcNAc-R) dando como resultado dirección potenciada de los viriones a APC y una respuesta inmunitaria humoral y celular aumentada a la gripe. Sin embargo, la síntesis de epítopos de  $\alpha$ -gal es más difícil en comparación con la síntesis de péptidos regulares y como consecuencia más cara.

50 Volk *et al.* (1984, *Infect. Immun.* 45: 604-609) desvelan un fragmento de toxina del tétanos que comprende la mitad N terminal de la cadena pesada de la toxina que incluye la secuencia GITELKKL que abarca los restos 383 a 390 de la cadena pesada de la toxina como se representa en SEQ ID NO: 3 en el presente documento y anticuerpos de la misma.

55 Raju *et al.* (1996, *J. Autoimmun.* 9: 79-88) desvelan péptidos sintéticos solapantes, cada uno de 20 restos de longitud, usados para determinar el repertorio epitópico de linfocitos T CD4+ humanos. Uno de los péptidos reconocidos por dichas células abarca los restos 371-390 de la cadena pesada de toxina de tétanos, que comprende completamente la secuencia GITELKKL.

60 Demotz *et al.* (1989, *J. Immunol.* 142: 394-402) desvelan anticuerpos monoclonales que se unen con el fragmento B de toxina del tétanos y fragmentos recombinantes 744-1315 y 604-1315 que comprenden la secuencia GITELKKL.

65

Engstrom *et al.* (J. Immunoassays 16: 231-245) desvelan un "péptido 20", que comprende la secuencia GITEL, que reconocen los anticuerpos IgG e IgA humanos.

5 El documento WO 2004/000873 desvela un conjugado que comprende un epítipo del tétanos derivado de la secuencia de cadena pesada del tétanos 830-843 que comprende la secuencia GITE.

Fischer *et al.* (1994, Mol. Immunol. 31: 1141-1148) desvelan el mapeo de epítipos de anticuerpos inducidos en ratones y en conejos para el toxoide del tétanos y que los hexapéptidos de la región que abarca los restos 350-400 de la cadena pesada del toxoide del tétanos muestran alta reactividad para los anticuerpos.

10 Sin embargo, ninguna técnica anterior enseña o sugiere péptidos que comprenden un epítipo lineal de toxina del tétanos contra los que están presentes con frecuencia anticuerpos en circulación en la población humana. La técnica anterior tampoco enseña ni sugiere el uso de estos péptidos para conjugación con un antígeno contra el que se desee una respuesta inmunitaria, para aumentar la eficacia con la que puede inducirse esta respuesta inmunitaria deseada.

15 Por lo tanto, aún existe la necesidad en la técnica de métodos y medios para aumentar la inmunogenicidad de vacunas.

20 Sumario de la invención

Una primera realización de la invención se refiere a un conjugado que comprende un péptido conjugado con un antígeno, inmunógeno o a un vehículo que comprende un antígeno o inmunógeno, en el que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 8, 9, 12, 13, 16, 17, 19-24, 151-158, 163-166, 168, 172-176, 179-182 y 185-197, 198-208 y 210-216, y en el que el antígeno, el inmunógeno o el vehículo que comprende el antígeno o inmunógeno se conjuga con el extremo C terminal del péptido.

25 La segunda realización se refiere a un conjugado de acuerdo con la primera realización, en el que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos proporcionada en una cualquiera de SEQ ID NO: 12, 13, 16, 17 y 19-24.

30 La tercera realización se refiere a un conjugado de acuerdo con realizaciones previas, en el que de 2 a 20 péptidos se unen con el antígeno, inmunógeno o el vehículo que comprende un antígeno o inmunógeno.

35 La cuarta realización se refiere a un conjugado de acuerdo con las realizaciones previas, para su uso como un medicamento. Preferentemente el conjugado es para uso como un medicamento en un sujeto que tiene anticuerpos contra la toxina del tétanos o toxoide del tétanos. Más preferentemente, el medicamento es una vacuna profiláctica o terapéutica.

40 La quinta realización se refiere a un conjugado de acuerdo con una cualquiera de la primera a la cuarta realización, para su uso en la prevención o tratamiento de cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto.

45 La sexta realización se refiere al uso de un conjugado de acuerdo con una cualquiera de la primera a la cuarta realización, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto. Preferentemente el conjugado es para su uso como un medicamento en un sujeto que tiene anticuerpos contra la toxina del tétanos o toxoide del tétanos.

50 En una séptima realización, el conjugado es para su uso como un medicamento en un sujeto al que se ha administrado una vacuna para generar anticuerpos en circulación para toxina del tétanos al menos 2 semanas antes de administrar el conjugado.

En una octava realización, el conjugado o su uso como un medicamento son para dirección a antígeno mediada por anticuerpo.

55 En una novena realización, el conjugado o su uso como un medicamento son para tratamiento de cáncer que comprende además cirugía, quimioterapia y/o radioterapia.

60 En una décima realización, el conjugado o su uso como medicamento son para el tratamiento de un sujeto que tiene anticuerpos contra toxina del tétanos o toxoide del tétanos que se ha inmunizado con toxoide del tétanos, ha tenido profilaxis post-exposición para tétanos y/o ha padecido tétanos.

En una undécima realización, en los conjugados de la invención, el antígeno o inmunógeno comprende un epítipo de linfocitos T. Más preferentemente, el antígeno o inmunógeno comprende un linfocito T citotóxico y/o un epítipo de linfocito T auxiliar.

65 En una duodécima realización, en los conjugados de la invención, el péptido y el antígeno, inmunógeno o el vehículo que comprende un antígeno o inmunógeno se conjugan mediante un enlazador. Preferentemente el enlazador es

ácido amino hexanoico-lisina biotinilada. En otra realización, en los conjugados de la invención, el péptido y el antígeno, inmunógeno o el vehículo que comprende un antígeno o inmunógeno se conjugan sin enlazador. En una realización preferida, en los conjugados de la invención, el péptido y el antígeno, inmunógeno o el vehículo que comprende un antígeno o inmunógeno se conjugan mediante un enlace covalente.

5 En una decimotercera realización, la invención se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 8, 9, 12, 13, 16, 17, 19-24, 151-158, 163-166, 168, 172-176, 179-182 y 185-197, 198-208 y 210-216.

10 En una decimocuarta realización, la invención se refiere a un péptido de la decimotercera realización que consiste en: la secuencia de aminoácidos como se proporciona en una cualquiera de SEQ ID NO: 12, 13, 16, 17 y 19-24.

En una decimoquinta realización, la invención se refiere a un péptido de acuerdo con la decimoquinta realización, en la que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO: 24.

15 Descripción de la invención

Definiciones

20 La expresión "respuesta inmunitaria" como se usa en el presente documento se refiere a la producción de anticuerpos y/o células (tales como linfocitos T) que se dirigen contra, o ayudan en la descomposición o inhibición de un epítipo antigénico particular o epítipos antigénicos particulares. Las expresiones "una respuesta inmunoprotectora eficaz", "inmunoprotección" y expresiones similares, para fines de la presente invención, significan una respuesta inmunitaria que se dirige contra uno o más epítipos antigénicos de un patógeno o contra uno o más epítipos antigénicos de una célula cancerosa para proteger contra infección por el patógeno o contra el cáncer en un sujeto vacunado. Para fines de la presente invención, la protección contra infección por un patógeno o protección contra el cáncer incluye no solamente la prevención absoluta de infección o cáncer, sino también cualquier reducción detectable en el grado o tasa de infección por un patógeno o del cáncer, o cualquier reducción detectable en la gravedad de la enfermedad o cualquier síntoma o afección resultante de infección por el patógeno o cáncer en un sujeto vacunado, por ejemplo en comparación con un sujeto infectado no vacunado. Una respuesta inmunoprotectora eficaz en el caso de cáncer también incluye eliminación de las células cancerosas, reduciendo de este modo el tamaño del cáncer o incluso suprimiendo el cáncer. La vacunación para conseguir esto también se denomina vacunación terapéutica.

35 Puede inducirse una respuesta inmunoprotectora eficaz en sujetos que no se han infectado previamente con el patógeno y/o no están infectados con el patógeno o no padecen aún cáncer en el momento de la vacunación. También puede inducirse una respuesta inmunoprotectora eficaz en un sujeto ya infectado por el patógeno o que ya padece el cáncer en el momento de la vacunación.

40 De acuerdo con la presente invención, el uso general en el presente documento del término "antígeno" se refiere a cualquier molécula que se una específicamente con un anticuerpo. El término también se refiere a cualquier molécula o fragmento molecular que puede unirse con una molécula del MHC y presentarse.

45 El término "antígeno" puede usarse en el presente documento indistintamente con el término "inmunógeno" y se usa en el presente documento para describir una proteína, péptido, composición celular, organismo u otra molécula que induzca una respuesta inmunitaria humoral y/o celular (es decir, es antigénico), de modo que la administración del inmunógeno a un sujeto (por ejemplo, mediante una vacuna de la presente invención) monta una respuesta inmunitaria específica de inmunógeno contra el mismo inmunógeno/antígeno o uno similar que se encuentra dentro de los tejidos del sujeto. Por lo tanto, vacunar a un sujeto contra un antígeno particular significa, en una realización, que se induce una respuesta inmunitaria contra el antígeno o parte inmunogénica del mismo, como resultado de administración del antígeno. La vacunación da como resultado preferentemente un efecto protector o terapéutico, en el que la exposición posterior al antígeno (o a una fuente del antígeno) induce una respuesta inmunitaria contra el antígeno (o fuente) que reduce o previene una enfermedad o afección en el sujeto. El concepto de vacunación se conoce bien en la técnica. La respuesta inmunitaria que se induce por administración de una composición profiláctica o terapéutica de la presente invención puede ser cualquier cambio detectable en cualquier faceta del estado inmunitario (por ejemplo, respuesta celular, respuesta humoral, producción de citocinas), en comparación con en ausencia de la administración de la vacuna.

60 Un "epítipo" se define en el presente documento como un único sitio inmunogénico dentro de un antígeno/inmunógeno dado que es suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto. Los expertos en la materia reconocerán que los epítipos de linfocitos T son de tamaño y composición diferentes de epítipos de linfocitos B, y que los epítipos de linfocitos T presentados a través de la ruta del MHC de Clase I difieren de epítipos presentados a través de la ruta del MHC de Clase II. Los epítipos pueden ser epítipos de secuencia lineal o conformacionales (regiones de unión conservadas) dependiendo del tipo de respuesta inmunitaria. Un antígeno puede ser tan pequeño como un epítipo individual, o mayor, y puede incluir múltiples epítipos. Como tal, el tamaño de un antígeno puede ser tan pequeño como de aproximadamente 5-12 aminoácidos (por ejemplo, un péptido) y tan

grande como; una proteína de longitud completa, incluyendo un multímero y proteínas de fusión, proteínas quiméricas, células completas, microorganismos completos o partes de los mismos (por ejemplo, lisados de células completas o extractos de microorganismos).

5 Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” significa una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de una molécula de inmunoglobulina que tiene la capacidad de unirse específicamente con un antígeno particular. Los anticuerpos se conocen bien por los expertos habituales en la ciencia de la inmunología.

10 El término “inmunogenicidad” de una vacuna se define en el presente documento como la capacidad de inducir y activar linfocitos T (tanto linfocitos T citotóxicos como linfocitos T auxiliares) e inducir producción de anticuerpos en un sujeto.

15 La expresión “dirección a antígeno mediada por anticuerpo” se usa en el presente documento para indicar un sistema de suministro de antígeno que usa dirección a antígeno mediada por anticuerpo (tal como por ejemplo IgG) mediante receptores de Fc que se expresan en la superficie celular de APC, tal como por ejemplo DC y macrófagos. Mediante el uso de anticuerpos específicos de antígeno, pueden formarse complejos de estos anticuerpos con el antígeno proteico *in vitro* pero también *in vivo*. Estos complejos (denominados complejos inmunitarios (CI)) pueden unirse con las APC mediante estos receptores de Fc, posteriormente captarse, y después el antígeno se procesará y se presentará un péptido derivado de los mismos a linfocitos T específicos. Es importante que en la dirección a antígeno mediada por anticuerpo los CI también activen las APC y esto conduce a estimulación óptima de los linfocitos T específicos (Schuurhuis *et al.*, J Immunol. 168, 2240-2246, 2002.). Por lo tanto, en dirección a antígeno mediada por anticuerpo, se usan anticuerpos específicos que circulan en seres humanos para dirigirse selectivamente a antígenos para estimular el sistema inmunitario celular.

25 El término “péptido” como se usa en el presente documento se define como una cadena de restos de aminoácidos, que tienen habitualmente una secuencia definida. Como se usa en el presente documento el término péptido es intercambiable con los términos “polipéptido” y “proteína”. En el contexto de la presente invención, el término “péptido” se define como cualquier péptido o proteína que comprende al menos dos aminoácidos unidos por un enlace peptídico modificado o no modificado. El término “péptido” se refiere a moléculas de cadena corta tales como oligopéptidos u oligómeros o a moléculas de cadena larga tales como proteínas. Un péptido de acuerdo con la presente invención puede comprender aminoácidos modificados. Por lo tanto, el péptido de la presente invención también puede modificarse por procesos naturales tales como modificaciones post-transcripcionales o por un proceso químico. Algunos ejemplos de estas modificaciones son: acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, enlace covalente con flavina, enlace covalente con un hemo, enlace covalente con un nucleótido o un derivado de nucleótido, enlace covalente con un resto de carbohidrato modificado o no modificado, enlace con un lípido o un derivado de lípido, enlace covalente con fosfotidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de moléculas de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, hidroxilación, yodación, metilación, oxidación, fosforilación, racemización, hidroxilación, etc. Por lo tanto, cualquier modificación del péptido que no tenga el efecto de eliminar la inmunogenicidad del péptido está abarcada dentro del alcance de la presente invención.

45 La expresión “identidad de secuencia” se define en el presente documento como una relación entre dos o más secuencias de aminoácidos (péptidos o proteínas) o dos o más secuencias de ácido nucleico (polinucleótidos), como se determina comparando las secuencias. Habitualmente, las identidades o similitudes de secuencia se comparan sobre la longitud completa de las secuencias comparadas. En la técnica “identidad” también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, según sea el caso, como se determina por la coincidencia entre tramos de dichas secuencias. La “similitud” entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de un péptido con la secuencia de un segundo péptido. La “identidad” y “similitud” pueden calcularse fácilmente por diversos métodos, conocidos por los expertos en la materia. En una realización preferida, la identidad de secuencia se determina comparando la longitud completa de las secuencias como se identifica en el presente documento. Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud se codifican en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen por ejemplo el BestFit, BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990), públicamente disponible del NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894). Un algoritmo más preferido usado es EMBOSS (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align>). Son parámetros preferidos para comparación de secuencias de aminoácidos que usan EMBOSS apertura de hueco 10,0, extensión de hueco 0,5, matriz Blosum 62. Son parámetros preferidos para comparación de secuencias de ácido nucleico que usa EMBOSS apertura de hueco 10,0, extensión de hueco 0,5, matriz completa de ADN (matriz de identidad de ADN). Opcionalmente, en la determinación del grado de similitud de aminoácidos, el experto en la materia también puede tener en cuenta las denominadas sustituciones de aminoácidos “conservativas”, como resultará evidente para el experto en la materia. Las sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales

que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas es ácido aspártico y ácido glutámico; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Son sustituciones de aminoácidos preferidas la sustitución de un aminoácido con un aminoácido del mismo grupo de aminoácidos conservativo. Estos grupos de aminoácidos conservativos son: alanina-valina-leucina-isoleucina-metionina; fenilalanina-tirosina-triptófano; lisina-arginina-histidina; asparagina-glutamina; ácido aspártico y ácido glutámico; serina-treonina; glicina-prolina. En este caso particular otro grupo de sustitución de aminoácidos conservativa es lisina-formilisina.

Los términos “tumor” o “cáncer” en un sujeto se refieren a la presencia de células que poseen características tales como crecimiento o morfología atípicos, incluyendo proliferación descontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, velocidad de crecimiento y proliferación rápida y ciertos elementos morfológicos característicos. Con frecuencia, las células cancerosas estarán en forma de un tumor, pero dichas células también pueden existir aisladas entre sí dentro de un sujeto. “Tumor” incluye neoplasias tanto benignas como malignas.

En el contexto de la invención, un “paciente” o “sujeto” puede ser un animal (incluyendo seres humanos). Preferentemente, un paciente o sujeto es un ser humano.

La expresión “elisa Tettox” se usa en el presente documento para indicar un elisa específico para anticuerpos de toxoide del tétanos, que se define adicionalmente en otra parte del presente documento.

#### Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han mostrado previamente que los complejos inmunitarios (CI) preformados son formulaciones de vacuna muy potentes para sensibilización eficaz de respuestas de linfocitos T en ratones (Schuurhuis *et al.*, J Immunol. 168, 2240-2246, 2002). Formando complejo del antígeno proteico ovoalbúmina (OVA) con anticuerpos contra OVA los inventores fueron capaces de dirigir eficazmente el antígeno a células dendríticas (CD), conduciendo simultáneamente a maduración de CD fuerte. Estas CD maduras presentaron de forma cruzada péptidos derivados de OVA a linfocitos T CD8 *in vitro* y fueron altamente eficaces en la sensibilización de linfocitos T CD8+ tras inmunización en ratones. Resulta importante que estas respuestas de linfocitos T fueron capaces de controlar tumores *in vivo*, especialmente eficaces cuando estos CI se precargaron en CD (Schuurhuis *et al.*, J Immunol 176, 4573-4580, 2006). La inmunización con CD cargadas con CI preformados dio como resultado inmunidad tumoral protectora pero también tratamiento terapéutico de ratones portadores de tumores. El control del tumor *in vivo* fue dependiente de la presencia de receptores de Fc activadores en CD y la inducción de linfocitos T CD8+ citotóxicos. Estos hallazgos muestran que la dirección a antígenos mediada por anticuerpos específicos a CD es un modo de inducción altamente eficaz de inmunidad de linfocitos T contra el cáncer.

Los inventores de la presente invención han descubierto ahora sorprendentemente que también pueden usarse anticuerpos en circulación, preexistentes, para sensibilizar eficazmente la proliferación de linfocitos T específicos en ratones. Se indujeron anticuerpos contra el hapteno TNP (un grupo de trinitrofenilo unido a un péptido o proteína) por inmunización con un vehículo de hapteno específico (TNP-BSA). Posteriormente, los ratones inmunizados se expusieron a un antígeno proteico no relacionado acoplado con el mismo hapteno (TNP-OVA). Se descubrió que las respuestas de linfocitos T contra el antígeno proteico no relacionado OVA se indujeron a un nivel mucho mayor en estos ratones en comparación con ratones de control que se habían vacunado con BSA sin TNP. Estos hallazgos proporcionan una prueba de principio de que la inmunogenicidad de una vacunación puede mejorarse haciendo uso de anticuerpos en circulación que ya están presentes en el momento de la vacunación. Debido a las diferencias entre especies entre ratones y seres humanos el objetivo debe ser un grupo diferente de anticuerpos en circulación y por lo tanto los inventores presentan un péptido que puede aplicarse en seres humanos para la mejora de la eficacia e inmunogenicidad de vacunas.

Este enfoque imita tanto como sea posible la respuesta inmunitaria natural usada por el sistema inmunitario del cuerpo para librarse de microorganismos invasores, en particular microorganismos que infestan y dependen de las células del cuerpo tales como virus y bacterias intracelulares tales como por ejemplo bacilos de tuberculosis. El enfoque de vacuna de la presente invención de hecho hace un uso óptimo de las dos ramas principales de la inmunidad específica, concretamente anticuerpos preexistentes en el plasma sanguíneo, e inmunidad mediada por células proporcionada por linfocitos T. La invención utiliza el fragmento Fc de anticuerpos para suministrar antígeno unido en el otro extremo del anticuerpo a las células presentadoras de antígenos. El trabajo previo ha mostrado que este es uno de los modos más eficaces para dirigir el antígeno de inmunización a células presentadoras de antígenos (APC), es decir las células que inician respuestas inmunitarias en el cuerpo, tales como por ejemplo células dendríticas (CD) o macrófagos. Para la presente invención, las CD son las APC más importantes. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, parece que porque los antígenos que inducen la inmunidad mediada por células requerida están unidos físicamente con los aminoácidos definidos que se unen con anticuerpos antimicrobianos preexistentes en el plasma, se producirá una focalización extraordinaria del antígeno de eficacia sin precedentes en APC, por ejemplo CD, mediante unión de los complejos unidos a anticuerpo con los denominados Receptores de Fc en las APC (véase Figura 1). Esto permite no solamente una introducción muy eficaz de los antígenos diana (es

decir, antígenos diana víricas o tumorales) en las APC, sino que también induce activación vigorosa de las APC. Ambos acontecimientos son esenciales para la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células terapéuticas robustas (respuestas de linfocitos T), requeridas para la erradicación de células anómalas, tales como células tumorales o células infectadas por virus. De hecho, en experimentos en ratones con compuestos de unión a anticuerpo, conjugados con péptidos que inducen respuestas de linfocitos T, este enfoque aumentó fuertemente respuestas de linfocitos T, en comparación con respuestas vistas contra componentes no conjugados.

Por razones históricas, apenas se han aplicado farmacodinámica y ciencia de farmacodistribución modernas a las vacunas. Teniendo en cuenta la naturaleza compleja de las vacunas tradicionales, esto no es sorprendente, porque rastrear el destino en el cuerpo humano de cada uno de los productos de degradación de vacunas tradicionales, compuestos en gran medida de organismos atenuados o muertos por calor, constituiría una tarea casi imposible. Dichos argumentos no se aplican, sin embargo, a vacunas de la presente invención. En primer lugar, la naturaleza más de tipo fármaco de una vacuna de acuerdo con la presente invención permite una determinación del destino de la vacuna *in vivo* mucho mejor. En segundo lugar, los estudios farmacodinámicos y de farmacodistribución de la nueva generación de vacunas son extremadamente necesarios para desarrollar su potencial terapéutico de una manera racional. El reto en el diseño y ensayo en las nuevas vacunas es cómo hacerlas más potentes y por lo tanto convertirlas de vacunas puramente preventivas, que se basan en gran medida en la neutralización de anticuerpos, a vacunas terapéuticas que poseen la potencia requerida para inducir respuestas de linfocitos T fuertes y curar infecciones persistentes establecidas y enfermedades provocadas por infecciones, tales como cáncer vírico así como tener influencia curativa en afecciones no infecciosas tales como cáncer no vírico.

#### Péptido

Un péptido de acuerdo con la presente invención, preferentemente es una molécula contra la que ya están disponibles anticuerpos en circulación en el sujeto en el que se desea la respuesta inmunitaria. La toxina del tétanos (TTx), también conocida como tetanoespasmina, toxina espasmogénica, TeTx, TeNT y TTX, es una de las proteínas más tóxicas conocidas. TTx es una neurotoxina producida por la espora vegetativa de *Clostridium tetani* en condiciones anaerobias y provoca el tétanos en seres humanos. Existe como una cadena pesada y una ligera conectadas mediante un enlace disulfuro entre las cisteínas L438 y H10 e interacciones no covalentes. El toxoide del tétanos (TTd) se prepara destoxificando TTx por tratamiento de la proteína con formalina. Este tratamiento da como resultado diversas modificaciones de la proteína (por ejemplo formilación de las cadenas laterales de restos de lisina y la formación de reticulaciones inter e intramoleculares). Aunque TTd es una forma modificada de TTx (y es por lo tanto una proteína diferente) TTd es capaz de inducir inmunidad protectora contra el tétanos, lo que implica que los anticuerpos inducidos por vacunación de TTd reconocen TTx. Los presentes inventores han buscado epítomos lineales de anticuerpos de TTd usando péptidos lineales no modificados de la secuencia de aminoácidos de TTx. La toxina del tétanos tiene 1314 aminoácidos (SEQ ID NO: 1) y se sintetiza por *C. tetani* como una única cadena peptídica que se proteoliza para producir dos fragmentos, la cadena ligera (LC; también conocida como cadena alfa) derivada del extremo amino terminal (SEQ ID NO: 2), y la cadena pesada (HC; también conocida como cadena beta) derivada del extremo carboxilo terminal (SEQ ID NO: 3).

Se usa toxoide del tétanos (TTd) en inmunización, tal como por ejemplo la vacuna de combinación de DTP infantil contra tres enfermedades infecciosas (difteria, pertussis (tosferina), tétanos) o la vacuna de DTP-poliomielitis. Casi todas las personas se han inmunizado con el toxoide del tétanos (TTd) a una edad temprana, ya que se incluye en la vacuna que se usa en el programa de vacunación de niños de muchos países. Además, muchas personas se han expuesto más tarde a TTd, ya que la vacuna antitetánica es un procedimiento común después de lesiones sospechosas de ser causa potencial de una infección tetánica. Como consecuencia, están presentes anticuerpos antitoxina/toxoide del tétanos en una parte significativa de la población humana de países industrializados. Por lo tanto, puede esperarse que la dirección de conjugados que comprenden un epítomo de TTx/TTd, es decir un péptido de acuerdo con la invención, a APC sea eficaz en dichas vacunas, como resultado de formación *in situ* de complejos inmunitarios entre los anticuerpos antitoxina/toxoide del tétanos y conjugados que comprenden un epítomo de TTx/TTd.

En un primer aspecto la presente invención se refiere a un péptido que comprende: (i) al menos 10 restos de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 que comprenden la secuencia de aminoácidos GITELKKL; o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70, 80, 90 o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos como se proporciona en (i) y en la que, cuando se somete a muestras de suero de al menos 10 sujetos humanos que se han vacunado con un toxoide del tétanos está en al menos el 50 % de las muestras de suero unidas con anticuerpos de las muestras de suero, como se determina en un ELISA Tettox; y en la que puede esperarse que las APC sean eficaces en dichas vacunas, como resultado de formación *in situ* de complejos inmunitarios entre los anticuerpos antitoxina/toxoide del tétanos y conjugados que comprenden un epítomo de TTx/TTd.

En un primer aspecto la presente invención se refiere a un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9-11 expuestas en el presente documento. Se desvela un péptido que comprende: (i) al menos 10 restos de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 que comprenden la secuencia de aminoácidos GITELKKL; o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70, 80, 90 o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos como se proporciona en (i) y en la que el péptido, cuando se somete a muestras de suero de al menos

10 sujetos humanos que se han vacunado con un toxoide del tétanos está en al menos el 50 % de las muestras de suero unido con anticuerpos de las muestras de suero, como se determina en un ELISA Tettox; y en la que el péptido no es la cadena beta de toxina del tétanos. Preferentemente, los al menos 10 restos de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en (i) son 10 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 3. Preferentemente, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70, 80, 90 o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos como se proporciona en (i) es una secuencia de aminoácidos de 10 aminoácidos de los que al menos 7, 8, 9 o 10 aminoácidos son idénticos a 10 restos de aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 3 que comprenden la secuencia de aminoácidos GITELKKL.

Preferentemente, un péptido de acuerdo con (ii) anterior, se somete a muestras de suero de al menos 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 150, 250 o más sujetos humanos. Más preferentemente, las muestras de suero son de sujetos humanos que tienen un alto título de anticuerpos anti-TTd, por ejemplo al menos 100 Unidades Internacionales (UI) por ml como se determina usando el ensayo ELISA Tettox como se describe posteriormente en el presente documento. En una realización preferida, los sujetos humanos son sujetos humanos seleccionados aleatoriamente, preferentemente sujetos humanos seleccionados aleatoriamente que tienen un alto título de anticuerpos anti TTd como se ha descrito anteriormente.

Un ELISA Tettox se realiza preferentemente de la siguiente manera:

se recubre una placa de 96 pocillos (preferentemente de Euro-Diagnostica, Arnhem, Países Bajos) con estreptavidina. La placa de 96 pocillos recubierta con estreptavidina se bloquea con PBS que contiene BSA 5 % (200 µl/pocillo, 1 h, temperatura ambiente). Posteriormente, la placa se lava tres veces con PBS que contiene Tween20 0,05 %. Se recubre un péptido biotinilado por incubación de 1 h a temperatura ambiente con 100 µl/pocillo de una solución de 2 µg/ml del péptido biotinilado en PBS que contiene BSA 1 %. La placa se lava tres veces con PBS que contiene Tween20 0,05 % seguido de incubación durante 1 h a temperatura ambiente con 100 µl de suero de un sujeto humano como se ha definido anteriormente (preferentemente que tiene un título alto de anticuerpos anti TTd) que se habían diluido al menos 100, 200, 400, 500 o 1000 veces y preferentemente no más de 100.000, 10.000, 7.500, 5.000 o 2.500 veces con PBS que contiene BSA 1 %. Después la placa se lava tres veces con PBS que contiene Tween20 0,05 %. Cada pocillo se incuba durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo IgG conjugado con HRP (IgG de ratón antihumano-HRP monoclonal, clon G18-145, cat n.º 555788, Becton Dickinson, 100 µl/pocillo de una dilución 1000x en PBS que contiene Tween20 0,05 %) después de lo cual la placa se lava tres veces con PBS que contiene Tween20 0,05 %. Se realiza desarrollo con 2,2'-azino-di-(ácido 3-etilbenzotiazolinsulfónico), ABTS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1/1000, 100 µl/pocillo. La densidad óptica se mide a 415 nm con un lector de microplacas BIO-RAD, modelo 680. En cada placa, se incluye preferentemente un control negativo, más preferentemente al menos por triplicado. Un control negativo preferido es suero de un sujeto humano sin anticuerpos anti TTd detectables. Otro control negativo preferido es una solución de BSA. Preferentemente, un péptido de acuerdo con (ii) anterior se une con anticuerpos en al menos 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % más preferentemente 100 % de las muestras de suero humano ensayadas. Se considera que un péptido está unido con anticuerpos en una muestra de suero si la densidad óptica determinada para esa muestra de suero particular es al menos 2,0, más preferentemente 2,5, 3,0, 3,5 o más veces mayor en comparación con la densidad óptica que se determina para el control negativo.

Como alternativa, el péptido en (ii) puede unirse con anticuerpos presentes en TetaQuin® (Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos). En el ELISA Tettox como se ha descrito anteriormente, en lugar de suero de un sujeto humano, pueden usarse 100 µl de TetaQuin® que se habían diluido 800x con PBS que contenía BSA 1 %, en cuyo caso se considera que el péptido está unido con anticuerpos en TetaQuin® si la densidad óptica determinada para la muestra es al menos 2,0, más preferentemente 2,5, 3,0, 3,5 o más veces mayor en comparación con la densidad óptica que se determina para el control negativo.

Preferentemente, todas las mediciones en el ELISA Tettox se realizan por duplicado, más preferentemente por triplicado o más.

Preferentemente, un péptido de acuerdo con la divulgación comprende la secuencia de aminoácidos de FIGITELKKL (SEQ ID NO: 4), GITELKKLES (SEQ ID NO: 5) o IGITELKKLE (SEQ ID NO: 6). Más preferentemente, un péptido de acuerdo con la divulgación consiste en la secuencia de aminoácidos de FIGITELKKL (SEQ ID NO: 4), GITELKKLES (SEQ ID NO: 5) o IGITELKKLE (SEQ ID NO: 6).

En una realización, la presente divulgación se refiere a un péptido que comprende: (i) la secuencia de aminoácidos como se proporciona en una cualquiera de SEQ ID NO: 4-24; o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70, 80, 90 o 100 % de identidad de secuencia y/o al menos 70, 80, 90 o 100 % de similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO: 4-24 y en la que el péptido, cuando se somete a muestras de suero en al menos 10 sujetos humanos que se habían vacunado con toxoide del tétanos está en al menos 50 % de las muestras de suero unido con anticuerpos de las muestras de suero, como se determina en un ELISA Tettox como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, el péptido no comprende restos de aminoácidos adicionales en su extremo N-terminal. Más preferentemente, la presente divulgación se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO: 24.

Un péptido de la divulgación comprende o consiste en al menos 10 restos de aminoácidos, preferentemente al menos 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más restos de aminoácidos.

5 En una realización adicional más, la presente divulgación se refiere a un péptido de la invención, en el que el péptido comprende o consiste en menos de 100 restos de aminoácidos, más preferentemente menos de 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 restos de aminoácidos. Más preferentemente un péptido de acuerdo con la divulgación consiste en 18 restos de aminoácidos, y más preferentemente un péptido de acuerdo con la invención consiste en SEQ ID NO: 24.

10 En otra realización, en un péptido de la presente divulgación se sustituyen restos de aminoácidos por otros restos de aminoácidos, preferentemente por restos de aminoácidos conservativos como se ha definido adicionalmente anteriormente. Los restos de aminoácidos en un péptido de la invención que se sustituyen, son preferentemente los restos de aminoácidos en la posición 381, 382, 386-390, 392-398 de SEQ ID NO: 3.

15 Como alternativa o en combinación con al menos una realización previa, la divulgación se refiere a una realización en la que el péptido comprende restos de aminoácidos adicionales en el extremo C terminal de SEQ ID NO: 4-24.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un péptido de acuerdo con la divulgación, en el que los restos de aminoácidos adicionales no derivan de toxina del tétanos o la cadena beta de toxina del tétanos.

20 En otra realización, la presente invención se refiere a un péptido de la invención, en el que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.

25 En una realización adicional, el péptido de la divulgación es un péptido presentado en la Tabla 2 y que tiene una DO mayor de 0,2, 0,25, 0,35, 0,45, 0,6, 0,75, 0,8, 0,85, 1,0, 1,05, 1,1 o 1,15; un péptido presentado en la Tabla 3 y que tiene una DO mayor de 0,3, 0,35, 0,4, 0,75, 1,0, 1,15, 1,45, 1,5, 1,55, 1,65, 1,7, 1,85, 1,9 o 2,0; un péptido presentado en la Tabla 5 y que tiene una DO mayor de 0,16, 0,18, 0,3, 0,38, 0,62, 0,65, 0,7, 0,71, 0,85, 0,88, 0,9, 0,91 o 1,0; o un péptido presentado en la Tabla 6 y que tiene una DO con al menos uno de Tetaquin<sup>R</sup> o suero 034960 mayor de 0,37, 0,41, 0,7, 0,72, 0,8, 0,83, 0,88, 0,9, 0,95, 0,97, 1,01, 1,02, 1,04 o 1,1. Estas DO se determinan de acuerdo con el ELISA Tettox usando TetaQuin<sup>®</sup> como se describe en otra parte en el presente documento.

30 La divulgación proporciona adicionalmente un método para preparar los péptidos de la invención. Un péptido de la invención se produce preferentemente por síntesis química y purificación posterior (por ejemplo véase Ejemplos).

35 Los restos individuales de los péptidos de la divulgación pueden incorporarse en el péptido por un enlace peptídico o mimético de enlace peptídico. Un mimético de enlace peptídico incluye modificaciones de cadena principal peptídica bien conocidas por los expertos en la materia. Dichas modificaciones incluyen modificaciones del nitrógeno de amida, el carbono  $\alpha$ , carbonilo de amida, reemplazo completo del enlace amida, extensiones, supresiones o reticulaciones de cadena principal. Véase, en general, Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. VII (Weinstein ed., 1983). Se conocen varias modificaciones de cadena principal peptídica, y estas incluyen  $\Psi$  [CH<sub>2</sub>S],  $\Psi$  [CH<sub>2</sub>NH],  $\Psi$  [CSNH<sub>2</sub>],  $\Psi$  [NHCO],  $\Psi$  [COCH<sub>2</sub>] y  $\Psi$  [(E) o (Z) CH=CH]. La nomenclatura usada anteriormente sigue la sugerida por Spatola, anteriormente. En este contexto,  $\Psi$  indica la ausencia de un enlace amida. La estructura que reemplaza el grupo amida se especifica entre paréntesis.

45 También pueden incorporarse miméticos de aminoácidos en los péptidos. Un "mimético de aminoácido" como se usa en el presente documento es un resto distinto de un aminoácido de origen natural que actúa conformacional y funcionalmente como un sustituto de un aminoácido en un péptido de la presente divulgación. Dicho resto actúa como un sustituto de un resto de aminoácido si no interfiere con la capacidad del péptido para unirse con anticuerpos de TTD de una manera definida anteriormente en el presente documento. Los miméticos de aminoácidos pueden incluir aminoácidos no proteicos, tales como  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -aminoácidos,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -iminoácidos (tales como ácido piperidin-4-carboxílico) así como muchos derivados de L- $\alpha$ -aminoácidos. Varios miméticos de aminoácidos adecuados son conocidos por los expertos en la materia, incluyendo ciclohexilalanina, ácido 3-ciclohexilpropiónico, L-adamantil alanina, ácido adamantilacético y similares. Además, los D-aminoácidos pueden considerarse miméticos. Se analizan miméticos peptídicos adecuados para péptidos de la presente divulgación en Morgan y Gainor, (1989) Ann. Repts. Med. Chem. 24: 243-252.

### Conjugado

60 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 expuestas en el presente documento. La divulgación se refiere a un conjugado, que comprende un péptido como se ha definido anteriormente y un inmunógeno o un vehículo que comprende un inmunógeno. Preferentemente, el péptido como se ha definido anteriormente se conjuga en su extremo C terminal con un inmunógeno o con un vehículo que comprende un inmunógeno.

65

Un conjugado de acuerdo con la presente invención puede actuar para mejorar una amplia diversidad de vacunas, incluyendo vacunas para prevención y/o tratamiento de enfermedades infecciosas (tales como por ejemplo vacunas víricas o bacterianas) y de cánceres (no víricos) (tales como, por ejemplo, una vacuna tumoral). Por ejemplo, la invención puede usarse provechosamente en vacunas contra virus como VIH, ébola y SARS, para prevenir enfermedades parasitarias como malaria y contra bacterias como *S. aureus* resistente a multifármacos (SARM) y tuberculosis resistente a multifármacos. Es importante señalar que la intención de la presente invención no es usar un péptido de la invención para inducir inmunidad protectora contra el tétanos. En su lugar, los péptidos de la invención se usan en sujetos con inmunidad preexistente contra el tétanos en forma de anticuerpos anti TTd o anti TTx en circulación que se unen, preferentemente se unen fuertemente, con los péptidos de la invención. Los péptidos de la invención se usan en sujetos con inmunidad preexistente contra el tétanos para suministro de inmunógenos y/o vehiculos que comprenden un inmunógeno a células presentadoras de antígenos (APC) para inducir y/o potenciar inmunidad contra el inmunógeno en el sujeto.

El inmunógeno en el conjugado de la invención puede ser un péptido, fragmento proteico, proteína, carbohidrato y/o una combinación de los mismos. En una realización de epítipo y un epítipo de HLA de clase II se administran juntos en al menos dos péptidos inmunogénicos diferentes. Varias publicaciones han demostrado que linfocitos T CD4+ tras la interacción con células dendríticas (CD) presentadoras de epítipos de clase II regulan positivamente el ligando CD40. La interacción del linfocito Th CD4+ por su ligando CD40 con la molécula de CD40 en las CD conduce a activación de las CD. Las CD activadas presentan moléculas coestimulantes reguladas positivamente y secretan citocinas promotoras de CTL. Esto no solamente permite una respuesta de CTL CD8+ más robusta inducida por dicha CD activada que presenta epítipos restringidos de MHC de clase I, sino también una respuesta de CTL de memoria mucho más robusta (Ridge *et al.* 1998, Nature 393: 474; Schoenberger *et al.* 1998, Nature 393: 480; Sun *et al.* 2004, Nat. Immunol. 5: 927). La necesidad de expresión de CD40 en CD para respuestas de CTL CD8+ antitumorales robustas después de vacunación con péptidos largos (35 aa.) se publicó en Zwaveling *et al.* (2002, J. Immunol. 169: 350). Recientemente se ha descubierto que sin la inducción de respuestas Th CD4+ por epítipos del MHC de clase II contenidos en los péptidos largos, las respuestas de CTL CD8+ inducidas son menos vigorosas y de vida más corta, careciendo completamente de memoria de CTL CD8+.

En una realización, un péptido inmunogénico de la invención comprende más de un epítipo de HLA de clase I y/o más de un epítipo de HLA de clase II, y/o el más de un epítipo de HLA de clase I y/o el más de un epítipo de HLA de clase II se administran juntos en al menos dos péptidos inmunogénicos diferentes. En caso de que estén presentes más de un epítipo de HLA de clase I y/o más de un epítipo de HLA de clase II en un péptido inmunogénico de la invención (o se administren en al menos dos péptidos inmunogénicos diferentes), los diversos epítipos diferentes pueden ser cada uno del mismo antígeno fuente, o pueden ser de más de un antígeno fuente diferente. En caso de que sean de más de un antígeno fuente diferente, los diversos antígenos pueden ser cada uno del mismo patógeno o el mismo tumor/misma célula tumoral, o pueden ser de más de un patógeno diferente o de más de un tumor/célula tumoral. En el presente documento se describen posteriormente antígenos de agentes infecciosos (patógenos) o células tumorales de los que pueden derivarse epítipos de HLA de clase I y/o epítipos de HLA de clase II para uso en un péptido inmunogénico de la invención.

Los epítipos de linfocitos T citotóxicos (CTL) presentados por HLA de clase I así como epítipos de T auxiliares de HLA de clase II se producen intracelularmente, por una secuencia de mecanismos intracelulares definidos. En primer lugar, el acontecimiento dominante que define un epítipo de linfocitos T es la liberación del epítipo (o precursor de epítipo) de sus regiones de proteínas flanqueantes en los péptidos inmunogénicos de la invención mediante digestión enzimática por peptidasas citosólicas. Diversas peptidasas, peptidasas citosólicas y/o no citosólicas (por ejemplo peptidasas del RE) pueden estar implicadas en la liberación proteolítica del epítipo de sus regiones flanqueantes en el péptido inmunogénico. Una de dichas peptidasas citosólicas incluye por ejemplo el proteasoma multicatalítico (Rock *et al.*, 2004, Nat. Immunol. 5: 670), que puede estar implicado en la generación del extremo N así como el C terminal de epítipos de CTL. En particular el proteasoma está implicado con frecuencia en la generación del extremo C terminal exacto de epítipos de CTL. La generación del extremo amino terminal de un epítipo de linfocitos T es en cierta medida flexible porque varias exopeptidasas amino terminales (como ERAP1, aminopeptidasa sensible a puromicina, bleomicina hidrolasa y otras) residen en el citosol y en el retículo endoplásmico (RE) y esas enzimas de recorte tienen la capacidad de acortar un precursor epitópico elongado en el extremo N terminal hasta su longitud precisa. Otra peptidasa implicada en el procesamiento de epítipos de péptidos inmunogénicos incluye, por ejemplo, nardilisina. La generación del extremo C terminal de un epítipo de linfocitos T puede ser algo flexible porque la timet oligopeptidasa (TOP) citosólica (EC 3.4.24.15) tiene la capacidad de acortar un precursor epitópico elongado en el extremo C terminal hasta su longitud precisa liberando 3-5 aminoácidos.

En una realización, un péptido inmunogénico de la invención comprende dos o más epítipos como se ha descrito anteriormente dispuestos como perlas en un hilo, por lo que los epítipos (las perlas) se unen directamente entre sí y/o se unen a través de las secuencias enlazadoras. Las secuencias de aminoácidos que flanquean o enlazan los péptidos/epítipos preferentemente comprenden sitios de escisión proteolítica como se describe en el presente documento. Las secuencias de aminoácidos espaciadoras que flanquean o unen los epítipos en los péptidos inmunogénicos de la invención no necesitan estar presentes en casos en los que el sitio de escisión proteolítica sea parte del epítipo. Sin embargo, en otros casos las secuencias de aminoácidos espaciadoras, que comprenden o no comprenden uno o más sitios de escisión proteolítica, pueden tener una longitud de 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15 o más

aminoácidos. La secuencia de aminoácidos del espaciador puede ser o no contigua con la secuencia de aminoácidos que flanquea de forma natural el epítipo en su antígeno fuente.

5 En una realización adicional de los péptidos inmunogénicos de la invención, el péptido inmunogénico comprende una secuencia de aminoácidos que no existe de forma natural, es decir que no existe en la naturaleza pero que es el resultado de la intervención y/o el diseño humano. En esta realización, un péptido inmunogénico comprenderá uno o más epítopos de HLA de clase I y/o epítopos de HLA de clase II como se ha definido anteriormente, por lo que dicho epítipo preferentemente consiste en secuencias de aminoácidos naturales de antígenos de agentes infecciosos y/o tumores. Sin embargo, al menos una secuencia de aminoácidos en el péptido inmunogénico que flanquea al menos un epítipo en el péptido inmunogénico y/o que une dos epítopos en el péptido inmunogénico no es del antígeno (de origen natural o de tipo silvestre) del que derivan el epítipo o los epítopos y/o la secuencia de aminoácidos de enlace/flanqueante es de otras localizaciones dentro del antígeno que no son contiguas con el epítipo que flanquean. En una realización preferida la secuencia de aminoácidos de enlace/flanqueante en un péptido inmunogénico de la invención comprende uno o más de los motivos de escisión de proteasa como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto de acuerdo con la invención pueden componerse péptidos inmunogénicos (de vacuna) para inducir una respuesta de linfocitos T que comprenden uno o más epítopos de HLA de clase I y/o epítopos de HLA de clase II, pudiendo dichos epítopos estar flanqueados por y unidos entre sí por secuencias de aminoácidos que comprenden motivos de escisión de proteasa como se describe que dirigirán la liberación proteolítica eficaz de los epítopos de los péptidos inmunogénicos para presentación de los epítopos en la superficie celular en las moléculas del MHC de clase I o II apropiadas.

25 En una realización adicional el péptido inmunogénico de la invención es un péptido sintético. El uso de péptidos relativamente cortos es altamente preferido para fines médicos ya que estos pueden sintetizarse *in vitro* eficazmente, lo que no es posible o no es económico para proteínas nativas mayores de aproximadamente 100 aminoácidos. La síntesis química de péptidos es práctica rutinaria y los expertos en la materia conocen diversos métodos adecuados. En un aspecto la invención también se refiere por lo tanto a un método para producir un péptido inmunogénico de la invención por síntesis química o producción en una célula hospedadora recombinante. La síntesis química de péptidos también supera los problemas asociados con producción recombinante de proteínas intactas, que es difícil de normalizar y requiere medidas exhaustivas de purificación y control de calidad. Son particularmente ventajosos péptidos inmunogénicos con una longitud que supera la longitud de los epítopos del HLA de clase I y/o clase II (por ejemplo que tienen una longitud como se indica posteriormente en el presente documento) para su uso como un componente de vacuna porque son suficientemente grandes para captarse por células presentadoras de antígenos profesionales, en particular CD, como se explica en el documento WO02/070006 y procesarse en las CD antes de que tenga lugar la presentación en superficie celular de los epítopos de HLA de clase I y clase II contenidos. Por lo tanto, la inducción desfavorable de tolerancia de linfocitos T por la presentación sistémica de epítopos de HLA de clase I mínimos en células no presentadoras de antígenos (como se muestra en Toes *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93: 7855 y Toes *et al.*, 1996, J. Immunol. 156: 3911) se evita por la aplicación de péptidos inmunogénicos de la invención que tienen una longitud como se indica en el presente documento (como se muestra en Zwaveling *et al.*, 2002, J. Immunol. 169: 350). Para mayor claridad, un péptido inmunogénico de la invención comprende preferentemente al menos uno de un epítipo presentado por HLA de clase I y un epítipo presentado por HLA de clase II. Cada uno de estos epítopos es presentable y se unirá con la molécula de HLA específica correspondiente presente en las células después de haberse procesado como se describe en el presente documento. Cada epítipo de HLA puede por lo tanto nombrarse también como un epítipo de unión de y/o presentable por HLA. La longitud de un péptido inmunogénico y/o un péptido inmunogénico sintético de la invención es preferentemente de al menos 19, 20, 21, 22, 25, 27, 30, 33, 35, 40 o 45 aminoácidos y preferentemente no más de 100, 80, 60, 50 aminoácidos.

50 Los péptidos que se unen con anticuerpo de TTd de la invención en los conjugados de la invención pueden conjugarse directamente con los inmunógenos, o como alternativa, los péptidos que se unen con el anticuerpo de TTd pueden conjugarse con nanorrecipientes (vehículo) farmacéuticamente aceptables que comprenden los inmunógenos. En dichos conjugados, los inmunógenos pueden, por ejemplo, estar encapsulados dentro de nanorrecipientes, tales como nanopartículas, virosomas, liposomas o nanogeles, por lo que el péptido de unión a anticuerpo de TTd está conjugado preferentemente acoplado a dicho nanorrecipiente. Dicha conjugación con el nanorrecipiente puede ser directamente o mediante cualquiera de los agentes de conjugación poliméricos bien conocidos tales como esfingomielina, polietilenglicol (PEG) u otros polímeros orgánicos. En la patente de Estados Unidos n.º 6.372.250 se describen detalles para producir dichas composiciones farmacéuticas que comprenden liposomas dirigidos (PEG). Por lo tanto, en una realización preferida, un conjugado de acuerdo con la invención es un conjugado en el que el vehículo o transportador farmacéuticamente aceptable comprende al menos uno de: una proteína vehículo, un nanorrecipiente, un liposoma, un sistema políplex, un sistema lipoplex y polietilenglicol.

60 En la técnica se conoce una gran diversidad de métodos para la conjugación de péptidos de unión a anticuerpo de TTd de la invención con un inmunógeno o un vehículo que comprende un inmunógeno. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en Hermanson (1996, Bioconjugate Techniques, Academic Press), en los documentos U.S. 6.180.084 y U.S. 6.264.914 e incluyen por ejemplo métodos usados para unir haptenos con proteínas vehículo como se usan habitualmente en inmunología aplicada (véase Harlow y Lane, 1988, "Antibodies: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). Se reconoce que, en algunos casos, un péptido

de unión a anticuerpo de TTD o inmunógeno puede perder eficacia o funcionalidad tras su conjugación dependiendo, por ejemplo, del procedimiento de conjugación o el grupo químico utilizado en el mismo. Sin embargo, dada la gran diversidad de métodos para conjugación el experto en la materia es capaz de encontrar un método de conjugación que no afecta o afecta en la menor medida a la eficacia o funcionalidad de las entidades para conjugar. Los métodos adecuados para conjugación de un péptido con un inmunógeno o vehículo incluyen por ejemplo conjugación de carbodiimida (Bauminger y Wilchek, 1980, Meth. Enzymol. 70: 151-159). Como alternativa, un inmunógeno o vehículo puede acoplarse a un péptido de unión a anticuerpo de TTD como se describe en Nagy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7269-7273 (1996); y Nagy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1794-1799 (1998), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia. Otros métodos para conjugación que pueden usarse de forma adecuada son, por ejemplo, oxidación de peryodato sódico seguida de alquilación reductora de reactivos apropiados y reticulación de glutaraldehído. Otros modos convenientes para reticulación son acoplamiento químico mediante un ligamiento de Staudinger, mediante ligamiento de Staudinger-Bertozzi, mediante ligamiento químico usando un tioéster, mediante cicloadición de [2+3]-Huisgen (química click), mediante enlaces disulfuro y similares. Un método particularmente ventajoso de la conjugación puede aplicarse cuando no solamente el péptido de unión a anticuerpo de TTD sino también el inmunógeno o vehículo es un (poli)péptido. En dichos casos las dos entidades pueden sintetizarse en una única cadena (poli)peptídica que comprende las secuencias de aminoácidos tanto del péptido de unión a anticuerpo de TTD como del péptido o vehículo de inmunógeno. Además de enlaces covalentes, en un conjugado de acuerdo con la invención el inmunógeno o vehículo también puede conjugarse directamente con la molécula peptídica de unión a anticuerpo de TTD mediante interacción proteína-proteína no específica o específica, enlace no covalente y/o enlace químico coordinado, cuya conjugación puede efectuarse opcionalmente mediante un espaciador o enlazador que se une con el inmunógeno o vehículo y el péptido de unión a anticuerpo de TTD.

En una realización preferida, un conjugado de acuerdo con la invención comprende 1 - 20, más preferentemente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y menos de 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10 péptidos que se unen con el antígeno, inmunógeno o el vehículo que comprende un antígeno o inmunógeno. Más preferentemente, el conjugado comprende 2-20, más preferentemente 2-15, 2-10, 2-5, más preferentemente 3 o 4 péptidos que se unen con un antígeno, inmunógeno o el vehículo que comprende un antígeno o inmunógeno. En caso de que el conjugado comprenda un vehículo que comprenda un antígeno o inmunógeno y un péptido, el número de péptidos puede ser mucho mayor de 20, por ejemplo más de 100, 200, 300, 400, 500, preferentemente menos de 800, 700, 600.

Un conjugado de la invención que consiste principalmente en péptidos es preferiblemente soluble en soluciones acuosas fisiológicamente aceptables (por ejemplo PBS) que comprenden no más de 60, 50, 40, 35, 20, 10, 5 o 0 % de DMSO. En dicha solución, un conjugado es preferentemente soluble a una concentración de al menos 0,5, 1, 2, 4 u 8 mg de conjugado por ml. Como alternativa, una mezcla de más de un conjugado diferente de la invención es soluble a una concentración de al menos 0,5, 1, 2, 4 u 8 mg de péptido por ml en dichas soluciones.

#### Uso profiláctico y terapéutico

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado de acuerdo con la invención para uso como un medicamento. Más preferentemente, la presente invención se refiere a un conjugado como se ha definido anteriormente para su uso como un medicamento en un sujeto que tiene anticuerpos contra toxina del tétanos o toxoide del tétanos.

En una realización preferida, un medicamento de acuerdo con la invención es una vacuna profiláctica o terapéutica, más preferentemente una vacuna profiláctica o terapéutica contra una enfermedad infecciosa o un cáncer.

En una realización más preferida, el medicamento es para dirección a antígeno mediada por anticuerpo como se ha definido adicionalmente anteriormente.

En otro aspecto más la presente invención se refiere a un conjugado de acuerdo con la invención, para uso en la prevención o el tratamiento de cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto. De acuerdo con este aspecto, la invención también se refiere al uso de un conjugado de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto.

Por lo tanto, un inmunógeno en un conjugado de la invención puede comprender epítopos de HLA de clase I y/o clase II de una amplia serie de antígenos de tumor y patógenos (agentes infecciosos). Por ejemplo, antígenos tumorales tales como MAGE, BAGE, RAGE, GAGE, SSX-2, NY-ESO-1, antígeno CT, CEA, PSA, p53, XAGE y PRAME pero también en tumores malignos inducidos por vía vírica, que comprenden virus de papiloma humano (VPH), virus del herpes de sarcoma de Kaposi (VHSK), linfoma inducido por virus de Epstein Bar (VEB). Otros ejemplos de antígenos tumorales de los que pueden derivar epítopos para su uso en la presente invención son auto-antígenos expresados de forma ubicua que se sabe que están asociados con cáncer, que incluyen por ejemplo p53, MDM-2, HDM2 y otras proteínas que desempeñan un papel en la ruta de p53, moléculas tales como survivina, telomerasa, citocromo P450 isoforma 1B1, Her-2/neu y CD19 y todas las denominadas proteínas constitutivas. Los cánceres que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención se seleccionan entre la siguiente lista: cánceres de pulmón, de colon, de esófago, de ovario, de páncreas, de piel, gástrico, de cabeza y cuello, de vejiga, sarcoma,

de próstata, hepatocelular, de cerebro, adrenal, de mama, endometrial, mesotelioma, renal, tiroideo, hematológico, carcinoide, melanoma, paratiroideo, de cuello uterino, neuroblastoma, de Wilms, de testículo, de hipófisis y feocromocitoma.

5 Además, un inmunógeno en un conjugado de la invención puede comprender epítomos de HLA de clase I y/o clase II de antígenos de patógenos y agentes infecciosos tales como virus, bacterias, hongos y protozoos. Algunos ejemplos de virus patógenos que provocan infecciones o tumores de los que pueden derivar epítomos de antígenos incluyen: hepatitis (A, B o C), virus del herpes (por ejemplo, VZV, HSV-I, HAV-6, HSV-II y CMV, virus de Epstein Barr),  
 10 adenovirus, virus SV40 (que provoca mesotelioma), virus de la gripe, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus sincitial respiratorio (VSR), virus de paperas, rotavirus, virus de sarampión, virus de rubeola, parvovirus, virus vaccinia, virus HTLV, virus dengue, virus del molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus JC, virus de la encefalitis por arbovirus y virus de la inmunodeficiencia humana (virus VIH: por ejemplo, de tipo I y II), infecciones por Virus del Papiloma Humano (VPH), más en particular de los tipos de alto riesgo tumoral de VPH, que comprenden VPH tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68. Algunos ejemplos de bacterias patógenas que provocan infecciones de las que pueden derivar epítomos incluyen: *Listeria*, *Escherichia*, *Chlamydia*, bacterias  
 15 *Rickettsia*, Micobacterias, Estafilococos, Estreptococos, Neumococos, Meningococos, Gonococos, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Diphtheria*, *Salmonella*, bacilos, bacterias que provocan cólera, tétanos, botulismo, carbunco, peste, leptospirosis y enfermedad de Lyme. Algunos ejemplos de hongos patógenos que provocan infecciones de las que pueden derivar epítomos de antígenos incluyen: *Candida* (por ejemplo, *albicans*,  
 20 *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (por ejemplo, *fumigatus*, *niger*), hongos del género *Mucorales* (*Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* y *Histoplasma capsulatum*. Algunos ejemplos de parásitos patógenos que provocan infecciones de las que pueden derivar epítomos de antígenos incluyen: *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria*, *Fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* y  
 25 *Plasmodium falciparis*.

En una realización preferida, el sujeto tiene anticuerpos contra toxina del tétanos o toxoide del tétanos.

30 Como alternativa o en combinación con otra realización, en una realización preferida de la invención el medicamento es una vacuna profiláctica o terapéutica.

Como alternativa o en combinación con otra realización, en una realización preferida de la invención el método comprende además administrar una vacuna para inducir una respuesta inmunitaria a toxoide del tétanos. Preferentemente, la vacuna para inducir una respuesta inmunitaria al toxoide del tétanos se administra al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30 o más semanas antes de administrar el conjugado. Preferentemente, la vacuna es TTd.

40 En otra realización el conjugado se premezcla con Tetaquin para formar complejos inmunitarios y posteriormente se administra.

En el caso de ensayo de vacunación, es bastante posible el pretratamiento de sujetos con inmunización de TTd para aumentar los niveles de anticuerpos contra TTx.

45 En una realización preferida el medicamento es para dirección a antígeno mediada por anticuerpo como se ha definido anteriormente.

50 En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a un método para tratar o prevenir el cáncer o una enfermedad infecciosa, que comprende las etapas de administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad eficaz de un conjugado de acuerdo con la invención.

En una realización preferida el sujeto para tratar tiene anticuerpos contra toxina del tétanos o toxoide del tétanos.

55 En una realización más preferida, el conjugado se administra junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. También pueden incorporarse agentes estabilizantes, agentes osmóticos, agentes tamponantes, agentes de dispersión y similares farmacéuticamente aceptables en las composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de la invención. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y aplicación terapéutica, preferentemente parenteral. El vehículo farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible, no tóxica, adecuada para suministrar el conjugado a un sujeto. Se ejemplifican vehículos farmacéuticamente aceptables para suministro parenteral mediante NaCl 0,9 % en tampón estéril o glucosa 5 % opcionalmente complementada con una albúmina 20 %.

60 En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a un método para tratar o prevenir un cáncer o una enfermedad infecciosa, que comprende las etapas de administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad eficaz de un conjugado de acuerdo con la invención.

65

En una realización preferida el sujeto para tratar tiene anticuerpos contra toxina del tétanos o toxoide del tétanos.

En una realización más preferida, el conjugado se administra junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. También pueden incorporarse agentes estabilizantes, agentes osmóticos, agentes tamponantes, agentes de dispersión y similares farmacéuticamente aceptables en las composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de la invención. La forma preferida depende del modo preferido de administración y aplicación terapéutica, preferentemente parenteral. El vehículo farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible, no tóxica, adecuada para suministrar el conjugado a un sujeto. Se ejemplifican vehículos farmacéuticamente aceptables para suministro parenteral mediante NaCl 0,9 % en tampón estéril o glucosa 5 % opcionalmente complementada con una albúmina 20 %. Las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles. La vía parenteral para administración del conjugado es de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo inyección o infusión por vías intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial o intralesional. Un conjugado de acuerdo con la invención se administra preferentemente por inyección de embolada. Una composición farmacéutica típica para inyección intramuscular estaría compuesta para contener, por ejemplo, 1-10 ml de solución salina tamponada con fosfato y 1 a 100 µg, preferentemente 10 a 300 µg (de proteína de antígeno) de conjugado de la presente invención. Se conocen bien en la técnica métodos para preparar composiciones administrables por vía parenteral y se describen en más detalle en diversas fuentes, incluyendo, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15ª ed., Mack Publishing, Easton, PA, 1980).

En una realización adicional, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende además al menos un compuesto o adyuvante estimulante de respuesta inmunitaria. Provechosamente, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente uno o más adyuvantes sintéticos. Estos adyuvantes pueden mezclarse con una composición farmacéutica de acuerdo con la invención o pueden administrarse por separado al mamífero o ser humano para tratar. Son particularmente preferidos los adyuvantes que se sabe que actúan mediante los receptores de tipo Toll. Los compuestos inmunomodificadores que son capaces de activar el sistema inmunitario innato pueden activarse mediante ADN de CpG no metilado o complejos de cromatina – IgG. En particular, TLR3, TLR7 y TLR9 desempeñan un papel importante en la mediación de una respuesta inmunitaria innata contra infecciones víricas, y se prefieren particularmente compuestos capaces de activar estos receptores para su uso en un método de tratamiento y en una composición o un medicamento de acuerdo con la invención. Los adyuvantes particularmente preferidos comprenden, pero sin limitación, compuestos producidos de forma sintética que comprenden ARNbc, poli(I:C), ADN de CpG no metilado que desencadena receptores TLR3 y TLR9, IC31, IMSAVAC, Montanide ISA-51 (un adyuvante producido por Seppic 7, Francia). Otro compuesto inmunomodificador preferido es un inhibidor de la adhesión de linfocitos T, más preferentemente un inhibidor de un receptor de endotelina tal como BQ-788 (Buckanovich RJ *et al*, Ishikawa K, PNAS (1994) 91: 4892). BQ-788 es N-cis-2,6-dimetil-piperidinocarbonil-L-gamma-metileucil-D-1- metoxicarboniltriptofanil-D-norleucina. Sin embargo, cualquier derivado de BQ-788 o compuesto BQ-788 modificado también está abarcado dentro del alcance de la presente invención. En otra realización preferida, un compuesto adyuvante sintético está unido físicamente a un péptido o péptido inmunogénico de la invención. El enlace físico de adyuvantes y compuestos coestimulantes o grupos funcionales, con el epítipo de HLA de clase I y HLA de clase II que comprende péptidos proporciona una respuesta inmunitaria potenciada por estimulación simultánea de células presentadoras de antígenos, en particular células dendríticas, que internalizan, metabolizan y presentan antígenos.

Preferentemente, el conjugado es una vacuna profiláctica o terapéutica.

Como alternativa, o en combinación con una o más otras realizaciones, en una realización de la invención el método de tratamiento comprende además administrar una vacuna para inducir una respuesta inmunitaria contra toxoide del tétanos al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30 o más semanas antes de administrar el conjugado. Preferentemente, la vacuna es TTd.

Preferentemente, un sujeto que tiene anticuerpos contra toxina de tétanos o toxoide del tétanos se ha inmunizado con toxoide del tétanos, ha tenido profilaxis post-exposición para el tétanos y/o ha padecido tétanos.

Como alternativa o en combinación con otras realizaciones de la invención, el método de tratamiento de cáncer de acuerdo con la invención puede comprender además otros métodos de tratamiento. Son ejemplos de otros métodos de tratamiento que pueden combinarse con el método de tratamiento de acuerdo con la invención por ejemplo quimiopresentación de células, en particular células dendríticas, que internalizan, metabolizan y presentan antígenos.

Preferentemente, el conjugado es una vacuna profiláctica o terapéutica.

Como alternativa, o en combinación con una o más realizaciones adicionales, en una realización de la invención el método de tratamiento comprende además administrar una vacuna para inducir una respuesta inmunitaria contra toxoide del tétanos al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30 o más semanas antes de administrar el conjugado. Preferentemente, la vacuna es TTd.

Preferentemente, un sujeto que tiene anticuerpos contra la toxina del tétanos o el toxoide del tétanos se ha inmunizado con toxoide del tétanos, ha tenido profilaxis post-exposición para el tétanos y/o ha padecido tétanos.

Como alternativa o en combinación con otras realizaciones de la invención, el método de tratamiento de cáncer de acuerdo con la invención puede comprender además otros métodos de tratamiento. Son ejemplos de otros métodos de tratamiento que pueden combinarse con el método de tratamiento de acuerdo con la invención por ejemplo quimioterapia, terapia de radiación (también conocida como radioterapia, terapia de rayos X, irradiación) y/o cirugía. El experto en la materia, típicamente un Doctor en Medicina, conocerá qué métodos de tratamiento son adecuados en una situación específica.

En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo “comprender” y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitante para indicar que se incluyen artículos después de la palabra, pero no se excluyen artículos no mencionados específicamente. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido “un” o “una” no excluye la posibilidad de que esté presente más de un elemento, a no ser que el contexto claramente requiera que haya uno y solamente uno de los elementos. El artículo indefinido “un” o “una” habitualmente significa por lo tanto “al menos uno” o “al menos una”.

Los siguientes ejemplos se ofrecen solamente para fines ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Descripción de las figuras

Figura 6. Esquema sintético para la síntesis de compuesto central 26.

Figura 7. Esquema sintético para la síntesis de construcción 33.

Figura 8. Espectro de masas desconvolucionado de la construcción 33,  $PM_{calc} = 13.153,1$ ,  $PM_{obs} = 13.154,0$ .

Figura 9. Citometría de flujo de ganglio linfático de drenaje para linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de SIINFEKL, usando tanto tetrámeros de SIINFEKL (panel izquierdo) como ensayo de secreción de citocinas específicas para SIINFEKL (panel derecho). Los ganglios linfáticos fueron de ratones vacunados con la construcción 33 con (+AB) o sin (-AB) por vía intravenosa con anticuerpos específicos de TTE o de ratones no tratados (sin tratamiento previo).

## Ejemplos

### 1. Materiales y métodos

#### 1.1. Síntesis peptídica de procedimiento general

Se realizó síntesis peptídica en un sintetizador múltiple (Syro II, MultiSyntech). Una resina Tentagel S Ac precargada (Rapp Polymere) que portaba el aminoácido protegido por Fmoc apropiado (10  $\mu$ mol) se lavó con NMP (3 x 0,8 ml) y se trató con piperidina 20 % en NMP (3 x 3 min, 0,8 ml). La resina se lavó con NMP (6 x 0,8 ml). A la resina se añadieron aminoácido de Fmoc (6 equiv, 0,6 M en NMP), PyBOP (6 equiv, 0,67 M en NMP) y NMM (12 equiv, solución 33 % en NMP). La reacción de acoplamiento se realizó durante 90 min con agitación ocasional y al final del acoplamiento la resina se lavó con NMP (6 x 0,8 ml). La resina se trató durante 2,5 h con 1 ml de TFA que contenía agua al 5 %. En caso de que estuviera presente W en el péptido, también se añadió mercaptoetano 5 % a la mezcla de escisión. En el caso de que estuviera presente C en el péptido, el cóctel de escisión se trató con dos gotas de trietilsilano antes de la precipitación. El péptido se precipitó con 9 ml de éter/pentano 1/1 (v/v) y se aisló por centrifugación. El precipitado se aisló, se disolvió en agua o agua/ácido acético y se liofilizó para obtener un sólido blanco. La pureza del péptido se comprobó con CL-EM (Acquity Waters) y la masa molecular se determinó en un Voyager DE-Pro (Perseptive Biosystems).

#### 1.2. Protocolo de ELISA Tettox

Se bloquearon placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (Euro-Diagnostica) con PBS que contenía BSA al 5 % (200  $\mu$ l/pocillo, 1 h, temperatura ambiente). Las placas se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween20 al 0,05 %. Se realizó recubrimiento de los péptidos biotinilados por incubación durante 1 h a temperatura ambiente con 100  $\mu$ l / pocillo de una solución de 2  $\mu$ g / ml del péptido biotinilado en PBS que contenía BSA al 1 %. Las placas se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween20 al 0,05 %. Los pocillos se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con 100  $\mu$ l de Tetaquin que se habían diluido 800x con PBS que contenía BSA al 1 % o con 100  $\mu$ l de suero humano que se había diluido 100x con PBS que contenía BSA al 1 %. Las placas se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween20 al 0,05 %. Cada pocillo se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo IgG conjugado con HRP (IgG de ratón anti-humano-HRP monoclonal, clon G18-145, cat. n.º 555788, Becton Dickinson, 100  $\mu$ l/pocillo de una dilución 1000x en PBS que contiene Tween20 0,05 %). Las placas se

lavaron tres veces con PBS que contenía Tween20 0,05 %. Se realizó desarrollo con 2,2'-azino-di-(ácido 3-etilbenzotiazolin sulfónico), ABTS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1/1000, 100 µl/pocillo. La densidad óptica se midió a 415 nm con un lector de microplacas BIO-RAD, modelo 680.

### 5 1.3. Síntesis de un conjugado ejemplar

En este Ejemplo se describe la síntesis de una construcción que contiene tres copias de un epítipo TT y una copia de un epítipo de ovoalbúmina. El sistema se ha desarrollado de tal manera que pueda realizarse acoplamiento del epítipo TT y OVA a temperatura ambiente en ausencia de iones de cobre. En primer lugar, tres copias de un epítipo de TT que se ha extendido con un espaciador y un resto de cisteína se acoplan al compuesto central 26. En la segunda etapa un epítipo de OVA que se ha extendido con un espaciador y un grupo azida se acopla para obtener la construcción 33.

Resultará evidente para un experto en la materia que este es solamente un ejemplo de la síntesis de una construcción de acuerdo con la presente invención, y este ejemplo no es limitante para la presente invención.

#### 1.3.1 Síntesis del compuesto 26

Véase la figura 6 referente al esquema sintético para la síntesis del compuesto principal 26.

2,2-bis-bromometano-3-(tritoloxi)propan-1-ol (16): Se disolvió dibromuro 15 (131 g, 500 mmol) disponible comercialmente en piridina (1000 ml) y se añadió cloruro de tritilo (69,7 g, 250 mmol), la mezcla se agitó durante una noche. Después de concentrarse al vacío, el residuo se recogió en EtOAc y se lavó con H<sub>2</sub>O, la fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. La cromatografía en columna (PE-Tol-EA 50-50-0 → 0-99-1) proporcionó el compuesto del título en forma de un aceite de color ligeramente amarillo (116 g, 93 %). (*R<sub>F</sub>*: PE-EA 70-30 = 0,78).

2,2-bis-bromometano-1-ftalimido-3-(tritoloxi)propano (17): Se coevaporó 16 (116 g, 232 mmol) disuelto en THF (1160 ml) y se desgasificó con argón durante 30 min. Se añadieron PPh<sub>3</sub> (76 g, 290 mmol) y ftalimida (42,6 g, 290 mmol) en atmósfera de argón. Cuando todos los sólidos se hubieron disueltos, se añadió DEAD (133 ml, 290 mmol) gota a gota. La mezcla se agitó durante una noche y se concentró al vacío. El residuo restante se recogió en tolueno y se cristalizó un subproducto tras dejarlo reposar a -20 °C durante una noche. El licor madre se concentró al vacío y se recogió en Et<sub>2</sub>O y se cristalizó un segundo subproducto tras dejarlo reposar a -20 °C durante una noche. El licor madre se concentró al vacío. La cromatografía en columna (Tol-EA 100-0 → 98-2) proporcionó el compuesto del título en forma de un aceite de un color ligeramente amarillo (76,6 g, 52 % y 80 g de producto no puro). (*R<sub>F</sub>*: PE-EA 80-20 = 0,53), RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3,35 (s, 2H, CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>OTr), 3,57 (d, 2H, *J* = 10,8 Hz, CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>Br), 3,66 (d, 2H, *J* = 10,8 Hz, CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>Br), 3,95 (s, 2H, CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>NPhth), 7,22-7,31 (m, 9H, H arom), 7,24-7,44 (m, 6H, H arom), 7,71-7,73 (m, 2H, H arom), 7,83-7,86 (m, 2H, H arom). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 37,2 (CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>Br), 41,3 (CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>NPhth), 43,8 (Cq CC<sub>4</sub>H<sub>8</sub>), 64,9 (CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>OTr), 87,3 (Cq OTr), 123,4 (CH arom), 127,2 (CH arom), 127,9 (CH arom), 128,2 (CH arom), 128,8 (CH arom), 131,9 (Cq arom), 134,1 (CH arom), 143,2 (Cq arom), 168,7 (C=O Phth).

2,2-bis-azidometano-1-ftalimido-3-(tritoloxi)propano (18): Se disolvió 17 (76,6 g, 121 mmol) en DMF (1000 ml). A esta solución se le añadió NaN<sub>3</sub> (39 g, 600 mmol) y LiCl (cat). La mezcla se sometió a reflujo durante 6 horas y se concentró al vacío. El residuo se recogió en EtOAc y se lavó con H<sub>2</sub>O, la fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío (66,1 g, 98 %). (*R<sub>F</sub>*: PE-EA 80-20 = 0,57), RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3,13 (s, 2H, CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>OTr), 3,46 (d, 2H, *J* = 12,4 Hz, CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3,51 (d, 2H, *J* = 12,4 Hz, CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3,76 (s, 2H, CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>NPhth), 7,22-7,79 (m, 19H, H arom). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 40,2 (CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>NPhth), 44,4 (Cq CC<sub>4</sub>H<sub>8</sub>), 52,9 (CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 63,4 (CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>OTr), 86,9 (Cq OTr), 123,2 (CH arom), 127,2 (CH arom), 127,9 (CH arom), 128,2 (CH arom), 128,8 (CH arom), 131,9 (Cq arom), 134,1 (CH arom), 143,3 (Cq arom), 168,5 (C=O Phth).

1-amino-2,2-bis-azidometano-3-(tritoloxi)propano (19): Se recogió 18 (50,1 g, 90 mmol) en EtOH seco (450 ml) y se añadió hidrazina (6,55 ml, 135 mmol) en atmósfera de argón. La reacción se agitó durante 3 días (durante los cuales apareció un sólido) hasta que los análisis por TLC mostraron la conversión completa del material de partida en un punto de ascenso más bajo. El sólido se filtró y se lavó dos veces con EtOH frío y las capas orgánicas combinadas se concentraron al vacío. La cromatografía en columna (PE-EA 75-25 → 25-75) proporcionó el compuesto del título en forma de un aceite incoloro (24,8 g, 64%). (*R<sub>F</sub>*: DCM-MeOH 95-5 = 0,44), RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2,62 (s, 2H, CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2,99 (s, 2H, CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>OTr), 3,38 (s, 4H, CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 7,13-7,43 (m, 15H, H arom). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 42,1 (CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 44,6 (Cq CC<sub>4</sub>H<sub>8</sub>), 52,1 (CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 61,4 (CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>OTr), 86,5 (Cq OTr), 126,9 (CH arom), 127,2 (CH arom), 128,2 (CH arom), 143,4 (Cq arom).

1-(*tert*-butoxicarbonilamino)-2,2-di-(*tert*-butoxicarbonilamino)metilpropan-3-ol (20): Se disolvió 19 (24,8 g, 58 mmol) en THF (580 ml), después, se añadieron H<sub>2</sub>O (29 ml) y PPh<sub>3</sub> (33,3 g, 127,6 mmol). Esta mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente y después se calentó hasta 50 °C durante 6 horas adicionales (*R<sub>F</sub>*: EtOH *t*-BuOH H<sub>2</sub>O AcOH: 4-2-2-1 = 0,42). La reacción se concentró al vacío y se recogió en H<sub>2</sub>O (580 ml) y se filtró. A la solución acuosa se le añadió HCl al 37 % (29 ml, 348 mmol) y se agitó durante 3 días (*R<sub>F</sub>*: EtOH *t*-BuOH H<sub>2</sub>O AcOH: 4-2-2-1 = 0,05). La reacción se concentró al vacío y se coevaporó 3 veces con H<sub>2</sub>O para retirar la mayor parte del HCl. El residuo se recogió en H<sub>2</sub>O y se lavó con DCM. La fase acuosa se concentró al vacío. El residuo se recogió en H<sub>2</sub>O

(220 ml) y ACN (220 ml). A esta solución se le añadió NaOH (solución 3 molar en H<sub>2</sub>O) hasta pH 7. Después, se añadieron NaOH (60 ml, 176 mmol, solución 3 molar en H<sub>2</sub>O) y Boc<sub>2</sub>O (38,4 g, 176 mmol) y la mezcla se agitó durante una noche. Se separaron las capas y la capa acuosa se lavó 2 veces con EtOAc. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. La cristalización a partir de PE/EtOAc proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (12,9 g, 51%). (*R<sub>F</sub>*: PE-EA 80-20 = 0,53), RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,45 (s, 27H, CH<sub>3</sub> Boc), 2,82 (d, 6H, *J* = 6,8 Hz, CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>NH), 3,13 (d, 2H, *J* = 4,4 Hz, CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>OH), 4,32 (t, 1H, *J* = 4,4 Hz, OH), 5,78 (t, 3H, *J* = 6,4 Hz, NH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 28,3 (CH<sub>3</sub> Boc), 39,0 (CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>NH), 46,1 (Cq CC<sub>4</sub>H<sub>8</sub>), 60,3 (CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>OH), 79,7 (Cq Boc), 157,8 (C=O Boc).

10 Ácido 1-(*tert*-butoxicarbonilamino)-2,2-di-(*tert*-butoxicarbonilamino)metil-3-propanoico (21): Se suspendió 20 (12,2 g, 28 mmol) en EtOAc (280 ml), MeCN (280 ml) y H<sub>2</sub>O (280 ml). A esta suspensión se le añadió NaIO<sub>4</sub> (24,1 g, 113 mmol) y una cantidad catalítica de RuCl<sub>3</sub> que viró de negro a naranja. Cuando la suspensión se volvió transparente, los análisis TLC indicaron la conversión completa a un punto de ascenso más bajo. Se separó la capa orgánica y la capa acuosa se lavó con EtOAc. Se añadió EDTA (104 g, 280 mmol) a las capas orgánicas combinadas y se agitó durante una noche. Se separaron las capas y la capa orgánica se lavó con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y durante la concentración, se cristalizó proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (8,77 g, 70 %). (*R<sub>F</sub>*: PE-EA-AcOH 50-50-3 gotas = 0,77), RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,43 (s, 27H, CH<sub>3</sub> Boc), 3,25 (d, 6H, *J* = 6,0 Hz, CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>NH), 5,78 (sa, 3H, NH), 9,59 (vbs, 1H, COOH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 28,3 (CH<sub>3</sub> Boc), 40,31 (CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>NH), 53,0 (Cq CC<sub>4</sub>H<sub>8</sub>), 79,8 (Cq Boc), 157,0 (C=O Boc), 176,5 (C=O COOH).

25 Ácido tri-amino-2,2-dimetil propanoico protegido con Boc con espaciador PEG de amino (22): A una solución de 21 (0,447g, 1,0 mmol) en DCM (20 ml) y Et<sub>3</sub>N (0,21 ml, 1,5 mmol) en atmósfera de argón se le añadió HATU (0,380 g, 1,5 mmol), la reacción se agitó durante 15 min y después se añadió 2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etan-1-amina (1,46 ml, 10 mmol). Después de agitar durante una noche, la mezcla se lavó con H<sub>2</sub>O y la capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. La cromatografía en columna (DCM/MeOH 100-0 → 90-10) proporcionó el compuesto del título en forma de un aceite incoloro (0,293 g, 51 %). (*R<sub>F</sub>*: DCM-MeOH 90-10 = 0,15), RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,44 (s, 27H, CH<sub>3</sub> Boc), 2,91 (t, 2H, *J* = 4,8 Hz, CH<sub>2</sub> peg), 3,23 (d, 6H, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>2</sub> cadena principal), 3,40 (m, 2H, CH<sub>2</sub> peg), 3,46 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 3,56 (t, 4H, *J* = 5,2 Hz, peg), 3,63 (sa, 4H, peg), 5,88 (sa, 3H, NH Boc), 7,33 (sa, 1H, NH peg amida); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 28,2 (CH<sub>3</sub> Boc), 39,1 (CH<sub>2</sub> peg), 41,1 (CH<sub>2</sub> cadena principal), 52,2 (Cq CC<sub>4</sub>H<sub>8</sub>), 69,3 (2 x CH<sub>2</sub> peg), 70,0 (CH<sub>2</sub> peg), 70,1 (CH<sub>2</sub> peg), 72,1 (CH<sub>2</sub> peg), 79,6 (Cq Boc), 157,0 (C=O Boc), 172,6 (C=O peg amida).

35 Ácido tri-amino-2,2-dimetil propanoico protegido con Boc con espaciador PEG de difenilciclooctino (24): A una solución de 22 (0,383 g, 0,662 mmol) en DMF (13 ml) y Et<sub>3</sub>N (0,27 ml, 1,98 mmol) en atmósfera de argón se le añadió 23 (0,267 g, 0,695 mmol). Después de agitar durante una noche, la mezcla se concentró al vacío. La cromatografía de exclusión por tamaño (LH20 MeOH-/DCM 1-1) y la posterior cromatografía en columna (DCM/MeOH 100-0 → 99-1) proporcionaron el compuesto del título en forma de un aceite incoloro (0,125 g, 33 %). (*R<sub>F</sub>*: DCM-MeOH 90-10 = 0,9); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,44 (s, 27H, CH<sub>3</sub> Boc), 2,89 (m, 1H, CH<sub>2</sub> octino), 3,17 (d, 1H, *J* = 13,6 Hz, CH<sub>2</sub> octino), 3,23-3,25 (d, 6H, *J* = 6,8 Hz, CH<sub>2</sub> cadena principal), 3,40-3,45 (m, 4H, CH<sub>2</sub> peg), 3,58-3,60 (m, 4H, CH<sub>2</sub> peg), 3,65 (sa, 4H, CH<sub>2</sub> peg), 5,50 (sa, 1H, CH octino), 5,50 (sa, 3H, NH Boc), 5,81 (sa, 1H, NH carbamato), 7,27-7,37 (m, 8H, H arom), 7,52 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, NH peg amida); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 28,3 (CH<sub>3</sub> Boc), 39,1 (CH<sub>2</sub> peg), 40,9 (CH<sub>2</sub> peg), 41,1 (CH<sub>2</sub> CC<sub>4</sub>H<sub>8</sub>), 46,0 (CH<sub>2</sub> octino), 52,2 (Cq CC<sub>4</sub>H<sub>8</sub>), 69,21 (CH<sub>2</sub> peg), 69,9 (2 x CH<sub>2</sub> peg), 70,0 (CH<sub>2</sub> peg), 70,3 (CH<sub>2</sub> peg), 76,6 (CH octino), 79,8 (Cq Boc), 109,9 (Cq Arom), 112,8 (Cq Arom), 121,2 (Cq Arom), 123,7-129,8 (CH arom), 151,1, 152,2, 155,5, 157,0 (C=O Boc), 172,6 (C=O peg amida).

50 Enlazador de ácido tri-amino-2,2-dimetil propanoico funcionalizado con propionil maleimida con espaciador PEG de difenilciclooctino (26): Se disolvió el compuesto 24 (38 mg, 0,047 mmol) a 0 °C en atmósfera de argón en HCl 4M en dioxano (0,47 ml, 1,88 mmol). Se dejó que la mezcla se calentase hasta temperatura ambiente. Después de que el análisis CLEM (CLEM: 1090: 13,5 min, *R<sub>F</sub>*: 6,52 min) mostrase la conversión completa a la tri-amina (6 h), la mezcla se vertió en Et<sub>2</sub>O a 0 °C y seguidamente se centrifugó. Se decantó el Et<sub>2</sub>O y el residuo se recogió en DCM (0,1 M). A esta solución se le añadió éster de OSu del ácido maleimida propanoico 25 (0,05 g, 0,188 mmol) y Et<sub>3</sub>N (19 µl, 0,188 mmol). Después de que el análisis CLEM (CLEM: 1090: 13,5 min, *R<sub>F</sub>*: 7,56 min) mostrase que la reacción se había completado, se purificó directamente la mezcla usando cromatografía en columna (DCM/MeOH 100-0 → 96-3) proporcionando el compuesto del título en forma de un aceite de color amarillo (0,0124 g, 27%). (*R<sub>F</sub>*: DCM-MeOH 90-10 = 0,4); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,26 (sa, 6H), 2,54 (sa, 6H), 3,19-3,45 (m, 6H), 3,58-3,82 (m, 14H), 5,47 (s, 1H), 6,71 (s, 6H), 7,29 (s, 8H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 29,6, 34,2, 34,8, 39,2, 39,7, 40,9, 46,1, 50,9, 53,4, 69,0, 69,9, 70,17, 76,6, 109,8, 112,8, 121,2, 123,7, 125,8, 126,1, 126,9, 127,6, 127,8, 128,0, 129,9, 134,2, 150,9, 155,5, 170,4, 171,7, 172,2.

### 1.3.2 Síntesis de la construcción 33

Véase Figura 7 para Esquema Sintético para síntesis de la construcción 33.

65

F-I-G-I-T-E-L-K-K-L-E-S-K-I-N-K-V-F-A-A-K-Y-A-R-V-R-A-K-C (TTE-SH) (30) (SEQ ID NO: 217)

El péptido 30 se sintetizó usando síntesis peptídica de fase sólida en una resina Tentagel S Ac (Rapp, Tübingen). Se realizaron acoplamientos normales (1,5 h) usando aminoácidos Fmoc que portaban protección de cadena lateral lábil por ácidos (requerido). Se realizó activación con PyBop y NMM. Se realizó desprotección de Fmoc con 20 % vol de piperidina en NMP. Se realizaron lavados con NMP. Se realizó escisión de la resina y desprotección de cadena lateral con TFA que contenía agua al 5 % y trietilsilano al 2 %. Se realizó purificación con rpHPLC. Se realizó análisis de péptido purificado con UPLC-MS (Acquity, Waters).  
 Azidohexanoil-L-E-Q-L-E-S-I-I-N-F-E-K-L-A-A-A-A-K (OVAE) (31) (SEQ ID NO: 217)  
 El péptido 31 se sintetizó de forma similar al péptido 30. El grupo de azidohexanoilo se introdujo usando un acoplamiento con ácido azidohexanoico/PyBop/NMM. Se realizó escisión de la resina y desprotección de cadena lateral con TFA que contenía agua al 5 %.

Construcción 33

Se disolvió péptido de TTE 30 (4,8 mg, 1,44 μmol) en H<sub>2</sub>O desgasificado (800 μl, millipore) en atmósfera de argón, el pH se ajustó a 6 mediante la adición de NaHCO<sub>3</sub> (0,5 M, 20 μl, desgasificado). A esta solución se añadió 26 (0,234 mg, 0,24 μmol) en MeCN (23 μl). Esta mezcla se agitó 3 h después de lo cual la espectrometría de masas (QTof) mostró conversión completa de 26 en 32. Además se observó TTE-SH y el disulfuro relacionado TTE-S-S-ETT, que resulta del exceso de TTE-SH que se había usado. A esta mezcla se añadió péptido OVAE (31, 0,63 mg, 0,289 μmol) en DMSO (400 μl, millipore). En 1 hora 32 se convirtió a 33 de acuerdo con la espectrometría de masas (Qtof). La mezcla se purificó mediante HPLC produciendo 2,7 mg, 0,20 μmol, 83 %. El producto se analizó por espectrometría de masas y se observó la masa esperada (véase Figura 8 para espectro de masas desconvolucionado, PM<sub>calc</sub> = 13.153,1, PM<sub>obs</sub> = 13.154,0).

2. Resultados

2.1. Sensibilización de linfocitos T específicos de antígeno sistémico en ratones

Los ratones se inmunizaron repetidamente con TNP-BSA dando como resultado altos títulos de anticuerpos en circulación contra el hapteno TNP (TNP inmunizado) o se dejaron sin inmunizar (sin tratamiento previo). Después de 1-2 meses se inyectaron a todos los ratones linfocitos T CD8 específicos de OVA sin tratamiento previo que se habían marcado con el colorante fluorescente CFSE. Después de 24 h se inyectó a los ratones una única dosis de TNP-OVA. 3 días después los ratones se sacrificaron y se analizó la proliferación específica de OVA de los linfocitos T marcados en bazo y ganglios linfáticos por citometría de flujo (Figura 2). Los símbolos representan ratones individuales. El análisis estadístico muestra que la proliferación de linfocitos T específicos de OVA mediada por anticuerpo anti-TNP es significativamente diferente de los otros grupos: P<0,001. Por lo tanto, la sensibilización de linfocitos T específicos de antígeno sistémicos puede facilitarse por anticuerpos en circulación preexistentes contra epítopos de haptenos.

2.2. Síntesis péptidos solapantes de TTx

Ya que los humanos no tienen anticuerpos en circulación contra TNP y ya que no se desea inmunizar a seres humanos para obtener anticuerpos anti-TNP en circulación, los inventores seleccionaron un patógeno contra el que la mayoría de los seres humanos sí tienen anticuerpos en circulación. Los inventores sintetizaron cadena alfa y beta de TTx en péptidos solapantes (22 aminoácidos de longitud, 10 aminoácidos de solapamiento). Para este estudio se prepararon 109 péptidos por medio de síntesis en fase sólida. Los péptidos se sintetizaron con una Lys(biotina) C terminal conectada con el péptido mediante un espaciador de Ahx (ácido amino hexanoico). Estos péptidos de biotina pueden unirse con una placa de ELISA de estreptavidina para análisis. Los péptidos se exploraron en ELISA con respecto a anticuerpos de unión en Tetaquin. Tetaquin es una mezcla de anticuerpos de un gran panel de donantes de sangre que tienen todos altos títulos de anticuerpos anti-TTd. TetaQuin existe para el 90 % de IgG humano (100-180 mg/ml) y está disponible de Sanquin (Ámsterdam, Países Bajos). Se realizaron Elisa en los que los péptidos biotinilados se unen individualmente con placas de Elisa recubiertas con estreptavidina. Para cada péptido se ensayó una serie de concentraciones de TetaQuin con respecto a unión. De esta manera se identificaron los péptidos con mejor unión. Los resultados se expresan como DO del ELISA. Esta no es una cifra absoluta, sino que se usa solamente para diferenciar entre diferentes péptidos en un ensayo. El experto en la materia es consciente de que las DO pueden variar entre diversos ensayos.

Tabla 1: Péptidos solapantes cadena alfa de TTx y cadena beta de TTx

Péptidos de 22 unidades solapantes (solapamiento de 10 aminoácidos) de			
Cadena α de TTx (38 péptidos)			
Cadena β de TTx (71 péptidos)			
Número de síntesis	Número de trabajo	Secuencia	SEQ ID NO:
0826-3	α1	PITINNFYSDPVENNDTIIMMEZO	25
0826-4	α2	VNNDTIIMMEPPYCKGLDIYYKZO	26
0826-5	α3	YCKGLDIYYKAFKITDRIWIVPZO	27
0826-6	α4	KITDRIWIVPERYEFGTKPEDFZO	28

ES 2 616 258 T3

Péptidos de 22 unidades solapantes (solapamiento de 10 aminoácidos) de Cadena $\alpha$ de TTx (38 péptidos) Cadena $\beta$ de TTx (71 péptidos)			
Número de síntesis	Número de trabajo	Secuencia	SEQ ID NO:
0826-7	$\alpha$ 5	YFEGTKPEDFNPPSSSLIEGASEZO	29
0826-8	$\alpha$ 6	PSSSLIEGASEYYDPNYLRTDSDZO	30
0826-9	$\alpha$ 7	DPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFZO	31
0826-10	$\alpha$ 8	RFLQTMVKLFNRIKNNVAGEALZO	32
0827-33	$\alpha$ 9	IKNNVAGEALLDKIINAIPYLGZO	33
0827-34	$\alpha$ 10	KIINAIPYLGNSYSLLDKFDTNZO	34
0827-35	$\alpha$ 11	YSLLDKFDTNNSNSVSNLLEQDZO	35
0827-36	$\alpha$ 12	SVSNLLEQDPSGATTKSAMLTZO	36
0827-37	$\alpha$ 13	GATTKSAMLTNLIIFGPGPVLNZO	37
0828-1	$\alpha$ 14	IIFGPGPVLNKNEVRGIVLRVDZO	38
0828-2	$\alpha$ 15	EVRGIVLRVDNKNYFPCRDGFGZO	39
0828-3	$\alpha$ 16	NYFPCRDGFGSIMQMAFCPEYVZO	40
0828-4	$\alpha$ 17	MQMAFCPEYVPTFDNVIENTSZO	41
0828-5	$\alpha$ 18	FDNVIENTSLTIGKSKYFQDPZO	42
0828-6	$\alpha$ 19	IGKSKYFQDPALLMHელიHVLZO	43
0828-7	$\alpha$ 20	LLMHელიHVLHGLYGMQVSSHEZO	44
0828-8	$\alpha$ 21	LYGMQVSSHEIIPSKQEIYMQHZO	45
0828-9	$\alpha$ 22	PSKQEIYMQHTYPIAEELFTFZO	46
0828-10	$\alpha$ 23	PISAEELFTFGQDANLISIDIZO	47
0828-11	$\alpha$ 24	QDANLISIDIKNDLYEKTLDNDYZO	48
0828-12	$\alpha$ 25	DLYEKTLDNDYKAIANKLSQVTSZO	49
0828-13	$\alpha$ 26	IANKLSQVTSNDPNIDIDSYKZO	50
0828-14	$\alpha$ 27	DPNIDIDSYKQIYQQKYQFDKZDZO	51
0828-15	$\alpha$ 28	YQQKYQFDKDSNGQYIVNEDKFZO	52
0828-16	$\alpha$ 29	GQYIVNEDKFQILYNSIMYGFTZO	53
0828-17	$\alpha$ 30	LYNSIMYGFTIEILGKKNIKTZO	54
0828-18	$\alpha$ 31	ELGKKNIKTRLSYFSMNHDPVZO	55
0828-19	$\alpha$ 32	SYFSMNHDPVKIPNLLDDTIYNZO	56
0828-20	$\alpha$ 33	PNLLDDTIYNDTEGFNIESKDLZO	57
0828-21	$\alpha$ 34	EGFNIESKDLKSEYKQNMVRVNZO	58
0828-22	$\alpha$ 35	EYKQNMVRVNTNAFRNVDGSGLZO	59
0828-23	$\alpha$ 36	AFRNVDGSGLVSKLIGLCKKIIZO	60
0828-24	$\alpha$ 37	KLIGLCKKIIPPTNIRENLYNRZO	61
0828-25	$\alpha$ 38	IGLCKKIIPPTNIRENLYNRTAZO	62
0828-26	$\beta$ 1	SLTDLGGELCIKIKNEDLTFIAZO	63
0828-27	$\beta$ 2	IKNEDLTFIAEKNSFSEEPFQDZO	64
0828-28	$\beta$ 3	NSFSEEPFQDEIVSYNTKNKPLZO	65
0828-29	$\beta$ 4	VSYNTKNKPLNFNYSLDKIIVDZO	66
0828-30	$\beta$ 5	NYSLDKIIVDYNLQSKITLPNDZO	67
0828-31	$\beta$ 6	LQSKITLPNDRTPVTKGIPYAZO	68
0828-32	$\beta$ 7	TPVTKGIPYAPEYKSNAASTIEZO	69
0828-33	$\beta$ 8	YKSNAASTIEIHNIDDNTIYQYZO	70
0828-34	$\beta$ 9	NIDDNTIYQYLYAQKSPTTLQRZO	71
0828-35	$\beta$ 10	AQKSPTTLQRITMTNSVDDALIZO	72
0828-36	$\beta$ 11	MTNSVDDALINSTKIYSYFPSVZO	73
0828-37	$\beta$ 12	TKIYSYFPSVISKVNQGAQGILZO	74
0828-38	$\beta$ 13	KVNQGAQGILFLQWVRDIIDDFZO	75
0828-39	$\beta$ 14	QWVRDIIDDFFTNESSQKTIDKZO	76
0828-40	$\beta$ 15	ESSQKTIDKISDVSTIVPYIGZO	77
0828-41	$\beta$ 16	DVSTIVPYIGPALNIVKQGYEGZO	78
0828-42	$\beta$ 17	LNIVKQGYEGNFIGALETTGVVZO	79
0828-43	$\beta$ 18	IGALETTGWLLLEYIPEITLPZO	80
0828-44	$\beta$ 19	LEYIPEITLPVIAALSIAESSTZO	81
0828-45	$\beta$ 20	AALSIAESSTQKEKIIKTIDNFZO	82
0828-46	$\beta$ 21	EKIIKTIDNFLEKRYEKWIEVYZO	83

ES 2 616 258 T3

Péptidos de 22 unidades solapantes (solapamiento de 10 aminoácidos) de Cadena $\alpha$ de TTx (38 péptidos) Cadena $\beta$ de TTx (71 péptidos)			
Número de síntesis	Número de trabajo	Secuencia	SEQ ID NO:
0828-47	$\beta$ 22	KRYEKWIEVYKLVKAKWLGTVNZO	84
0828-48	$\beta$ 23	VKAKWLGTVNTQFQKRSYQMYRZO	85
0828-49	$\beta$ 24	FQKRSYQMYRSLEYQVDAIKKIZO	86
0828-50	$\beta$ 25	EYQVDAIKKIIDYKYIYSGPDZO	87
0828-51	$\beta$ 26	YEYKIYSGPDKEQIADINNLKZO	88
0828-52	$\beta$ 27	QIADINNLKKNLEEKANKAMIZO	89
0828-53	$\beta$ 28	LEEKANKAMININIFMRESSRSZO	90
0828-54	$\beta$ 29	NIFMRESSRSFLVNQMINEAKKZO	91
0828-55	$\beta$ 30	VNQMINEAKKQLLEFDTQSKNIZO	92
0828-56	$\beta$ 31	LEFDTQSKNILMQYIKANSKFIZO	93
0828-57	$\beta$ 32	QYIKANSKFIGITELKKLESKIZO	94
0828-58	$\beta$ 33	TELKKLESKINKVFSTPIPFYSZO	95
0828-59	$\beta$ 34	VFSTPIPFYSKLNDCWVDNEEZO	96
0828-60	$\beta$ 35	NLDCWVDNEEDIDVILKKSTILZO	97
0828-61	$\beta$ 36	DVILKKSTILNLDINNDIISDIZO	98
0828-62	$\beta$ 37	DINNDIISDISGFNSSVITYPDZO	99
0828-63	$\beta$ 38	FNSSVITYPDAQLVPGINGKAIZO	100
0828-64	$\beta$ 39	LVPGINGKAIHLVNNESSEVIVZO	101
0828-65	$\beta$ 40	VNESSEVIVHKAMDIEYNDMFZO	102
0828-66	$\beta$ 41	AMDIEYNDMFNNFTVSFWLRVPZO	103
0828-67	$\beta$ 42	FTVSFWLRVPKVSASHLEQYGTZO	104
0828-68	$\beta$ 43	SASHLEQYGTNEYSIISSMKKHZO	105
0828-69	$\beta$ 44	YSIISSMKKHLSIGSGWSVSLZO	106
0828-70	$\beta$ 45	SIGSGWSVSLKGNLIWTLKDSZO	107
0828-71	$\beta$ 46	NNLIWTLKDSAGEVRQITFRDLZO	108
0828-72	$\beta$ 47	EVRQITFRDLPDKFNAYLANKWZO	109
0828-73	$\beta$ 48	KFNAYLANKWVITITNDRLSSZO	110
0828-74	$\beta$ 49	ITITNDRLSSANLYINGVLMGSZO	111
0828-75	$\beta$ 50	LYINGVLMGSAEITGLGAIREZDZO	112
0828-76	$\beta$ 51	ITGLGAIREDNITLKLDRCNNZO	113
0828-77	$\beta$ 52	ITLKLDRCNNNQYVSIDKFRIZO	114
0828-78	$\beta$ 53	QYVSIDKFRIFCKALNPKEIEKZO	115
0828-79	$\beta$ 54	KALNPKEIEKLYTSYLSITFLRZO	116
0828-80	$\beta$ 55	TSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEZO	117
0828-81	$\beta$ 56	WGNPLRYDTEYLLIPVASSSKDZO	118
0828-82	$\beta$ 57	LIPVASSKDVQLKNITDYMYLZO	119
0828-83	$\beta$ 58	LKNITDYMYLTNAPSYTNGKLNZO	120
0828-84	$\beta$ 59	APSYTNGKLNIIYRRLYNGLKZFZO	121
0828-85	$\beta$ 60	YRRLYNGLKFIKRYTPNNEIDZO	122
0828-86	$\beta$ 61	KRYTPNNEIDSFVKSGDFIKLYZO	123
0828-87	$\beta$ 62	VKSGDFIKLYVSYNNNEHIVGYZO	124
0828-88	$\beta$ 63	YNNNEHIVGYPKDGNAFNLDLDRZO	125
0828-89	$\beta$ 64	DGNAFNLDLDRILRVGYNAPGIPZO	126
0828-90	$\beta$ 65	RVGYNAPGIPLYKKMEAVKLRDZO	127
0828-91	$\beta$ 66	KKMEAVKLRDLKTYSVQLKLYDZO	128
0828-92	$\beta$ 67	TYSVQLKLYDDKNASLGLVGTHZO	129
0828-93	$\beta$ 68	NASLGLVGTHNGQIGNDPNRDIZO	130
0828-94	$\beta$ 69	QIGNDPNRDILIASNWYFNHLKZO	131
0828-95	$\beta$ 70	ASNWYFNHLKDKILGCDWYFVPZO	132
0828-96	$\beta$ 71	LKDKILGCDWYFVPTDEGWTNDZO	133

Z = ácido aminohexanoico  
O = Lys(biotina)-amida

2.3. Resultados de exploración para péptidos de cadena alfa y cadena  $\beta$

Los péptidos de 22 unidades de la cadena  $\alpha$  de TTx se ensayaron en el ELISA Tettox (figura 3). Se identificó que

p31 (=α31) tenían buena unión con TetaQuin®. Se ensayaron péptidos de 22 unidades de la cadena β de TTx en el ELISA Tettox (Figura 4). Se identificó que p18, p32, p41, p48, p54 y p55 (=β18, β32, β41, β48, β54 y β55) tenían buena unión con TetaQuin®.

5 Conclusión: en Tetaquin hay anticuerpos presentes contra α31, β18, β32, β41, β48, β54, β55.

2.4. *Resultados de exploración de α31, β18, β32, β41, β48, β54, β55 en sueros individuales*

10 A continuación, los inventores ensayaron estos 7 péptidos en sueros individuales, porque es necesario un epítipo para el que todas las personas preparen anticuerpos. Los resultados se muestran en la Figura 5. Todos los donantes tienen anticuerpos contra solamente el péptido 32 de la cadena beta.

2.5. *Optimización del péptido mínimo que es necesario para unión*

15 Este péptido se optimizó para unión para identificar los péptidos más cortos con buena unión con TetaQuin® (véase Tabla 2). Se ensayaron variantes de longitud de péptido β32 para determinar qué parte del péptido es esencial para la unión de Ab y qué parte puede omitirse. Cuanto mayor sea la DO mejor será la unión del péptido con TetaQuin®. Conclusión: el péptido más corto que se une con TetaQuin® comprende 10 restos de aminoácidos. Además, el péptido puede acortarse en el extremo N terminal. Los mejores resultados se obtienen con el de 22 unidades.

20

2.6. *Definición adicional del péptido óptimo*

Se ensayaron más variantes de longitud (mostradas en la tabla3).

25 Conclusión: El péptido debería iniciarse con FIGIT y el de 18 unidades hasta la siguiente F es el mejor. Aquí los inventores ensayaron también si la formilación de una o más lisinas en el péptido mejoraba la unión. Esto no parece suceder. Esto podría haber sido importante porque TTx es la forma formilada de la toxina del tétanos.

30 Posteriormente, los inventores ensayaron algunas otras variantes de longitud y si los restos de aminoácidos C terminales pueden reemplazarse por un espaciador más largo. Además se ensayó si supone alguna diferencia el que el extremo N terminal o el extremo C terminal esté biotinilado o si uno de ellos puede estar mejor libre. Véase tabla 4.

35 Conclusión: Los restos de aminoácidos C terminales preferentemente no se reemplazan por solamente un espaciador más largo. El péptido actúa mejor cuando el extremo C terminal está unido y el extremo N terminal está libre. Esto es importante para el diseño de vacunas.

2.7. *Exploración de Ala y exploración de sustitución conservativa*

40 Se ensayaron péptidos (FIGITELKKLESKINKVF) con una sustitución de Ala (Tabla 5) o con un reemplazo conservado (Tabla 6). Esto se realizó para obtener una idea preliminar de la importancia relativa de cada aminoácido. Las posiciones 3-5 y 11 parecen algo más importantes que algunas otras posiciones. No se encontró ningún péptido mejorado.

Tabla 2. ELISA Tettox de diversas longitudes de péptido β-32 usando TettaQuin®

Con enlazador

<b>Variantes de longitud del péptido β-32</b>				
Número de síntesis	Número de trabajo	Secuencia	DO	SEQ ID NO:
0915-1	P1	Q Y I K A N S K F I G I T E L K K L E S K I Z O	1,3	023
0915-2	P2	I K A N S K F I G I T E L K K L E S K I Z O	1,2	022
0915-3	P3	Q Y I K A N S K F I G I T E L K K L E S Z O	1,1	021
0915-4	P4	A N S K F I G I T E L K K L E S K I Z O	1,05	020
0915-5	P5	I K A N S K F I G I T E L K K L E S Z O	0,9	019
0915-6	P6	Q Y I K A N S K F I G I T E L K K L Z O	0,75	018
0915-8	P7	S K F I G I T E L K K L E S K I Z O	1,15	017
0915-9	P8	A N S K F I G I T E L K K L E S Z O	0,85	016
0915-10	P9	I K A N S K F I G I T E L K K L Z O	0,6	015
0915-11	P10	Q Y I K A N S K F I G I T E L K Z O	0,25	014
0915-13	P11	F I G I T E L K K L E S K I Z O	1,0	013
0915-14	P12	S K F I G I T E L K K L E S Z O	0,8	012
0915-15	P13	A N S K F I G I T E L K L Z O	0,6	011
0915-16	P14	I K A N S K F I G I T E L K Z O	0,2	134
0915-17	P15	Q Y I K A N S K F I G I T E Z O	0,25	010
0915-27	P16	G I T E L K K L E S K I Z O	0,45	009
0915-28	P17	F I G I T E L K K L E S Z O	0,45	008
0915-29	P18	S K F I G I T E L K K L Z O	0,45	007
0915-30	P19	A N S K F I G I T E L K Z O	0,2	135
0915-31	P20	I K A N S K F I G I T E Z O	0,2	136
0915-32	P21	Q Y I K A N S K F I G I Z O	0,2	137
0915-33	P22	T E L K K L E S K I Z O	0,2	138
0915-34	P23	G I T E L K K L E S Z O	0,25	005
0915-35	P24	F I G I T E L K K L Z O	0,35	004
0915-36	P25	S K F I G I T E L K Z O	0,2	139
0915-37	P26	A N S K F I G I T E Z O	0,2	140
0915-38	P27	I K A N S K F I G I Z O	0,2	141

Variantes de longitud del péptido β-32			
Número de síntesis	Número de trabajo	Secuencia	SEQ ID NO:
0915-39	F28	Q Y I K A N S K F I Z O	142
0915-40	F29	L K K L E S K I Z O	143
0915-41	F30	T E L K K L E S Z O	144
0915-42	F31	G I T E L K K L Z O	145
0915-43	F32	F I G I T E L K Z O	146
0915-44	F33	S K F I G I T E Z O	147
0915-45	F34	A N S K F I G I Z O	148
0915-46	F35	I K A N S K F I Z O	149
0915-47	F36	Q Y I K A N S K Z O	150

Sin enlazador

Variantes de longitud del péptido β-32			
Número de síntesis	Número de trabajo	Secuencia	SEQ ID NO:
0915-1	F1	Q Y I K A N S K F I G I T E L K K L E S K I	023
0915-2	F2	I K A N S K F I G I T E L K K L E S K I	022
0915-3	F3	Q Y I K A N S K F I G I T E L K K L E S	021
0915-4	F4	A N S K F I G I T E L K K L E S K I	020
0915-5	F5	I K A N S K F I G I T E L K K L E S	019
0915-6	F6	Q Y I K A N S K F I G I T E L K K L	018
0915-8	F7	S K F I G I T E L K K L E S K I	017
0915-9	F8	A N S K F I G I T E L K K L E S	016
0915-10	F9	I K A N S K F I G I T E L K K L	015
0915-11	F10	Q Y I K A N S K F I G I T E L K	014
0915-13	F11	F I G I T E L K K L E S K I	013
0915-14	F12	S K F I G I T E L K K L E S	012
0915-15	F13	A N S K F I G I T E L K K L	011
0915-16	F14	I K A N S K F I G I T E L K	134
0915-17	F15	Q Y I K A N S K F I G I T E	010
0915-27	F16	G I T E L K K L E S K I	009
0915-28	F17	F I G I T E L K K L E S	008

Variantes de longitud del péptido $\beta$ -32				
Número de síntesis	Número de trabajo	Secuencia	DO	SEQ ID NO:
0915-29	P18	S K F I G I T E L K K L	0,45	007
0915-30	P19	A N S K F I G I T E L K	0,2	135
0915-31	P20	I K A N S K F I G I T E	0,2	136
0915-32	P21	Q Y I K A N S K F I G I	0,2	137
0915-33	P22	T E L K K L E S K I	0,2	138
0915-34	P23	G I T E L K K L E S	0,25	005
0915-35	P24	F I G I T E L K K L	0,35	004
0915-36	P25	S K F I G I T E L K	0,2	139
0915-37	P26	A N S K F I G I T E	0,2	140
0915-38	P27	I K A N S K F I G I	0,2	141
0915-39	P28	Q Y I K A N S K F I	0,2	142
0915-40	P29	L K K L E S K I	0,2	143
0915-41	P30	T E L K K L E S	0,2	144
0915-42	P31	G I T E L K K L	0,2	145
0915-43	P32	F I G I T E L K	0,2	146
0915-44	P33	S K F I G I T E	0,2	147
0915-45	P34	A N S K F I G I	0,2	148
0915-46	P35	I K A N S K F I	0,2	149
0915-47	P36	Q Y I K A N S K	0,2	150

Tabla 3. ELISA Tettox de variantes de longitud del péptido β-32 usando TetaQuin®

Número de síntesis	Número de trabajo	Secuencia	DO	SEQ ID NO:
0925-52	1	FIGITELKKLESKINKVFSSTZO	1,85	151
0925-53	2	FIGITELKKLESKINKVFSZO	1,90	152
0925-54	3	FIGITELKKLESKINKVFZO	2,30	153
0925-55	4	FIGITELKKLESKINKVZO	2,00	154
0925-56	5	FIGITELKKLESKINKZO	1,55	155
0925-57	6	FIGITELKKLESKINZO	1,65	156
0925-58	7	IGITELKKLESKINZO	1,45	157
0925-59	8	GITELKKLESKINKZO	0,75	158
0925-60	9	ITELKKLESKINKVZO		159
0925-61	10	TELKKLESKINKVFZO	0,35	160
0925-62	11	ELKKLESKINKVFSZO	0,35	161
0925-63	12	LKKLESKINKVFSSTZO	0,40	162
0925-64	13	FIGITELJKLESKIZO	1,70	163
0925-65	14	FIGITELKJLESKIZO	1,50	164
0925-66	15	FIGITELKKLESJIZO	2,10	165
0925-67	16	FIGITELJJLESKIZO	1,15	166
0925-68	17	FIGITELJKLESJIZO		167
0925-69	18	FIGITELKJLESJIZO	1,65	168
0925-70	19	FIGITELJJLESJIZO	1,00	169
Control neg.			0,30	

Z = Ahx  
O = Lis(biotina)  
J = Lys(formilo)

Tabla 4. Efecto de espaciador más largo y biotilación C frente a N terminal

JZZSKFIGITELKKLESKINKVF	0,47	SEQ ID NO: 170
JZSKFIGITELKKLESKINKVF	0,28	SEQ ID NO: 170
JZZFIGITELKKLESKINKVF	0,22	SEQ ID NO: 171
JZFIGITELKKLESKINKVF	0,17	SEQ ID NO: 171
FIGITELKKLESKINKVFZZO	1,16	SEQ ID NO: 172
FIGITELKKLESKINKVZZO	0,68	SEQ ID NO: 173
FIGITELKKLESKINKZZO	0,65	SEQ ID NO: 174
FIGITELKKLESKINZZO	0,64	SEQ ID NO: 175
FIGITELKKLESKIZZO	0,79	SEQ ID NO: 176
QYIKANSKFIGITELKKLESKIZO (b32)	1,16	SEQ ID NO: 177
SLTDLGGELCIIKIKNEDLTFIAZO (b1, contr. neg)	0,12	SEQ ID NO: 178

Z = Ahx  
O = Lis(biotina)  
J = Biotina

Tabla 5. Exploración de Ala de FIGITELKKLESKINKVF

N.º	N.º de SINT	SECUENCIA	DO DE ELISA		SEQ ID NO:
		1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8	TETAQUIN	SUERO 034960	
1	0942-09	FIGITELKKLESKINKVFZO	1,26	1,36	179
2	0942-10	<b>A</b> FIGITELKKLESKINKVFZO	1,12	1,29	180
3	0942-11	<b>F</b> AFIGITELKKLESKINKVFZO	1,04	1,18	181
4	0942-12	<b>F</b> I <b>A</b> ITELKKLESKINKVFZO	0,65	0,23	182
5	0942-13	<b>F</b> I <b>A</b> T <b>E</b> ITELKKLESKINKVFZO	0,30	0,18	183
6	0942-14	<b>F</b> I <b>G</b> I <b>A</b> ELKKLESKINKVFZO	0,38	0,16	184
7	0942-15	<b>F</b> I <b>G</b> I <b>T</b> <b>A</b> LKKLESKINKVFZO	1,24	1,28	185
8	0942-16	<b>F</b> I <b>G</b> I <b>T</b> <b>E</b> <b>A</b> KKLESKINKVFZO	0,90	0,91	186
9	0942-17	<b>F</b> I <b>G</b> I <b>T</b> <b>E</b> <b>L</b> <b>A</b> KKLESKINKVFZO	0,62	0,65	187
10	0942-18	<b>F</b> I <b>G</b> I <b>T</b> <b>E</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>A</b> LESKINKVFZO	1,06	1,22	188
11	0942-19	<b>F</b> I <b>G</b> I <b>T</b> <b>E</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>K</b> <b>A</b> ESKINKVFZO	0,70	0,71	189
12	0942-20	<b>F</b> I <b>G</b> I <b>T</b> <b>E</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>A</b> SKINKVFZO	0,85	0,91	190
13	0942-21	<b>F</b> I <b>G</b> I <b>T</b> <b>E</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>E</b> <b>A</b> KINKVFZO	1,27	1,48	191
14	0942-22	<b>F</b> I <b>G</b> I <b>T</b> <b>E</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>A</b> INKVFZO	1,10	1,27	192
15	0942-23	<b>F</b> I <b>G</b> I <b>T</b> <b>E</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>K</b> <b>A</b> NKVFZO	0,88	1,08	193
16	0942-24	<b>F</b> I <b>G</b> I <b>T</b> <b>E</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>K</b> <b>I</b> <b>A</b> KVFZO	1,37	1,29	194
17	0942-25	<b>F</b> I <b>G</b> I <b>T</b> <b>E</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>K</b> <b>I</b> <b>N</b> <b>A</b> VFZO	1,30	1,28	195

N.º	N.º de SINT	SECUENCIA	DO DE ELISA		SEQ ID NO:
		1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8	TETAQUIN	SUERO 034960	
18	0942-26	FIGITELKKLESKINK <b>A</b> FZO	1,24	1,39	196
19	0942-27	FIGITELKKLESKINK <b>V</b> AZO	1,26	1,20	197

Tabla 6: Exploración de sustituciones conservativas de FIGITELKKLESKINKVF

N.º	N.º de SINT	SECUENCIA	DO DE ELISA		SEQ ID NO:
		1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8	TETAQUIN	SUERO 034960	
1	0942-09	FIGITELKKLESKINK <b>V</b> FZO	1,26	1,36	198
20	0942-28	<b>Y</b> IGITELKKLESKINK <b>V</b> FZO	1,23	1,30	199
21	0942-29	<b>F</b> LGITELKKLESKINK <b>V</b> FZO	1,19	1,29	200
22	0942-30	FI <b>S</b> ITELKKLESKINK <b>V</b> FZO	1,10	1,32	201
23	0942-31	FI <b>L</b> ITELKKLESKINK <b>V</b> FZO	0,97	1,19	202
24	0942-32	FI <b>S</b> ELKKLESKINK <b>V</b> FZO	0,83	0,70	203
25	0942-33	FIGIT <b>D</b> LKKLESKINK <b>V</b> FZO	1,01	0,95	204
26	0942-34	FIGITEI <b>K</b> KLESKINK <b>V</b> FZO	0,72	0,80	205
27	0942-35	FIGITEL <b>R</b> KLESKINK <b>V</b> FZO	1,02	0,90	206
28	0942-36	FIGITEL <b>K</b> RLESKINK <b>V</b> FZO	1,12	1,23	207
29	0942-37	FIGITELKK <b>I</b> ESKINK <b>V</b> FZO	1,11	1,14	208
30	0942-38	FIGITELKK <b>L</b> DSKINK <b>V</b> FZO	0,41	0,37	209
31	0942-39	FIGITELKK <b>L</b> E <b>T</b> KINK <b>V</b> FZO	0,88	1,04	210
32	0942-40	FIGITELKK <b>L</b> ES <b>R</b> INK <b>V</b> FZO	1,19	1,27	211
33	0942-41	FIGITELKK <b>L</b> ESK <b>L</b> NK <b>V</b> FZO	1,11	1,32	212
34	0942-42	FIGITELKK <b>L</b> ESK <b>I</b> Q <b>K</b> V <b>F</b> ZO	1,41	1,26	213
35	0942-43	FIGITELKK <b>L</b> ESK <b>I</b> N <b>R</b> V <b>F</b> ZO	1,26	1,31	214
36	0942-44	FIGITELKK <b>L</b> ESK <b>I</b> N <b>K</b> L <b>F</b> ZO	1,30	1,47	215
37	0942-45	FIGITELKK <b>L</b> ESK <b>I</b> N <b>K</b> V <b>Y</b> ZO	1,11	1,23	216

Z = Ahx  
O = Lys(biotina)

5 Se sabe que la captación de los anticuerpos por las células inmunitarias mediante receptores Fc puede mejorarse por reticulación de anticuerpos. Se generan por lo tanto multímeros de los péptidos anteriormente identificados y se compara la eficacia de multímeros frente a monómeros. Esta comparación se realiza usando epítomos CTL y auxiliares de HPV16E7 y ovoalbúmina (OVA) en ensayos *in vitro* e *in vivo* (véase posteriormente). Además, algunas de las construcciones anteriormente mencionadas se sintetizan en forma fluorescente para poder investigar la captación de las construcciones en diversos tipos celulares, incluyendo células dendríticas (CD).

10

### 2.8. Validación de los resultados con las construcciones en ratones (*in vivo*)

15 Los ratones se vacunaron repetidas veces con TTd para inducir altos títulos de anticuerpo contra TTd (determinado con ELISA). Posteriormente, estos ratones se expondrán a una única dosis de uno de los péptidos anteriormente identificados que se unen con OVA.

Los animales se supervisan con respecto a:

- 20 - Sensibilización de linfocitos T eficaz por medio de proliferación de linfocitos T transgénicos TCR marcados con CFSE y cuantificación de los números de linfocitos T CD8 específicos en ratones de tipo silvestre usando tetrámeros del MHC de clase I específicos.
- Protección y potencia terapéutica de las construcciones contra tumores (células tumorales que expresan OVA B16-OVA).

25 Ya que el repertorio de linfocitos B en ratones contra antígenos ajenos es enorme puede esperarse que la respuesta de anticuerpo contra epítomos de TTd lineales en ratones sea muy similar a la de seres humanos. En el caso de que las respuestas en ratones sean significativamente diferentes a la de seres humanos, lo que resultará evidente a partir de los estudios de vacunación en ratones, se usarán los ratones Medarex que expresan un sistema de locus Ig de linfocitos B humanizado. Como alternativa, estos ratones (que son tolerantes para anticuerpos humanos) pueden usarse para ensayar las construcciones precargando estas con anticuerpos de uso clínico, bien definidos (TetaQuin). Estos complejos preformados se inyectarán seguido de análisis de sensibilización de linfocitos T. En este sistema, los receptores de Fc murinos se consideran compatibles con complejos de anticuerpo-antígeno humanos.

35

2.9 Validación de los resultados con las construcciones en CD humanas *in vitro*

5 Los péptidos anteriormente identificados se ensayan con respecto a su funcionalidad en el sistema humano en células dendríticas derivadas de monocitos humanos (CDMo) *in vitro*. Se incuban construcciones peptídicas con cantidades valoradas de anticuerpos anti-TTd (Tetaquin) y los complejos formados cultivados junto con CDMo y se llevan a cabo estudios de presentación de antígenos y maduración de CD.

10 Las construcciones péptido-péptido consisten en secuencias peptídicas derivadas de VPH que albergan epítopos restringidos de HLA-A2 o HLA-DR3 bien definidos para reconocimiento de ensayo por linfocitos T CD8 específicos de VPH y linfocitos T CD4 respectivamente.

La maduración de CD se ensaya tiñendo con anticuerpos específicos contra marcadores de maduración de CD CD80, CD86, CD40, MHC de clase II y MHC de clase I por análisis de FACScan.

15 2.10 Vacunación de ratones con construcción 33 con o sin administración previa de anticuerpos específicos

20 Para determinar las capacidades de sensibilización potenciada de la construcción 33 en presencia de anticuerpos específicos para TTE *in vivo*, se vacunaron ratones con una dosis subóptima de construcción 33 por vía subcutánea en solución salina. Se inyectó por vía intravenosa a un grupo de ratones anticuerpos específicos de TTE (anticuerpos de conejo anti TTE purificados ProtG) 4 horas antes de la vacunación con la construcción 33. 7 días después de la vacunación, los ratones se sacrificaron y se analizaron ganglios linfáticos de drenaje por citometría de flujo con respecto a linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de SIINFEKL, usando tanto tetrameros de SIINFEKL (Figura 9, panel izquierdo) como ensayo de secreción de citocinas específicas para SIINFEKL (Figura 9, panel derecho). Como se muestra en la Figura 9, está presente un mayor porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de SIINFEKL en ratones que recibieron anticuerpos específicos de TTE y construcción 33, frente a ratones que recibieron solamente construcción 33, lo que significa capacidad de sensibilización superior de la construcción 33 en presencia de anticuerpos específicos de TTE.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> Academisch Ziekenhuis Leiden h.o.d.n. LUMC Stichting Technische Wetenschappen (STW)
- <120> Polipéptidos, conjugados y métodos para aumentar la inmunogenicidad de una vacuna
- 35 <130> P6028543PCT
- <150> EP10156505.9
- <151> 15-03-2010
- 40 <150> US61/317.930
- <151> 26-03-2010
- <160> 219
- 45 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 1314
- <212> PRT
- 50 <213> *Clostridium tetani*
- <400> 1

ES 2 616 258 T3

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

Thr Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Tyr Cys Lys Gly Leu Asp Ile Tyr  
 20 25 30

Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Val Pro Glu Arg  
 35 40 45

Tyr Glu Phe Gly Thr Lys Pro Glu Asp Phe Asn Pro Pro Ser Ser Leu  
 50 55 60

Ile Glu Gly Ala Ser Glu Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Arg Thr Asp  
 65 70 75 80

Ser Asp Lys Asp Arg Phe Leu Gln Thr Met Val Lys Leu Phe Asn Arg  
 85 90 95

Ile Lys Asn Asn Val Ala Gly Glu Ala Leu Leu Asp Lys Ile Ile Asn  
 100 105 110

Ala Ile Pro Tyr Leu Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Leu Asp Lys Phe Asp  
 115 120 125

Thr Asn Ser Asn Ser Val Ser Phe Asn Leu Leu Glu Gln Asp Pro Ser  
 130 135 140

Gly Ala Thr Thr Lys Ser Ala Met Leu Thr Asn Leu Ile Ile Phe Gly  
 145 150 155 160

ES 2 616 258 T3

Pro Gly Pro Val Leu Asn Lys Asn Glu Val Arg Gly Ile Val Leu Arg  
165 170 175

Val Asp Asn Lys Asn Tyr Phe Pro Cys Arg Asp Gly Phe Gly Ser Ile  
180 185 190

Met Gln Met Ala Phe Cys Pro Glu Tyr Val Pro Thr Phe Asp Asn Val  
195 200 205

Ile Glu Asn Ile Thr Ser Leu Thr Ile Gly Lys Ser Lys Tyr Phe Gln  
210 215 220

Asp Pro Ala Leu Leu Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly  
225 230 235 240

Leu Tyr Gly Met Gln Val Ser Ser His Glu Ile Ile Pro Ser Lys Gln  
245 250 255

Glu Ile Tyr Met Gln His Thr Tyr Pro Ile Ser Ala Glu Glu Leu Phe  
260 265 270

Thr Phe Gly Gly Gln Asp Ala Asn Leu Ile Ser Ile Asp Ile Lys Asn  
275 280 285

Asp Leu Tyr Glu Lys Thr Leu Asn Asp Tyr Lys Ala Ile Ala Asn Lys  
290 295 300

Leu Ser Gln Val Thr Ser Cys Asn Asp Pro Asn Ile Asp Ile Asp Ser  
305 310 315 320

Tyr Lys Gln Ile Tyr Gln Gln Lys Tyr Gln Phe Asp Lys Asp Ser Asn  
325 330 335

Gly Gln Tyr Ile Val Asn Glu Asp Lys Phe Gln Ile Leu Tyr Asn Ser  
340 345 350

Ile Met Tyr Gly Phe Thr Glu Ile Glu Leu Gly Lys Lys Phe Asn Ile  
355 360 365

Lys Thr Arg Leu Ser Tyr Phe Ser Met Asn His Asp Pro Val Lys Ile  
370 375 380

Pro Asn Leu Leu Asp Asp Thr Ile Tyr Asn Asp Thr Glu Gly Phe Asn  
385 390 395 400

Ile Glu Ser Lys Asp Leu Lys Ser Glu Tyr Lys Gly Gln Asn Met Arg  
405 410 415

ES 2 616 258 T3

Val Asn Thr Asn Ala Phe Arg Asn Val Asp Gly Ser Gly Leu Val Ser  
 420 425 430

Lys Leu Ile Gly Leu Cys Lys Lys Ile Ile Pro Pro Thr Asn Ile Arg  
 435 440 445

Glu Asn Leu Tyr Asn Arg Thr Ala Ser Leu Thr Asp Leu Gly Gly Glu  
 450 455 460

Leu Cys Ile Lys Ile Lys Asn Glu Asp Leu Thr Phe Ile Ala Glu Lys  
 465 470 475 480

Asn Ser Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gln Asp Glu Ile Val Ser Tyr Asn  
 485 490 495

Thr Lys Asn Lys Pro Leu Asn Phe Asn Tyr Ser Leu Asp Lys Ile Ile  
 500 505 510

Val Asp Tyr Asn Leu Gln Ser Lys Ile Thr Leu Pro Asn Asp Arg Thr  
 515 520 525

Thr Pro Val Thr Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Pro Glu Tyr Lys Ser Asn  
 530 535 540

Ala Ala Ser Thr Ile Glu Ile His Asn Ile Asp Asp Asn Thr Ile Tyr  
 545 550 555 560

Gln Tyr Leu Tyr Ala Gln Lys Ser Pro Thr Thr Leu Gln Arg Ile Thr  
 565 570 575

Met Thr Asn Ser Val Asp Asp Ala Leu Ile Asn Ser Thr Lys Ile Tyr  
 580 585 590

Ser Tyr Phe Pro Ser Val Ile Ser Lys Val Asn Gln Gly Ala Gln Gly  
 595 600 605

Ile Leu Phe Leu Gln Trp Val Arg Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr Asn  
 610 615 620

Glu Ser Ser Gln Lys Thr Thr Ile Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser Thr  
 625 630 635 640

Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Val Lys Gln Gly Tyr  
 645 650 655

Glu Gly Asn Phe Ile Gly Ala Leu Glu Thr Thr Gly Val Val Leu Leu  
 660 665 670

ES 2 616 258 T3

Leu Glu Tyr Ile Pro Glu Ile Thr Leu Pro Val Ile Ala Ala Leu Ser  
675 680 685

Ile Ala Glu Ser Ser Thr Gln Lys Glu Lys Ile Ile Lys Thr Ile Asp  
690 695 700

Asn Phe Leu Glu Lys Arg Tyr Glu Lys Trp Ile Glu Val Tyr Lys Leu  
705 710 715 720

Val Lys Ala Lys Trp Leu Gly Thr Val Asn Thr Gln Phe Gln Lys Arg  
725 730 735

Ser Tyr Gln Met Tyr Arg Ser Leu Glu Tyr Gln Val Asp Ala Ile Lys  
740 745 750

Lys Ile Ile Asp Tyr Glu Tyr Lys Ile Tyr Ser Gly Pro Asp Lys Glu  
755 760 765

Gln Ile Ala Asp Glu Ile Asn Asn Leu Lys Asn Lys Leu Glu Glu Lys  
770 775 780

Ala Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Ile Phe Met Arg Glu Ser Ser  
785 790 795 800

Arg Ser Phe Leu Val Asn Gln Met Ile Asn Glu Ala Lys Lys Gln Leu  
805 810 815

Leu Glu Phe Asp Thr Gln Ser Lys Asn Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys  
820 825 830

Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser  
835 840 845

Lys Ile Asn Lys Val Phe Ser Thr Pro Ile Pro Phe Ser Tyr Ser Lys  
850 855 860

Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile Leu  
865 870 875 880

Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile Ser  
885 890 895

Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala Gln  
900 905 910

Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly Lys Ala Ile His Leu Val Asn Asn Glu  
915 920 925

Ser Ser Glu Val Ile Val His Lys Ala Met Asp Ile Glu Tyr Asn Asp

ES 2 616 258 T3

930						935										940
Met	Phe	Asn	Asn	Phe	Thr	Val	Ser	Phe	Trp	Leu	Arg	Val	Pro	Lys	Val	
945						950				955						960
Ser	Ala	Ser	His	Leu	Glu	Gln	Tyr	Gly	Thr	Asn	Glu	Tyr	Ser	Ile	Ile	
				965					970					975		
Ser	Ser	Met	Lys	Lys	His	Ser	Leu	Ser	Ile	Gly	Ser	Gly	Trp	Ser	Val	
			980					985					990			
Ser	Leu	Lys	Gly	Asn	Asn	Leu	Ile	Trp	Thr	Leu	Lys	Asp	Ser	Ala	G	
		995					1000					1005				
Glu	Val	Arg	Gln	Ile	Thr	Phe	Arg	Asp	Leu	Pro	Asp	Lys	Phe	Asn		
1010						1015					1020					
Ala	Tyr	Leu	Ala	Asn	Lys	Trp	Val	Phe	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Asp		
1025						1030					1035					
Arg	Leu	Ser	Ser	Ala	Asn	Leu	Tyr	Ile	Asn	Gly	Val	Leu	Met	Gly		
1040						1045					1050					
Ser	Ala	Glu	Ile	Thr	Gly	Leu	Gly	Ala	Ile	Arg	Glu	Asp	Asn	Asn		
1055						1060					1065					
Ile	Thr	Leu	Lys	Leu	Asp	Arg	Cys	Asn	Asn	Asn	Asn	Gln	Tyr	Val		
1070						1075					1080					
Ser	Ile	Asp	Lys	Phe	Arg	Ile	Phe	Cys	Lys	Ala	Leu	Asn	Pro	Lys		
1085						1090					1095					
Glu	Ile	Glu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Leu	Ser	Ile	Thr	Phe	Leu		
1100						1105					1110					
Arg	Asp	Phe	Trp	Gly	Asn	Pro	Leu	Arg	Tyr	Asp	Thr	Glu	Tyr	Tyr		
1115						1120					1125					
Leu	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Ser	Ser	Lys	Asp	Val	Gln	Leu	Lys	Asn		
1130						1135					1140					
Ile	Thr	Asp	Tyr	Met	Tyr	Leu	Thr	Asn	Ala	Pro	Ser	Tyr	Thr	Asn		
1145						1150					1155					
Gly	Lys	Leu	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Arg	Arg	Leu	Tyr	Asn	Gly	Leu	Lys		
1160						1165					1170					
Phe	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	Thr	Pro	Asn	Asn	Glu	Ile	Asp	Ser	Phe		
1175						1180					1185					

ES 2 616 258 T3

Val Lys Ser Gly Asp Phe Ile Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Asn Asn  
 1190 1195 1200

Asn Glu His Ile Val Gly Tyr Pro Lys Asp Gly Asn Ala Phe Asn  
 1205 1210 1215

Asn Leu Asp Arg Ile Leu Arg Val Gly Tyr Asn Ala Pro Gly Ile  
 1220 1225 1230

Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu Ala Val Lys Leu Arg Asp Leu Lys  
 1235 1240 1245

Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu Tyr Asp Asp Lys Asn Ala Ser  
 1250 1255 1260

Leu Gly Leu Val Gly Thr His Asn Gly Gln Ile Gly Asn Asp Pro  
 1265 1270 1275

Asn Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp Tyr Phe Asn His Leu  
 1280 1285 1290

Lys Asp Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro Thr Asp  
 1295 1300 1305

Glu Gly Trp Thr Asn Asp  
 1310

<210> 2  
 <211> 456  
 <212> PRT  
 <213> *Clostridium tetani*  
 <400> 2

5

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

Thr Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Tyr Cys Lys Gly Leu Asp Ile Tyr  
 20 25 30

Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Val Pro Glu Arg  
 35 40 45

Tyr Glu Phe Gly Thr Lys Pro Glu Asp Phe Asn Pro Pro Ser Ser Leu  
 50 55 60

Ile Glu Gly Ala Ser Glu Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Arg Thr Asp  
 65 70 75 80

10

ES 2 616 258 T3

Ser Asp Lys Asp Arg Phe Leu Gln Thr Met Val Lys Leu Phe Asn Arg  
85 90 95

Ile Lys Asn Asn Val Ala Gly Glu Ala Leu Leu Asp Lys Ile Ile Asn  
100 105 110

Ala Ile Pro Tyr Leu Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Leu Asp Lys Phe Asp  
115 120 125

Thr Asn Ser Asn Ser Val Ser Phe Asn Leu Leu Glu Gln Asp Pro Ser  
130 135 140

Gly Ala Thr Thr Lys Ser Ala Met Leu Thr Asn Leu Ile Ile Phe Gly  
145 150 155 160

Pro Gly Pro Val Leu Asn Lys Asn Glu Val Arg Gly Ile Val Leu Arg  
165 170 175

Val Asp Asn Lys Asn Tyr Phe Pro Cys Arg Asp Gly Phe Gly Ser Ile  
180 185 190

Met Gln Met Ala Phe Cys Pro Glu Tyr Val Pro Thr Phe Asp Asn Val  
195 200 205

Ile Glu Asn Ile Thr Ser Leu Thr Ile Gly Lys Ser Lys Tyr Phe Gln  
210 215 220

Asp Pro Ala Leu Leu Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly  
225 230 235 240

Leu Tyr Gly Met Gln Val Ser Ser His Glu Ile Ile Pro Ser Lys Gln  
245 250 255

Glu Ile Tyr Met Gln His Thr Tyr Pro Ile Ser Ala Glu Glu Leu Phe  
260 265 270

Thr Phe Gly Gly Gln Asp Ala Asn Leu Ile Ser Ile Asp Ile Lys Asn  
275 280 285

Asp Leu Tyr Glu Lys Thr Leu Asn Asp Tyr Lys Ala Ile Ala Asn Lys  
290 295 300

Leu Ser Gln Val Thr Ser Cys Asn Asp Pro Asn Ile Asp Ile Asp Ser  
305 310 315 320

Tyr Lys Gln Ile Tyr Gln Gln Lys Tyr Gln Phe Asp Lys Asp Ser Asn  
325 330 335

Gly Gln Tyr Ile Val Asn Glu Asp Lys Phe Gln Ile Leu Tyr Asn Ser





ES 2 616 258 T3

Pro Thr Thr Leu Gln Arg Ile Thr Met Thr Asn Ser Val Asp Asp Ala  
 115 120 125

Leu Ile Asn Ser Thr Lys Ile Tyr Ser Tyr Phe Pro Ser Val Ile Ser  
 130 135 140

Lys Val Asn Gln Gly Ala Gln Gly Ile Leu Phe Leu Gln Trp Val Arg  
 145 150 155 160

Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr Asn Glu Ser Ser Gln Lys Thr Thr Ile  
 165 170 175

Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser Thr Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala  
 180 185 190

Leu Asn Ile Val Lys Gln Gly Tyr Glu Gly Asn Phe Ile Gly Ala Leu  
 195 200 205

Glu Thr Thr Gly Val Val Leu Leu Leu Glu Tyr Ile Pro Glu Ile Thr  
 210 215 220

Leu Pro Val Ile Ala Ala Leu Ser Ile Ala Glu Ser Ser Thr Gln Lys  
 225 230 235 240

Glu Lys Ile Ile Lys Thr Ile Asp Asn Phe Leu Glu Lys Arg Tyr Glu  
 245 250 255

Lys Trp Ile Glu Val Tyr Lys Leu Val Lys Ala Lys Trp Leu Gly Thr  
 260 265 270

Val Asn Thr Gln Phe Gln Lys Arg Ser Tyr Gln Met Tyr Arg Ser Leu  
 275 280 285

Glu Tyr Gln Val Asp Ala Ile Lys Lys Ile Ile Asp Tyr Glu Tyr Lys  
 290 295 300

Ile Tyr Ser Gly Pro Asp Lys Glu Gln Ile Ala Asp Glu Ile Asn Asn  
 305 310 315 320

Leu Lys Asn Lys Leu Glu Glu Lys Ala Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile  
 325 330 335

Asn Ile Phe Met Arg Glu Ser Ser Arg Ser Phe Leu Val Asn Gln Met  
 340 345 350

Ile Asn Glu Ala Lys Lys Gln Leu Leu Glu Phe Asp Thr Gln Ser Lys  
 355 360 365

ES 2 616 258 T3

Asn Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile  
 370 375 380

Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys Val Phe Ser Thr  
 385 390 395 400

Pro Ile Pro Phe Ser Tyr Ser Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn  
 405 410 415

Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu  
 420 425 430

Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser  
 435 440 445

Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala Gln Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly Lys  
 450 455 460

Ala Ile His Leu Val Asn Asn Glu Ser Ser Glu Val Ile Val His Lys  
 465 470 475 480

Ala Met Asp Ile Glu Tyr Asn Asp Met Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser  
 485 490 495

Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gln Tyr  
 500 505 510

Gly Thr Asn Glu Tyr Ser Ile Ile Ser Ser Met Lys Lys His Ser Leu  
 515 520 525

Ser Ile Gly Ser Gly Trp Ser Val Ser Leu Lys Gly Asn Asn Leu Ile  
 530 535 540

Trp Thr Leu Lys Asp Ser Ala Gly Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe Arg  
 545 550 555 560

Asp Leu Pro Asp Lys Phe Asn Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val Phe  
 565 570 575

Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ile Asn  
 580 585 590

Gly Val Leu Met Gly Ser Ala Glu Ile Thr Gly Leu Gly Ala Ile Arg  
 595 600 605

Glu Asp Asn Asn Ile Thr Leu Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn Asn Asn  
 610 615 620

Gln Tyr Val Ser Ile Asp Lys Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Leu Asn

ES 2 616 258 T3

```

625                               630                               635                               640
Pro Lys Glu Ile Glu Lys Leu Tyr Thr Ser Tyr Leu Ser Ile Thr Phe
                               645                               650                               655
Leu Arg Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Tyr Tyr
                               660                               665                               670
Leu Ile Pro Val Ala Ser Ser Ser Lys Asp Val Gln Leu Lys Asn Ile
                               675                               685
Thr Asp Tyr Met Tyr Leu Thr Asn Ala Pro Ser Tyr Thr Asn Gly Lys
                               690                               695                               700
Leu Asn Ile Tyr Tyr Arg Arg Leu Tyr Asn Gly Leu Lys Phe Ile Ile
705                               710                               715                               720
Lys Arg Tyr Thr Pro Asn Asn Glu Ile Asp Ser Phe Val Lys Ser Gly
                               725                               730                               735
Asp Phe Ile Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Asn Asn Asn Glu His Ile Val
                               740                               745                               750
Gly Tyr Pro Lys Asp Gly Asn Ala Phe Asn Asn Leu Asp Arg Ile Leu
755                               760                               765
Arg Val Gly Tyr Asn Ala Pro Gly Ile Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu
770                               775                               780
Ala Val Lys Leu Arg Asp Leu Lys Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu
785                               790                               795                               800
Tyr Asp Asp Lys Asn Ala Ser Leu Gly Leu Val Gly Thr His Asn Gly
                               805                               810                               815
Gln Ile Gly Asn Asp Pro Asn Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp
                               820                               825                               830
Tyr Phe Asn His Leu Lys Asp Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr Phe
835                               840                               845
Val Pro Thr Asp Glu Gly Trp Thr Asn Asp
850                               855

```

<210> 4  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial



ES 2 616 258 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

5

<400> 9

**Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile**  
**1 5 10**

10

<210> 10  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 10

**Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu**  
**1 5 10**

20

<210> 11  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 11

30

**Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu**  
**1 5 10**

35

<210> 12  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 12

**Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser**  
**1 5 10**

45

<210> 13  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

50

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 13

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile**  
**1 5 10**

55

<210> 14  
 <211> 16

ES 2 616 258 T3

<212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 5 <223> Péptido Artificial

<400> 14

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

10 <210> 15  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Péptido Artificial

<400> 15

20 Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu  
 1 5 10 15

<210> 16  
 <211> 16  
 25 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Péptido Artificial

30 <400> 16

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

35 <210> 17  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Péptido Artificial

<400> 17

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

45 <210> 18  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 50 <213> Artificial

<220>  
 <223> Péptido Artificial

55 <400> 18

ES 2 616 258 T3

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

Lys Leu

5 <210> 19  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 10 <400> 19

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

Glu Ser

15 <210> 20  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 20

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

Lys Ile

25 <210> 21  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 35 <400> 21

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

Lys Leu Glu Ser  
 20

40 <210> 22  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 45 <220>

ES 2 616 258 T3

<223> Péptido Artificial

<400> 22

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

Glu Ser Lys Ile  
20

5

<210> 23

<211> 22

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

15 <400> 23

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

Lys Leu Glu Ser Lys Ile  
20

20

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Péptido Artificial

<400> 24

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys  
1 5 10 15

Val Phe

30

<210> 25

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 25

40

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

Thr Ile Ile Met Met Glu  
20

<210> 26

<211> 22

ES 2 616 258 T3

<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 26

Val Asn Asn Asp Thr Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Tyr Cys Lys Gly  
1 5 10 15

Leu Asp Ile Tyr Tyr Lys  
20

10 <210> 27  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Péptido Artificial

20 <400> 27

Tyr Cys Lys Gly Leu Asp Ile Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp  
1 5 10 15

Arg Ile Trp Ile Val Pro  
20

25 <210> 28  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 28

Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Val Pro Glu Arg Tyr Glu Phe Gly  
1 5 10 15

Thr Lys Pro Glu Asp Phe  
20

35 <210> 29  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 29

ES 2 616 258 T3

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

Ile Glu Gly Ala Ser Glu  
 20

5 <210> 30  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 30

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

Leu Arg Thr Asp Ser Asp  
 20

15 <210> 31  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 31

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

Thr Met Val Lys Leu Phe  
 20

25 <210> 32  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 32

Arg Phe Leu Gln Thr Met Val Lys Leu Phe Asn Arg Ile Lys Asn Asn  
 1 5 10 15

Val Ala Gly Glu Ala Leu  
 20

40 <210> 33  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>

ES 2 616 258 T3

<223> Péptido Artificial

<400> 33

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

Ala Ile Pro Tyr Leu Gly  
20

5

<210> 34

<211> 22

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

15

<400> 34

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

Asp Lys Phe Asp Thr Asn  
20

20

<210> 35

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 35

Tyr Ser Leu Leu Asp Lys Phe Asp Thr Asn Ser Asn Ser Val Ser Phe  
1 5 10 15

Asn Leu Leu Glu Gln Asp  
20

30

<210> 36

<211> 22

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

40

<400> 36

Ser Val Ser Phe Asn Leu Leu Glu Gln Asp Pro Ser Gly Ala Thr Thr  
1 5 10 15

Lys Ser Ala Met Leu Thr  
20

ES 2 616 258 T3

<210> 37  
<211> 22  
<212> PRT  
5 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> Péptido Artificial  
  
10 <400> 37  
  
Gly Ala Thr Thr Lys Ser Ala Met Leu Thr Asn Leu Ile Ile Phe Gly  
1 5 10 15  
  
Pro Gly Pro Val Leu Asn  
20  
  
15 <210> 38  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
20 <223> Péptido Artificial  
  
<400> 38  
  
Ile Ile Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Lys Asn Glu Val Arg Gly  
1 5 10 15  
  
Ile Val Leu Arg Val Asp  
20  
  
25 <210> 39  
<211> 22  
<212> PRT  
30 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> Péptido Artificial  
  
35 <400> 39  
  
Glu Val Arg Gly Ile Val Leu Arg Val Asp Asn Lys Asn Tyr Phe Pro  
1 5 10 15  
  
Cys Arg Asp Gly Phe Gly  
20  
  
40 <210> 40  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
45 <223> Péptido Artificial  
  
<400> 40

ES 2 616 258 T3

Asn Tyr Phe Pro Cys Arg Asp Gly Phe Gly Ser Ile Met Gln Met Ala  
 1 5 10 15

Phe Cys Pro Glu Tyr Val  
 20

5 <210> 41  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido Artificial

<400> 41

Met Gln Met Ala Phe Cys Pro Glu Tyr Val Pro Thr Phe Asp Asn Val  
 1 5 10 15

Ile Glu Asn Ile Thr Ser  
 20

15 <210> 42  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido Artificial

<400> 42

Phe Asp Asn Val Ile Glu Asn Ile Thr Ser Leu Thr Ile Gly Lys Ser  
 1 5 10 15

Lys Tyr Phe Gln Asp Pro  
 20

25 <210> 43  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Péptido Artificial

<400> 43

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

Glu Leu Ile His Val Leu  
 20

40 <210> 44  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

ES 2 616 258 T3

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 44

5

Leu Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr Gly Met  
1 5 10 15

Gln Val Ser Ser His Glu  
20

<210> 45

<211> 22

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

15

<400> 45

Leu Tyr Gly Met Gln Val Ser Ser His Glu Ile Ile Pro Ser Lys Gln  
1 5 10 15

Glu Ile Tyr Met Gln His  
20

20

<210> 46

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 46

Pro Ser Lys Gln Glu Ile Tyr Met Gln His Thr Tyr Pro Ile Ser Ala  
1 5 10 15

Glu Glu Leu Phe Thr Phe  
20

30

<210> 47

<211> 22

<212> PRT

35

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

40

<400> 47

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

Leu Ile Ser Ile Asp Ile  
20

ES 2 616 258 T3

<210> 48  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 10  
 <400> 48  
 Gln Asp Ala Asn Leu Ile Ser Ile Asp Ile Lys Asn Asp Leu Tyr Glu  
 1 5 10 15  
 Lys Thr Leu Asn Asp Tyr  
 20  
 15  
 <210> 49  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 49  
 Asp Leu Tyr Glu Lys Thr Leu Asn Asp Tyr Lys Ala Ile Ala Asn Lys  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Gln Val Thr Ser  
 20  
 25  
 <210> 50  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 50  
 35  
 Ile Ala Asn Lys Leu Ser Gln Val Thr Ser Cys Asn Asp Pro Asn Ile  
 1 5 10 15  
 Asp Ile Asp Ser Tyr Lys  
 20  
 40  
 <210> 51  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 45  
 <400> 51

ES 2 616 258 T3

Asp Pro Asn Ile Asp Ile Asp Ser Tyr Lys Gln Ile Tyr Gln Gln Lys  
 1 5 10 15

Tyr Gln Phe Asp Lys Asp  
 20

5 <210> 52  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 52

Tyr Gln Gln Lys Tyr Gln Phe Asp Lys Asp Ser Asn Gly Gln Tyr Ile  
 1 5 10 15

Val Asn Glu Asp Lys Phe  
 20

15 <210> 53  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 53

Gly Gln Tyr Ile Val Asn Glu Asp Lys Phe Gln Ile Leu Tyr Asn Ser  
 1 5 10 15

Ile Met Tyr Gly Phe Thr  
 20

25 <210> 54  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 35 <400> 54

Leu Tyr Asn Ser Ile Met Tyr Gly Phe Thr Glu Ile Glu Leu Gly Lys  
 1 5 10 15

Lys Phe Asn Ile Lys Thr  
 20

40 <210> 55  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

ES 2 616 258 T3

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 55

5

**Glu Leu Gly Lys Lys Phe Asn Ile Lys Thr Arg Leu Ser Tyr Phe Ser**  
 1 5 10 15

**Met Asn His Asp Pro Val**  
 20

<210> 56

<211> 22

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

15

<400> 56

**Ser Tyr Phe Ser Met Asn His Asp Pro Val Lys Ile Pro Asn Leu Leu**  
 1 5 10 15

**Asp Asp Thr Ile Tyr Asn**  
 20

20

<210> 57

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 57

**Pro Asn Leu Leu Asp Asp Thr Ile Tyr Asn Asp Thr Glu Gly Phe Asn**  
 1 5 10 15

**Ile Glu Ser Lys Asp Leu**  
 20

30

<210> 58

<211> 22

<212> PRT

35

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

40

<400> 58

**Glu Gly Phe Asn Ile Glu Ser Lys Asp Leu Lys Ser Glu Tyr Lys Gly**  
 1 5 10 15

**Gln Asn Met Arg Val Asn**  
 20

ES 2 616 258 T3

<210> 59  
<211> 22  
<212> PRT  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> Péptido Artificial

10 <400> 59

**Glu Tyr Lys Gly Gln Asn Met Arg Val Asn Thr Asn Ala Phe Arg Asn**  
**1 5 10 15**

**Val Asp Gly Ser Gly Leu**  
**20**

<210> 60  
15 <211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
20 <223> Péptido Artificial

<400> 60

**Ala Phe Arg Asn Val Asp Gly Ser Gly Leu Val Ser Lys Leu Ile Gly**  
**1 5 10 15**

**Leu Cys Lys Lys Ile Ile**  
**20**

25 <210> 61  
<211> 22  
<212> PRT  
30 <213> Artificial

<220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 61

35 <210> 62  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Péptido Artificial

40 <400> 62

45 <400> 62

**Lys Leu Ile Gly Leu Cys Lys Lys Ile Ile Pro Pro Thr Asn Ile Arg**  
**1 5 10 15**

**Glu Asn Leu Tyr Asn Arg**  
**20**

ES 2 616 258 T3

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

Leu Tyr Asn Arg Thr Ala  
20

5 <210> 63  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 63

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

Asp Leu Thr Phe Ile Ala  
20

15 <210> 64  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 64

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

Glu Glu Pro Phe Gln Asp  
20

25 <210> 65  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 65

Asn Ser Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gln Asp Glu Ile Val Ser Tyr Asn  
1 5 10 15

Thr Lys Asn Lys Pro Leu  
20

40 <210> 66  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

ES 2 616 258 T3

<223> Péptido Artificial

<400> 66

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

Asp Lys Ile Ile Val Asp  
20

5

<210> 67

<211> 22

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

15 <400> 67

Asn Tyr Ser Leu Asp Lys Ile Ile Val Asp Tyr Asn Leu Gln Ser Lys  
1 5 10 15

Ile Thr Leu Pro Asn Asp  
20

20 <210> 68

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Péptido Artificial

<400> 68

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

Lys Gly Ile Pro Tyr Ala  
20

30

<210> 69

<211> 22

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

40 <400> 69

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

Ala Ala Ser Thr Ile Glu  
20

<210> 70

ES 2 616 258 T3

<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Péptido Artificial  
  
<400> 70

Tyr Lys Ser Asn Ala Ala Ser Thr Ile Glu Ile His Asn Ile Asp Asp  
1 5 10 15

Asn Thr Ile Tyr Gln Tyr  
20

10  
  
15 <210> 71  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Péptido Artificial  
  
20 <400> 71

Asn Ile Asp Asp Asn Thr Ile Tyr Gln Tyr Leu Tyr Ala Gln Lys Ser  
1 5 10 15

Pro Thr Thr Leu Gln Arg  
20

25 <210> 72  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Péptido Artificial  
  
<400> 72

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

Val Asp Asp Ala Leu Ile  
20

35 <210> 73  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> Péptido Artificial  
  
<400> 73

ES 2 616 258 T3

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

Ser Tyr Phe Pro Ser Val  
20

5 <210> 74  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 74

Thr Lys Ile Tyr Ser Tyr Phe Pro Ser Val Ile Ser Lys Val Asn Gln  
1 5 10 15

Gly Ala Gln Gly Ile Leu  
20

15 <210> 75  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 75

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

Asp Ile Ile Asp Asp Phe  
20

25 <210> 76  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Péptido Artificial  
35 <400> 76

Gln Trp Val Arg Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr Asn Glu Ser Ser Gln  
1 5 10 15

Lys Thr Thr Ile Asp Lys  
20

40 <210> 77  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

ES 2 616 258 T3

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 77

5

Glu Ser Ser Gln Lys Thr Thr Ile Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser Thr  
1 5 10 15

Ile Val Pro Tyr Ile Gly  
20

<210> 78

<211> 22

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

15

<400> 78

Asp Val Ser Thr Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Val  
1 5 10 15

Lys Gln Gly Tyr Glu Gly  
20

20

<210> 79

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 79

30

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

Glu Thr Thr Gly Val Val  
20

35

<210> 80

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 80

Ile Gly Ala Leu Glu Thr Thr Gly Val Val Leu Leu Leu Glu Tyr Ile  
1 5 10 15

Pro Glu Ile Thr Leu Pro  
20

45

<210> 81

<211> 22

ES 2 616 258 T3

<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 81

Leu Glu Tyr Ile Pro Glu Ile Thr Leu Pro Val Ile Ala Ala Leu Ser  
1 5 10 15

Ile Ala Glu Ser Ser Thr  
20

10 <210> 82  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Péptido Artificial

20 <400> 82

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

Lys Thr Ile Asp Asn Phe  
20

25 <210> 83  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 83

Glu Lys Ile Ile Lys Thr Ile Asp Asn Phe Leu Glu Lys Arg Tyr Glu  
1 5 10 15

Lys Trp Ile Glu Val Tyr  
20

35 <210> 84  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 84

ES 2 616 258 T3

Lys Arg Tyr Glu Lys Trp Ile Glu Val Tyr Lys Leu Val Lys Ala Lys  
1 5 10 15

Trp Leu Gly Thr Val Asn  
20

5 <210> 85  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 85

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

Ser Tyr Gln Met Tyr Arg  
20

15 <210> 86  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 86

Phe Gln Lys Arg Ser Tyr Gln Met Tyr Arg Ser Leu Glu Tyr Gln Val  
1 5 10 15

Asp Ala Ile Lys Lys Ile  
20

25 <210> 87  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 87

Glu Tyr Gln Val Asp Ala Ile Lys Lys Ile Ile Asp Tyr Glu Tyr Lys  
1 5 10 15

Ile Tyr Ser Gly Pro Asp  
20

40 <210> 88  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

ES 2 616 258 T3

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 88

5

Tyr Glu Tyr Lys Ile Tyr Ser Gly Pro Asp Lys Glu Gln Ile Ala Asp  
1 5 10 15

Glu Ile Asn Asn Leu Lys  
20

<210> 89

<211> 22

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

15

<400> 89

Gln Ile Ala Asp Glu Ile Asn Asn Leu Lys Asn Lys Leu Glu Glu Lys  
1 5 10 15

Ala Asn Lys Ala Met Ile  
20

20

<210> 90

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 90

Leu Glu Glu Lys Ala Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Ile Phe Met  
1 5 10 15

Arg Glu Ser Ser Arg Ser  
20

30

<210> 91

<211> 22

<212> PRT

35

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

40

<400> 91

Asn Ile Phe Met Arg Glu Ser Ser Arg Ser Phe Leu Val Asn Gln Met  
1 5 10 15

Ile Asn Glu Ala Lys Lys  
20

ES 2 616 258 T3

5  
 <210> 92  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 92

10  
 Val Asn Gln Met Ile Asn Glu Ala Lys Lys Gln Leu Leu Glu Phe Asp  
 1 5 10 15  
 Thr Gln Ser Lys Asn Ile  
 20

15  
 <210> 93  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 93

20  
 Leu Glu Phe Asp Thr Gln Ser Lys Asn Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys  
 1 5 10 15  
 Ala Asn Ser Lys Phe Ile  
 20

25  
 <210> 94  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 94

30  
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Leu Glu Ser Lys Ile  
 20

35  
 <210> 95  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 95

40  
 <210> 95  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 95

45  
 <210> 95  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 95

ES 2 616 258 T3

Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys Val Phe Ser Thr  
 1 5 10 15

Pro Ile Pro Phe Ser Tyr  
 20

5 <210> 96  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 96

Val Phe Ser Thr Pro Ile Pro Phe Ser Tyr Ser Lys Asn Leu Asp Cys  
 1 5 10 15

Trp Val Asp Asn Glu Glu  
 20

15 <210> 97  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 97

Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile Leu  
 1 5 10 15

25 Lys Lys Ser Thr Ile Leu  
 20

30 <210> 98  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 98

Asp Val Ile Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu Asp Ile Asn Asn  
 1 5 10 15

Asp Ile Ile Ser Asp Ile  
 20

40 <210> 99  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>

ES 2 616 258 T3

<223> Péptido Artificial

<400> 99

Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser  
1 5 10 15

5 Val Ile Thr Tyr Pro Asp  
20

<210> 100

<211> 22

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

15 <400> 100

Phe Asn Ser Ser Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala Gln Leu Val Pro Gly  
1 5 10 15

Ile Asn Gly Lys Ala Ile  
20

20 <210> 101

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Péptido Artificial

<400> 101

Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly Lys Ala Ile His Leu Val Asn Asn Glu  
1 5 10 15

Ser Ser Glu Val Ile Val  
20

30 <210> 102

<211> 22

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 102

40

Val Asn Asn Glu Ser Ser Glu Val Ile Val His Lys Ala Met Asp Ile  
1 5 10 15

Glu Tyr Asn Asp Met Phe  
20

<210> 103

ES 2 616 258 T3

<211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Péptido Artificial

<400> 103

Ala Met Asp Ile Glu Tyr Asn Asp Met Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser  
 1 5 10 15

Phe Trp Leu Arg Val Pro  
 20

10

<210> 104  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Péptido Artificial

20

<400> 104

Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His  
 1 5 10 15

Leu Glu Gln Tyr Gly Thr  
 20

25

<210> 105  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30

<220>  
 <223> Péptido Artificial

<400> 105

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

Ser Ser Met Lys Lys His  
 20

35

<210> 106  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40

<220>  
 <223> Péptido Artificial

<400> 106

ES 2 616 258 T3

Tyr Ser Ile Ile Ser Ser Met Lys Lys His Ser Leu Ser Ile Gly Ser  
 1 5 10 15

Gly Trp Ser Val Ser Leu  
 20

5 <210> 107  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 107

Ser Ile Gly Ser Gly Trp Ser Val Ser Leu Lys Gly Asn Asn Leu Ile  
 1 5 10 15

Trp Thr Leu Lys Asp Ser  
 20

15 <210> 108  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 108

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

Ile Thr Phe Arg Asp Leu  
 20

25 <210> 109  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 35 <400> 109

Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe Arg Asp Leu Pro Asp Lys Phe Asn Ala  
 1 5 10 15

Tyr Leu Ala Asn Lys Trp  
 20

40 <210> 110  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

ES 2 616 258 T3

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 110

5

Lys Phe Asn Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val Phe Ile Thr Ile Thr  
1 5 10 15

Asn Asp Arg Leu Ser Ser  
20

<210> 111

<211> 22

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

15

<400> 111

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

Gly Val Leu Met Gly Ser  
20

20

<210> 112

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 112

Leu Tyr Ile Asn Gly Val Leu Met Gly Ser Ala Glu Ile Thr Gly Leu  
1 5 10 15

Gly Ala Ile Arg Glu Asp  
20

30

<210> 113

<211> 22

<212> PRT

35

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

40

<400> 113

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

Leu Asp Arg Cys Asn Asn  
20

ES 2 616 258 T3

<210> 114  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
  
 10 <400> 114  
  
     Ile Thr Leu Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn Asn Asn Gln Tyr Val Ser  
     1                  5                                  10                                  15  
  
     Ile Asp Lys Phe Arg Ile  
                   20  
  
 15 <210> 115  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
  
 <400> 115  
  
     Gln Tyr Val Ser Ile Asp Lys Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Leu Asn  
     1                  5                                  10                                  15  
  
     Pro Lys Glu Ile Glu Lys  
                   20  
  
 25  
  
 30 <210> 116  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
  
 35 <400> 116  
  
     Lys Ala Leu Asn Pro Lys Glu Ile Glu Lys Leu Tyr Thr Ser Tyr Leu  
     1                  5                                  10                                  15  
  
     Ser Ile Thr Phe Leu Arg  
                   20  
  
 40 <210> 117  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 45 <223> Péptido Artificial  
  
 <400> 117

ES 2 616 258 T3

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

Leu Arg Tyr Asp Thr Glu  
20

5 <210> 118  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 118

Trp Gly Asn Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Tyr Tyr Leu Ile Pro Val  
1 5 10 15

Ala Ser Ser Ser Lys Asp  
20

15 <210> 119  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 119

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

Thr Asp Tyr Met Tyr Leu  
20

25 <210> 120  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Péptido Artificial  
35 <400> 120

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

Thr Asn Gly Lys Leu Asn  
20

40 <210> 121  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

ES 2 616 258 T3

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 121

5

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

Tyr Asn Gly Leu Lys Phe  
20

<210> 122

<211> 22

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

15

<400> 122

Tyr Arg Arg Leu Tyr Asn Gly Leu Lys Phe Ile Ile Lys Arg Tyr Thr  
1 5 10 15

Pro Asn Asn Glu Ile Asp  
20

20

<210> 123

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 123

Lys Arg Tyr Thr Pro Asn Asn Glu Ile Asp Ser Phe Val Lys Ser Gly  
1 5 10 15

Asp Phe Ile Lys Leu Tyr  
20

30

<210> 124

<211> 22

<212> PRT

35

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

40

<400> 124

Val Lys Ser Gly Asp Phe Ile Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Asn Asn Asn  
1 5 10 15

Glu His Ile Val Gly Tyr  
20



ES 2 616 258 T3

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

Gln Leu Lys Leu Tyr Asp  
 20

5 <210> 129  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 129

Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu Tyr Asp Asp Lys Asn Ala Ser Leu  
 1 5 10 15

Gly Leu Val Gly Thr His  
 20

15 <210> 130  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 130

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

Asp Pro Asn Arg Asp Ile  
 20

25 <210> 131  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 35 <400> 131

Gln Ile Gly Asn Asp Pro Asn Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp  
 1 5 10 15

Tyr Phe Asn His Leu Lys  
 20

40 <210> 132  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

ES 2 616 258 T3

<220>  
<223> Péptido Artificial

5 <400> 132

Ala Ser Asn Trp Tyr Phe Asn His Leu Lys Asp Lys Ile Leu Gly Cys  
1 5 10 15

Asp Trp Tyr Phe Val Pro  
20

10 <210> 133  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 133

Leu Lys Asp Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro Thr Asp  
1 5 10 15

20 Glu Gly Trp Thr Asn Asp  
20

<210> 134  
<211> 14  
<212> PRT  
25 <213> Artificial

<220>  
<223> Péptido Artificial

30 <400> 134

Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys  
1 5 10

35 <210> 135  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 135

Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys  
1 5 10

45 <210> 136  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> Péptido Artificial

ES 2 616 258 T3

<400> 136

Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu  
1 5 10

5

<210> 137  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> Péptido Artificial

15

<400> 137

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile  
1 5 10

20

<210> 138  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

25

<220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 138

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

30

<210> 139  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

35

<220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 139

Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys  
1 5 10

40

<210> 140  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

45

<220>  
<223> Péptido Artificial

50

<400> 140

Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu  
1 5 10

55

<210> 141  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial



ES 2 616 258 T3

<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial  
5 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 146

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys**  
**1 5**

<210> 147  
<211> 8  
<212> PRT  
15 <213> Artificial  
<220>  
<223> Péptido Artificial  
20 <400> 147

**Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu**  
**1 5**

<210> 148  
<211> 8  
<212> PRT  
25 <213> Artificial  
<220>  
30 <223> Péptido Artificial  
<400> 148

**Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile**  
**1 5**

<210> 149  
<211> 8  
<212> PRT  
40 <213> Artificial  
<220>  
<223> Péptido Artificial  
45 <400> 149

**Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile**  
**1 5**

<210> 150  
<211> 8  
<212> PRT  
50 <213> Artificial  
<220>  
55 <223> Péptido Artificial  
<400> 150

ES 2 616 258 T3

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys  
1 5

5 <210> 151  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 151

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys  
1 5 10 15

Val Phe Ser Thr  
20

15 <210> 152  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 152

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys  
1 5 10 15

25 Val Phe Ser

30 <210> 153  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 153

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys  
1 5 10 15

Val Phe

40 <210> 154  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 154

ES 2 616 258 T3

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys  
 1 5 10 15

Val

5 <210> 155  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido Artificial

<400> 155

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys  
 1 5 10 15

15 <210> 156  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido Artificial

25 <400> 156

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn  
 1 5 10 15

30 <210> 157  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Péptido Artificial

<400> 157

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn  
 1 5 10

40 <210> 158  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Péptido Artificial

<400> 158

Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys  
 1 5 10

50 <210> 159  
 <211> 14  
 <212> PRT

ES 2 616 258 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

5

<400> 159

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

10

<210> 160  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

15

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 160

Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys Val Phe  
1 5 10

20

<210> 161  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

25

<220>

<223> Péptido Artificial

30

<400> 161

Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys Val Phe Ser  
1 5 10

35

<210> 162  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

40

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 162

Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys Val Phe Ser Thr  
1 5 10

45

<210> 163  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

50

<220>

<223> Péptido Artificial

55

<220>

<221> MOD\_RES  
<222> (8)..(8)  
<223> FORMILACIÓN

ES 2 616 258 T3

<400> 163

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Leu Lys Leu Glu Ser Lys Ile  
1 5 10

5 <210> 164  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Péptido Artificial

<220>  
15 <221> MOD\_RES  
<222> (9)..(9)  
<223> FORMILACIÓN

<400> 164

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Leu Leu Glu Ser Lys Ile  
1 5 10

20 <210> 165  
<211> 14  
<212> PRT  
25 <213> Artificial

<220>  
<223> Péptido Artificial

30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)..(13)  
<223> FORMILACIÓN

35 <400> 165

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Leu Ile  
1 5 10

40 <210> 166  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Péptido Artificial

<220>  
50 <221> MOD\_RES  
<222> (8)..(9)  
<223> FORMILACIÓN

<400> 166

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Leu Leu Leu Glu Ser Lys Ile  
1 5 10

55 <210> 167  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
 <223> Péptido Artificial

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> FORMILACIÓN

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> FORMILACIÓN

15 <400> 167

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Leu Lys Leu Glu Ser Leu Ile  
 1 5 10

20 <210> 168  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Péptido Artificial

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> FORMILACIÓN

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> FORMILACIÓN

<400> 168

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Leu Leu Glu Ser Leu Ile  
 1 5 10

40 <210> 169  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Péptido Artificial

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223> FORMILACIÓN

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)..(9)  
 <223> FORMILACIÓN

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> FORMILACIÓN

ES 2 616 258 T3

<400> 169

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Leu Leu Leu Glu Ser Leu Ile  
1 5 10

5 <210> 170  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 170

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

15 Asn Lys Val Phe  
20

<210> 171  
<211> 18  
<212> PRT  
20 <213> Artificial

<220>  
<223> Péptido Artificial

25 <400> 171

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys  
1 5 10 15

Val Phe

30 <210> 172  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 172

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys  
1 5 10 15

Val Phe

40 <210> 173  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 173

ES 2 616 258 T3

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys**  
**1 5 10 15**

**Val**

5 <210> 174  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 174

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys**  
**1 5 10 15**

15 <210> 175  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido Artificial

25 <400> 175

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn**  
**1 5 10 15**

30 <210> 176  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Péptido Artificial  
 <400> 176

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile**  
**1 5 10**

40 <210> 177  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Péptido Artificial

50 <400> 177

**Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys**  
**1 5 10 15**

**Lys Leu Glu Ser Lys Ile**  
**20**

ES 2 616 258 T3

5 <210> 178  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Péptido Artificial

10 <400> 178

**Ser Leu Thr Asp Leu Gly Gly Glu Leu Cys Ile Lys Ile Lys Asn Glu**  
**1 5 10 15**

**Asp Leu Thr Phe Ile Ala**  
**20**

15 <210> 179  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 179

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys**  
**1 5 10 15**

**Val Phe**

25 <210> 180  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 180

**Ala Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys**  
**1 5 10 15**

35 **Val Phe**

40 <210> 181  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Péptido Artificial

45 <400> 181

ES 2 616 258 T3

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

Val Phe

5 <210> 182  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 182

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

Val Phe

15 <210> 183  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 183

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

Val Phe

25 <210> 184  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Péptido Artificial  
<400> 184

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

Val Phe

40 <210> 185  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Péptido Artificial

ES 2 616 258 T3

<400> 185

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

Val Phe

5 <210> 186  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 186

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

Val Phe

15 <210> 187  
<211> 18  
<212> PRT  
20 <213> Artificial

<220>  
<223> Péptido Artificial

25 <400> 187

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

Val Phe

30 <210> 188  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 188

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

Val Phe

40 <210> 189  
<211> 18  
<212> PRT  
45 <213> Artificial

<220>

ES 2 616 258 T3

<223> Péptido Artificial

<400> 189

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

5 Val Phe

<210> 190

<211> 18

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

15 <400> 190

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

Val Phe

<210> 191

20 <211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Péptido Artificial

<400> 191

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

Val Phe

30 <210> 192

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> Péptido Artificial

<400> 192

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

40 Val Phe

<210> 193

<211> 18

<212> PRT

45 <213> Artificial

ES 2 616 258 T3

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 193

5

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ala Asn Lys**  
**1 5 10 15**

**Val Phe**

<210> 194

<211> 18

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

15

<400> 194

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Ala Lys**  
**1 5 10 15**

**Val Phe**

<210> 195

<211> 18

20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

25

<400> 195

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Ala**  
**1 5 10 15**

**Val Phe**

30

<210> 196

<211> 18

<212> PRT

35

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 196

40

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys**  
**1 5 10 15**

**Ala Phe**

<210> 197

<211> 18

45

<212> PRT

ES 2 616 258 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

5

<400> 197

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys**  
**1 5 10 15**

**Val Ala**

10

<210> 198

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 198

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys**  
**1 5 10 15**

**Val Phe**

20

<210> 199

<211> 18

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

30

<400> 199

**Tyr Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys**  
**1 5 10 15**

**Val Phe**

35

<210> 200

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 200

**Phe Leu Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys**  
**1 5 10 15**

**Val Phe**

45

<210> 201

ES 2 616 258 T3

<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Péptido Artificial  
  
<400> 201

**Phe Ile Ser Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys**  
1 5 10 15

10 **Val Phe**

<210> 202  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Péptido Artificial

20 <400> 202

**Phe Ile Gly Leu Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys**  
1 5 10 15

**Val Phe**

<210> 203  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> Péptido Artificial

30 <400> 203

**Phe Ile Gly Ile Ser Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys**  
1 5 10 15

**Val Phe**

<210> 204  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> Péptido Artificial

40 <400> 204

**Phe Ile Gly Ile Thr Asp Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys**  
1 5 10 15

45 **Val Phe**

<210> 205

ES 2 616 258 T3

<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 205

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Ile Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys  
1 5 10 15

10 Val Phe

<210> 206  
<211> 18  
<212> PRT  
15 <213> Artificial

<220>  
<223> Péptido Artificial

20 <400> 206

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

Val Phe

25 <210> 207  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Péptido Artificial

<400> 207

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

35 Val Phe

<210> 208  
<211> 18  
<212> PRT  
40 <213> Artificial

<220>  
<223> Péptido Artificial

45 <400> 208

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Ile Glu Ser Lys Ile Asn Lys  
1 5 10 15

Val Phe

ES 2 616 258 T3

5 <210> 209  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Péptido Artificial

10 <400> 209

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Ser Lys Ile Asn Lys**  
 1 5 10 15

**Val Phe**

15 <210> 210  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido Artificial

<400> 210

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Thr Lys Ile Asn Lys**  
 1 5 10 15

**Val Phe**

25 <210> 211  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Péptido Artificial

<400> 211

35 **Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Arg Ile Asn Lys**  
 1 5 10 15

**Val Phe**

40 <210> 212  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Péptido Artificial

<400> 212

ES 2 616 258 T3

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Leu Asn Lys**  
1 5 10 15

**Val Phe**

5 <210> 213  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
10 <223> Péptido Artificial  
  
<400> 213

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

**Val Phe**

15 <210> 214  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
20 <220>  
<223> Péptido Artificial  
  
<400> 214

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Arg**  
1 5 10 15

**Val Phe**

25 <210> 215  
<211> 18  
<212> PRT  
30 <213> Artificial  
  
<220>  
35 <223> Péptido Artificial  
<400> 215

**Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys**  
1 5 10 15

**Leu Phe**

40 <210> 216  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
45 <223> Péptido Artificial  
  
<400> 216

ES 2 616 258 T3

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys  
1 5 10 15

Val Tyr

5 <210> 217  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
10 <220>  
<223> Péptido Sintético 30  
  
<400> 217

Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu Ser Lys Ile Asn Lys  
1 5 10 15

Val Phe Ala Ala Lys Tyr Ala Arg Val Arg Ala Lys Cys  
20 25

15 <210> 218  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
20 <220>  
<223> Péptido Sintético 31  
  
25 <400> 218

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

Ala Ala Lys

30 <210> 219  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Epítopo  
  
35 <400> 219

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu  
1 5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un conjugado, que comprende un péptido conjugado con un antígeno, inmunógeno o con un vehículo que comprende un antígeno o inmunógeno, en el que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 8, 9, 12, 13, 16, 17, 19-24, 151-158, 163-166, 168, 172-176, 179-182, 185-197, 198-208 y 210-216, y en el que el antígeno, el inmunógeno o el vehículo que comprende el antígeno o inmunógeno está conjugado con el extremo C terminal del péptido.
- 10 2. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos como se proporciona en una cualquiera de las SEQ ID NO: 12, 13, 16, 17 y 19-24.
- 15 3. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO: 24.
- 20 4. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que de 2 a 20 péptidos están unidos con el antígeno, inmunógeno o el vehículo que comprende el antígeno o inmunógeno.
- 25 5. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en el que el antígeno o el inmunógeno es un antígeno tumoral o inmunógeno tumoral o un antígeno de patógeno o inmunógeno de patógeno.
- 30 6. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, para uso como un medicamento.
- 35 7. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, para uso en la prevención o el tratamiento de cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto.
- 40 8. Uso de un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto.
- 45 9. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 7 o un uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el sujeto tiene anticuerpos contra la toxina del tétanos o el toxoide del tétanos.
- 50 10. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 7 o un uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el sujeto es un sujeto al que se ha administrado una vacuna para generar anticuerpos en circulación para la toxina del tétanos al menos 2 semanas antes de administrar el conjugado.
11. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 7 o un uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha enfermedad infecciosa es una enfermedad vírica, bacteriana, fúngica o parasitaria.
12. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 7 o un uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho cáncer se selecciona entre cánceres de pulmón, de colon, de esófago, de ovario, de páncreas, de piel, gástrico, de cabeza y cuello, de vejiga, sarcoma, de próstata, hepatocelular, de cerebro, adrenal, de mama, endometrial, mesotelioma, renal, tiroideo, hematológico, carcinoide, melanoma, paratiroideo, de cuello uterino, neuroblastoma, de Wilms, de testículo, de hipófisis o feocromocitoma.
13. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 8, 9, 12, 13, 16, 17, 19-24, 151-158, 163-166, 168, 172-176, 179-182, 185-197, 198-208 y 210-216.
14. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 13, que consiste en la secuencia de aminoácidos como se proporciona en una cualquiera de SEQ ID NO: 12, 13, 16, 17 y 19-24.
15. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos como se proporciona en SEQ ID NO: 24.

Fig 1

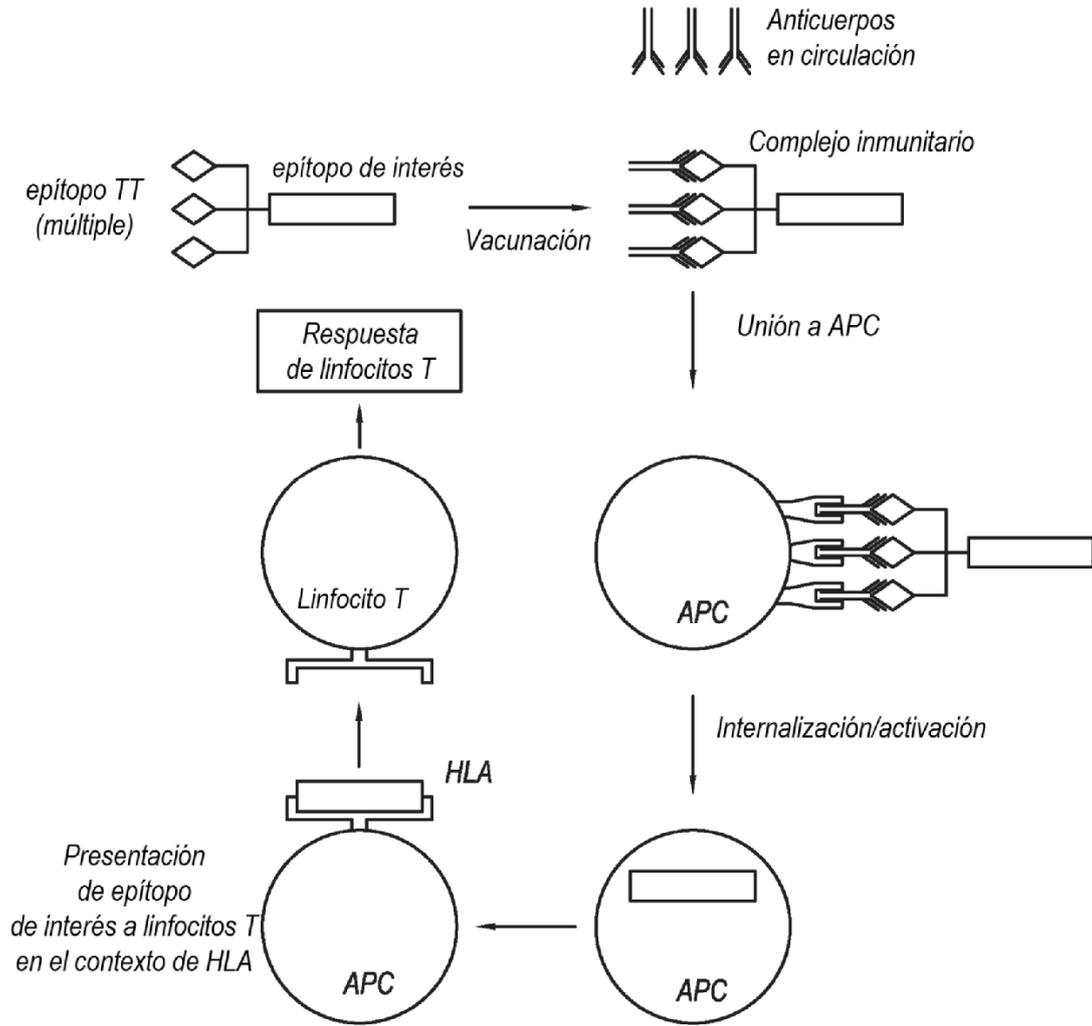


Fig 2a

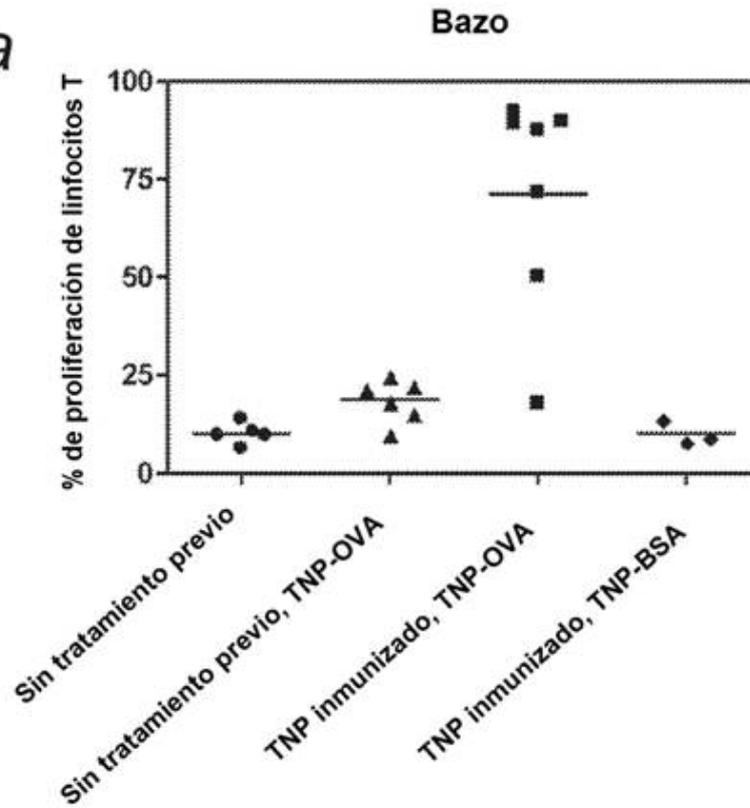
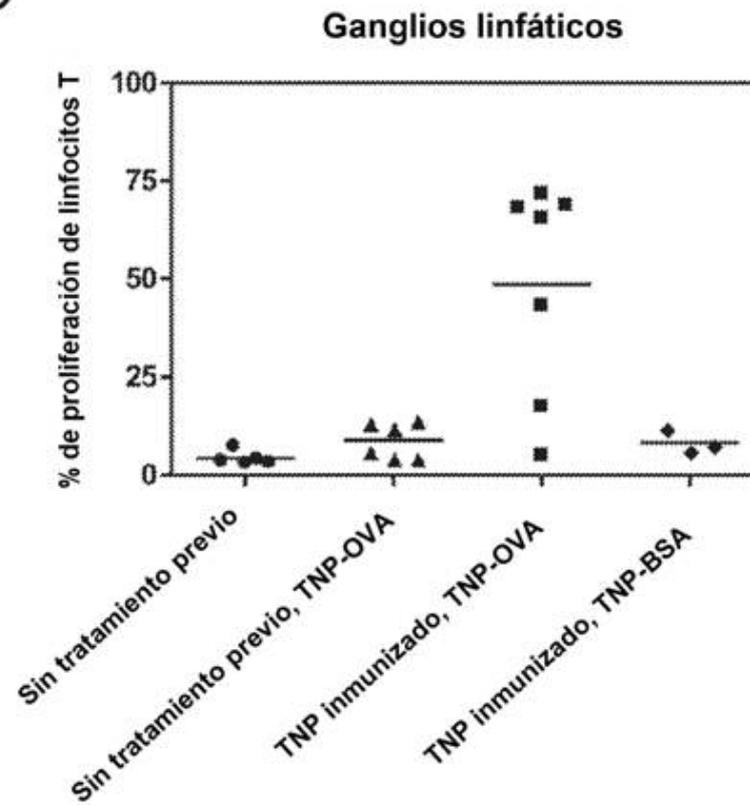
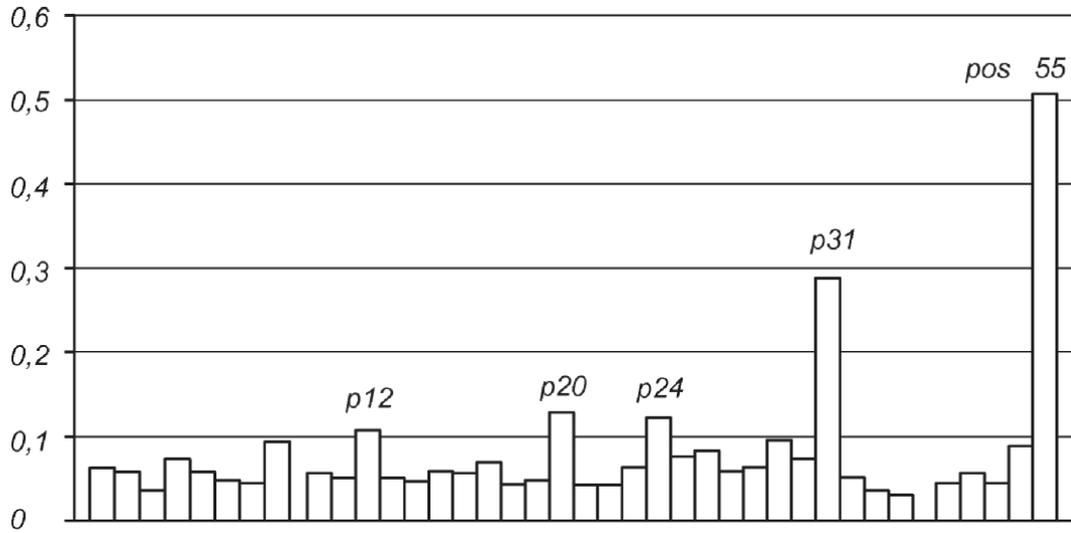


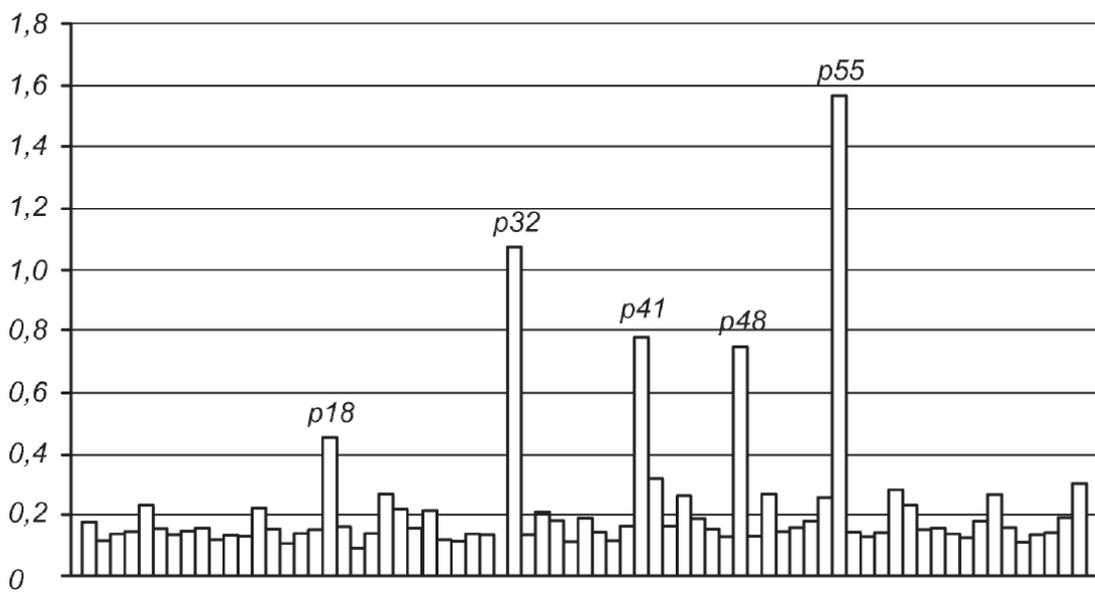
Fig 2b



*Fig 3*

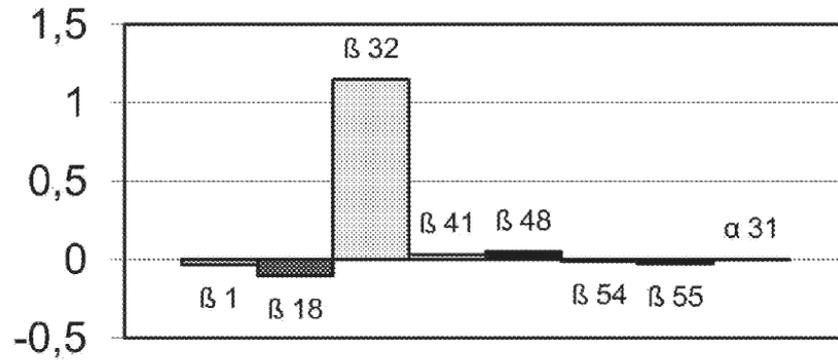


*Fig 4*



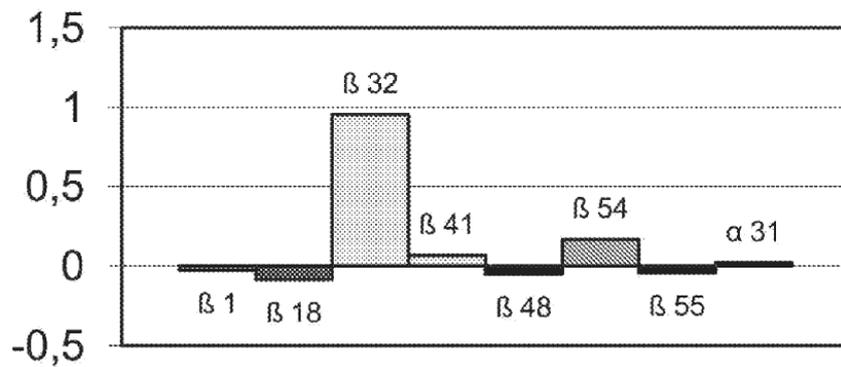
*Fig 5a*

**suero N.º034758**



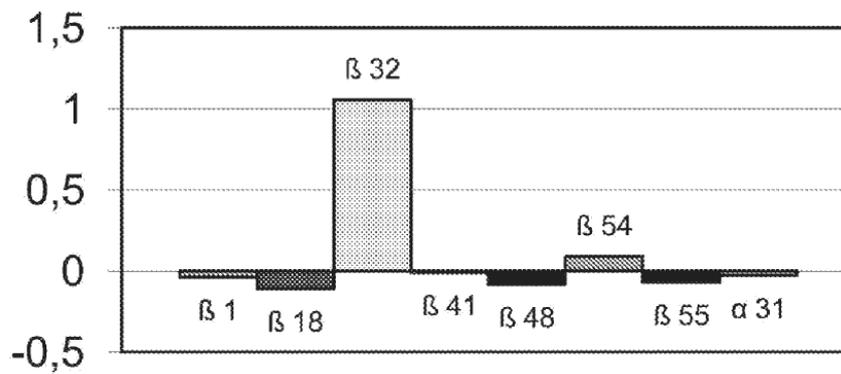
*Fig 5b*

**suero N.º034773**



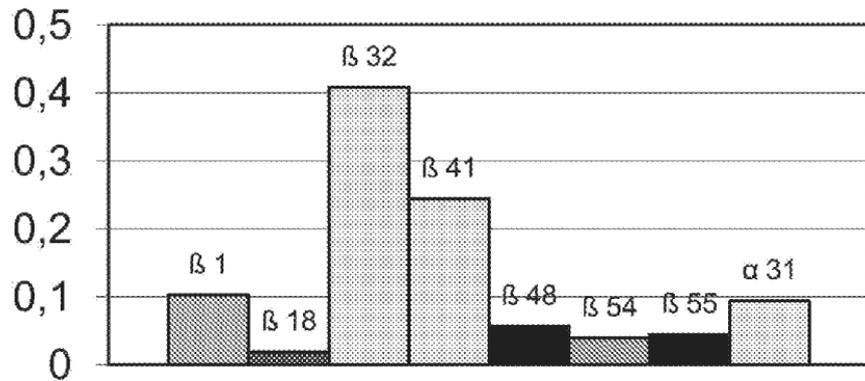
*Fig 5c*

**suero N.º033994**



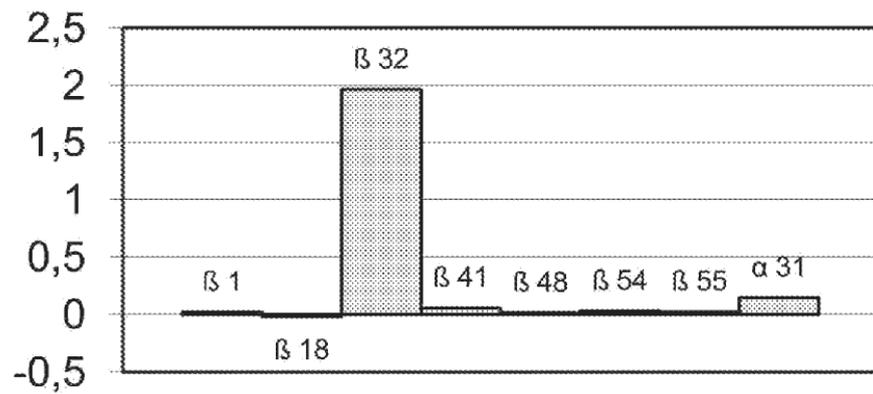
*Fig 5d*

**suero N.º034986**



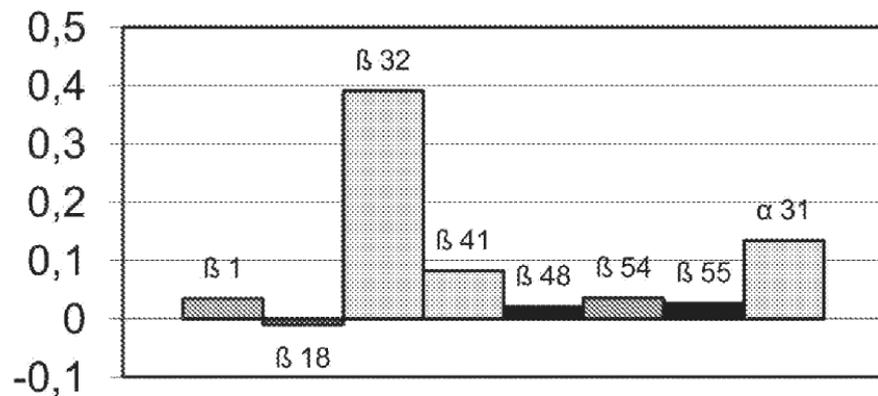
*Fig 5e*

**suero N.º034876**



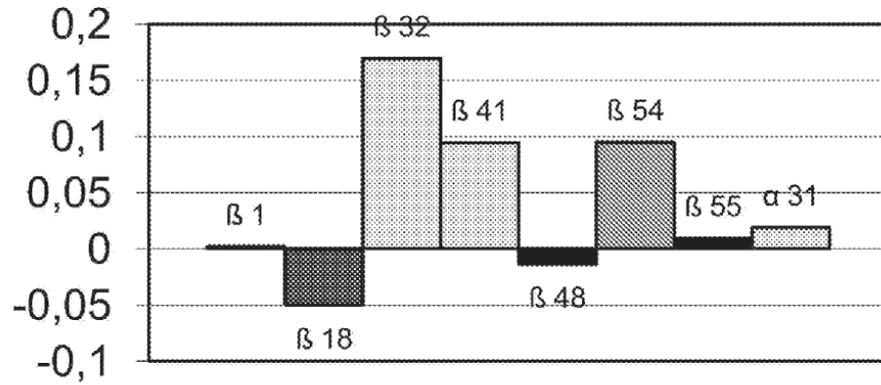
*Fig 5f*

**suero N.º035222**



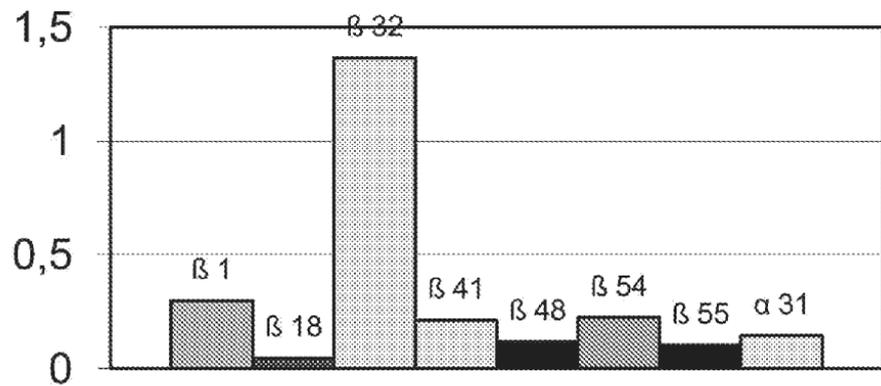
*Fig 5g*

**suero N.º035407**



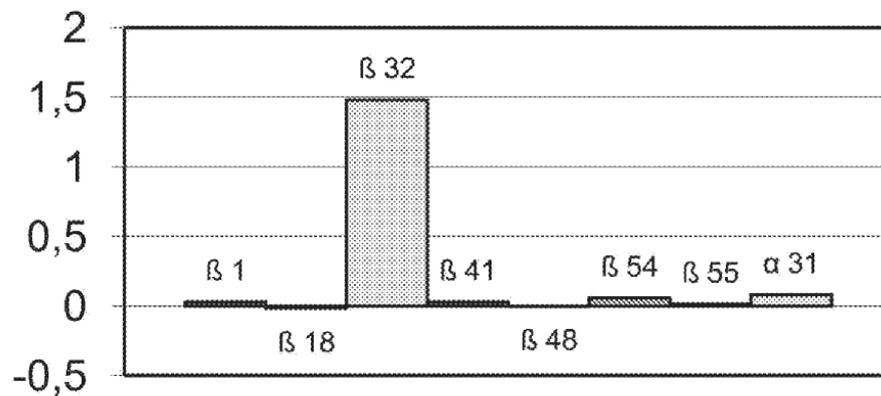
*Fig 5h*

**suero N.º035400**



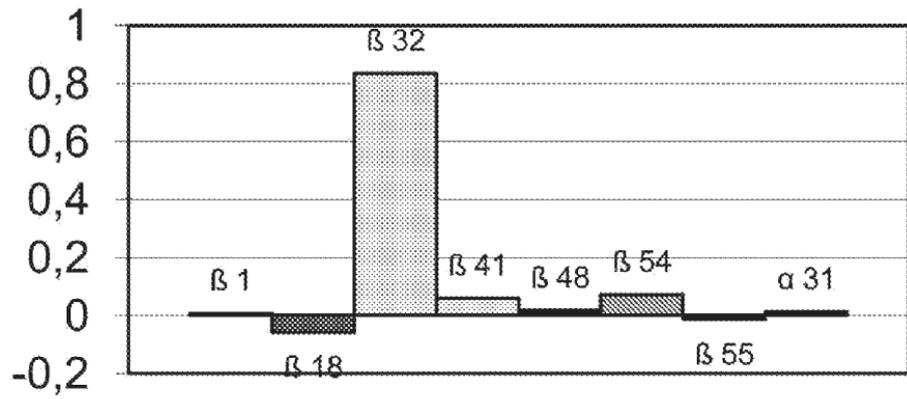
*Fig 5i*

**suero N.º035040**



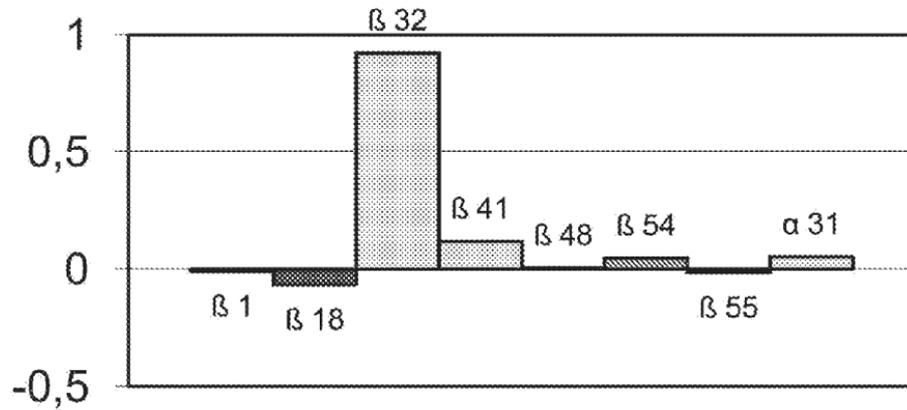
*Fig 5j*

**suero N.º508-0285**



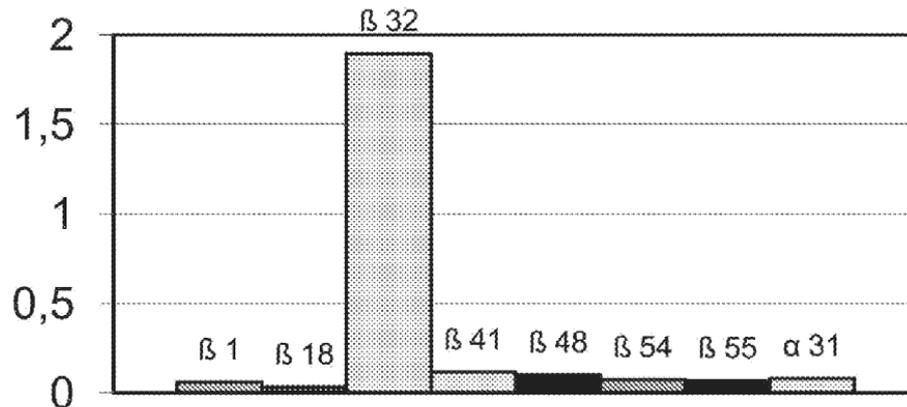
*Fig 5k*

**suero N.º035463**



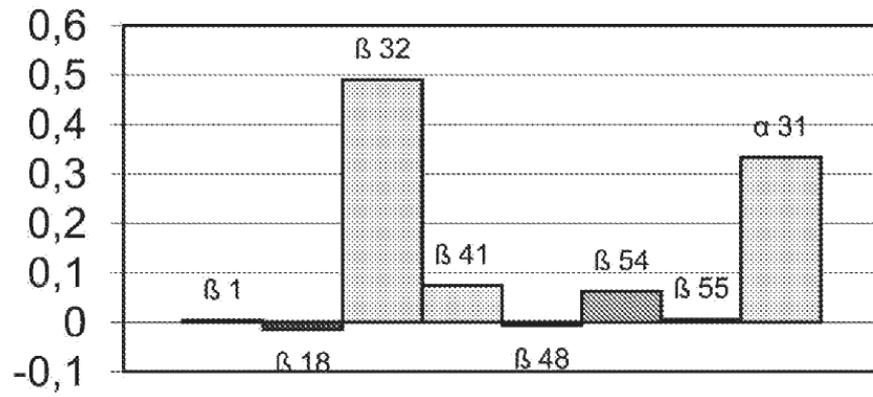
*Fig 5l*

**suero N.º034960**



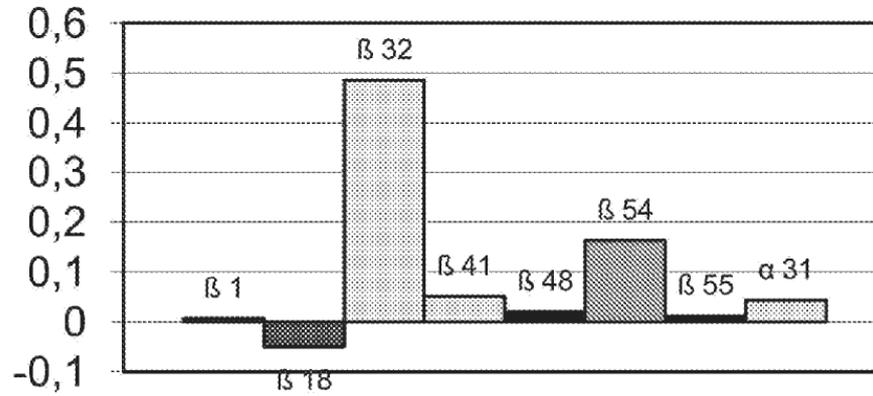
*Fig 5m*

**suero N.º034872**



*Fig 5n*

**suero N.º035415**



*Fig 5o*

**Tetaquin**

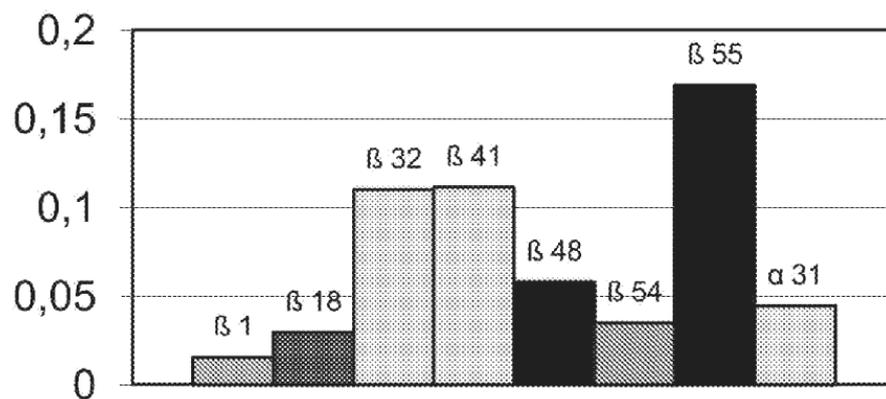


Fig 6

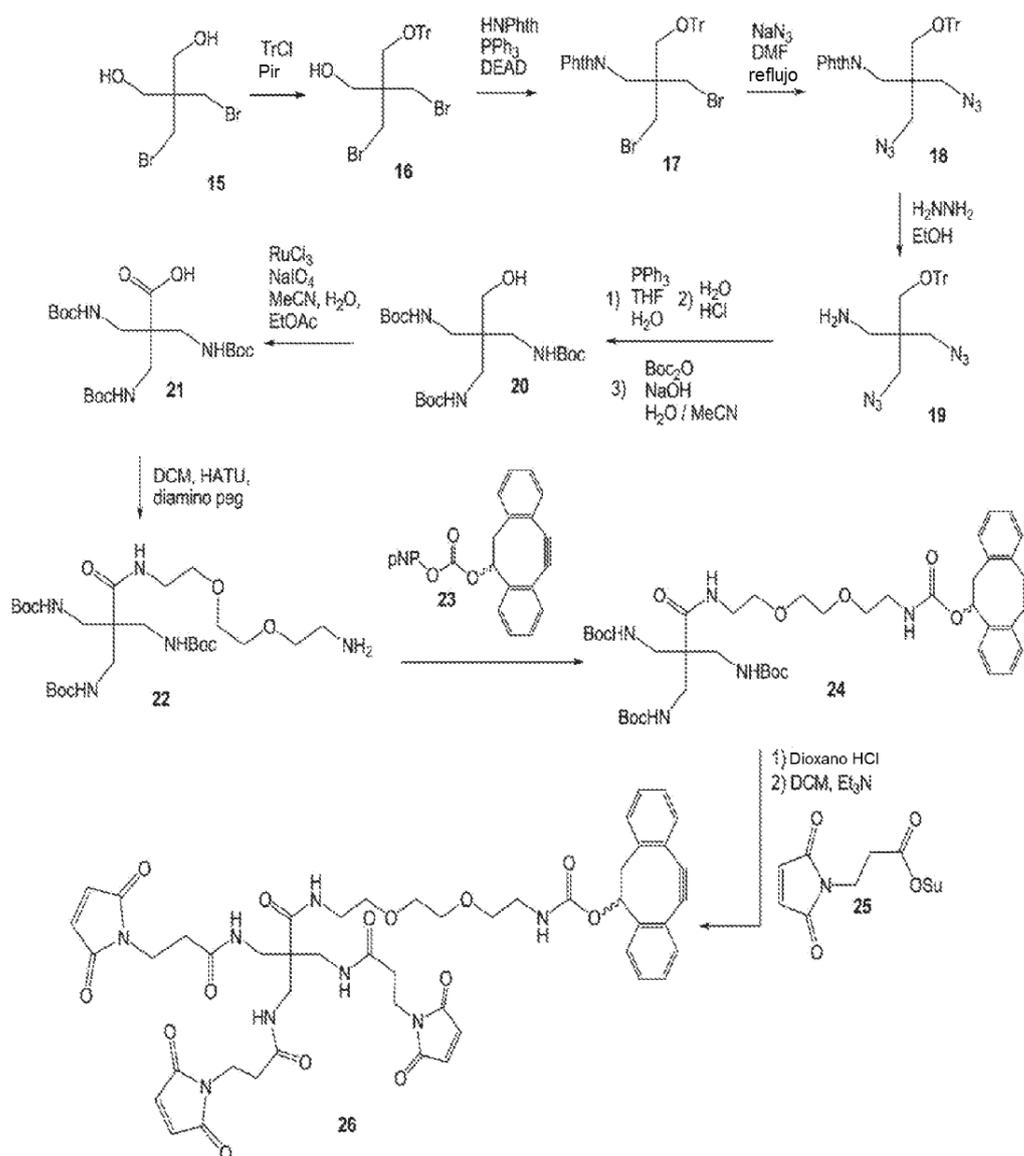
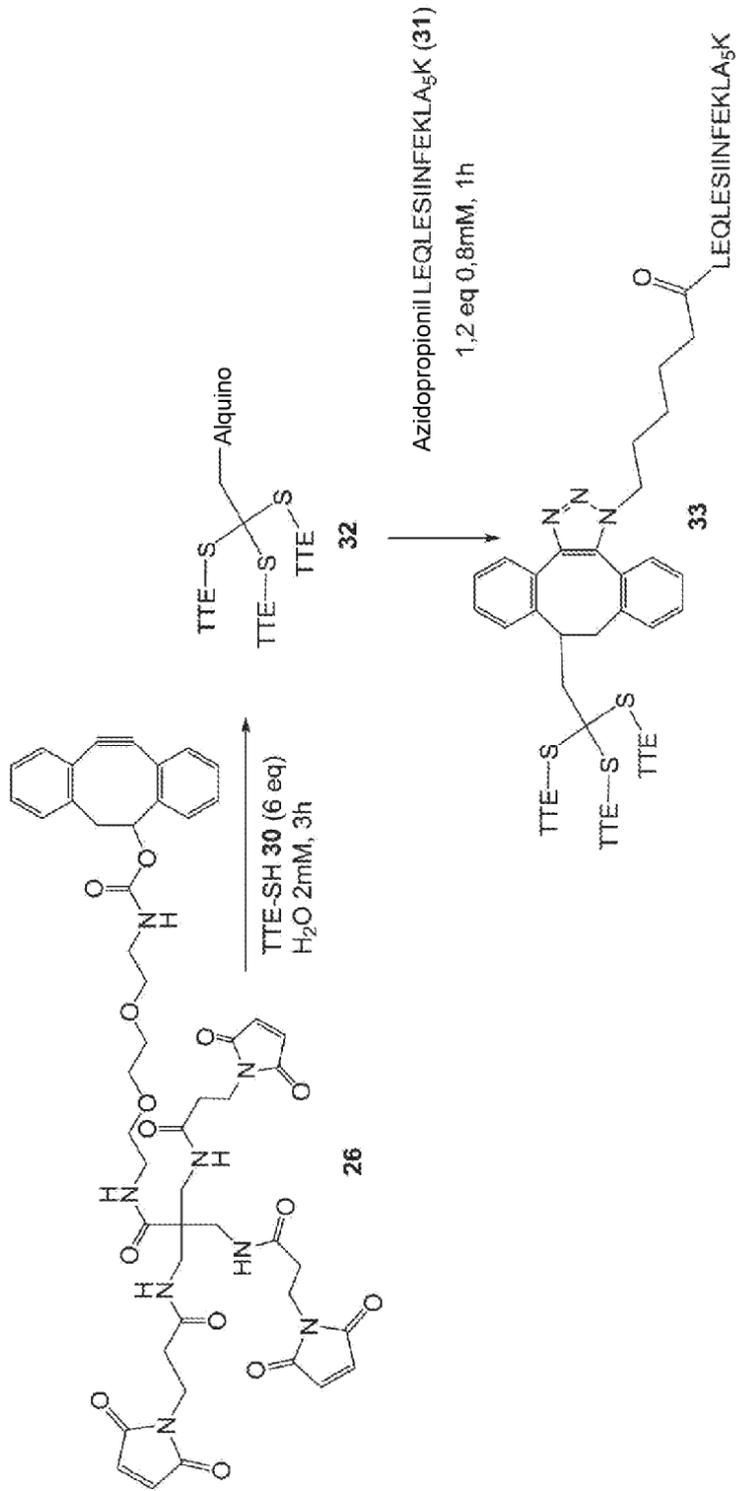
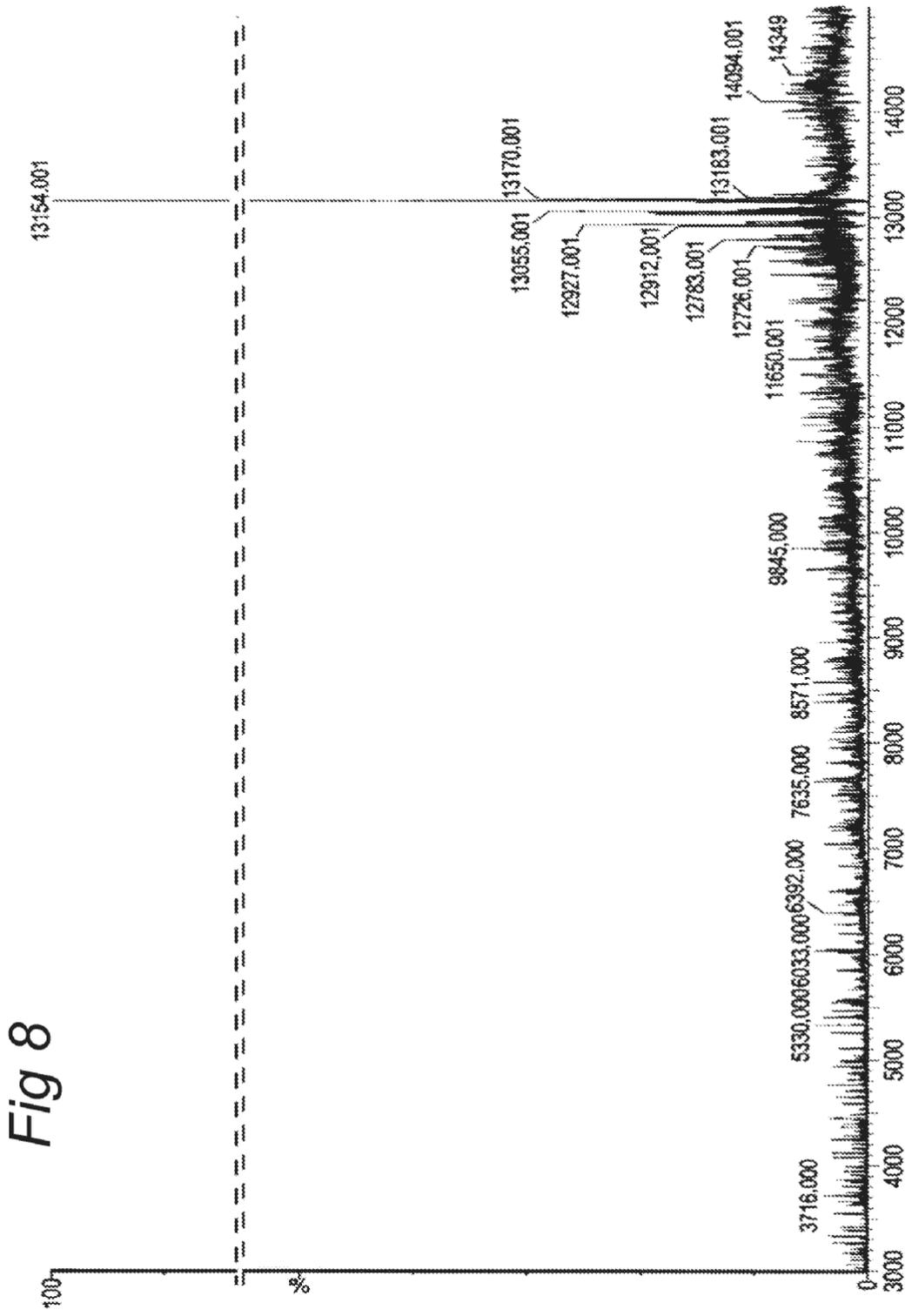
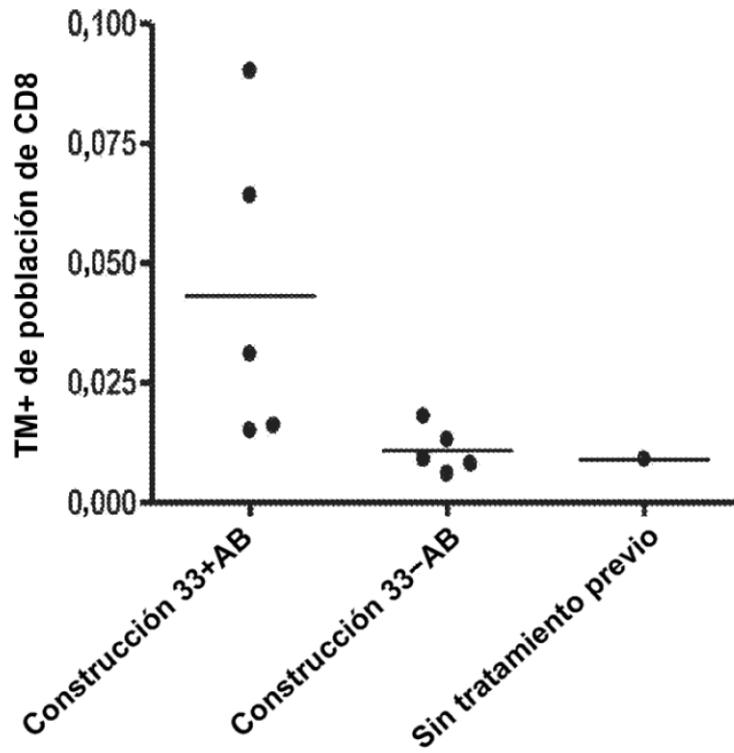


Fig 7





*Fig 9a*



*Fig 9b*

