

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 892**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/295** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2010 PCT/US2010/002330**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2011 WO11031298**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2010 E 10815729 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2470554**

54 Título: **Composiciones que inducen la ayuda de las células T**

30 Prioridad:

**06.01.2010 US 335611 P**  
**26.08.2009 US 237147 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.11.2017**

73 Titular/es:

**SELECTA BIOSCIENCES, INC. (100.0%)**  
**480 Arsenal Street Building One**  
**Watertown, MA 02472, US**

72 Inventor/es:

**FRASER, CHRISTOPHER;**  
**LIPFORD, GRAYSON, B.;**  
**LAMOTHE, ROBERT y**  
**ALTREUTER, DAVID, H.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 641 892 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

Composiciones que inducen la ayuda de las células T

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La actividad de ciertas vacunas puede mejorarse mediante el suministro concomitante de ayuda de las células T. La ayuda de las células T puede inducirse a través de la presentación de ciertos antígenos de péptidos que pueden formar complejos con MHC II. Son necesarias composiciones y métodos que puedan inducir la ayuda de las células T mejorada para una respuesta de la vacuna.

Las proteínas con poliepítopos que comprenden péptidos de unión a MHC II enlazados por enlazantes Lys-Gly se divulgan en WO99/55730 y en Falugi et al., Eur. J. Immunol. (2001) 31:3816-3824.

## 10 COMPENDIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende nanoportadores que comprende: A – x – B;

15 y un excipiente farmacéuticamente aceptable; en donde x comprende un sitio de escisión de catepsina que comprende KSVSR; en donde A comprende un primer péptido de unión a MHC II, comprendiendo el primer péptido de unión a MHC II un péptido que tiene al menos 70% de identidad con un péptido de unión a HLA-DP natural, un péptido que tiene al menos 70% de identidad con un péptido de unión a HLA-DQ natural o un péptido que tiene al menos 70% de identidad con un péptido de unión a HLA-DR natural; en donde B comprende un segundo péptido de unión a MHC II, comprendiendo el segundo péptido de unión a MHC II un péptido que tiene al menos 70% de identidad con un péptido de unión a HLA-DP natural, un péptido que tiene al menos 70% de identidad con un péptido de unión a HLA-DQ natural o un péptido que tiene al menos 70% de identidad con un péptido de unión a HLA-DR natural, y en donde A y B no tienen 100% de identidad entre sí.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende: uno o más ácidos nucleicos aislados que codifican una composición que comprende A – x – B como se ha definido anteriormente, en donde cuando hay más de un ácido nucleico aislado, los ácidos nucleicos aislados juntos codifican la composición que comprende A – x – B.

25 En un aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende A – x – B, en donde x comprende un sitio de escisión de catepsina que comprende KSVSR y en donde A – x – B comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75% de identidad con cualquiera de las secuencias de aminoácidos indicadas como SEQ ID NOs: 12, 14, 17, 19 y 39-44.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 La Figura 1 muestra un ejemplo representativo de los datos de citometría de flujo que muestran que la expresión de IFN- $\gamma$  estimuló las células T de la memoria central CD4+/ CD45RAbaja/ CD62Lalta.

35 La Figura 2 muestra el porcentaje de células T de la memoria central normalizadas a células T CD4+/ CD45Ramed/ CD62Lalta/ IFN- $\gamma$ + no estimuladas. Las quimeras de péptidos de Clase II proporcionan una respuesta de memoria de células T CD4 sólida. Los péptidos se agregaron a una concentración final de 4 $\mu$ M. Los testigos PBMC negativos y positivos no fueron estimulados o fueron estimulados con un grupo de 5 péptidos (5PP), respectivamente. Antes de los análisis citométricos de flujo, las células se tiñeron con CD4-FITC, CD45RA-PE y CD62LCy7PE. Luego las células se permeabilizaron, se fijaron y se tiñeron con IFN- $\gamma$ . Las células T de la memoria central son CD4+ / CD45Ramedia / CD62Lalta / IFN- $\gamma$ +. Los valores que se muestran son el porcentaje de células CD62L+/IFN- $\gamma$ + que se encuentra en una ventana CD4+/CD62L. Los valores se normalizaron restando los valores para un testigo no estimulado para cada donante.

40 La Figura 3 muestra el número (sobre 20) de donantes positivos para células T de memoria que responden a péptidos. Los donantes se consideraron positivos si los valores fueron mayores que 0,08% de respuesta de células T de memoria central en la población de CD4+CD45RAbaja.

45 La Figura 4 muestra ejemplos representativos de los datos de citometría de flujo que muestran la expresión de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en células T de memoria central CD4+/ CD45RAbaja/ CD62Lalta específica de péptidos. Las quimeras de péptidos de Clase II proporcionan una respuesta de memoria de células dendríticas / células T de memoria central CD4 sólida. Los monocitos se aislaron de PBMC por selección negativa de perlas magnéticas y se cultivaron en IL-4 y GM-CSF durante una semana para inducir la diferenciación de las células dendríticas (DC). Se aislaron células CD4+ autólogas de PBMC criopreservadas y se cultivaron junto con las DC en presencia o ausencia de péptido. La detección de la expresión de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en las células T de la memoria central fue como se describió anteriormente. Las células T de la memoria central inmaduras expresan IFN- $\gamma$ / TNF- $\alpha$  e IL-2; las células T de la memoria efectora comprometida expresan únicamente IL-4 o IFN- $\gamma$ .

50 La Figura 5 muestra la expresión porcentual de IL-4, TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  en células T de la memoria central CD4+/ CD45RAbaja/ CD62Lalta específicas de péptidos. Se muestra la expresión de citoquina en co-cultivo de células

dendríticas / células T CD4 autólogas en presencia o ausencia de péptido. Se muestra el número de células T de la memoria positiva de citoquina por 75000 eventos recolectadas por citometría de flujo (normalizada a no estimulada).

5 La Figura 6 muestra la co-expresión porcentual de TNF- $\alpha$  más IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  más IL-4 en células T de la memoria central CD4+/ CD45RAbaja/ CD62Lalta específicas de péptidos. Se muestra la co-expresión de citoquina en cultivo de células dendríticas / células T CD4 autólogas en presencia o ausencia de péptido.

La Figura 7 muestra variantes de TT830pDTt (SEQ ID NOS: 13, 108-113, 126, 114-118, respectivamente.)

10 La Figura 8 muestra el porcentaje de células T de la memoria central CD62L+/ IFN- $\gamma$ + en CD4+/CD45RAbaja (4 Donantes). Las quimeras de péptidos de Clase II proporcionan una respuesta de memoria de células T CD4 sólida. Las células T de la memoria central son CD4+/CD45RAbaja/CD62L+/IFN- $\gamma$ +. Los valores que se muestran son el porcentaje de células CD62L+/IFN- $\alpha$ + que se encuentra en una ventana CD4+/CD62L.

15 La Figura 9 muestra el porcentaje de células T de la memoria central CD4+/ CD45RAbaja/ CD62Lalta (16 donantes) utilizando péptidos quiméricos con un epítipo adenoviral. Las quimeras de péptidos de Clase II proporcionan una respuesta de memoria de células T CD4 sólida. Las células T de la memoria central son CD4+/CD45RAbaja/CD62L+/IFN- $\gamma$ +. Los valores que se muestran son el porcentaje de células CD62L+/IFN- $\gamma$ + que se encuentra en una ventana CD4+/CD62L. Se muestran las SEQ ID NOS: 13, 17, 19 y 20, respectivamente.

20 La Figura 10 muestra el porcentaje de células T de la memoria central CD4+/ CD45RAbaja/ CD62Lalta (16 donantes) en variantes de AdvkDTt adenoviral. Las quimeras de péptidos AdvkDTt modificados proporcionan una respuesta de memoria de células T CD4 sólida. Las células T de la memoria central son CD4+/CD45RAbaja/CD62L+/IFN- $\gamma$ +. Los valores que se muestran son el porcentaje de células CD62L+/IFN- $\alpha$ + que se encuentra en una ventana CD4+/CD62L. Se muestran las SEQ ID NOS: 71-73 y 127-129, respectivamente.

La Figura 11 muestra epítipos quiméricos para la influenza, seleccionados para perfiles de pan HLA-DR conservados. Se muestran las SEQ ID NOS: 39-44, 32 y 93-98, respectivamente.

25 La Figura 12 muestra el porcentaje de células T de la memoria central CD4+/ CD45RAbaja/ CD62Lalta (5 donantes) en epítipos de la influenza conservados quiméricos. Las quimeras de péptidos de Influenza modificadas altamente conservadas proporcionan una respuesta de memoria de células T CD4 sólida. Las células T de la memoria central son CD4+/CD45RAbaja/CD62L+/IFN- $\gamma$ +. Los valores que se muestran son el porcentaje de células CD62L+/IFN- $\gamma$ + que se encuentra en una ventana CD4+/CD62L. Se muestran las SEQ ID Nos: 101-106, respectivamente.

La Figura 13 muestra las titulaciones anti-nicotina generadas utilizando composiciones y nanoportadores sintéticos de la invención.

30 La Figura 14 muestra las titulaciones anti-nicotina generadas utilizando composiciones y nanoportadores sintéticos de la invención.

35 La Figura 15 muestra una selección de epítipos quiméricos utilizando el programa de predicción de epítipos de células T de la Base de datos de Epítipos Inmunes\* (IEDB). Para cada péptido, se generó un rango percentil utilizando cada uno de los tres métodos (ARB, SMM\_align y Sturniolo) comparando el puntaje del péptido con los puntajes de cinco millones de 15 mers aleatorios seleccionados de la base de datos de SWISSPROT. Los rangos percentiles para los tres métodos se utilizaron luego para generar el rango para un método de consenso. Un pequeño rango percentil numerado indica afinidad alta. La unión por afinidad alta prevista (<3 percentil superior) aparece en negrita. La distribución de los alelos se proporciona para poblaciones europeas (búlgara, croata, cubana (Eu), checa, finesa, georgiana, irlandesa, norteamericana (Eu), eslovena.)

40 La Figura 16 muestra la cobertura de la población de HLA-DR proyectada de epítipos simples y quiméricos – Europa.

La Figura 17 muestra un análisis de unión prevista de epítipos de Clase II individuales para la Influenza A. Las SEQ ID NOS: 78-82 están representadas en la primera columna de la tabla.

La Figura 18 muestra un análisis de unión prevista de epítipos quiméricos para la Influenza A.

45 La Figura 19 muestra péptidos quiméricos pan PB1 de Clase II conservados para la Influenza A+B. Las SEQ ID NOS: 101-106 están representadas en la primera columna de la tabla.

La Figura 20 muestra una sustitución de aminoácidos sin pérdida de afinidad de unión prevista con la Clase II. Se muestran las SEQ ID NOS: 2, 120-122, 3 y 123-125, respectivamente.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

50 Antes de describir la presente invención en detalle, debe comprenderse que esta invención no está limitada a los materiales o parámetros de proceso particularmente ejemplificados, ya que, por supuesto, estos pueden variar. También debe comprenderse que la terminología utilizada en la presente tiene como fin únicamente describir

realizaciones particulares de la invención y no pretende limitar el uso de terminología alternativa para describir la presente invención.

Como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "un polímero" incluye una mezcla de dos o más de dichas moléculas, la referencia a "un disolvente" incluye una mezcla de dos o más de dichos disolventes, la referencia a "un adhesivo" incluye mezclas de dos o más de dichos materiales, etc.

## A. INTRODUCCIÓN

Las respuestas inmunes a las vacunas pueden mejorarse de manera beneficiosa para proporcionar una respuesta de anticuerpos más sólida incluyendo un epítipo de memoria de unión de Clase II en la vacuna. Sin embargo, la Clase II está compuesta por tres conjuntos diferentes de genes, (HLA-DR, DP y DQ), cada uno con diferentes afinidades de unión a epítopos. Además, cada uno de los genes tiene varios alelos que pueden encontrarse en una población, que producen proteínas con capacidad de unión a epítopos variable, de manera que epítopos de células T individuales tienen alelos de Clase II restringidos. Por lo tanto, la restricción de epítopos de Clase II causa un problema ya que el epítipo tiene cobertura de población limitada. Para obtener una cobertura de población amplia debería diseñarse un péptido que sea promiscuo y no selectivo para DP, DQ y DR. Este problema puede superarse diseñando péptidos para que sean específicos para antígenos a los que ha estado expuesta la mayor parte de la población, y tienen actividad amplia en los alelos de Clase II HLA. Los epítopos individuales que tienen actividad amplia pero limitada incluyen por ejemplo los epítopos que se encuentran en vacunas comunes tales como la toxina del tétanos (TT) y la toxina diftérica (DT). Además de los epítopos que se encuentran en virus naturales, tal como el adenovirus (AdV), a los cuales la mayor parte de la población ha estado expuesta y que tienen titulaciones de anticuerpos activos, pueden tener una amplia cobertura de población. Idealmente los péptidos diseñados tendrán un epítipo de afinidad alta para el alelo DP4 dominante (DPA1\*01/DPB1\*401 y DPA1\*0103/DPB1\*0402) y/o epítopos de afinidad alta para alelos HLA-DR o HLA-DQ con reactividad amplia en una población. Para identificar péptidos de Clase II de cobertura amplia, los inventores diseñaron y evaluaron epítopos quiméricos en base a afinidades de clase II de HLA previstas.

Como se muestra en los Ejemplos, los péptidos de la invención que se diseñaron en base a las afinidades de Clase II HLA previstas proporcionan una cobertura amplia en los alelos DP, DQ y DR de Clase II HLA múltiples en humanos y proporcionan una activación de células T de memoria sólida. Estos péptidos nuevos muestran una cobertura amplia en varios alelos de Clase II y una mejora importante en la generación de una respuesta de memoria de células T CD4+.

Los Ejemplos 1-4 ilustran el abordaje general de la invención. Los Ejemplos 5 y 6 ilustran las modificaciones de las propiedades físicas de los péptidos y las composiciones de la invención obtenidas o derivadas del virus de la influenza. Los Ejemplos 7-13 ilustran varias aplicaciones de las composiciones de la invención.

La presente invención se describirá ahora en más detalle.

## B. DEFINICIÓN

"Adyuvante" significa un agente que no constituye un antígeno específico, pero promueve la resistencia y la longevidad de la respuesta inmune a un antígeno co-administrado. Dichos adyuvantes pueden incluir, a modo no taxativo, estimuladores de los receptores de reconocimiento de patrones, tales como receptores tipo Toll, receptores RIG-1 y tipo NOD (NLR), sales minerales, tales como alumbre, alumbre combinado con lípido monofosforilo (MPL) A de Enterobacterias, tales como *Escherichia coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* o *Shigella flexneri*, o específicamente con MPL® (AS04), MPL A de las bacterias mencionadas anteriormente por separado, saponinas, tales como QS-21, Quil-A, ISCOMs, ISCOMATRIX™, emulsiones tales como MF59™, Montanide® ISA 51 e ISA 720, AS02 (QS21+escualeno+ MPL®), liposomas y formulaciones liposomales tales como AS01, micropartículas y microportadores sintetizados o específicamente preparados tales como vesículas de membrana externa (OMV) derivadas de bacterias de *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y otros, o partículas de quitosán, agentes formadores de depósitos, tales como copolímeros de bloque Pluronic®, péptidos específicamente modificados o preparados, tales como dipéptido de muramilo, 4-fosfatos de aminoalquil glucosaminida, tales como RC529, o proteínas, tales como toxoides bacterianos o fragmentos de toxinas.

En realizaciones, los adyuvantes comprenden agonistas para receptores de reconocimiento de patrones (PRR), incluidos, a modo no taxativo, receptores tipo Toll (TLR), específicamente TLR 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 y/o combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, los adyuvantes comprenden agonistas de receptores tipo Toll 3, agonistas de receptores tipo Toll 7 y 8, o agonistas del receptor tipo Toll 9; preferiblemente, los adyuvantes citados comprenden imidazoquinolinas; tal como R848; derivados de adenina, tales como los que se divulgan en la patente de los Estados Unidos 6.329.381 (Sumitomo Pharmaceutical Company); ADN inmunoestimulador; o ARN inmunoestimulador. En realizaciones específicas, los nanoportadores sintéticos incorporan como adyuvantes compuestos que son agonistas de los receptores tipo Toll (TLR) 7 y 8 ("agonistas de TLR 7/8"). Los compuestos de agonistas de TLR 7/8 divulgados en la Patente de los Estados Unidos 6.696.076 de Tomai et al. son de utilidad,

incluidas, a modo no taxativo, amins de imidazoquinolina, amins de imidazopiridina, amins de cicloalquilimidazopiridina 6,7-fusionada y amins de imidazoquinolina con puente en 1,2. Adyuvantes preferidos comprenden imiquimod y resiquimod (también conocido como R848). En realizaciones específicas, un adyuvante puede ser un agonista para la molécula CD40 de superficie de DC. En ciertas realizaciones, para estimular la inmunidad en vez de la tolerancia, un nanoportador sintético incorpora un adyuvante que promueve la maduración de DC (necesaria para el cebado de células T sin tratamiento previo) y la producción de citoquinas, tales como interferones tipo I, que promueven las respuestas de anticuerpos. En realizaciones, los adyuvantes también pueden comprender moléculas de ARN inmunoestimulador, tales como, a modo no taxativo, ARNdh o poli I:C (un estimulante de TLR3) y/o los que se divulgan en F. Heil et al., "Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8" *Science* 303(5663), 1526-1529 (2004); J. Vollmer et al., "Immune modulation by chemically modified ribonucleosides and oligoribonucleotides" WO 2008033432 A2; A. Forsbach et al., "Immunostimulatory oligoribonucleotides containing specific sequence motif(s) and targeting the Toll-like receptor 8 pathway" WO 2007062107 A2; E. Uhlmann et al., "Modified oligoribonucleotide analogs with enhanced immunostimulatory activity" *Pub. de Sol. de Pat. de los Estados Unidos* 2006241076; G. Lipford et al., "Immunostimulatory viral RNA oligonucleotides and use for treating cancer and infections" WO 2005097993 A2; G. Lipford et al., "Immunostimulatory G,U-containing oligoribonucleotides, compositions, and screening methods" WO 2003086280 A2. En algunas realizaciones, un adyuvante puede ser un agonista de TLR-4, tal como un lipopolisacárido bacteriano (LPS), VSV-G y/o HMGB-1. En algunas realizaciones, los adyuvantes pueden comprender agonistas de TLR-5, tales como flagelina, o porciones o derivados de los mismos, incluidos, a modo no taxativo, los que se describen en las Patentes de los Estados Unidos 6.130.082, 6.585.980 y 7.192.725. En realizaciones específicas, los nanoportadores específicos incorporan un ligando para un receptor similar a Toll (TLR)-9, tales como moléculas de ADN inmunoestimulador que comprenden CpG, que inducen la secreción de interferones tipo I y estimulan la activación de células T y B que conducen a una mayor producción de anticuerpos y respuestas de células T citotóxicas (Krieg et al., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell activation. *Nature*. 1995. 374:546-549; Chu et al. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J. Exp. Med.* 1997. 186:1623-1631; Lipford et al. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur. J. Immunol.* 1997. 27:2340-2344; Roman et al. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat. Med.* 1997. 3:849-854; Davis et al. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* 1998. 160:870-876; Lipford et al., Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol.* 1998. 6:496-500; Patente de los Estados Unidos 6.207.646 de Krieg et al.; Patente de los Estados Unidos 7.223.398 de Tuck et al.; Patente de los Estados Unidos 7.250.403 de Van Nest et al. o la patente de los Estados Unidos 7.566.703 de Krieg et al.

En algunas realizaciones, los adyuvantes pueden ser estímulos proinflamatorios liberados de células necróticas (por ejemplo, cristales de urato). En algunas realizaciones, los adyuvantes pueden ser componentes activados de la cascada de complementos (por ejemplo, CD21, CD35, etc.). En algunas realizaciones, los adyuvantes pueden ser componentes activados de complejos inmunes. Los adyuvantes también incluyen agonistas de receptores de complementos, tal como una molécula que se enlaza a CD21 o CD35. En algunas realizaciones, el agonista del receptor de complementos induce la opsonización de complementos endógenos del nanoportador sintético. En algunas realizaciones, los adyuvantes son citoquinas, que son pequeñas proteínas o factores biológicos (en el rango de 5 kD – 20 kD) que son liberados por células y tienen efectos específicos sobre la interacción célula-célula, la comunicación y el comportamiento de otras células. En algunas realizaciones, el agonista del receptor de citoquina es una molécula pequeña, anticuerpo, proteína de fusión o aptámero.

En realizaciones, al menos una porción de la dosis de adyuvante puede acoplarse a nanoportadores sintéticos, preferiblemente, toda la dosis de adyuvante se acopla a nanoportadores sintéticos. En otras realizaciones, al menos una porción de la dosis no está acoplada a los nanoportadores sintéticos. En realizaciones, la dosis de adyuvante comprende dos o más tipos de adyuvantes. Por ejemplo, a modo no taxativo, pueden combinarse adyuvantes que actúan en receptores de TLR diferentes. Como un ejemplo, en una realización, un agonista de TLR 7/8 puede combinarse con un agonista de TLR 9. En otra realización, un agonista de TLR 7/8 puede combinarse con un agonista de TLR 4. En otra realización adicional, un agonista de TLR 9 puede combinarse con un agonista de TLR 3.

"Administrar" o "administración" significa proporcionar un fármaco a un sujeto de una manera que es farmacológicamente útil.

"Antígeno" significa antígeno de células B o antígeno de células T.

"Antígeno de células B" significa cualquier antígeno que sea o que se reconozca por una respuesta inmune y la provoque en una célula B (por ejemplo, un antígeno que sea específicamente reconocido por un receptor de células B en una célula B). En algunas realizaciones, un antígeno que es un antígeno de células T también es un antígeno de células B. En otras realizaciones, el antígeno de células T no es también un antígeno de células B. Los antígenos de células B incluyen, a modo no taxativo, proteínas, péptidos, moléculas pequeñas y carbohidratos. En algunas realizaciones, el antígeno de células B es un antígeno no proteico (es decir, no es ni una proteína ni un antígeno peptídico). En algunas realizaciones, el antígeno de células B es un carbohidrato asociado con un agente infeccioso. En algunas realizaciones, el antígeno de células B es una glicoproteína o un glicopéptido asociado con un agente infeccioso. El agente infeccioso puede ser una bacteria, un virus, un hongo, un protozoario o un parásito. En algunas

realizaciones, el antígeno de células B es un antígeno deficientemente inmunogénico. En algunas realizaciones, el antígeno de células B es una sustancia de la que se abusa o una porción de la misma. En algunas realizaciones, el antígeno de células B es una sustancia adictiva o una porción de la misma. Las sustancias adictivas incluyen, a modo no taxativo, la nicotina, un narcótico, un antitusígeno, un tranquilizante y un sedante. En algunas realizaciones, el antígeno de células B es una toxina, tal como una toxina de un arma química o fuentes naturales. El antígeno de células B también puede ser un agente ambiental peligroso. En algunas realizaciones, el antígeno de células B es un auto antígeno. En otras realizaciones, el antígeno de células B es un aloantígeno, un alérgeno, un sensibilizador de contacto, un antígeno de enfermedad degenerativa, un hapteno, un antígeno de enfermedad infecciosa, un antígeno de cáncer, un antígeno de enfermedad atópica, un antígeno de enfermedad autoinmune, una sustancia adictiva, un xenoantígeno o una enzima de enfermedad metabólica, o un producto enzimático de la misma.

“Acoplar” o “acoplado” o “se acopla” (y similares) significa asociar químicamente una entidad (por ejemplo un resto) con otra. En algunas realizaciones, el acoplamiento es covalente. En realizaciones no covalentes, el acoplamiento no covalente es mediado por interacciones no covalentes que incluyen, a modo no taxativo, interacciones de carga, interacciones de afinidad, coordinación de metales, adsorción física, interacciones de huésped-anfitrión, interacciones hidrófobas, interacciones de apilamiento TT, interacciones de unión a hidrógeno, interacciones van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo y/o combinaciones de las mismas.

“Derivado” significa tomado de una fuente y sometido a una modificación significativa. Por ejemplo, se diría que un péptido o ácido nucleico con una secuencia con solamente 50% de identidad con un péptido o ácido nucleico natural, preferiblemente un péptido o ácido nucleico de consenso, deriva del péptido o ácido nucleico natural. Los ácidos nucleicos que son derivados, sin embargo, no pretenden incluir ácidos nucleicos con secuencias que no son idénticas a una secuencia de ácido nucleico natural, preferiblemente una secuencia de ácido nucleico de consenso, únicamente debido a la degeneración del código genético. Una modificación significativa es una modificación que afecta significativamente las propiedades químicas o inmunológicas del material en cuestión. Los péptidos y ácidos nucleicos derivados pueden incluir también aquellos con una secuencia con más de 50% de identidad con una secuencia de péptidos o ácidos nucleicos naturales si dichos péptidos y ácidos nucleicos derivados han alterado las propiedades químicas o inmunológicas en comparación con el péptido o ácido nucleico natural. Estas propiedades químicas o inmunológicas comprenden hidrofiliencia, estabilidad, afinidad de unión a MHC II y capacidad para acoplarse con un portador tal como un nanoportador sintético.

“Forma de dosificación” significa un fármaco en un medio, portador, vehículo o dispositivo adecuado para su administración a un sujeto.

“Encapsular” o “encapsulado” significa encerrar dentro de un nanoportador sintético, preferiblemente encerrar completamente dentro de un nanoportador sintético. La mayor parte o la totalidad de una sustancia que está encapsulada no está expuesta al medio local externo al nanoportador sintético. La encapsulación es distinta de la presencia de al menos una porción de una sustancia sobre una superficie de un nanoportador sintético, lo que deja la sustancia expuesta al medio local externo al nanoportador sintético. En una realización, un ejemplo de un proceso que resulta en al menos una porción de una sustancia presente sobre la superficie del nanoportador sintético es adsorción.

“Péptido de unión a MHC II” significa un péptido que se une al Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II con una afinidad suficiente como para permitir que el complejo de péptido/MHC interactúe con un receptor de células T en las células T. La interacción del complejo de péptido/MHC con el receptor de células T en células T puede establecerse a través de la medición de la producción de citoquina y/o la proliferación de células T utilizando técnicas convencionales. En realizaciones, los péptidos de unión a MHC II tienen un valor de CI50 de afinidad de 5000 nM o menos, preferiblemente 500 nM o menos, y más preferiblemente 50 nM o menos para unión con una molécula de MHC II. En realizaciones, los péptidos de unión a MHC II de acuerdo con la invención (incluidos expresamente el primer, el segundo y el tercer péptido de unión a MHC II) tienen longitudes iguales o mayores que 5-mer y pueden ser tan grandes como una proteína. En otras realizaciones, los péptidos de unión a MHC II de acuerdo con la invención (incluidos expresamente el primer, el segundo y el tercer péptido de unión a MHC II) tienen longitudes en el rango de 5-mer a 50-mer, preferiblemente en el rango de 5-mer a 40-mer, más preferiblemente en el rango de 5-mer a 30-mer y aun más preferiblemente de 6-mer a 25-mer.

“Identidad” significa el porcentaje de aminoácidos o residuos o bases de ácidos nucleicos que están posicionados de manera idéntica en una alineación de secuencia unidimensional. La identidad mide cuán relacionadas están las secuencias que se están comparando. En una realización, la identidad entre dos secuencias puede determinarse utilizando el programa BESTFIT. En realizaciones, los péptidos de unión a MHC II mencionados (tales como A, B o C) pueden tener al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95%, incluso más preferiblemente al menos 97% o incluso más preferiblemente al menos 99% de identidad con un péptido de unión a HLA-DP natural, un péptido de unión a HLA-DQ natural y/o un péptido de unión a HLA-DR natural. En realizaciones, A, B y C no son 100% idénticos entre sí; y en otras realizaciones A y B no son 100% idénticos entre sí. En realizaciones, los ácidos nucleicos mencionados pueden tener al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, incluso más preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95%, incluso más preferiblemente al menos 97% o incluso más

preferiblemente al menos 99% de identidad con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica o es complementaria a una que codifica un péptido de unión a HLA-DP, un péptido de unión a HLA-DQ natural y/o un péptido de unión a HLA-DR natural.

5 “Ácido nucleico aislado” significa un ácido nucleico que está separado de su entorno nativo y está presente en cantidad suficiente como para permitir su identificación o uso. Un ácido nucleico aislado puede ser uno que es (i) amplificado *in vitro* por, por ejemplo, reacción en cadena de polimerasa (PCR); (ii) producido recombinantemente por clonación; (iii) purificado, como por escisión y separación de gel o (iv) sintetizado, por ejemplo, por síntesis química. Un ácido nucleico aislado es uno que es fácilmente manipulable por técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos contenida en un vector en el cual los sitios de restricción 5' y 3' son conocidos o para los cuales se han divulgado secuencias de cebador de reacción en cadena de polimerasa (PCR) se considera aislada pero una secuencia de ácidos nucleicos que existe en su estado nativo en su huésped naturales no se considera aislada. Un ácido nucleico aislado puede estar básicamente purificado, aunque no necesariamente. Por ejemplo, un ácido nucleico que está aislado dentro de un vector de clonación o expresión no es puro porque puede comprender solo un pequeño porcentaje del material en la célula en la cual reside. Dicho ácido nucleico está aislado, sin embargo, tal como el término se utiliza en la presente debido a que es fácilmente manipulable por técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica. Cualquiera de los ácidos nucleicos proporcionados en la presente pueden estar aislados.

20 “Polipéptido aislado” significa que el polipéptido está separado de su entorno nativo y está presente en cantidad suficiente como para permitir su identificación o uso. Esto significa, por ejemplo, que el polipéptido puede (i) producirse selectivamente por la clonación de la expresión o (ii) purificarse como por cromatografía o electroforesis. Proteínas o polipéptidos aislados pueden ser, aunque no necesariamente, básicamente puros. Dado que un polipéptido aislado puede mezclarse con un portador farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, el polipéptido puede comprender sólo un pequeño porcentaje en peso de la preparación. No obstante, el polipéptido está aislado porque se separó de las sustancias con las cuales puede asociarse en sistemas vivos, por ejemplo, se aisló de otras proteínas. Cualquiera de los péptidos o polipéptidos proporcionados en la presente pueden estar aislados.

“Enlazante” significa un resto que conecta dos componentes químicos a través de un único enlace covalente o múltiples enlaces covalentes.

30 “Dimensión máxima de un nanoportador sintético” significa la mayor dimensión de un nanoportador medida a lo largo de cualquier eje del nanoportador sintético. “Dimensión mínima de un nanoportador sintético” significa la dimensión más pequeña de un nanoportador sintético medida a lo largo de cualquier eje del nanoportador sintético. Por ejemplo, para un nanoportador sintético esferoide, la dimensión máxima y mínima de un nanoportador sintético serían básicamente idénticas y serían el tamaño de su diámetro. De manera similar, para un nanoportador sintético cuboide, la dimensión mínima de un nanoportador sintético sería la más pequeña de su altura, ancho o largo, mientras que la dimensión máxima de un nanoportador sintético sería la mayor de su altura, ancho o largo. En una realización, una dimensión mínima de al menos un 75%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 90%, de los nanoportadores sintéticos en una muestra, en base al número total de nanoportadores sintéticos en la muestra, es mayor que 100 nm. En una realización, una dimensión máxima de al menos 75%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, de los nanoportadores sintéticos en una muestra, en base al número total de nanoportadores sintéticos en la muestra, es menor o igual que 5  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, una dimensión mínima de al menos un 75%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 90%, de los nanoportadores sintéticos en una muestra, en base al número total de nanoportadores sintéticos en la muestra, es mayor o igual que 110 nm, más preferiblemente mayor o igual que 120 nm, más preferiblemente mayor o igual que 130 nm y aún más preferiblemente mayor o igual que 150 nm. Preferiblemente, una dimensión máxima de al menos un 75%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 90%, de los nanoportadores sintéticos en una muestra, en base al número total de nanoportadores sintéticos en la muestra, es menor o igual que 3  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente menor o igual que 2  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente menor o igual que 1  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente menor o igual que 800 nm, más preferiblemente menor o igual que 600 nm y aún más preferiblemente menor o igual que 500 nm. En realizaciones preferidas, una dimensión máxima de al menos un 75%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 90%, de los nanoportadores sintéticos en una muestra, en base al número total de nanoportadores sintéticos, es mayor o igual que 100 nm, más preferiblemente mayor o igual que 120 nm, más preferiblemente mayor o igual que 130 nm, más preferiblemente mayor o igual que 140 nm y aún más preferiblemente mayor o igual que 150 nm. La medición de los tamaños de los nanoportadores sintéticos se obtiene suspendiendo los nanoportadores sintéticos en un medio líquido (generalmente acuoso) y utilizando dispersión de luz dinámica (por ejemplo, un instrumento Brookhaven ZetaPALS).

60 “Péptido de unión a HLA-DP natural” significa un péptido obtenido o derivado de la naturaleza que se une específicamente a un antígeno de leucocitos humanos DP de MHC Clase II con una afinidad suficiente como para permitir que el complejo de péptido/HLA-DP interactúe con el receptor de células T en las células T. En realizaciones, los péptidos de unión a HLA-DP naturales tienen un valor de CI50 de afinidad de 5000 nM o menos, preferiblemente 500 nM o menos, y más preferiblemente 50 nM o menos para un antígeno de leucocitos humanos DP de MHC Clase II. En realizaciones, el péptido de unión a HLA-DP natural comprende una secuencia de péptidos

- obtenida o derivada de virus, bacterias o levadura, incluidos a modo no taxativo: Clostridium tetani, virus de la Hepatitis B, virus del herpes humano, virus de la Influenza, virus Vaccinia, virus del Epstein-Barr (EBV), virus de la varicela, virus del sarampión, virus del sarcoma de Rous (RSV), Citomegalovirus (CMV), virus Varicella zoster (VZV), virus de paperas, Corynebacterium diphtheria, adenovirus humanos y/o virus de la viruela. La predicción del epítipo de Clase II se realizó utilizando las herramientas de predicción de los epítipos de células T de la Base de datos de Epítipos Inmunes\* (IEDB) (<http://www.immuneepitope.org/>). Para cada péptido se generó un rango percentil para cada uno de los tres métodos (ARB, SMM\_align y Sturniolo) comparando el puntaje del péptido con los puntajes de cinco millones de 15 mers aleatorios seleccionados de la base de datos de SWISSPROT. Los rangos percentiles para los tres métodos se utilizaron luego para generar el rango para un método de consenso.
- 5 “Péptido de unión a HLA-DQ natural” significa un péptido obtenido o derivado de la naturaleza que se une específicamente a un antígeno de leucocitos humanos DQ de MHC Clase II con una afinidad suficiente como para permitir que el complejo de péptido/HLA-DP interactúe con el receptor de células T en las células T. En realizaciones, los péptidos de unión a HLA-DQ naturales tienen un valor de CI50 de afinidad de 5000 nM o menos, preferiblemente 500 nM o menos, y más preferiblemente 50 nM o menos para un antígeno de leucocitos humanos DQ de MHC Clase II. En realizaciones, el péptido de unión a HLA-DQ natural comprende una secuencia de péptidos obtenida o derivada de virus, bacterias o levadura, incluidos a modo no taxativo: Clostridium tetani, virus de la Hepatitis B, virus del herpes humano, virus de la Influenza, virus Vaccinia, virus del Epstein-Barr (EBV), virus de la varicela, virus del sarampión, virus del sarcoma de Rous (RSV), Citomegalovirus (CMV), virus Varicella zoster (VZV), virus de paperas, Corynebacterium diphtheria, adenovirus humanos y/o virus de la viruela. La predicción del epítipo de Clase II se realizó utilizando las herramientas de predicción de los epítipos de células T de la Base de datos de Epítipos Inmunes\* (IEDB) (<http://www.immuneepitope.org/>). Para cada péptido, se generó un rango percentil para cada uno de los tres métodos (ARB, SMM\_align y Sturniolo) comparando el puntaje del péptido con los puntajes de cinco millones de 15 mers aleatorios seleccionados de la base de datos de SWISSPROT. Los rangos percentiles para los tres métodos se utilizaron luego para generar el rango para un método de consenso.
- 10 “Péptido de unión a HLA-DR natural” significa un péptido obtenido o derivado de la naturaleza que se une específicamente a un antígeno de leucocitos humanos DR de MHC Clase II con una afinidad suficiente como para permitir que el complejo de péptido/HLA-DR interactúe con el receptor de células T en las células T. En realizaciones, los péptidos de unión a HLA-DR naturales tienen un valor de CI50 de afinidad de 5000 nM o menos, preferiblemente 500 nM o menos, y más preferiblemente 50 nM o menos para un antígeno de leucocitos humanos DR de MHC Clase II. En realizaciones, el péptido de unión a HLA-DR natural comprende una secuencia de péptidos obtenida o derivada de virus, bacterias o levadura, incluidos a modo no taxativo: Clostridium tetani, virus de la Hepatitis B, virus del herpes humano, virus de la Influenza, virus Vaccinia, virus del Epstein-Barr (EBV), virus de la varicela, virus del sarampión, virus del sarcoma de Rous (RSV), Citomegalovirus (CMV), virus Varicella zoster (VZV), virus de paperas, Corynebacterium diphtheria, adenovirus humanos y/o virus de la viruela. La predicción del epítipo de Clase II se realizó utilizando las herramientas de predicción de los epítipos de células T de la Base de datos de Epítipos Inmunes\* (IEDB) (<http://www.immuneepitope.org/>). Para cada péptido, se generó un rango percentil para cada uno de los tres métodos (ARB, SMM\_align y Sturniolo) comparando el puntaje del péptido con los puntajes de cinco millones de 15 mers aleatorios seleccionados de la base de datos de SWISSPROT. Los rangos percentiles para los tres métodos se utilizaron luego para generar el rango para un método de consenso.
- 15 “Obtenido” significa tomado de una fuente sin modificación significativa. Una modificación significativa es una modificación que afecta significativamente las propiedades químicas o inmunológicas del material en cuestión. Por ejemplo, a modo no taxativo, un péptido o ácido nucleico con una secuencia con más de 90%, preferiblemente más de 95%, preferiblemente más de 97%, preferiblemente más de 98%, preferiblemente más de 99%, preferiblemente 100% de identidad con una secuencia de péptidos o nucleótidos naturales, preferiblemente una secuencia de péptidos o nucleótidos de consenso natural y propiedades químicas y/o inmunológicas que no son considerablemente diferentes del péptido o ácido nucleico natural se diría que se obtiene de la secuencia de péptidos o nucleótidos natural. Se pretende que los ácidos nucleicos que se obtienen incluyan ácidos nucleicos con secuencias que no son idénticas a una secuencia de nucleótidos de consenso únicamente debido a la degeneración del código genético. Dichos ácidos nucleicos pueden incluso tener una secuencia con menos de 90% de identidad con una secuencia de nucleótidos natural, preferiblemente una secuencia de nucleótidos de consenso. Estas propiedades químicas o inmunológicas comprenden hidrofiliidad, estabilidad, afinidad de unión a MHC II y capacidad para acoplarse con un portador tal como un nanoportador sintético.
- 20 “Excipiente farmacéuticamente aceptable” significa un material farmacológicamente inactivo utilizado junto con los péptidos mencionados en la formulación de realizaciones de las composiciones de la invención, formas de dosificación, vacunas y similares. Excipientes farmacéuticamente aceptables comprenden una variedad de materiales conocidos en la técnica, incluidos, a modo no taxativo, sacáridos (tales como glucosa, lactosa y similares), conservantes tales como agentes antimicrobianos, ayudas de reconstitución, colorantes, solución salina (tal como solución salina tamponada con fosfato), soluciones amortiguadoras, dispersantes, estabilizadores, otros excipientes indicados en la presente y otros materiales convencionalmente conocidos.
- 25 “Sujeto” significa animales, incluidos mamíferos de sangre caliente tales como humanos y primates; aves; animales domésticos, mascotas o animales de granja tales como gatos, perros, ovejas, cabras, reses, caballos y cerdos;
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

animales de laboratorio tales como ratones, ratas y conejillos de Indias; peces; reptiles; animales de zoológico y animales salvajes y similares.

5 “Nanoportador(es) sintético(s)” significa un objeto específico que no se encuentra en la naturaleza y que posee al menos una dimensión que tiene un tamaño menor o igual a 5 micrones. Las nanopartículas de albúmina generalmente se incluyen como nanopartículas sintéticas. Sin embargo, en ciertas realizaciones los nanoportadores sintéticos no comprenden nanopartículas de albúmina. En realizaciones, los nanoportadores sintéticos no comprenden quitosano.

10 Un nanoportador sintético puede ser, a modo no taxativo, uno o una pluralidad de nanopartículas de base lipídica, nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, emulsiones a base de tensoactivo, dendrímeros, fulerenos, nanocables, partículas similares a virus, partículas en base a péptido o proteína (tales como nanopartículas de albúmina) y/o nanopartículas que se desarrollan utilizando una combinación de nanomateriales tales como nanopartículas de lipídico-polímero. Los nanoportadores sintéticos pueden tener una variedad de diferentes formas, incluidas, a modo no taxativo, esferoide, cuboide, piramidal, oblonga, cilíndrica, toroidal y similares. Los nanoportadores sintéticos de acuerdo con la invención comprenden una o más superficies. Los nanoportadores sintéticos ejemplares que pueden adaptarse para utilizarse en la práctica de la presente invención comprenden: (1) las partículas biodegradables divulgadas en la Patente de los Estados Unidos 5,543,158 de Gref et al., (2) las nanopartículas poliméricas de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Publicada 20060002852 de Saltzman et al., (3) las nanopartículas litográficamente construidas de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Publicada 20090028910 de DeSimone et al., (4) la invención del documento WO 2009/051837 de von Andrian et al., o (5) las nanopartículas divulgadas en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Publicada 2008/0145441 de Penades et al. En realizaciones, los nanoportadores sintéticos pueden poseer una relación de aspecto mayor que 1:1, 1:1,2, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 o mayor que 1:10.

25 Los nanoportadores sintéticos de acuerdo con la invención que tienen una dimensión mínima menor o igual a aproximadamente 100 nm, preferiblemente menor o igual a 100 nm, no comprenden una superficie con grupos hidroxilo que activan un complemento o alternativamente comprenden una superficie que consiste esencialmente en restos que no son grupos hidroxilo que activan un complemento. En una realización preferida, los nanoportadores sintéticos de acuerdo con la invención que tienen una dimensión mínima menor o igual a aproximadamente 100 nm, preferiblemente menor o igual a 100 nm, no comprenden una superficie que active sustancialmente un complemento o alternativamente comprenden una superficie que consiste esencialmente en restos que sustancialmente no activan un complemento. En una realización más preferida, los nanoportadores sintéticos de acuerdo con la invención que tienen una dimensión mínima menor o igual a aproximadamente 100 nm, preferiblemente menor o igual a 100 nm, no comprenden una superficie que active un complemento o alternativamente comprenden una superficie que consiste esencialmente en restos que no activan un complemento. En una realización, los nanoportadores sintéticos de acuerdo con la invención excluyen partículas tipo virus.

35 “Antígeno de células T” significa un antígeno de células T CD4+ o un antígeno de células CD8+. “Antígeno de células T CD4+” significa cualquier antígeno que es reconocido por una respuesta inmune en una célula T CD4+ y provoca la misma, por ejemplo, un antígeno que es reconocido específicamente por un receptor de células T en una célula T CD4+ por medio de la presentación del antígeno o porción del mismo unido a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad Clase II (MHC). “Antígeno de células T CD8+” significa cualquier antígeno que es reconocido por una respuesta inmune en una célula T CD8+ y provoca la misma, por ejemplo, un antígeno que es reconocido específicamente por un receptor de células T en una célula T CD8+ por medio de la presentación del antígeno o porción del mismo unido a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) Clase I. En algunas realizaciones, un antígeno que es un antígeno de células T también es un antígeno de células B. En otras realizaciones, el antígeno de células T no es también un antígeno de células B. Los antígenos de células T generalmente son proteínas o péptidos, pero pueden ser otras moléculas tales como lípidos y glicolípidos. Los antígenos de células T son antígenos que estimulan una respuesta de células T CD4+ o una respuesta de células T CD8+.

50 “Vacuna” significa una composición de materia que mejora la respuesta inmune a un patógeno o enfermedad particular. Una vacuna típicamente contiene factores que estimulan el sistema inmune de un sujeto para reconocer un antígeno específico como ajeno y eliminarlo del cuerpo del sujeto. Una vacuna también establece una ‘memoria’ inmunológica de modo que el antígeno será rápidamente reconocido y encontrará una respuesta si una persona vuelve a ser expuesta. Las vacunas pueden ser profilácticas (por ejemplo, para prevenir una futura infección de cualquier patógeno) o terapéuticas (por ejemplo, una vacuna contra un antígeno específico de tumor para el tratamiento del cáncer). Las vacunas de acuerdo con la invención pueden comprender uno o más péptidos de unión a MHC II o uno o más ácidos nucleicos que codifican, o son complementarios a uno o más ácidos nucleicos que codifican, el o los péptidos de unión a MHC II.

### C. PÉPTIDOS DE LA INVENCION Y MÉTODOS DE REALIZACIÓN Y USO DE LOS MISMOS

60 En realizaciones, las composiciones de la invención y métodos relacionados comprenden A – x – B, en donde x comprende un sitio de escisión de cathepsina que comprende KVSVR, A comprende un primer péptido de unión a MHC II y B comprende un segundo péptido de unión a MHC II. Adicionalmente, en realizaciones, las composiciones

de la invención y los métodos relacionados comprenden A – x – B – y – C, en donde x comprende un sitio de escisión de catepsina que comprende KVSVR, y puede comprender un enlazante o puede no comprender un enlazante, A comprende un primer péptido de unión a MHC II, B comprende un segundo péptido de unión a MHC II y C comprende un tercer péptido de unión a MHC II.

- 5 En ciertas realizaciones, y si y está presente, puede no comprender un enlazante, en cuyo caso A – x – B y C pueden estar presentes en las composiciones de la invención como mezclas. Dicho abordaje de mezcla puede utilizarse para combinar fácilmente un número de diferentes péptidos de unión a MHC II, facilitando así el uso y/o simplificando la síntesis, por ejemplo, creando una única molécula más grande que contiene residuos de los péptidos de unión de MHC II. Las mezclas pueden formularse utilizando métodos farmacéuticos de mezcla tradicionales.
- 10 Estos incluyen el mezclado de líquido-líquido en el cual dos o más suspensiones, que contienen cada una uno o más conjuntos de péptidos, se combinan directamente o se juntan por medio de uno o más recipientes que contienen diluyente. Dado que los péptidos también pueden producirse o almacenarse en forma de polvo, el mezclado de polvo-polvo podría realizarse de la misma manera que la re-suspensión de dos o más polvos en un medio común. Dependiendo de las propiedades de los péptidos y su potencial de interacción, pueden conferirse ventajas a una u
- 15 otra ruta de mezcla.

Las mezclas pueden realizarse utilizando técnicas de fabricación y combinación farmacéuticas para llegar a formas de dosificación útiles. Técnicas adecuadas para utilizar en la práctica de la presente invención pueden encontrarse en el Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice, Editado por Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-Obeng y Suzanne M. Kresta, 2004 John Wiley & Sons, Inc.; y Pharmaceuticals: The Science of Dosage Form Design, 2nd Ed. Editado por M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstone. En realizaciones, composiciones típicas de la invención que comprenden las mezclas de péptidos pueden comprender soluciones amortiguadoras inorgánicas u orgánicas (por ejemplo, sales de fosfato de sodio o potasio, carbonato, acetato o citrato) y agentes de ajuste del pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o potasio, sales de citrato o acetato, aminoácidos y sus sales) antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, alfa-tocoferol), tensoactivos (por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80, polioxietileno 9-10 nonil fenol, desoxicolato de sodio), estabilizadores de solución, y/o crio/lío estabilizadores (por ejemplo, sacarosa, lactosa, manitol, trehalosa), agentes de ajuste osmótico (por ejemplo, sales o azúcares), agentes antibacterianos (por ejemplo, ácido benzoico, fenol, gentamicina), agentes antiespumantes (por ejemplo, polidimetilsiloxano), conservantes (por ejemplo, timerosal, 2-fenoxietanol, EDTA), estabilizadores poliméricos y agentes de ajuste de viscosidad (por ejemplo, polivinilpirrolidona, poloxámero 488, carboximetilcelulosa) y co-disolventes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicol, etanol).

20

25

30

En realizaciones, y si está presente, puede comprender un enlazante. En realizaciones, un enlazante puede conectar directamente aminoácidos – ya sea naturales o modificados – que son parte del péptido de unión a MHC II, o un enlazante puede incorporar átomos, preferiblemente átomos múltiples, para enlazar los péptidos de unión a MHC II. Los enlazantes pueden ser útiles por varias razones, incluido, a modo no taxativo, para facilitar la síntesis, facilitar la escisión química, separar los péptidos de unión a MHC II, insertar un sitio químicamente reactivo (como un disulfuro) y/o un sitio de escisión de proteasa. Los enlazantes pueden comprender enlazantes escindibles que son escindidos en ciertas condiciones fisiológicas y enlazantes no escindibles que son poco escindidos en condiciones fisiológicas encontradas por las composiciones de la invención cuando se administran a un sujeto.

35

En ciertas realizaciones, y si está presente, puede comprender un enlazante que comprende un enlazante de amida, un enlazante de disulfuro, un enlazante de sulfuro, un enlazante de 1,2,3-triazol 1,4-disustituido, un enlazante de éster de tiol, un enlazante de éster de tiol o un enlazante de imina. Enlazantes adicionales útiles en la práctica de la presente invención comprenden: enlazantes de éster de tiol formados a partir de tiol y ácido, enlazantes de hidrazida formados a partir de hidrazina y ácido, enlazantes de imina formados a partir de amina y aldehído o cetona, enlazantes de tiourea formados a partir de tiol y tioisocianato, enlazantes de amidina formados a partir de amina y éster de imidato y enlazantes de amina formados a partir de aminación reductiva de amina y aldehído. En realizaciones, x, y/o si está presente, puede comprender un enlazante que comprende una secuencia de péptidos, preferiblemente secuencias que comprenden un sitio escindible de proteasa lisosomal (por ejemplo, un sitio de escisión de catepsina), un polímero biodegradable, un enlazante de alcano, alqueno, aromático o heterocíclico sustituido o insustituido, un polímero sensible al pH, enlazantes heterobifuncionales o un separador de glicol oligomérico.

40

45

50

Enlazantes escindibles incluyen, a modo no taxativo, secuencias de péptidos, preferiblemente secuencias de péptidos que comprenden un sitio de escisión de proteasa lisosomal; un polímero biodegradable; un polímero degradable de pH o un enlace de disulfuro. Sitios de escisión de proteasa lisosomal comprenden secuencias de péptidos específicamente conocidas por ser escindibles por proteasas lisosomales que comprenden proteasas de serina, proteasas de treonina, proteasas de aspartato, proteasas de cinc, proteasas de glutámico de metaloproteasas, proteasas de cisteína (AMSH/STAMP Catepsina F, Catepsina 3, Catepsina H, Catepsina 6, Catepsina L, Catepsina 7/Catepsina 1 Catepsina O, Catepsina A Catepsina S, Catepsina B, Catepsina V, Catepsina C/DPPI, Catepsina X/Z/P, Catepsina D, Legumaina). Los polímeros biodegradables se degradan en una variedad de condiciones fisiológicas, mientras que los polímeros degradables de pH se degradan a una tasa acelerada en condición de pH bajo (menos que el pH fisiológico). En ciertas realizaciones, la secuencia de péptidos del enlazante comprende una secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 99 o 119.

55

60

pmglp (SEQ ID NO: 99)

skvsvr (SEQ ID NO: 119)

Puede encontrarse información adicional en: A. Purcell et al., "More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design." *J.Nat Rev Drug Discov.* 2007; 5:404-14; R. Bei et al., "TAA polyepitope DNA-based vaccines: A potential tool for cancer therapy." *J Biomed Biotech.* 2010 ; 102785: 1-12; W. Wriggers et al., "Control of protein functional dynamics by peptide linkers." *Biopolymers.* 2005;80(6):736-46; J. Timmerman et al., "Carrier protein conjugate vaccines: the "missing link" to improved antibody and CTL responses?" *Hum Vaccin.* 2009 Mar;5(3):181-3' B. Law et al., "Proteolysis: a biological process adapted in drug delivery, therapy, and imaging." *Bioconjug Chem.* 2009 Sep;20(9):1683-95.

10 Un enlazante de amida es el enlazante formado entre un grupo amino sobre un componente químico con el grupo carboxilo de un segundo componente químico. Estos enlazantes pueden realizarse utilizando cualquiera de las químicas de formación de los enlazantes de amina convencionales con aminoácidos o polipéptidos protegidos adecuadamente. En una realización, los enlazantes de amida mencionados podrían formarse durante la síntesis general de A y B (o B y C, etc.), simplificando así la creación de x y/o y. Este tipo de química de enlace puede  
15 disponerse fácilmente para incluir un grupo enlazante escindible.

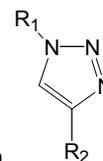
Un enlazante de disulfuro es un enlazante entre dos átomos de azufre de la forma, por ejemplo, de R<sub>1</sub>-S-S-R<sub>2</sub>. Un enlazante de disulfuro puede formarse por acoplamiento oxidativo de dos moléculas iguales o disimilares tales como péptidos que contienen sustituyentes de mercaptano (-SH) o, preferiblemente, utilizando un enlazante pre-formado de la forma, por ejemplo, de:

20 H<sub>2</sub>N- R<sub>1</sub>-S-S-R<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H donde la función del aminoácido y/o carboxilo están protegidas adecuadamente. Este tipo de química de enlace es susceptible a escisión reductiva que provocaría la separación de los dos péptidos de memoria individuales. Esto es importante debido a que puede encontrarse un entorno de reducción en lisosomas, que es un compartimiento objetivo de interés inmunológico.

Puede utilizarse la química de hidrazida y aldehído/cetona para formar enlazantes. Se prepara un primer péptido que  
25 contiene una función de aldehído/cetona, terminal a la primera cadena de péptido. Se prepara un segundo péptido con una hidrazida (si el primer péptido contiene un aldehído/cetona) o un aldehído (si el primer péptido contiene una hidrazida) terminal con la segunda cadena de péptido. Los dos péptidos se dejan reaccionar entonces, lo que enlaza los dos péptidos a través de una función de hidrazona. En general, el enlace de hidrazona formado de esa forma es escindible en condiciones ácidas, tal como aquellas que se encuentran en el lisosoma. Si se desea una mayor  
30 estabilidad del enlazante, la hidrazona puede reducirse para formar la hidrazida alquilada estable (no escindible) correspondiente (similar a la aminación reductiva de una amina con aldehído o cetona para formar la alquilamina correspondiente).

Los enlazantes no escindibles pueden formarse utilizando una variedad de químicas y pueden formarse utilizando  
35 varios materiales diferentes. Generalmente, un enlazante se considera no escindible cuando cada uno de dichos enlazantes no escindibles es estable durante más de 12 horas en condiciones de pH lisosomal. Ejemplos de enlazantes no escindibles incluyen, a modo no taxativo, grupos que contienen aminas, sulfuros, triazoles, hidrazonas, (ésteres de) amida y alcanos sustituidos o insustituidos, alquenos, aromáticos o heterociclos; polímeros; separadores de glicol oligomérico y/o aminoácidos no naturales o químicamente modificados. Los siguientes son ejemplos de varias metodologías comunes. La lista no es de ninguna manera completa y son posibles muchos otros  
40 métodos.

Un enlazante de sulfuro es de la forma de, por ejemplo, R<sub>1</sub>-S-R<sub>2</sub>. Este enlazante puede realizarse por alquilación de un mercaptano o por adición de Michael de un mercaptano en una molécula tal como un péptido a un alqueno  
45 activado en una segunda molécula tal como un péptido, o por la adición radical de un mercaptano en una molécula tal como un péptido a un alqueno en una segunda molécula tal como un péptido. El enlazante de sulfuro también puede preformarse como, por ejemplo: H<sub>2</sub>N- R<sub>1</sub>-S-R<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H donde la función amino y/o carboxilo se protegen adecuadamente. Este tipo de enlazante es resistente a la escisión, pero puede utilizarse para enlazar específicamente dos péptidos adecuadamente sustituidos y protegidos.



Un enlazante de triazol puede ser específicamente una 1,2,3-triazina de la forma  
50 pueden ser cualquier entidad química, y se realiza por la adición 1,3-dipolar de una azida unida al primer péptido a un alquino terminal a un segundo péptido. Esta química es descrita en detalle por Sharpless et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 41(14), 2596, (2002), y a menudo se denomina "química click de Sharpless". Se prepara un primer péptido que contiene una función de azida o alquino, terminal a la primera cadena de péptido. Se prepara un segundo péptido con un alquino (si el primer péptido contiene una azida) o una azida (si el primer péptido contiene un alquino)

terminal a la segunda cadena de péptido. Los dos péptidos se dejan reaccionar entonces en una cicloadición 3 + 2 con o sin un catalizador que enlaza los dos péptidos a través de una función de 1,2,3-triazina.

Puede utilizarse la química "click" del azufre para formar un enlazante. Se prepara un primer péptido que contiene una función de mercaptano o alqueno, terminal con la primera cadena de péptido. Se prepara un segundo péptido con un alqueno (si el primer péptido contiene un mercaptano) o un mercaptano (si el primer péptido contiene un alqueno) terminal con la segunda cadena de péptido. Los dos péptidos se dejan reaccionar en presencia de luz o una fuente radical que enlaza los dos péptidos a través de una función de sulfuro.

Puede utilizarse química de adición de Michael para formar un enlazante. A pesar de que pueden utilizarse una variedad de pares aceptores y donantes de Michael a efectos de la presente, un ejemplo preferible de este método es el uso de mercaptanos como el donante de Michael y los alquenos activados como el aceptor de Michael. Esta química difiere de la química click de azufre anterior porque el alqueno debe tener deficiencia de electrones y la catálisis radical no es necesaria. Se prepara un primer péptido que contiene una función de mercaptano o alqueno, terminal a la primera cadena de péptido. Se prepara un segundo péptido con un alqueno (si el primer péptido contiene un mercaptano) o un mercaptano (si el primer péptido contiene un alqueno) terminal a la segunda cadena de péptido. Los dos péptidos se dejan reaccionar en presencia de ácido o base que enlaza los dos péptidos a través de una función de sulfuro.

En realizaciones, A y B; A y C, B y C y A, B y C comprenden cada uno péptidos que tienen diferentes repertorios de unión a MHC II. DP, DQ y DR son proteínas codificadas por genes independientes. En una población humana no consanguínea hay una gran cantidad de variantes (alelos) de DP, DQ y DR, y cada alelo tiene una unión de péptido característica diferente. Por ejemplo, un péptido de unión a HLA-DP puede unir algunos alelos DP pero no otros. Un "repertorio de unión" a péptido se refiere a la combinación de alelos encontrada en DP, DQ y/o DR a la cual se unirá un péptido individual. La identificación de péptidos y/o combinaciones de los mismos que unen todos los alelos DP, DQ y/o DR, generando así respuestas de memoria en un alto porcentaje de personas hasta 100% inclusive de gente, proporciona un medio para mejorar la eficiencia de la vacuna.

En realizaciones, A y B comprenden cada uno una secuencia obtenida o derivada de un organismo infeccioso diferente. En realizaciones, A, B y C comprenden cada una secuencia de péptidos obtenida o derivada de un organismo infeccioso diferente. En realizaciones, secuencias de péptidos preferidas podrían ser de un epítipo de péptido o proteína que puede ser reconocido por una célula T. Secuencias de péptidos preferidas comprenden aquellos péptidos de unión a MHC II obtenidos o derivados de Clostridium tetani, virus de la Hepatitis B, virus del herpes humano, virus de la Influenza, virus Vaccinia, virus del Epstein barr (EBV), virus de la varicela, virus del sarampión, virus del sarcoma de Rous (RSV), Citomegalovirus (CMV), virus Varicella zoster (VZV), virus de paperas, Corynebacterium diphtheria, adenovirus humanos, virus de la viruela y/o un organismo infeccioso capaz de infectar a humanos y generar células de memoria CD4+ específicas de dicho organismo infeccioso después de que se haya iniciado la infección. En realizaciones, los péptidos de unión a MHC II que tienen al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95%, incluso más preferiblemente al menos 97%, o incluso más preferiblemente al menos 99% de identidad con un péptido de unión a HLA-DP natural, un péptido de unión a HLA-DQ natural y/o un péptido de unión a HLA-DR natural obtenido o derivado de Clostridium tetani, virus de la Hepatitis B, virus del herpes humano, virus de la Influenza, virus Vaccinia, virus del Epstein barr (EBV), virus de la varicela, virus del sarampión, virus del sarcoma de Rous (RSV), Citomegalovirus (CMV), virus Varicella zoster (VZV), virus de paperas, Corynebacterium diphtheria, adenovirus humanos, virus de la viruela y/o un organismo infeccioso capaz de infectar humanos y generar células de memoria CD4+ humanas específicas de dicho organismo infeccioso después de que se haya iniciado la infección. En realizaciones, A, B y C se seleccionan para proporcionar una respuesta inmune óptima utilizando las estrategias generales expuestas en los Ejemplos 1-6 más adelante.

En ciertas realizaciones, a efectos de facilitar el procesamiento y la formulación y/o para una administración mejorada dentro de un sistema biológico, puede ser deseable aumentar la solubilidad acuosa del péptido de unión a MHC II. Con este fin, un aumento en la hidrofiliidad puede lograrse agregando aminoácidos de extremo N- y/o C-terminal hidrófilos, agregando o modificando las secuencias de aminoácidos entre los sitios de unión o realizando sustituciones a estos aminoácidos del sitio de unión. El aumento en la hidrofiliidad puede medirse, por ejemplo, por medio de un puntaje GRAVY, Gran Promedio de Hidrofobicidad, inferior. Cuando sea posible, puede influirse en el diseño de posibles modificaciones para evitar o limitar los posibles efectos negativos sobre la afinidad de unión.

Una ruta posible de modificación es la adición de aminoácidos que no sean del sitio de unión en base a los aminoácidos adyacentes al epítipo del sitio de unión, especialmente si dichos aminoácidos de flaqueo aumentarían el promedio de hidrofiliidad local del péptido. Es decir, si un epítipo del sitio de unión en su secuencia extendida nativa es flanqueado por los aminoácidos hidrófilos al lado del extremo N- y/o C-terminal, preservar algunos de dichos aminoácidos de hidrófilos de flaqueo en el péptido puede entonces aumentar su solubilidad acuosa. En ausencia de secuencias de flaqueo probablemente se aumentaría la solubilidad o en el caso de que se deseen aumentos adicionales de hidrofiliidad, pueden realizarse adiciones no nativas, idealmente en base a la similitud con la secuencia nativa. La similitud entre los aminoácidos puede ser juzgada por índices tales como los matrices Blosum 45 o PAM 250 o por otros medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, si un epítipo tiene un puntaje GRAVY de -1,0 y está precedido en el extremo N-terminal por una secuencia de aminoácidos nativa EASF (GRAVY

= 0,075) entonces la extensión del péptido para incluir EASF bajaría el puntaje GRAVY. Alternativamente, una o más sustituciones a dicha secuencia líder EASF tal como A por S, S por N o F por Y (por ejemplo, EASY, GRAVY = -0,95) o truncamiento o sustitución (por ejemplo, NY, GRAVY = -2,4) también podrían proporcionar mayor hidrofiliidad.

- 5 En algunos casos, puede ser preferible reducir la solubilidad acuosa de un péptido, por ejemplo para mejorar el atrapamiento dentro de una matriz portadora hidrófoba. En dichos casos, pueden realizarse adiciones y sustituciones similares a aquellas descritas anteriormente pero reduciendo la hidrofiliidad.

- 10 También puede ser ventajoso ajustar la carga de péptidos neta en uno o más valores de pH. Por ejemplo, puede observarse una solubilidad mínima en el pI (pH isoelectrico) de un péptido. En caso de que se desee tener una solubilidad reducida en pH 7,4 y mayor solubilidad en pH 3,0, podrían realizarse entonces modificaciones o adiciones a la secuencia de aminoácidos para lograr un pI de 7,4 y para lograr una carga positiva neta significativa a pH 3,0. En el caso de un péptido básico, la adición de residuos ácidos tales como E o D o la sustitución de K por E son ejemplos de modificaciones que podrían reducir el pI.

- 15 La estabilidad biológica o química de un péptido también puede mejorarse por la adición o sustitución de grupos de aminoácidos o modificación de extremos utilizando técnicas conocidas en la técnica. Ejemplos incluyen, a modo no taxativo, amidación y acetilación y también pueden incluir sustituciones tal como el reemplazo de un Q del extremo C-terminal (Gln) por un L y otro aminoácido menos susceptible a redisposición.

- 20 En realizaciones, la invención está dirigida a composiciones que comprenden A – x – B, en donde x comprende un sitio de escisión de cathepsina que comprende KVSVR y en donde A – x – B comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75% de identidad con cualquiera de las secuencias de aminoácidos indicadas como SEQ ID NOs: 12, 14, 17, 19 y 39-44, y preferiblemente el polipéptido que se une a una molécula de MHC II como se describe en cualquier otra parte en la presente. También se divulgan en la presente los siguientes polipéptidos:

NNFTVSFWLRVLPKVSASHLET (SEQ ID NO:1) (21, TT317557(950-969));

TLLYVLFEV (SEQ ID NO:2) (9, AdVhex64950(913-921));

- 25 ILMQYIKANSKFIGI (SEQ ID NO:3) (15, TT27213(830-841));

QSIALLMVAQAIPLVGEL (SEQ ID NO:4) (20, DT 52336(331-350));

TLLYVLFEVNNFTVSFWLRVLPKVSASHLET (SEQ ID NO:5) (30, AdvTT950);

TLLYVLFEVILMQYIKANSKFIGI (SEQ ID NO:6) (24, AdvTT830);

ILMQYIKANSKFIGIQSIALLMVAQAIPLVGEL (SEQ ID NO:7) (35, TT830DT);

- 30 QSIALLMVAQAIPLVGELILMQYIKANSKFIGI (SEQ ID NO:8) (35, DTTT830);

ILMQYIKANSKFIGIQSIALLMVAQ (SEQ ID NO:9) (27, TT830DTtrunc);

QSIALLMVAQAIIILMQYIKANSKFIGI (SEQ ID NO:10) (29, DTtruncTT830);

TLLYVLFEVPMGLPILMQYIKANSKFIGI (SEQ ID NO:11) (29, AdvpmpIpiTT830);

TLLYVLFEVKVSVRILMQYIKANSKFIGI (SEQ ID NO:12) (29, AdvkvsrTT830);

- 35 ILMQYIKANSKFIGIPMGLPQSIALLMVAQ (SEQ ID NO:13) (32, TT830pmpIpiDTTrunc o TT830pDTt);

ILMQYIKANSKFIGIKVSVRQSIALLMVAQ (SEQ ID NO:14) (32, TT830kvsrDTTrunc1);

TLLYVLFEVQSIALLMVAQ (SEQ ID NO:15) (21, AdvDTt);

TLLYVLFEVpmpIpiQSIALLMVAQ (SEQ ID NO:16) (26, AdvpDTt);

TLLYVLFEVkvsvrQSIALLMVAQ (SEQ ID NO:17) (26, AdvkDTt);

- 40 TLLYVLFEVpmpIpi NNFTVSFWLRVLPKVSASHLET (SEQ ID NO:18) (35, AdvpTT950);

TLLYVLFEVkvsvr NNFTVSFWLRVLPKVSASHLET (SEQ ID NO:19) (35, AdvkTT950);

ILMQYIKANSKFIGI QSIALLMVAQTLLYVLFEV (SEQ ID NO:20) (36, TT830DTtAdv);

TLLYVLFEV ILMQYIKANSKFIGIQSIALLMVAQ (SEQ ID NO:21) (36, AdvTT830DTt);

QSIALLMVAQAIPLV (SEQ ID NO:22) (17, DTt-3);

- IDKISDVSTIVPYIGPALNI (SEQ ID NO:23) (20, TT632)
- QSIALLSSLMVAQAIPLVIDKISDVSTIVPYIGPALNI (SEQ ID NO:24) (37, DTt-3TT632);
- IDKISDVSTIVPYIGPALNIQSIALLSSLMVAQAIPLV (SEQ ID NO:25) (37, TT632DTt-3);
- QSIALLSSLMVAQAIPLVpmglpIDKISDVSTIVPYIGPALNI (SEQ ID NO:26) (43, DTt-3pTT632);
- 5 IDKISDVSTIVPYIGPALNipmglpQSIALLSSLMVAQAIPLV (SEQ ID NO:27) (43, TT632pDTt-3);
- YVKQNTLKLAT (SEQ ID NO:28) (11, minX);
- CYPYDVPDYASLRSLVASS (SEQ ID NO:29) (19, 7430);
- NAELLVALENQHTI (SEQ ID NO:30) (14, 31201t);
- TSLYVRASGRVTVSTK (SEQ ID NO:31) (16, 66325);
- 10 EKIVLLFAIVSLVKSDQICI (SEQ ID NO:32) (20, ABW1);
- QILSIYSTVASSLALAIMVA (SEQ ID NO:33) (20, ABW2);
- MVTGIVSLMLQIGNMISIWVSHSI (SEQ ID NO:34) (24, ABP);
- EDLIFLARSALILRGSV (SEQ ID NO:35) (17, AAT);
- CSQRSKFLLMDALKLSIED (SEQ ID NO:36) (19, AAW);
- 15 IRGFVYFVETLARSICE (SEQ ID NO:37) (14, IRG);
- TFEFTSFFYRYGFVANFSMEL (SEQ ID NO:38) (21, TFE);
- LIFLARSALILRkvsvrNAELLVALENQHTI (SEQ ID NO:39) (31, AATk3120t);
- NAELLVALENQHTIkvsvrLIFLARSALILR (SEQ ID NO:40) (31, 3120tkAAT);
- ILSIYSTVASSLALAIkvsvrLIFLARSALILR (SEQ ID NO:41) (33, ABW2kAAT);
- 20 LIFLARSALILRkvsvrILSIYSTVASSLALAI (SEQ ID NO:42) (33, AATkABW2);
- LIFLARSALILRkvsvrCSQRSKFLLMDALKL (SEQ ID NO:43) (32, AATkAAW);
- CSQRSKFLLMDALKLkvsvrLIFLARSALILR (SEQ ID NO:44) (32, AAWkAAT);
- TFEFTSFFYRYGFVANFSMEL IRGFVYFVETLARSICE (SEQ ID NO:45) (38, TFEIRG) (SEQ ID NO:103); o
- IRGFVYFVETLARSICE TFEFTSFFYRYGFVANFSMEL (SEQ ID NO:46) (38, IRGTFE) (SEQ ID NO:104).
- 25 Los péptidos para su uso en la invención, particularmente péptidos de unión a MHC II, pueden realizarse utilizando una variedad de técnicas convencionales. En ciertas realizaciones, los péptidos pueden realizarse sintéticamente utilizando métodos estándar tales como síntesis sobre un soporte sólido utilizando resinas de Merrifield o similares. Esto puede lograrse con o sin una máquina diseñada para dichas síntesis.
- 30 En realizaciones alternativas, con el fin de expresar péptidos para su uso en la invención, especialmente péptidos de unión a MHC II, pueden utilizarse técnicas recombinantes. En dichas realizaciones, un ácido nucleico que codifica toda la secuencia de péptidos (y la secuencia de enlazante, si corresponde) se clonaría en un vector de expresión que se transcribiría cuando se transfecta a una línea celular. En realizaciones, un vector de expresión puede comprender un plásmido, retrovirus o un adenovirus, entre otros. El ADN para el péptido (y grupo enlazante, si está presente) puede aislarse utilizando abordajes de biología molecular, por ejemplo, mediante el uso de una reacción
- 35 en cadena de polimerasa para producir el fragmento de ADN, que luego se purifica y se clona en un vector de expresión y se transfecta a la línea celular. Técnicas adicionales útiles en la práctica de la presente invención pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology 2007 de John Wiley and Sons, Inc.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Tercera Edición) Joseph Sambrook, Peter MacCallum Cancer Institute, Melbourne, Australia; David Russell, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Cold Spring Harbor.
- 40 La producción de los péptidos recombinantes puede realizarse de varias formas utilizando células de diferentes organismos, por ejemplo, células CHO, células de insectos (por ejemplo, para expresión de baculovirus), *E. coli*, etc. Adicionalmente, con el fin de obtener una traducción óptima de proteínas la secuencia de ácidos nucleicos puede modificarse para incluir codones que comúnmente se utilizan en los organismos de los cuales derivan las células. Las SEQ ID NOs 1-46 incluyen ejemplos de secuencias obtenidas o derivadas de toxoide de tétanos, toxina diftérica
- 45 y péptidos de adenovirus, y las SEQ ID NOs 47-68 incluyen la secuencia de ADN equivalente en base al uso del

codón preferido para humanos y *E. coli*. Utilizando ADN optimizado para uso de codones en una especie específica puede permitir la producción de proteínas recombinantes óptima. Las frecuencias de codones puede optimizarse para su uso en humanos utilizando datos de frecuencia tales como los que están disponibles de varios registros de usos de codones. Uno de dichos registros es la Base de datos de uso de codones. Y. Nakamura et al., "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000." Nucl. Acids Res. 28, 292 (2000).

En realizaciones, las composiciones de la invención comprenden un ácido nucleico que codifica un péptido que comprende A – x – B, en donde x comprende un sitio de escisión de catepsina. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN, tal como ARNm. En realizaciones, las composiciones de la invención comprenden un complemento, tal como un complemento de largo completo o degenerado (debido a la degeneración del código genético) de cualquier ácido nucleico proporcionado en la presente.

A comprende un primer péptido de unión a MHC II y B comprende un segundo péptido de unión a MHC II. Adicionalmente, en realizaciones, el ácido nucleico codifica A – x – B – y – C, en donde x comprende un sitio de escisión de catepsina que comprende KVSVR, y es un enlazante de amida o un enlazante peptídico, A comprende un primer péptido de unión a MHC II, B comprende un segundo péptido de unión a MHC II y C comprende un tercer péptido de unión a MHC II.

Ciertas secuencias de interés se enumeran a continuación. La secuencia nativa es la composición 1 (C1). La mejor secuencia humana en base a la frecuencia de codón humano es la composición 2 (C2). Las conversiones se realizaron utilizando la Serie de Manipulación de Secuencias: programas JavaScript para analizar y formatear las secuencias de proteínas y ADN. Biotechniques 28:1102-1104. [http://www.bioinformatics.org/sms2/rev\\_trans.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html)

TT950: NNFTVSFWLRVPKVSASHLET (SEQ ID NO:1)

C1: aataatntaccgtagcttttggtgaggggtcctaaagtagctgtagcttagaa (SEQ ID NO:47) AF154828 250-309

C2(humana):

aacaacttcaccgtgagcttctgctgagagtgcccaagtgagcgcaccacctggagacc (SEQ ID NO:48)

AdV: TLLYVLFV (SEQ ID NO:2)

C1: acgcttctctatgttctgtcgaagt (SEQ ID NO:49)

FJ025931 20891-20917

C2(humana):

accctgctgtacgtgctgttcgagtg (SEQ ID NO:50)

TT830: ILMQYIKANSKFIGI (SEQ ID NO:3)

C1: atttatgtagcagatataaaagcaaattctaaatttaggtata (SEQ ID NO:51)

X06214 2800-2844

C2(humana):

Atcctgatgcagtagcatcaaggccaacagcaagttcatcgcatc (SEQ ID NO:52)

DT: QSIALSSLMVAQAIPLVGEL (SEQ ID NO:4)

C1: caatcgatagctttatgctttaaaggtgctcaagctataaccattgtaggagagcta (SEQ ID NO:53)

FJ858272 1066-1125

C2(humana):

cagagcatgcacctgagcagcctgatggtggccaggccatccccctggtggcgagctg (SEQ ID NO:54)

Epítotos quiméricos:

AdVTT950: TLLYVLFVNNFTVSFWLRVPKVSASHLET (SEQ ID NO:5)

C2(humana):

accctgctgtacgtgctgttcgaggtgaacaacttcaccgtgagcttctgctgagagtg

cccaaggtgagcgcaccacctggagacc (SEQ ID NO:55)

AdVTT830: TLLYVLFEVILMQYIKANSKFIGI (SEQ ID NO:6)

C2(humana):

accctgctgtacgtgctgttcgaggtgatcctgatgcagtacatcaaggccaacagcaag  
ttcatcggcatc (SEQ ID NO:56)

5 TT830 DT: ILMQYIKANSKFIGIQSIALSSLMVAQAIPLVGEL (SEQ ID NO:7)

C2(humana):

atcctgatgcagtacatcaaggccaacagcaagttcatcggcatccagagcatcgccctg  
agcagcctgatggtggcccaggccatccccctggtggcgagctg (SEQ ID NO:57)

DT TT830: QSIALSSLMVAQAIPLVGELILMQYIKANSKFIGI (SEQ ID NO:8)

10 C2(humana):

cagagcatcgccctgagcagcctgatggtggcccaggccatccccctggtggcgagctg  
atcctgatgcagtacatcaaggccaacagcaagttcatcggcatc (SEQ ID NO:58)

TT830DTtrunc: ILMQYIKANSKFIGIQSIALSSLMVAQ (SEQ ID NO:9)

C2(humana):

15 atcctgatgcagtacatcaaggccaacagcaagttcatcggcatccagagcatcgccctg  
agcagcctgatggtggcccag (SEQ ID NO:59)

DT trunc TT830: QSIALSSLMVAQAILMQYIKANSKFIGI (SEQ ID NO:10)

C2(humana):

cagagcatcgccctgagcagcctgatggtggcccaggccatcatcctgatgcagtacatc

20 aaggccaacagcaagttcatcggcatc (SEQ ID NO:60)

Epítapos universales escindidos de catepsina quiméricos previstos

AdVpmpgpTT830: TLLYVLFEVPMG.LPILMQYIKANSKFIGI (SEQ ID NO:11)

C1 (Ecoli):

accctgctgtatgtgctgtttgaagtgccgatggcctgccgattctgatgcagtatatt

25 aaagcgaacagcaaatatttggcatt (SEQ ID NO:61)

C2(humana):

accctgctgtacgtgctgttcgaggtgcccctgcccctgcccctgatgcagtacatc  
aaggccaacagcaagttcatcggcatc (SEQ ID NO:62)

AdVkvsvrTT830: TLLYVLFEVKVS.VRILMQYIKANSKFIGI (SEQ ID NO:12)

30 C1 (Ecoli):

accctgctgtatgtgctgtttgaagtgaagtgagcgtgagcattctgatgcagtatatt

aaagcgaacagcaaatatttggcatt (SEQ ID NO:63)

C2(humana):

accctgctgtacgtgctgttcgaggtgaaggtgagcgtgagaatcctgatgcagtacatc

35 aaggccaacagcaagttcatcggcatc (SEQ ID NO:64)

TT830pmpgpDTtrunc: TLLYVLFEVKVS.VRILMQYIKANSKFIGI (SEQ ID NO:13)

C1 (Ecoli):

attctgatgcagtatattaagcgcaacagcaaatttattggcattccgatgggcctgccg

cagagcattgcgctgagcagcctgatggtggccag (SEQ ID NO:65)

C2(humana):

atcctgatgcagtacatcaaggccaacagcaagttcatcgcatcccatgggcctgccc

5 cagagcatgccttgagcagcctgatggtggccag (SEQ ID NO:66)

TT830kvsrDTtrunc: ILMQYIKANSKFIGIKVS.VRQSIALSSLMVAQ (SEQ ID NO:14)

C1 (Ecoli):

attctgatgcagtatattaagcgcaacagcaaatttattggcattaaagtgagcgtgcg

cagagcattgcgctgagcagcctgatggtggccag (SEQ ID NO:67)

10 C2(humana):

atcctgatgcagtacatcaaggccaacagcaagttcatcgcatcaagtgagcgtgaga

cagagcatgccttgagcagcctgatggtggccag (SEQ ID NO:68)

15 En realizaciones, el enlazante peptídico comprende un sitio de escisión de proteasa lisosomal (por ejemplo, un sitio de escisión de catepsina). En ciertas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un enlazante peptídico comprende la secuencia de ácidos nucleicos indicada como SEQ ID NO:69 o 70, una forma degenerada o un complemento de la misma.

ccgatggcctacca (SEQ ID NO:69)

aaggtctcagtgagaac (SEQ ID NO:70)

20 En realizaciones, A, B y/o C que están codificados por un ácido nucleico de la invención tienen al menos 70% de identidad con un péptido de unión a HLA-DP, HLA-DQ o HLA-DR natural. A, B y/o C codificados por un ácido nucleico tienen, en ciertas realizaciones, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, aun más preferiblemente al menos 85%, aun más preferiblemente al menos 90%, aun más preferiblemente al menos 95%, aun más preferiblemente al menos 97% o aun más preferiblemente al menos 99% de identidad con un péptido de unión a HLA-DP, HLA-DQ o HLA-DR natural. Preferiblemente, dichos ácidos nucleicos codifican un péptido que se une a una molécula de MHC Clase II.

30 En realizaciones, un ácido nucleico, por lo tanto, comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 60% de identidad con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido de unión a HLA-DP, HLA-DQ o HLA-DR natural. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico tiene preferiblemente al menos 65%, más preferiblemente al menos al menos 70%, aun más preferiblemente al menos 75%, aun más preferiblemente al menos 80%, aun más preferiblemente al menos 85%, aun más preferiblemente al menos 90%, aun más preferiblemente al menos 95%, aun más preferiblemente al menos 97% o incluso más preferiblemente al menos 99% de identidad con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido de unión a HLA-DP, HLA-DQ o HLA-DR natural.

35 La identidad porcentual puede calcularse utilizando varias herramientas de software disponibles públicamente desarrolladas por NCBI (Bethesda, Maryland) que pueden obtenerse a través de Internet (<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/>). Ejemplos de herramientas incluyen el sistema BLAST disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Alineaciones Pairwise y ClustalW (configuración de matriz BLOSUM30) así como análisis hidropáticos Kyte-Doolittle pueden obtenerse utilizando el software de análisis de secuencias MacVector (Oxford Molecular Group). Los complementos Watson-Crick (incluidos complementos de largo completo) de los ácidos nucleicos anteriores también están comprendidos por la invención.

45 También se divulgan en la presente ácidos nucleicos que se hibridizan con cualquiera de los ácidos nucleicos proporcionados en la presente. Pueden utilizarse procedimientos de hibridización de ácidos nucleicos estándar para identificar secuencias de ácidos nucleicos relacionados de identidad porcentual seleccionada. La frase "condiciones rigurosas", como se utiliza en la presente, se refiere a parámetros que son familiares en la técnica. Dichos parámetros incluyen sal, temperatura, largo de la sonda, etc. La cantidad de no coincidencia de bases resultante tras la hibridización puede estar en el rango de aproximadamente 0% ("rigurosidad alta") a aproximadamente 30% ("rigurosidad baja"). Un ejemplo de condiciones de rigurosidad alta es la hibridización a 65°C en una solución amortiguadora de hibridización (3,5X de SSC, 0,02% de Ficoll, 0,02% de polivinilpirrolidona, 0,02% de Albúmina de Suero Bovino, 2,5mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH7), 0,5% de SDS, 2mM de EDTA) SSC es 0,15M de cloruro de sodio/0,015M de citrato de sodio, pH 7; SDS es dodecilsulfato de sodio y EDTA es ácido etilendiaminatetraacético. Después de la

50

hibridización, una membrana sobre la cual se transfiere el ácido nucleico se lava, por ejemplo, en 2X SSC a temperatura ambiente y luego a 0,1 – 0,5X de SSC/0,1X SDS a temperaturas de hasta 68°C.

5 En realizaciones, el ácido nucleico puede unirse operativamente a un promotor. La expresión en huéspedes procariontes puede lograrse utilizando regiones reguladoras procariontes. La expresión en huéspedes eucariotes puede lograrse utilizando regiones reguladoras eucariotes. Dichas regiones incluirán en general una región promotora suficiente como para dirigir el inicio de la síntesis de ARN. En realizaciones, el ácido nucleico puede comprender además secuencias reguladoras transcripcionales y translacionales, dependiendo de la naturaleza del huésped. Las señales reguladoras transcripcionales y translacionales pueden obtenerse o derivar de fuentes virales, tales como retrovirus, adenovirus, virus del papiloma bovino, virus del simio o similares.

10 En realizaciones, un ácido nucleico se inserta en un vector capaz de integrar las secuencias deseadas en el cromosoma celular huésped. También pueden ser necesarios elementos adicionales para síntesis óptima del ARNm. Estos elementos pueden incluir señales de empalme, así como promotores de transcripción, potenciadores y señales de terminación.

15 En realizaciones, se incorpora un ácido nucleico en un plásmido o vector viral capaz de replicación autónoma en el huésped receptor. Puede emplearse cualquiera de una amplia variedad de vectores a estos efectos, tales como vectores procariontes y eucariotes. Los vectores eucariotes pueden ser vectores virales. Por ejemplo, a modo no taxativo, el vector puede ser un vector del virus de la varicela, vector del virus del herpes, vector del adenovirus o cualquiera de varios vectores de retrovirus. Los vectores virales incluyen virus de ADN o ARN para provocar la expresión del inserto de ADN o el inserto de ARN.

20 El vector u otro constructo pueden introducirse en una célula huésped apropiada por cualquier variedad de medios adecuados, es decir, transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, microinyección directa y similares. Adicionalmente, el ADN o ARN pueden inyectarse directamente en las células o pueden impulsarse a través de membranas celulares después de adherirse a micropartículas o nanopartículas, tales como los nanoportadores sintéticos proporcionados en la presente.

#### 25 D. USOS DEL PÉPTIDO DE LA INVENCIÓN: COMPOSICIONES Y MÉTODOS

Debe comprenderse que las composiciones de la invención pueden realizarse de cualquier manera adecuada y la invención no está limitada de ningún modo a composiciones que pueden producirse utilizando los métodos descritos en la presente. La selección de un método apropiado puede requerir la atención a las propiedades de los restos particulares que se están asociando.

30 Las composiciones de la invención pueden administrarse por una variedad de vías de administración, incluidas a modo no taxativo, vía parenteral (tal como subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica); oral; transnasal, transmucosa, rectal; oftálmica o transdérmica.

35 Las composiciones y métodos descritos en la presente pueden utilizarse para inducir, mejorar, suprimir, dirigir o redirigir una respuesta inmune. Las composiciones y métodos descritos en la presente pueden utilizarse para la profilaxis y/o tratamiento de afecciones tales como cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades metabólicas, enfermedades degenerativas, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades inmunológicas u otros trastornos y/o afecciones. Las composiciones y métodos descritos en la presente también pueden utilizarse para el tratamiento de una adicción, tal como una adicción a nicotina o a un narcótico. Las composiciones y métodos descritos en la presente también pueden utilizarse para la profilaxis y/o tratamiento de una afección que resulta de la exposición a una toxina, sustancia peligrosa, toxina del medio ambiente u otro agente dañino. Las composiciones y métodos descritos en la presente también pueden utilizarse para inducir o mejorar la proliferación de las células T o producción de citoquinas, por ejemplo, cuando las composiciones proporcionadas en la presente se ponen en contacto con las células T *in vivo* o *in vitro*.

45 En una realización, las composiciones de la invención pueden administrarse junto con vacunas conjugadas o no conjugadas. En realizaciones, las composiciones de la invención pueden unirse covalentemente o no covalentemente a un péptido portador o proteína portadora o a uno o más antígenos. Portadores útiles comprenden proteínas portadoras que se conocen como útiles en vacunas conjugadas, incluidas, a modo no taxativo, toxoide de tétanos (TT), toxoide de difteria (DT), el mutante no tóxico de toxina diftérica, CRM197, el complejo de proteína de membrana externa de *N. meningitidis* del grupo B y hemocianina de lapa californiana (KLH). Otros portadores pueden comprender los nanoportadores sintéticos descritos en cualquier otra parte en la presente y otros portadores que pueden ser conocidos convencionalmente.

55 La conjugación puede realizarse utilizando técnicas convencionales de conjugación covalente o no covalente. Técnicas útiles para utilizar las composiciones de la invención en dichas vacunas conjugadas o convencionales incluyen, a modo no taxativo, las que se describen generalmente en MD Lairmore et al., "Human T-lymphotropic virus type 1 peptides in chimeric and multivalent constructs with promiscuous T-cell epitopes enhance immunogenicity and overcome genetic restriction." *J Virol.* Oct;69(10):6077-89 (1995); CW Rittershause et al., "Vaccine-induced antibodies inhibit CETP activity in vivo and reduce aortic lesions in a rabbit model of atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Sep;20(9):2106-12 (2000); MV Chengalvala et al., "Enhanced

immunogenicity of hepatitis B surface antigen by insertion of a helper T cell epitope from tetanus toxoid." *Vaccine*. Mar 5;17(9-10):1035-41 (1999). NK Dakappagari et al., "A chimeric multi-human epidermal growth factor receptor-2 B cell epitope peptide vaccine mediates superior antitumor responses." *J Immunol*. Apr 15;170(8):4242-53 (2003); JT Garrett et al. "Novel engineered trastuzumab conformational epitopes demonstrate in vitro and in vivo antitumor properties against HER-2/neu." *J Immunol*. Jun 1;178(11):7120-31 (2007).

En otras realizaciones, las composiciones de la invención pueden combinarse con un antígeno, o una vacuna convencional, en un vehículo para formar una mezcla inyectable. Las mezclas pueden realizarse utilizando técnicas de fabricación y combinación farmacéuticas para llegar a formas de dosificación útiles. Técnicas adecuadas para utilizar en la práctica de la presente invención pueden encontrarse en una variedad de fuentes, incluidas, a modo no taxativo, M.F. Powell et al., *Vaccine Design*, 1995 Springer-Verlag publ.; o L. C. Paoletti et al. eds., *Vaccines: from Concept to Clinic. A Guide to the Development and Clinical Testing of Vaccines for Human Use 1999* CRC Press publ.

En realizaciones, las composiciones de la invención pueden utilizarse en combinación con nanoportadores sintéticos. Pueden utilizarse una amplia variedad de nanoportadores sintéticos de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, los nanoportadores sintéticos son esferas o esferoides. En algunas realizaciones, los nanoportadores sintéticos son planos o en forma de placa. En algunas realizaciones, los nanoportadores sintéticos son cubos o cuboides. En algunas realizaciones, los nanoportadores sintéticos son óvalos o elipses. En algunas realizaciones, los nanoportadores sintéticos son cilindros, conos o pirámides.

A menudo es deseable usar una población de nanoportadores sintéticos que sea relativamente uniforme en términos de tamaño, forma y/o composición de modo que cada nanoportador sintético tenga propiedades similares. Por ejemplo, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de los nanoportadores sintéticos, en base al número total de nanoportadores sintéticos, puede tener una dimensión mínima o dimensión máxima que se encuentra dentro del 5%, el 10% o el 20% del diámetro medio o la dimensión media de los nanoportadores sintéticos. En algunas realizaciones, una población de nanoportadores sintéticos puede ser heterogénea con respecto al tamaño, la forma y/o la composición.

Los nanoportadores sintéticos pueden ser sólidos o huecos y pueden comprender una o más capas. En algunas realizaciones, cada capa tiene una composición única y propiedades únicas con respecto a la(s) otra(s) capa(s). Para proporcionar un ejemplo, los nanoportadores sintéticos pueden tener una estructura núcleo/envoltura, en donde el núcleo es una capa (por ejemplo, un núcleo polimérico) y la envoltura es una segunda capa (por ejemplo, una bicapa o monocapa lipídica). Los nanoportadores sintéticos pueden comprender una pluralidad de diferentes capas.

En algunas realizaciones, los nanoportadores sintéticos pueden comprender opcionalmente uno o más lípidos. En algunas realizaciones, un nanoportador sintético puede comprender un liposoma. En algunas realizaciones, un nanoportador sintético puede comprender una bicapa lipídica. En algunas realizaciones, un nanoportador sintético puede comprender una monocapa lipídica. En algunas realizaciones, un nanoportador sintético puede comprender una micela. En algunas realizaciones, un nanoportador sintético puede comprender un núcleo que comprende una matriz polimérica rodeada de una capa lipídica (por ejemplo, bicapa lipídica, monocapa lipídica, etc.). En algunas realizaciones, un nanoportador sintético puede comprender un núcleo no polimérico (por ejemplo, partícula metálica, punto cuántico, partícula de cerámica, partícula ósea, partícula viral, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, etc.) rodeado de una capa lipídica (por ejemplo, bicapa lipídica, monocapa lipídica, etc.).

En algunas realizaciones, los nanoportadores sintéticos pueden comprender uno o más polímeros. En algunas realizaciones, dicho polímero puede estar rodeado por una capa de recubrimiento (por ejemplo, liposoma, monocapa lipídica, micela, etc.). En algunas realizaciones, varios elementos de los nanoportadores sintéticos pueden acoplarse al polímero.

En algunas realizaciones, una superficie de rasgo inmunológico, un resto de direccionamiento, oligonucleótido y/u otro elemento pueden asociarse covalentemente con una matriz polimérica. En algunas realizaciones, la asociación covalente está mediada por un conector. En algunas realizaciones, una superficie de rasgo inmunológico, un resto de direccionamiento, un oligonucleótido y/u otro elemento pueden asociarse no covalentemente con una matriz polimérica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una superficie de rasgo inmunológico, un resto de direccionamiento, oligonucleótido y/u otro elemento pueden encapsularse dentro de la matriz polimérica, ser rodeados por la misma y/o dispersarse en la misma. Alternativa o adicionalmente, una superficie de rasgo inmunológico, un resto de direccionamiento, oligonucleótido y/u otro elemento pueden asociarse con una matriz polimérica por interacciones hidrófobas, interacciones de carga, fuerzas de van der Waals, etc.

Una amplia variedad de polímeros y métodos para formar matrices poliméricas a partir de los mismos son conocidos convencionalmente. En general, una matriz polimérica comprende uno o más polímeros. Los polímeros pueden ser polímeros naturales o no naturales (sintéticos). Los polímeros pueden ser homopolímeros o copolímeros que comprenden dos o más monómeros. En términos de secuencia, los copolímeros pueden ser aleatorios, en bloque o comprender una combinación de secuencias aleatorias y en bloque. Típicamente, polímeros de acuerdo con la presente invención son polímeros orgánicos.

Ejemplos de polímeros adecuados para utilizar en la presente invención incluyen, a modo no taxativo, polietilenos, policarbonatos (por ejemplo, poli(1,3-dioxan-2-ona)), polianhídridos (por ejemplo, anhídrido polisebácico), polipropilfumeratos, poliamidas (por ejemplo, policaprolactam), poliacetales, poliéteres, poliésteres (por ejemplo, polilactida, poliglicólico, polilactida-co-glicólico, policaprolactona, ácido polihidroxi (por ejemplo, poli( $\beta$ -hidroxialcanoato)), poli(ortoésteres), policianoacrilatos, alcoholes polivinílicos, poliuretanos, polifosfacenos, poli(acrilatos), polimetacrilatos, poliureas, poliestirenos y poliaminas, polilisina, copolímeros de polilisina-PEG y poli(etilenimina), copolímeros de poli(etilenimina)-PEG.

En algunas realizaciones, los polímeros de acuerdo con la presente invención incluyen polímeros que han sido aprobados para su uso en humanos por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA) en virtud del artículo 177.2600 del título 21 del Código de Reglamentos Federales e incluyen, a modo no taxativo, poliésteres (por ejemplo, ácido poliláctico, ácido poli(láctico-co-glicólico), policaprolactona, polivalerolactona, poli(1,3-dioxan-2ona)); polianhídridos (por ejemplo, poli(anhídrido sebácico)); poliéteres (por ejemplo, polietilenglicol); poliuretanos; polimetacrilatos; poli(acrilatos); y policianoacrilatos.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser hidrófilos. Por ejemplo, los polímeros pueden comprender grupos aniónicos (por ejemplo, grupo fosfato, grupo sulfato, grupo carboxilato); grupos catiónicos (por ejemplo, grupo de amina cuaternaria); o grupos polares (por ejemplo, grupo hidroxilo, grupo tiol, grupo amina). En algunas realizaciones, un nanoportador sintético que comprende una matriz polimérica hidrófila genera un entorno hidrófilo dentro del nanoportador sintético. En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser hidrófobos. En algunas realizaciones, un nanoportador sintético que comprende una matriz polimérica hidrófoba genera un entorno hidrófobo dentro del nanoportador sintético. La selección de la hidrofiliidad o hidrofobicidad del polímero puede tener un impacto en la naturaleza de los materiales que se incorporan (por ejemplo, acoplados) dentro del nanoportador sintético.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden modificarse con uno o más restos y/o grupos funcionales. Una variedad de restos o grupos funcionales pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, los polímeros pueden modificarse con polietilenglicol (PEG), con un carbohidrato y/o poliacetales acíclicos derivados de polisacáridos (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301). Pueden realizarse ciertas realizaciones utilizando las enseñanzas generales de la Patente de los Estados No. 5543158 de Gref et al. o la publicación WO WO2009/051837 de Von Andrian et al.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden modificarse con un grupo de ácido graso o lípido. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behénico o lignocérico. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido palmitoleico, oleico, vaccénico, linoleico, alfa-linoleico, gama-linoleico, araquidónico, gadoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico o erúcido.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser poliésteres, incluidos copolímeros que comprenden unidades de ácido láctico y ácido glicólico, tales como poli(ácido láctico - ácido co-glicólico) y poli(láctido-co-glicólico), denominados colectivamente en la presente "PLGA"; y homopolímeros que comprenden unidades de ácido glicólico, denominados en la presente "PGA", y unidades de ácido láctico, tales como ácido poli-L-láctico, ácido poli-D-láctico, ácido poli-D,L-láctico, poli-L-láctido, poli-D-láctido y poli-D,L-láctido, denominados colectivamente en la presente "PLA". En algunas realizaciones, poliésteres ejemplares incluyen, por ejemplo, polihidroxiácidos; copolímeros de PEG y copolímeros de láctido y glicólico (por ejemplo, copolímeros de PLA-PEG, copolímeros de PGA-PEG, copolímeros de PLGA-PEG y derivados de los mismos. En algunas realizaciones, poliésteres incluyen, por ejemplo, poli(caprolactona), copolímeros de poli(caprolactona)-PEG, poli(L-lactida-co-L-lisina), éster de poli(serina), éster de poli(4-hidroxi-L-prolina), ácido poli[ $\alpha$ -(4-aminobutil)-L-glicólico] y derivados de los mismos.

En algunas realizaciones, un polímero puede ser PLGA. PLGA es un copolímero biocompatible y biodegradable de ácido láctico y ácido glicólico y varias formas de PLGA se caracterizan por la relación de ácido láctico:ácido glicólico. Ácido láctico puede ser ácido L-láctico, ácido D-láctico o ácido D,L-láctico. La tasa de degradación del PLGA puede ajustarse alterando la relación ácido láctico:ácido glicólico. En algunas realizaciones, el PLGA a ser utilizado de acuerdo con la presente invención se caracteriza por una relación ácido láctico:ácido glicólico de aproximadamente 85:15, aproximadamente 75:25, aproximadamente 60:40, aproximadamente 50:50, aproximadamente 40:60, aproximadamente 25:75 o aproximadamente 15:85.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser uno o más polímeros acrílicos. En ciertas realizaciones, los polímeros acrílicos incluyen, por ejemplo, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de metacrilato de aminoalquilo, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), copolímero de alquilamida de ácido metacrílico, poli(metacrilato de metilo), poli(anhídrido de ácido metacrílico), metacrilato de metilo, polimetacrilato, copolímero de poli(metacrilato de metilo), poli(acrilamida), copolímero de metacrilato de aminoalquilo, copolímeros de metacrilato de glicidilo, policianoacrilatos y combinaciones que comprende uno o más de los polímeros precedentes. El polímero de acrílico puede comprender copolímeros totalmente polimerizados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico con un bajo contenido de grupos de amonio cuaternario.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser polímeros catiónicos. En general, los polímeros catiónicos son capaces de condensar y/o proteger hebras de ácidos nucleicos con carga negativa (por ejemplo, ADN o derivados de los mismos). Los polímeros que contienen amina tales como dendrímeros de poli(lisina) (Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; y Kabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6:7), poli(etilenoimina) (PEI; Boussif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297) y poli(amidoamina) (Kukowska-Latallo et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703; y Haensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372) están cargados positivamente en un pH fisiológico, forman pares de iones con ácidos nucleicos y median la transfección en una variedad de líneas celulares. En realizaciones, los nanoportadores sintéticos de la invención pueden no comprender (o pueden excluir) polímeros catiónicos.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser poliésteres degradables que tienen cadenas laterales catiónicas (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010; Kwon et al., 1989, Macromolecules, 22:3250; Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633; y Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399). Ejemplos de estos poliésteres incluyen poli(L-láctido-co-L-lisina) (Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010), poli(éster de serina) (Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina) (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; y Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633), y poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina) (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; y Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633).

Las propiedades de éstos y otros polímeros y métodos para prepararlos son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos 6.123.727; 5.804.178; 5.770.417; 5.736.372; 5.716.404; 6.095.148; 5.837.752; 5.902.599; 5.696.175; 5.514.378; 5.512.600; 5.399.665; 5.019.379; 5.010.167; 4.806.621; 4.638.045; y 4.946.929; Wang et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:9480; Lim et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:2460; Langer, 2000, Acc. Chem. Res., 33:94; Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7; y Urich et al., 1999, Chem. Rev., 99:3181). De forma más general, una variedad de métodos para sintetizar ciertos polímeros adecuados se describen en Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Ed. por Goethals, Pergamon Press, 1980; Principles of Polymerization por Odian, John Wiley & Sons, Cuarta Edición, 2004; Contemporary Polymer Chemistry por Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, Nature, 390:386; y en las Patentes de los Estados Unidos 6.506.577, 6.632.922, 6.686.446 y 6.818.732.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser polímeros lineales o ramificados. En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser dendrímeros. En algunas realizaciones, los polímeros pueden estar sustancialmente reticulados entre sí. En algunas realizaciones, los polímeros pueden estar sustancialmente libres de reticulación. En algunas realizaciones, los polímeros pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención sin someterse a una etapa de reticulación. También debe comprenderse que los nanoportadores sintéticos de la invención pueden comprender copolímeros en bloque, copolímeros de injerto, combinaciones, mezclas y/o aductos de cualquiera de los anteriores y otros polímeros. Los expertos en la técnica reconocerán que los polímeros enumerados en la presente representan una lista de polímeros ejemplar, pero no completa, que pueden ser de utilidad de acuerdo con la presente invención.

En algunas realizaciones, los nanoportadores sintéticos pueden no comprender un componente polimérico. En algunas realizaciones, los nanoportadores sintéticos pueden comprender partículas de metal, puntos cuánticos, partículas de cerámica, etc. En algunas realizaciones, un nanoportador sintético no polimérico es una acumulación de componentes no poliméricos, tal como una acumulación de átomos metálicos (por ejemplo, átomos de oro).

En algunas realizaciones, los nanoportadores sintéticos pueden comprender opcionalmente una o más entidades anfífilas. En algunas realizaciones, una entidad anfífila puede promover la producción de nanoportadores sintéticos con mayor estabilidad, mejor uniformidad o mejor viscosidad. En algunas realizaciones, las entidades anfífilas pueden asociarse con la superficie interior de una membrana lipídica (por ejemplo, bicapa lipídica, monocapa lipídica, etc.). Muchas entidades anfífilas conocidas en la técnica son adecuadas para utilizar en la realización de nanoportadores sintéticos de acuerdo con la presente invención. Dichas entidades anfífilas incluyen, a modo no taxativo, fosfoglicéridos; fosfatidilcolinas; dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC); dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE); dioleiloxipropiltriethylamonio (DOTMA); dioleilfosfatidilcolina; colesterol; éster de colesterol; diacilglicerol; diacilglicerolsuccinato; difosfatidilglicerol (DPPG); hexanodecanol; alcoholes grasos tales como polietilenglicol (PEG); éter de polioxietilen-9-laurilo; un ácido graso tensioactivo, tal como ácido palmítico o ácido oleico; ácidos grasos; monoglicéridos de ácidos grasos; diglicéridos de ácidos grasos; amidas de ácidos grasos; glicocolato de trioleato de sorbitán (Span®85); monolaurato de sorbitán (Span®20); polisorbato 20 (Tween®20); polisorbato 60 (Tween®60); polisorbato 65 (Tween®65); polisorbato 80 (Tween®80); polisorbato 85 (Tween®85); monoestearato de polioxietileno; surfactina; un poloxómero; un éster de ácido graso de sorbitán tal como trioleato de sorbitán; lecitina; lisolecitina; fosfatidilserina; fosfatidilinositol; esfingomiolina; fosfatidiletanolamina (cefalina); cardioplipina; ácido fosfatídico; cerebrósidos; dicetilfosfato; dipalmitoilfosfatidilglicerol; estearilamina; dodecilamina; hexadecil-amina; palmitato de acetilo; ricinoleato de glicerol; estearato de hexadecilo; miristato de isopropilo; tiloxapol; polietilenglicol 5000-fosfatidiletanolamina; polietilenglicol 400-monostearato; fosfolípidos; detergentes sintéticos y/o naturales que tienen altas propiedades tensioactivas; desoxicolatos; ciclodextrinas; sales caotrópicas; agentes de apareamiento iónico y combinaciones de los mismos. Un componente de la entidad anfífila puede ser una mezcla de entidades anfífilas diferentes. Los expertos en la técnica reconocerán que se trata de una lista ejemplar no taxativa de

sustancias con actividad tensioactiva. Puede utilizarse cualquier entidad anfífilica en la producción de nanoportadores sintéticos que deben utilizarse de acuerdo con la presente invención.

En algunas realizaciones, los nanoportadores sintéticos pueden comprender opcionalmente uno o más carbohidratos. Los carbohidratos pueden ser naturales o sintéticos. Un carbohidrato puede ser un carbohidrato natural derivado. En ciertas realizaciones, un carbohidrato comprende monosacárido o disacárido, incluidas, a modo no taxativo, glucosa, fructosa, galactosa, ribosa, lactosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, celbiosa, manosa, xilosa, arabinosa, ácido glucorónico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galatosamina y ácido neurámico. En ciertas realizaciones, un carbohidrato es un polisacárido, incluido, a modo no taxativo, pululano, celulosa, celulosa microcristalina, metilcelulosa de hidroxipropilo (HPMC), hidroxicelulosa (HC), metilcelulosa (MC), dextrano, ciclodextrano, glicógeno, hidroxietilalmidón, carragenina, glicón, amilosa, quitosano, N,O-carboximetilquitosano, algina y ácido alginico, almidón, quitina, inulina, konjac, glucomanan, pustulán, heparina, ácido hialurónico, curdlano y xantano. En realizaciones, los nanoportadores sintéticos de la invención no comprenden (no excluyen específicamente) carbohidratos, tal como polisacárido. En ciertas realizaciones, el carbohidrato puede comprender un derivado de carbohidrato tal como un alcohol de azúcar, incluido, a modo no taxativo, manitol, sorbitol, xilitol, eritritol, maltitol y lactitol.

Las composiciones de acuerdo con la invención comprenden nanoportadores sintéticos de la invención o constructos de vacunas en combinación con excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones pueden realizarse utilizando técnicas de fabricación y combinación farmacéuticas para llegar a formas de dosificación útiles. En una realización, los nanoportadores sintéticos de la invención están suspendidos en solución salina estéril para inyección junto con un conservante. En realizaciones, composiciones típicas de la invención pueden comprender excipientes que comprenden soluciones amortiguadoras inorgánicas u orgánicas (por ejemplo, sales de fosfato de sodio o potasio, carbonato, acetato o citrato) y agentes de ajuste de pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o potasio, sales de citrato o acetato, aminoácidos y sus sales) antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, alfa-tocoferol), tensoactivos (por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80, polioxietileno 9-10 nonil fenol, desoxicolato de sodio), estabilizadores de solución, y/o criolío (por ejemplo, sacarosa, lactosa, manitol, trehalosa), agentes de ajuste osmótico (por ejemplo, sales o azúcares), agentes antibacterianos (por ejemplo, ácido benzoico, fenol, gentamicina), agentes antiespumantes (por ejemplo, polidimetilsiloxano), conservantes (por ejemplo, timerosal, 2-fenoxietanol, EDTA), estabilizadores poliméricos y agentes de ajuste de viscosidad (por ejemplo, polivinilpirrolidona, poloxámero 488, carboximetilcelulosa) y co-disolventes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicol, etanol).

Los péptidos de unión a MHC II pueden encapsularse en nanoportadores sintéticos utilizando una variedad de métodos incluidos, a modo no taxativo, C. Astete et al., "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles" *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, Vol. 17, No. 3, pp. 247-289 (2006); K. Avgoustakis "Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery" *Current Drug Delivery* 1:321-333 (2004); C. Reis et al., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles" *Nanomedicine* 2:8-21 (2006). Pueden utilizarse otros métodos adecuados para encapsular materiales tales como péptidos en nanoportadores sintéticos, incluidos, a modo no taxativo, los métodos divulgados en la Patente de los Estados Unidos 6.632.671 de Unger, 14 de octubre de 2003. En otra realización, los péptidos de unión a MHC II pueden adsorberse a una superficie de los nanoportadores sintéticos como se describe en general en M. Singh et al., "Anionic microparticles are a potent delivery system for recombinant antigens from *Neisseria meningitidis* serotype B". *J Pharm Sci.* Feb;93(2):273-82 (2004).

En realizaciones, las composiciones de acuerdo con la invención pueden comprender antígenos y/o adyuvantes. En realizaciones, las vacunas de acuerdo con la invención pueden comprender composiciones de la invención junto con antígenos y/o adyuvantes. Se indican en cualquier otra parte de la presente antígenos y/o adyuvantes útiles en la práctica de la invención. Como se indica en cualquier otra parte en la presente, los péptidos de unión a MHC II de las composiciones de la invención pueden acoplarse covalentemente o no covalentemente a los antígenos y/o adyuvantes, o pueden mezclarse con los antígenos y/o adyuvantes. Las técnicas generales para acoplamiento o mezcla de materiales se han indicado en cualquier otra parte en la presente; dichas técnicas pueden adaptarse a acoplamiento o mezcla de los péptidos de unión a MHC II de las composiciones de la invención o con los antígenos y/o adyuvantes. Para descripciones detalladas de métodos de conjugación covalentes disponibles, ver Hermanson G T "Bioconjugate Techniques", 2da Edición Publicada por Academic Press, Inc., 2008. Además de la unión covalente, el acoplamiento puede lograrse por la adsorción a un portador pre-formado, tal como un nanoportador sintético, o por encapsulación durante la formación de portadores, tal como un nanoportador sintético. En una realización preferida, los péptidos de unión a MHC II de las composiciones de la invención se acoplan a nanoportadores sintéticos que también se acoplan a antígenos y/o adyuvantes.

Los nanoportadores sintéticos pueden prepararse utilizando una amplia variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los nanoportadores sintéticos pueden formarse por medio de métodos como nanoprecipitación, flujo focalizado utilizando canales fluidicos, secado por pulverización, evaporación de disolvente de emulsión simple o doble, extracción de disolvente, separación de fases, molido, procedimientos de microemulsión, microfabricación, nanofabricación, capas sacrificiales, coacervación simple y compleja y otros métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Alternativa o adicionalmente, se han descrito síntesis de disolventes acuosos y orgánicos para un semiconductor monodisperso, nanomateriales conductores, magnéticos, orgánicos y otros (Pellegrino et al., 2005, *Small*, 1:48; Murray et al., 2000, *Ann. Rev. Mat. Sci.*, 30:545 y Trindade et al., 2001, *Chem. Mat.*, 13:3843). Se

han descrito en la literatura métodos adicionales (ver, por ejemplo, Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275; y Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755 y también las Patentes de los Estados Unidos 5578325 y 6007845).

5 Varios materiales pueden acoplarse a través de encapsulación en nanoportadores sintéticos, según sea deseable, utilizando una variedad de métodos incluidos a modo no taxativo C. Astete et al., "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles" J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 17, No. 3, pp. 247–289 (2006); K. Avgoustakis "Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery" Current Drug Delivery 1:321-333 (2004); C. Reis et al., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles" Nanomedicine 2:8–21 (2006). Pueden utilizarse otros métodos adecuados para encapsular materiales, tales como oligonucleótidos, en nanoportadores sintéticos, incluidos, a modo no taxativo, los métodos divulgados en la Patente de los Estados Unidos 6.632.671 de Unger (14 de octubre de 2003).

15 En ciertas realizaciones, se preparan nanoportadores sintéticos por medio de un proceso de nanoprecipitación o secado por pulverizado. Las condiciones utilizadas en la preparación de nanoportadores sintéticos pueden alterarse para proporcionar partículas de un tamaño o propiedades deseados (por ejemplo, hidrofobicidad, hidrofiliidad, morfología externa, "adhesión", forma, etc.). El método de preparación de los nanoportadores sintéticos y las condiciones (por ejemplo, disolvente, temperatura, concentración, tasa de flujo de aire, etc.) utilizadas pueden depender de los materiales que deben acoplarse con los nanoportadores sintéticos y/o la composición de la matriz polimérica.

20 Si las partículas preparadas por cualquiera de los métodos anteriores tienen un rango de tamaño fuera del rango deseado, se le puede dar a las partículas un tamaño adecuado, por ejemplo, utilizando un tamiz.

25 Debe comprenderse que las composiciones de la invención pueden realizarse de cualquier manera adecuada y la invención no está limitada de ningún modo a composiciones que pueden producirse utilizando los métodos descritos en la presente. La selección de un método apropiado puede requerir la atención a las propiedades de los restos particulares que se están asociando.

30 En algunas realizaciones, los nanoportadores sintéticos de la invención se fabrican en condiciones estériles o se someten a esterilización terminal. Esto puede asegurar que la composición resultante sea estéril y no infecciosa, mejorando de esa forma la seguridad cuando se compara con composiciones no estériles. Esto proporciona una medición de seguridad valiosa, especialmente cuando los sujetos que reciben nanoportadores sintéticos tienen defectos inmunes, padecen infección y/o son susceptibles a infección. En algunas realizaciones, los nanoportadores sintéticos de la invención pueden liofilizarse y almacenarse en suspensión o como polvo liofilizado, dependiendo de la estrategia de formulación durante períodos extendidos sin perder actividad.

35 Las composiciones de la invención pueden administrarse por una variedad de vías de administración, incluidas a modo no taxativo, vía parenteral (tal como subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica); oral; transnasal, transmucosa, rectal; oftálmica o transdérmica.

## E. EJEMPLOS

La invención se comprenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente con propósitos ilustrativos de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, a modo no taxativo.

40 Los expertos en la técnica apreciarán que pueden configurarse varias adaptaciones y modificaciones de las realizaciones recién descritas sin apartarse del alcance de la invención. Los expertos en la técnica pueden aplicar otras técnicas y métodos adecuados conocidos en la técnica en numerosas modalidades específicas y a la luz de la descripción de la presente invención descrita en la presente.

45 Por lo tanto, debe comprenderse que la invención puede ponerse en práctica de otra forma que no esté específicamente descrita en la presente. La descripción anterior pretende ser ilustrativa y no restrictiva. Muchas otras realizaciones serán evidentes para los expertos en la técnica tras una lectura de la descripción anterior. Por lo tanto, el alcance de la invención debería determinarse con referencia a las reivindicaciones adjuntas.

### Ejemplo 1: Generación de péptidos de memoria universal

50 Con el fin de generar péptidos quiméricos, se realizó la predicción del epítipo de Clase II utilizando las herramientas de predicción de los epítipos de células T de la Base de Datos de Epítipos Inmunes\* (IEDB) (<http://www.immuneepitope.org/>). Para cada péptido, la herramienta de predicción produce un rango percentil para cada uno de los tres métodos (ARB, SMM\_align y Sturniolo). El ranking se genera comparando el puntaje de los péptidos con los puntajes de cinco millones de 15 mers aleatorios seleccionados de la base de datos de SWISSPORT. Se utiliza luego la media de los rangos percentiles para los tres métodos para generar el rango para un método de consenso. Los péptidos que deben ser evaluados utilizando el método de consenso pueden generarse utilizando secuencias derivadas u obtenidas de varias fuentes, incluidas organismos infecciosos capaces de infectar humanos y generar células de memoria CD4+ humanas específicas de dicho organismo infeccioso luego de que se

haya iniciado la infección. Ejemplos de dichos organismos infecciosos han sido indicados en otras parte en la presente.

5 En una realización particular, la proteína individual y los epítomos de péptidos se seleccionaron de toxina de tétanos, toxina diftérica o adenovirus, y se analizaron para identificar los epítomos de HLA-DR y HLA-DP previstos. Para un análisis de toda la proteína, se seleccionaron epítomos previstos de HLA-DR en base a un ranking de consenso (aglutinantes de alta afinidad previstos) y cobertura amplia en los alelos de HLA-DR. Además, se seleccionaron epítomos que fueron aglutinantes de afinidad alta previstos para HLA-DP0401 y DP0402. Estos 2 alelos para DP se seleccionaron debido a que se encuentran en un porcentaje alto de la población en América del Norte (aproximadamente 75%). En base a los resultados de epítomos individuales, en ciertas realizaciones se generaron péptidos quiméricos que proporcionarían la cobertura más amplia prevista y unión de afinidad alta. Ver las Figuras 10 15-16. Como se muestra en la Figura 15, pueden generarse composiciones que tienen la forma A-x-B que tiene una cobertura prevista más amplia y unión de afinidad más alta que las composiciones que tienen sólo A o B pero no ambos.

15 En algunos casos, los sitios de escisión de catepsina se insertaron en la unión de los péptidos. Se sintetizaron los péptidos quiméricos (GenScript) y se resuspendieron en agua para su uso.

Si bien la realización particular indicada anteriormente se utilizó para producir composiciones optimizadas que comprendían péptidos de unión a HLA-DR y HLA-DP, pueden utilizarse las mismas técnicas para producir composiciones optimizadas que comprenden péptidos de unión a HLA-DQ.

Ejemplo 2: Evaluación de la secuencia de aminoácidos núcleo

20 Los epítomos específicos de HLA-DP y HLA-DR fueron evaluados para epítomos de unión núcleo por análisis de truncamiento (1,2). Se encontraron en común en varios epítomos secuencias de aminoácidos núcleo selectivas para una proteína de clase II de HLA específica. Un ejemplo de esto son las estructuras de unión núcleo comunes que se han identificado que constituyen un supertipo de especificidad de unión a péptidos para HLA-DP4 (3). Es probable que estos aminoácidos núcleo mantengan una configuración estructural que permita una unión de afinidad alta. Como resultado, es posible sustituir aminoácidos de región que no son del núcleo con propiedades químicas similares sin inhibir la capacidad de unirse a la Clase II (4). Esto puede demostrarse experimentalmente utilizando un análisis sustitucional y luego programas de predicción de unión de epítomos. Para realizar el análisis se introdujeron sustituciones de aminoácidos individuales y luego la unión de afinidad a la Clase II prevista se determinó utilizando la herramienta de predicción de unión a células T de IEDB (ver la Figura 20).

30 En este caso, se mostraron dos ejemplos, donde en la Parte A las sustituciones de hasta 70% en un epítomo adenoviral no afectan la afinidad para unión a DP4. Las sustituciones ilustradas de la Parte B de hasta 70% en un epítomo de toxoide de tétanos no inhibieron su unión prevista a HLADR0101 o HLADR0404, que son representativos de alelos DR. Por consiguiente, la generación de un péptido quimérico de afinidad alta con cobertura de HLA amplia a través de la modificación de las secuencias de aminoácidos no afectó la capacidad del péptido de unirse a MHC II. Además, la afinidad prevista mejorada del péptido puede lograrse sustituyendo aminoácidos, como se demuestra en este Ejemplo.

Si bien la realización particular indicada anteriormente se utilizó para ejemplificar composiciones optimizadas que comprendían péptidos de unión a HLA-DR o HLA-DP, pueden utilizarse las mismas técnicas para producir composiciones optimizadas que comprenden péptidos de unión a HLA-DQ.

40 Referencias:

1. Truncation analysis of several DR binding epitopes. O'Sullivan D, Sidney J, Del Guercio MF, Colón SM, Sette A. *J Immunol.* 15 de feb de 1991; 146(4):1240-6.
2. Adenovirus hexon T-cell epitope is recognized by most adults and is restricted by HLA DP4, the most common class II allele. Tang J, Olive M, Champagne K, Flomenberg N, Eisenlohr L, Hsu S, Flomenberg P. *Gene Ther.* 11 de sep de 2004;11(18):1408-15.
3. HLA-DP4, the most frequent HLA II molecule, defines a new supertype of peptide-binding specificity. Castelli FA, Buhot C, Sanson A, Zarour H, Pouvelle- Moratille S, Nonn C, Gahery-Ségard H, Guillet JG, Ménez A, Georges B, Maillère B. *J Immunol.* 15 de dic de 2002;169(12):6928-34.
4. Prediction of CD4(+) T cell epitopes restricted to HLA-DP4 molecules. Busson M, Castelli FA, Wang XF, Cohen WM, Charron D, Ménez A, Maillère B. *J Immunol Methods.* 20 de dic de 2006 20;317(1-2):144-51

Ejemplo 3: Evaluación de los péptidos

De las composiciones de la invención que comprenden péptidos de epítomos quiméricos se evaluó (1) la potencia de la respuesta de memoria; (2) la frecuencia de la respuesta de memoria contra una población de muestra aleatoria (N=20); y (3) la frecuencia de células T de memoria específica de antígenos dentro de los individuos (N=20).

La potencia de epítomos únicos y epítomos quiméricos se evaluó estimulando PBMC humanas con péptidos in vitro durante 24 horas y analizando luego las células por citometría de flujo. Las células T de memoria central CD4 activadas tienen el fenotipo: CD4+ CD45RA<sup>baja</sup> CD62L+ IFN- $\gamma$  +. Para estimar la frecuencia en la población de respuestas de memoria específicas a epítomos seleccionados, se evaluaron 20 donantes de sangre periférica para inducción de la expresión de citoquinas.

Brevemente, se obtuvo sangre entera de Research Blood Components (Cambridge). La sangre se diluyó 1:1 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se superpusieron 35 mL sobre 12 mLs de ficoll-paque premium (GE Healthcare) en un tubo de 50 mL. Los tubos se centrifugaron a 1400 RPM durante 30 minutos, y se recolectaron las PBMC de la fase de transición, se diluyeron en PBS con 10% de suero de ternero fetal (FCS) y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en medios de congelamiento celular (de Sigma) y se congelaron inmediatamente a -80°C durante toda la noche. Para un almacenamiento a largo plazo, las células se transfirieron a nitrógeno líquido. Las células se descongelaron (baño de agua a 37°C) según fue necesario y se resuspendieron en PBS con 10% de FCS, se centrifugaron y se resuspendieron hasta 5 X 10<sup>6</sup> células / mL en un medio de cultivo (RPMI [cellgro]), complementado con 5% de suero humano inactivado por calor (Sigma) l-glutamina, penicilina y estreptomina.

Para ensayos de respuesta de memoria de células T, se cultivaron las células en placas de 24 pocillos con 4  $\mu$ M de un péptido de acuerdo con la invención (obtenido de GenScript) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas. Luego se agregó un microlitro de Brefeldina A (Golgiplug, BD) por mL de medio de cultivo y las células se volvieron a colocar en una incubadora a 37°C durante 4-6 horas. Luego se transfirieron las células a una incubadora (5% CO<sub>2</sub>) a temperatura más baja (27°C) durante toda la noche y luego se procesaron para análisis de citometría de flujo. La detección de células T de memoria activadas se realizó por incubación de células con CD4-FITC, CD45RA-PE, CD62L-Cy7PE (BD) y luego se realizó la permeabilización y fijado (BD) de la membrana. Se detectó la expresión intracelular de interferón-gamma utilizando una APC interferón-gamma monoclonal (BioLegen). Luego se analizaron 200.000 – 500.000 células utilizando una citometría de flujo FACSCalibre y el software Cellquest. Las células recibieron un puntaje positivo si eran CD4+, CD45RA<sup>media</sup>, CD62L<sup>alta</sup> e IFN-gamma positivas.

Un ejemplo representativo de los datos de citometría de flujo que muestra la activación por péptidos quiméricos se muestra en la Figura 1, y el resumen de todos los datos se muestra en la Figura 2.

Los datos muestran que: (1) Los péptidos quiméricos de acuerdo con la invención activan un número más alto de células T de memoria central que los péptidos individuales solos y el péptido quimérico TT830pmglpDTt (que contiene un sitio de escisión de catepsina) tuvieron la respuesta más alta. (2) Los péptidos quiméricos de la invención obtuvieron una respuesta de memoria de más personas que los péptidos individuales, siendo TT830pmglpDTt positivo en 20/20 donantes (Figura 3). (3) El péptido quimérico TT830pmglpDTt que contiene un sitio de escisión de catepsina es más activo que sus componentes individuales (TT830 y DT) solos, y mejor que un péptido idéntico salvo que sin un sitio de escisión (TT830DT), lo que sugiere que la adición de un sitio de escisión de catepsina en péptidos quiméricos de la invención puede proporcionar una respuesta de memoria mejorada. (4) Los datos confirman el análisis de predicción de epítomos de células T que se muestra en la Figura 15. Los análisis predijeron que los péptidos quiméricos que consistían en epítomos TT830 y DT (TT830DTt) proporcionarían la afinidad de unión más alta en un amplio rango de alelos HLA-DR y que la inclusión de un sitio de escisión de catepsina (TT830pmglpDTt) mejoró la respuesta. La adición de TT830 o TT950 al epítopo AdV específico de DP no mejoró el número de respuestas positivas en comparación con el epítopo AdV solo. La afinidad alta y la amplia cobertura de AdVTT830 se debieron a la generación de un neoepítopo en la unión de AdV y TT830. Si bien pueden generar predicciones de afinidad alta, los neo-epítomos no inducirán una respuesta de memoria en individuos inmunizados. La inclusión de un sitio de escisión de catepsina entre los epítomos elimina el neoepítopo. En un caso la inserción de un sitio de escisión de catepsina eliminó la actividad del epítopo AdV (AdVpTT830), posiblemente debido a una alteración en la confirmación al realizar el epítopo inadecuado para unión de Clase II.

Ejemplo 4: Evaluación de las células T de memoria activadas por péptidos

Las células de memoria central temprana expresan múltiples citoquinas (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) cuando se reactivan con péptidos específicos, mientras que se piensa que las células T de memoria efectora comprometida expresan selectivamente IL-4 para memoria efectora comprometida de TH2, y IFN- $\gamma$  para memoria efectora comprometida de TH1. Se evaluó el estado de las células T de memoria activadas de péptidos utilizando análisis de citoquinas intracelular multi-color de co-cultivos de células dendríticas / células CD4.

Se aislaron monocitos de sangre periférica humana utilizando perlas magnéticas de selección negativa (Dyna) y se cultivó en presencia de GM-CSF e IL-4 durante 1 semana con el fin de inducir la diferenciación en células dendríticas. Las células T CD4 alogénicas se aislaron utilizando separación de perlas magnéticas (Dyna) y se co-cultivaron en presencia de DC en presencia o ausencia de péptido. El protocolo para estimulación y análisis desde ese punto es idéntico a aquel para PBMC descrito anteriormente en el Ejemplo 2.

La estimulación con péptidos TT830DT (SEQ. ID. No. 7) y TT830pDTt (TT830pmglpDTtrunc o SEQ. ID. No. 13) provocó una mayor expresión de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , pero no IL-4 (Figuras 4, 5). La citometría de flujo de color múltiple mostró que PBMC tratadas con TT830DTt y TT830pDTt tuvieron co-expresión inducida por péptidos de TNF- $\alpha$  e

IFN- $\gamma$ , pero no co-expresión de TNF- $\alpha$  e IL-4 (Figura 6), lo que sugiere que las células de la memoria central temprana están activadas.

Se construyó una serie de péptidos quiméricos que contenían una secuencia de epítipo adenoviral específico de DP4, junto con epítipos HLA-DR de TT y DT, con y sin enlazantes de cathepsina entre los epítipos (Figura 8). Como se describió anteriormente, se cultivaron las células en placas de 24 pocillos con 4  $\mu$ M de un péptido de acuerdo con la invención (obtenido de GenScript) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas. Luego se agregó un microlitro de Brefeldina A (Golgiplug, BD) por mL de medio de cultivo y las células se volvieron a colocar en una incubadora a 37°C durante 4-6 horas. Luego se transfirieron las células a una incubadora (5% de CO<sub>2</sub>) a temperatura más baja (27°C) durante toda la noche y luego se procesaron para análisis de citometría de flujo. La detección de células T de memoria activadas se realizó por incubación de células con CD4-FITC, CD45RA-PE, CD62L-Cy7PE (BD) y luego se realizó la permeabilización y fijado (BD) de la membrana. Se detectó la expresión intracelular de interferón-gamma utilizando una APC interferón-gamma monoclonal (BioLegend). Luego se analizaron 200.000 – 500.000 células utilizando una citometría de flujo FACSCalibre y el software Cellquest. Las células recibieron un puntaje positivo si eran CD4+, CD45RAmedia, CD62Lalta e IFN-gamma positiva. El análisis de 4 donantes para respuesta de memoria de células T mostró que los péptidos individuales y los péptidos heterodiméricos que carecen de un sitio de escisión de cathepsina produjeron una respuesta más débil en comparación con la respuesta de los donantes a péptidos heterotriméricos (AdvkDTt, AdvkTT950) que contenían el sitio de escisión de cathepsina 'kvsvr'. Además, un péptido heterotrimérico (TT830DTAdv) que contenía epítipos Adv, DT y TT también mostró una respuesta de memoria en los 4 donantes.

#### 20 Ejemplo 5: Modificaciones de péptidos de unión a MHC II para ajustar las propiedades físicas

Se generó una serie de secuencias modificadas de TT830pDTt (SEQ ID NO. 13) para alterar las propiedades de los péptidos como se muestra en la Figura 7. El alcance genérico y la naturaleza de estos tipos de modificaciones se ha descrito en cualquier otra parte en la presente. Los objetivos iniciales de la modificación de péptidos fueron: 1) mejorar la solubilidad acuosa (GRAVY-Gran Promedio de Hidrofobicidad- más bajo 2) cambiar el pI a través de las modificaciones de los aminoácidos de extremo N- y/o C-terminal 3) modificar el enlace interno (escisión de Cat S PMGLP), y modificar tanto el enlace externo como interno, 4) comprender la importancia de procesamiento del péptido en el compartimiento endosómico a través de la modificación del sitio de unión a Cat S cambiando a una escisión de Cathepsina B o creando un proceso de desintegración de péptidos alternativo.

Adicionalmente, las variaciones de la secuencia AdvkDT se generaron para alterar la hidrofobicidad del péptido y para reducir el pI hasta aproximadamente pH neutro. Las adiciones de secuencia al extremo N-terminal fueron guiadas en parte por la similitud con la secuencia de aminoácidos nativa precedente al extremo N-terminal del epítipo derivado de Adv.

AdvkDTd1 EESTLLYVLFVkvsvrQSIALLSSLMVAQK (30), pI = 6,6-7,1(seq 71)

AdvkDTd2 ESTLLYVLFVkvsvrQSIALLSSLMVAQKE (30), pI = 6,6-7,1(seq 72)

35 AdvkDTd3 KESTLLYVLFVkvsvrQSIALLSSLMVAQE (30), pI = 6,6-7,1(seq 73)

Se muestran los resultados para las variantes de AdvkDT (SEQ ID NOS. 71-73) (Figura 10). En todos los experimentos de 3 donantes diferentes, las variantes de AdvkDT (SEQ ID NOS. 71-73) indujeron una respuesta de memoria sólida en comparación con un testigo no estimulado (NS).

#### Ejemplo 6: Péptidos de memoria específica de la Influenza

Como un ejemplo de una composición optimizada por patógenos únicos específica de acuerdo con la invención, se identificaron epítipos pan HLA-DR que fueron altamente conservados dentro de la influenza tipo A, influenza tipo A y B o influenza tipo A, B y C (Figuras 11 y 12) utilizando el programa Blast del Instituto Nacional de Salud (NIH) y base de datos de nucleótidos de <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> en combinación con predicción de epítipos de Clase II utilizando las herramientas de predicción de epítipos de células de la Base de Datos de epítipos (IEDB) (<http://www.immuneepitope.org/>). Los resultados de la predicción de epítipos de células T para epítipos individuales y epítipos quiméricos se muestran en las Figuras 17-19 y se evaluó la capacidad de los epítipos quiméricos con afinidad alta prevista de generar una respuesta de células T de memoria. Brevemente: Se cultivaron las PBMC en placas de 24 pocillos con 4  $\mu$ M de péptido a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas. Luego se agregó Brefeldina A y las células se volvieron a colocar en una incubadora a 37°C durante 4-6 horas. Luego se transfirieron las células a una incubadora (5% de CO<sub>2</sub>) a temperatura más baja (27°C) durante toda la noche y luego se procesaron para análisis de citometría de flujo. La detección de células T de memoria activadas se realizó por incubación de células con CD4-FITC, CD45RA-PE, CD62L-Cy7PE (BD). Luego se analizaron 200.000 – 500.000 células utilizando una citometría de flujo FACSCalibre y el software Cellquest. Las células recibieron un puntaje positivo si eran CD4+, CD45RAmedia, CD62Lalta e IFN-gamma positiva.

#### 55 Epítipos individuales:

(minx) YVKQNTLKLAT (SEQ ID NO:74)

	7430)	CYPYDVPDYASLRSLVASS	(SEQ ID NO:75)
	(31201t)	NAELLVALENQHTI	(SEQ ID NO:76)
	(66325)	TSLYVRASGRVTVSTK	(SEQ ID NO:77)
	(ABW1)	EKIVLLFAIVSLVKSDQICI	(SEQ ID NO:78)
5	(ABW2)	QILSIYSTVASSLALAIMVA	(SEQ ID NO:79)
	(ABP)	MVTGIVSLMLQIGNMISIWVSHSI	(SEQ ID NO:80)
	(AAT)	EDLIFLARSALILRGSV	(SEQ ID NO:81)
	(AAW)	CSQRSKFLMDALKLSIED	(SEQ ID NO:82)
	(IRG)	IRGFVYFVETLARSICE	(SEQ ID NO:83)
10	(TFE)	TFEFTSFFYRYGFVANFSMEL	(SEQ ID NO:84)
	(MMM)	MMMGFMNMLSTVLGV	(SEQ ID NO:85)

Epítomos quiméricos:

	AATk3120t	LIFLARSALILRkvsvrNAELLVALENQHTI	(SEQ ID NO:86)
	3120tkAAT	NAELLVALENQHTIkvsvrLIFLARSALILR	(SEQ ID NO:87)
15	ABW2kAAT	ILSIYSTVASSLALAIkvsvrLIFLARSALILR	(SEQ ID NO:88)
	AATkABW2	LIFLARSALILRkvsvrILSIYSTVASSLALAI	(SEQ ID NO:89)
	AATkAAW	LIFLARSALILRkvsvrCSQRSKFLMDALKL	(SEQ ID NO:90)
	AAWkAAT	CSQRSKFLMDALKLkvsvrLIFLARSALILR	(SEQ ID NO:91)
	ABW9hema	EKIVLLFAIVSLVKSDQICI	(SEQ ID NO:92)
20	MMMTFE	MMMGFMNMLSTVLGV TFEFTSFFYRYGFVANFSMEL	(SEQ ID NO:93)
	TFEMMM	TFEFTSFFYRYGFVANFSMEL MMMGMFNMLSTVLGV	(SEQ ID NO:94)
	TFEIRG	TFEFTSFFYRYGFVANFSMEL IRGFVYFVETLARSICE	(SEQ ID NO:95)
	IRGTFE	IRGFVYFVETLARSICE TFEFTSFFYRYGFVANFSMEL	(SEQ ID NO:96)
	MMMkIRG	MMMGFMNMLSTVLGV kvsvr IRGFVYFVETLARSICE	(SEQ ID NO:97)
25	IRGkMMM	IRGFVYFVETLARSICEkvsvr MMMGMFNMLSTVLGV	(SEQ ID NO:98)

Las secuencias de péptidos de la Influenza quiméricos se muestran en la Figura 11. La respuesta de memoria de células de 5 donantes de PBMC se muestra en la Figura 12. Una respuesta de memoria de células T fue positiva para epítomos quiméricos AAWkAAT, AATkABW2, 3120tkAAT y ABW2kAAT, pero no en el epítomo ABW9 de pan HLA-DR con H5 restringido no quimérico. Estos datos muestran que cuatro epítomos conservados quiméricos de la invención que contienen péptidos específicos para la Influenza son activos para inducir una respuesta de memoria.

Ejemplo 7: Formulaciones de nanoportadores sintéticos (teórico)

Se sintetiza resiquimod (también conocido como R848) de acuerdo con la síntesis proporcionada en el Ejemplo 99 de la Patente de los Estados Unidos 5.389.640 de Gerster et al. Un conjugado de PLA-PEG-nicotina se prepara en Selecta Biosciences utilizando una estrategia de conjugación convencional. Se prepara PLA por una polimerización por apertura de anillo utilizando D-L-lactida (PM = aproximadamente 15 KD – 18 KD). La estructura de PLA se confirma por NMR. El alcohol polivinílico (PM = 11 KD - 31 KD, 85% hidrolizado) se adquiere en VWR Scientific. Estos se utilizan para preparar las siguientes soluciones:

1. Resiquimod en cloruro de metileno a 7,5 mg/mL.
2. PLA-PEG-nicotina en cloruro de metileno a 100 mg/mL
3. PLA en cloruro de metileno a 100 mg/mL
4. Péptido en agua a 10 mg/mL, teniendo el péptido la secuencia:

ILMQYIKANSKFIGIPMGLPQSIALLSSLMVAQ (SEQ ID NO. 13)

5. Alcohol polivinílico en agua a 50 mg/mL.

Se combina la solución No. 1 (0,4 mL), la solución No. 2 (0,4 mL), la solución No. 3 (0,4 mL) y la solución No. 4 (0,1 mL) en un pequeño vial y la mezcla se sonica a 50% de amplitud durante 40 segundos utilizando un sonificador digital Branson 250. A esta emulsión se le agrega la solución No. 5 (2,0 mL) y una sonicación a 35% de amplitud durante 40 segundos utilizando un sonificador digital Branson 250 forma la segunda emulsión. Esto se agrega a un vaso de precipitados que contiene agua (30 mL) y esta mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas para formar las nanopartículas. Se diluye una porción de la dispersión del nanoportador (1,0 mL) con agua (14 mL) y esta se concentra por centrifugación en un dispositivo de filtración centrífuga Amicon Ultra con un corte de membrana de 100 KD. Cuando el volumen es de aproximadamente 250 $\mu$ L, se agrega agua (15 mL) y las partículas se concentran nuevamente hasta aproximadamente 250 $\mu$ L utilizando el dispositivo Amicon. Se realiza un segundo lavado con solución salina tamponada con fosfato (pH = 7,5, 15 mL) de la misma manera y el concentrado final se diluye hasta un volumen total de 1,0 mL con solución salina tamponada con fosfato. Se espera proporcionar una dispersión final de nanoportador de aproximadamente 2,7 mg/mL en concentración.

15 Ejemplo 8: Formulaciones de nanoportadores sintéticos (teórico)

Se sintetiza resiquimod (también conocido como R848) de acuerdo con la síntesis proporcionada en el Ejemplo 99 de la Patente de los Estados Unidos 5.389.640 de Gerster et al. Se prepara un conjugado de PLA-PEG-nicotina en Selecta Biosciences. Se prepara PLA por una polimerización por apertura de anillo utilizando D-L-lactida (PM = aproximadamente 15 KD – 18 KD). La estructura de PLA se confirma por NMR. El alcohol polivinílico (PM = 11 KD - 31 KD, 85% hidrolizado) se adquiere en VWR Scientific. Estos se utilizan para preparar las siguientes soluciones:

1. Conjugado de PLA-848 a 100 mg/mL en cloruro de metileno
2. PLA-PEG-nicotina en cloruro de metileno a 100 mg/mL
3. PLA en cloruro de metileno a 100 mg/mL
4. Péptido en agua a 12 mg/mL, teniendo el péptido la secuencia:

25 TLLYVLFVNNFTVSWLRVLPKVSASHLET (SEQ ID NO. 5)

5. Alcohol polivinílico en agua a 50 mg/mL.

Se combina la solución No.1 (0,25 a 0,75 mL), solución No.2 (0,25 mL), solución No.3 (0,25 a 0,5 mL) y solución No.4 (0,1 mL) en un pequeño vial y la mezcla se sonica a 50% de amplitud durante 40 segundos utilizando un sonificador digital Branson 250. A esta emulsión se le agrega la solución No. 5 (2,0 mL) y una sonicación a 35% de amplitud durante 40 segundos utilizando un sonificador digital Branson 250 forma la segunda emulsión. Esto se agrega a un vaso de precipitados que contenía solución amortiguadora de fosfato (30 mL) y esta mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas para formar las nanopartículas. Para lavar las partículas se transfiere una porción de la dispersión de las nanopartículas (7,0 mL) a un tubo de centrífuga y se centrifuga a 5.300g durante una hora, el sobrenadante se retira y el granulado se resuspende en 7,0 mL de solución salina tamponada con fosfato. El procedimiento de centrifugación se repite y el granulado se resuspende en 2,2 mL de solución salina tamponada con fosfato para obtener una dispersión final de nanopartículas esperada de aproximadamente 10 mg/mL.

Ejemplo 9: Conjugación de composiciones de la invención con proteínas portadoras (teórico)

Se modifica un péptido (Seq ID No.5) con un Gly-Cys adicional en el extremo C-terminal para conjugación con una proteína portadora, CRM197 por medio del grupo tiol en el extremo terminal Cys. CRM<sub>197</sub> es un mutante no tóxico de la toxina diftérica con un cambio de aminoácido en su secuencia primaria. La glicina presente en la posición 52 de los aminoácidos de la molécula es reemplazada por un ácido glutámico por medio de un solo cambio de codón de ácido nucleico. Debido a este cambio, la proteína carece de actividad de ADP-ribosil transferasa y se vuelve no tóxica. Tiene un peso molecular de 58.408 Da.

Grupos de aminoácidos libres de CRM<sub>197</sub> son bromoacetilados por reacción con un exceso de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) CRM<sub>197</sub> (15 mg) se disuelve en NaHCO<sub>3</sub> 1,0 M (pH 8,4) y se enfría con hielo. Se agrega lentamente una solución de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (15 mg en 200  $\mu$ L de dimetilformamida (DMF) a la solución de CRM<sub>197</sub>, y la solución se mezcla cuidadosamente a temperatura ambiente en la oscuridad durante 2 horas. La proteína bromoacetilada resultante (activada) se purifica luego por diafiltración por medio de una diálisis con una membrana de 10 K de MWCO. El grado de bromoacetilación se determinó haciendo reaccionar el CRM<sub>197</sub> activado con cisteína, seguido por análisis de aminoácidos y cuantificación de la carboximetilcisteína (CMC) resultante.

El CRM<sub>197</sub> bromoacetilado se disuelve en solución amortiguadora 1 M de carbonato/bicarbonato de sodio a pH 9,0 y se mantiene a 2-8°C bajo argón. Se agrega una solución de péptido (TLLYVLFVNNFTVSWLRVLPKVSASHLET-G-C (SEQ ID NO:107; SEQ ID NO. 5 modificada)) (10 mg) en solución amortiguadora 1 M de carbonato/bicarbonato de

sodio a pH 9,0 a la solución de CRM<sub>197</sub> bromoacetilada y la mezcla se agita a 2-8°C durante 15-20 horas. Los grupos de bromoacetilo restantes se tapan luego con un exceso molar x 20 de N-acetilcisteamina durante 4-8 horas a 2-8°C. El conjugado de péptido-CRM197 resultante se purifica luego a temperatura ambiente por diafiltración sobre una membrana de 10K de MWCO diafiltrando contra solución amortiguadora de fosfato de sodio 0,01 M /0,9% de NaCl, pH 7,0. Se recolecta y se analiza el contenido de proteína en el conjugado de péptido-CRM197 retenido (ensayo colorimétrico Lowry o Micro-BCA), por SDS-PAGE, por análisis de aminoácidos y la inmunogenicidad en ratones.

Ejemplo 10: Mezcla de composiciones de la invención con vacunas convencionales que comprenden un antígeno (teórico)

10 Se prepara PLA por una polimerización por apertura de anillo utilizando D-L-lactida (PM = aproximadamente 15 KD – 18 KD). La estructura de PLA se confirma por NMR. El alcohol polivinílico (PM = 11 KD - 31 KD, 87-89% hidrolizado) se adquiere en VWR Scientific. Estos se utilizan para preparar las siguientes soluciones:

1. PLA en cloruro de metileno a 100 mg/mL
2. PLA-PEG en cloruro de metileno a 100 mg/mL.
- 15 3. Péptido en solución acuosa a 10 mg/mL, teniendo el péptido la secuencia de SEQ ID NO. 91
4. Alcohol polivinílico en agua o solución amortiguadora de fosfato a 50 mg/mL.

Se combinan la solución No.1 (0,5 a 1,0 mL), solución No.2 (0,25 mL a 0,5 mL) y solución No. 3 (0,05 a 0,3 mL) en un tubo de presión de vidrio y la mezcla se sonica a 50% de amplitud durante 40 segundos utilizando un sonificador digital Branson 250. A esta emulsión se le agrega la solución No. 4 (2,0 a 3,0 mL) y una sonicación a 30% de amplitud durante 40 a 60 segundos utilizando un sonificador digital Branson 250 forma la segunda emulsión. Esto se agrega a un vaso de precipitados que contenía solución amortiguadora de fosfato (30 mL) y esta mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas para formar los nanoportadores. Para lavar las partículas se transfiere una porción de la dispersión de los nanoportadores (27,0 mL a 30,0 mL) a un tubo de centrifuga y se centrifuga a 21.000g durante 45 minutos, el sobrenadante se retira y el granulado se resuspende en 30,0 mL de solución salina tamponada con fosfato. El procedimiento de centrifugación se repite y el granulado se resuspende en 8,1 – 9,3 mL de solución salina tamponada de fosfato.

Una alícuota de 4 mL de los nanoportadores sintéticos suspendidos se centrifuga para asentar los nanoportadores sintéticos. El sobrenadante se desecha y se agregan 0,5-mL de suspensión de la vacuna Fluarix® contra el virus de la Influenza trivalente. La vacuna de combinación se agita para resuspender los nanoportadores y la suspensión resultante se almacena a -20°C antes de su uso.

Ejemplo 11: Acoplamiento de composiciones de la invención con nanoportadores de oro (teórico)

Etapa-1. Formación de nanoportadores de oro (AuNCs): Se calienta una solución ac. de 500 mL de 1 mM HAuCl<sub>4</sub> hasta reflujo durante 10 min con agitación vigorosa en un matraz de fondo redondo de 1 L equipado con un condensador. Luego se agrega rápidamente una solución de 50 mL de 40 mM de citrato de sodio a la solución de agitación. La solución rojo vino intenso resultante se mantiene a reflujo durante 25-30 min y el calor se retira y la solución se enfría a temperatura ambiente. Luego se filtra la solución a través de un filtro de membrana de 0,8 µm para proporcionar la solución de AuNC. Los AuNC se caracterizan utilizando microscopio electrónico de espectroscopía y transmisión visible. Los AuNC son de aproximadamente 20 nm de diámetro protegidos por citrato con absorción pico a 520 nm.

40 Etapa 2. Conjugación de péptidos directa con AuNC: El péptido del extremo C-terminal del Ejemplo 9 (un péptido de SEQ ID NO. 5 que contiene una cisteína del extremo C-terminal) se acopla con los AuNC de la siguiente forma: Se agrega una solución de 145 µl del péptido (10 µM en 10 mM a pH 9,0 de solución amortiguadora de carbonato) a 1 mL de nanopartículas de oro protegidas por citrato de 20 nm de diámetro (1,16 nM) para producir una relación molar entre tiol y oro de 2500:1. La mezcla se agita a temperatura ambiente bajo argón durante 1 hora para permitir un intercambio completo de tiol con citrato sobre las nanopartículas de oro. El conjugado de péptido-AuNC se purifica luego por centrifugación a 12.000g durante 30 minutos. El sobrenadante se decanta y el granulado que contiene el péptido-AuNC se resuspende en 1 mL de agua para inyección para análisis y bioensayo posteriores.

Ejemplo 12: Nanoportadores sintéticos utilizando composiciones modificadas del Ejemplo 5

50 Se sintetiza resiquimod (también conocido como R848) de acuerdo con la síntesis proporcionada en el Ejemplo 99 de la Patente de los Estados Unidos 5.389.640 de Gerster et al. y se conjugó con PLGA, formando PLGA-R848, utilizando un enlazante de amida. El PLGA (IV 0,10 dL/g) y PLA (IV 0,21 dL/g) se adquirieron de Lakeshore Biomaterials. Un conjugado de PLA-PEG-nicotina se prepara en Selecta Biosciences utilizando una estrategia de conjugación convencional. El alcohol polivinílico (Pm = 11 KD - 31 KD, 87-89% hidrolizado) se adquirió en JT Baker.

Estos se utilizaron para preparar las siguientes soluciones:

1. PLGA-R848 en cloruro de metileno a 100 mg/mL.
2. PLA-PEG-nicotina en cloruro de metileno a 100 mg/mL
3. PLA en cloruro de metileno a 100 mg/mL
4. Péptido a 10 mg/mL en una solución que comprende 10% de DMSO, 50% de ácido láctico USP y 40% de agua, teniendo el péptido la secuencia: EESTLLYVLFVVKVSVRQSIALLSSLMVAQK (SEQ ID NO:71)
5. Alcohol polivinílico en solución amortiguadora de fosfato a pH 8 a 50mg/mL.

Se combina la solución No. 1 (0,5 mL), la solución No. 2 (0,25 mL) y la solución No. 3 (0,25 mL) y se agregó la solución No. 4 (0,25mL) en un pequeño recipiente y la mezcla se sonicó a 50% de amplitud durante 40 segundos utilizando un sonicador digital Branson 250. A esta emulsión se le agregó la solución No. 5 (2,0 mL). La mezcla se sonicó a 30% de amplitud durante 40 segundos utilizando el sonicador digital Branson 250 para formar la segunda emulsión. Esta emulsión se agregó luego a un vaso de precipitados de 50 mL que contenía 70 mM de solución amortiguadora de fosfato a pH 8 (30 mL) y luego se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para formar los nanoportadores sintéticos.

Para lavar los nanoportadores sintéticos, se transfirió una porción de la dispersión del nanoportador sintético (27,5 mL) a un tubo de centrifuga de 50 mL y se agitó a 9500 rpm (13.800 g) durante una hora a 4°C, el sobrenadante se retiró y el granulado se resuspendió en 27,5 mL de PBS (solución salina tamponada con fosfato). El procedimiento de lavado a base de centrifugado se repitió y el granulado se resuspendió en 8,5 g de solución salina tamponada con fosfato para obtener una concentración de la dispersión final del nanoportador sintético nominal de 10 mg/mL. Se realizó la determinación gravimétrica de la concentración real y la concentración se ajustó posteriormente en PBS a 5 mg/mL.

La inmunogenicidad de la formulación del nanoportador sintético se determinó por un estudio de inoculación en ratones C57BL6. Las inoculaciones se realizaron por vía subcutánea en las patas traseras de ratones C57BL6 sin tratamiento previo (5 ratones por grupo) de acuerdo con un programa de un cebador el día 0 y refuerzos los días 14 y 28. Para cada inoculación se inyectaron un total de 100 µg de nanoportadores, 50 µg por pata trasera. Se recolectaron los sueros los días 26, 40, 55 y 67. Se determinaron las titulaciones de anticuerpos anti-nicotina para los sueros como los valores CE50. Los grupos testigo se inocularon de manera similar utilizando nanoportador sintético de la misma formulación polimérica, incorporando un péptido de unión a MHC II de murino conocido (amida 323-339 de ovalbumina) como un testigo positivo o sin ningún péptido de unión a MHC II. Los datos se muestran en la Figura 13.

Ejemplo 13: Nanoportadores sintéticos utilizando las composiciones de la invención

El PLGA (5050 DLG 2,5A, IV 0,25 dL/g) se adquirió en Lakeshore Biomaterials. Se preparó un conjugado de PLA-PEG-nicotina en Selecta Biosciences. El alcohol polivinílico (Pm = 11 KD - 31 KD, 87-89% hidrolizado) se adquirió en JT Baker.

Estos se utilizaron para preparar las siguientes soluciones:

1. PLGA en cloruro de metileno a 100 mg/mL
2. PLA-PEG-nicotina en cloruro de metileno a 100 mg/mL
3. El péptido a 4 mg/mL en un disolvente que comprende 10% de DMSO en agua, teniendo el péptido la secuencia: ILMQYIKANSKFIGIPMGLPQSIALSSLMVAQ (SEQ ID NO: 13)
4. Alcohol polivinílico en solución amortiguadora de fosfato a pH 8 a 50 mg/mL.

Se combinaron la solución No. 1 (0,375 mL) y la solución No. 3 (0,125 mL) y se diluyeron con 0,50 mL de cloruro de metileno antes de que se agregara la solución No. 3 (0,25 mL) en un pequeño recipiente y la mezcla se sonicó a 50% de amplitud durante 40 segundos utilizando un sonicador digital Branson 250. A esta emulsión se le agregó la solución No. 4 (3,0 mL). La mezcla se sonicó a 30% de amplitud durante 60 segundos utilizando el sonicador digital Branson 250 para formar la segunda emulsión. Esta emulsión se agregó luego a un vaso de precipitados de 50 mL que contenía 70 mM de solución amortiguadora de fosfato a pH 8 (30 mL) y luego se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para formar los nanoportadores sintéticos.

Para lavar las partículas se transfirió una porción de la dispersión de los nanoportadores sintéticos (29 mL) a un tubo de centrifuga de 50mL y se agitó a 21.000 rcf durante 45 minutos a 4°C, el sobrenadante se retiró y el granulado se resuspendió en 29 mL de PBS (solución salina tamponada con fosfato). El procedimiento de lavado a base de centrifugado se repitió y el granulado luego se resuspendió en 4,4 g PBS para obtener una concentración de la dispersión final del nanoportador sintético nominal de 10 mg/mL. Se realizó la determinación gravimétrica de la concentración real y la concentración se ajustó posteriormente en PBS a 5 mg/mL.

5 La inmunogenicidad de la formulación de los nanoportadores sintéticos se determinó por un estudio de inoculación en ratones BALB/c. Los nanoportadores sintéticos se mezclaron con una solución de adyuvante CpG activo de murino, PS-1826 inmediatamente antes de la inyección. Las inoculaciones se realizaron por vía subcutánea en las patas traseras de ratones BALB/c sin tratamiento previo (5 ratones por grupo) de acuerdo con un programa de un cebador el día 0 y refuerzos los días 14 y 28. Para cada inoculación se inyectó un total de 100 µg de nanoportadores sintéticos y 20 µg de PS-1826, dividido igualmente entre las patas traseras. Se recolectaron los sueros los días 26 y 40. Se determinaron las titulaciones de anticuerpos anti-nicotina para los sueros como los valores CE50. Los grupos testigo se inocularon de manera similar utilizando nanoportadores sintéticos de formulación polimérica similar, incorporando los nanoportadores sintéticos testigo positivos un péptido de unión a MHC II de murino conocido (amida 323-339 de ovalbumina) y careciendo el nanoportador testigo negativo un péptido de unión a MHC II. Los resultados se muestran en la Figura 14.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Selecta Biosciences, Inc. et al.

<120> COMPOSICIONES QUE INDUCEN LA AYUDA DE LAS CÉLULAS T

5 <130> S1681.70005WO00

<140> aún no asignada

<141> 2010-08-24

<150> US 61/237147

<151> 2009-08-26

10 <150> US 61/335611

<151> 2010-01-06

<160> 129

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

15 <211> 21

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

20 <400> 1

Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala

1            5            10            15

Ser His Leu Glu Thr

20

25 <210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

30 <223> polipéptido sintético

<400> 2

Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val

1            5

<210> 3

35 <211> 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 3

Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile

5 1 5 10 15

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

10 <220>

<223> polipéptido sintético

<400> 4

Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu

1 5 10 15

15 Val Gly Glu Leu

20

<210> 5

<211> 30

<212> PRT

20 <213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 5

Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe

25 1 5 10 15

Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Thr

20 25 30

<210> 6

<211> 24

30 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 6

35 Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys

1 5 10 15

Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile

20  
 <210> 7  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 5 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 <400> 7  
 Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Gln  
 10 1 5 10 15  
 Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val  
 20 25 30  
 Gly Glu Leu  
 35  
 15 <210> 8  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> polipéptido sintético  
 <400> 8  
 Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu  
 1 5 10 15  
 Val Gly Glu Leu Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe  
 25 20 25 30  
 Ile Gly Ile  
 35  
 <210> 9  
 <211> 27  
 30 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 <400> 9  
 35 Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln

20            25  
 <210> 10  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 5 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 <400> 10  
 Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Ile Leu  
 10 1            5            10            15  
 Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile  
           20            25  
 <210> 11  
 <211> 29  
 15 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 <400> 11  
 20 Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Pro Met Gly Leu Pro Ile Leu  
 1            5            10            15  
 Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile  
           20            25  
 <210> 12  
 25 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 30 <400> 12  
 Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Lys Val Ser Val Arg Ile Leu  
 1            5            10            15  
 Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile  
           20            25  
 35 <210> 13  
 <211> 32  
 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 13

5 Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Pro

1 5 10 15

Met Gly Leu Pro Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln

20 25 30

<210> 14

10 <211> 32

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

15 <400> 14

Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Lys

1 5 10 15

Val Ser Val Arg Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln

20 25 30

20 <210> 15

<211> 21

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> polipéptido sintético

<400> 15

Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser

1 5 10 15

Leu Met Val Ala Gln

30 20

<210> 16

<211> 26

<212> PRT

<213> secuencia artificial

35 <220>

<223> polipéptido sintético

<400> 16

Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Pro Met Gly Leu Pro Gln Ser

1 5 10 15

Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln

20 25

5 <210> 17

<211> 26

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> polipéptido sintético

<400> 17

Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Lys Val Ser Val Arg Gln Ser

1 5 10 15

Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln

15 20 25

<210> 18

<211> 35

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> polipéptido sintético

<400> 18

Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Pro Met Gly Leu Pro Asn Asn

1 5 10 15

25 Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His

20 25 30

Leu Glu Thr

35

<210> 19

30 <211> 35

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

35 <400> 19

Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Lys Val Ser Val Arg Asn Asn

1 5 10 15

Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His

20 25 30

Leu Glu Thr

35

5 <210> 20

<211> 36

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> polipéptido sintético

<400> 20

Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Gln

1 5 10 15

Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Thr Leu Leu Tyr Val

15 20 25 30

Leu Phe Glu Val

35

<210> 21

<211> 36

20 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 21

25 Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys

1 5 10 15

Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu

20 25 30

Met Val Ala Gln

30 35

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> secuencia artificial

35 <220>

<223> polipéptido sintético

<400> 22

Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu

1 5 10 15

Val

5 <210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> polipéptido sintético

<400> 23

Ile Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser Thr Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro

1 5 10 15

Ala Leu Asn Ile

15 20

<210> 24

<211> 37

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> polipéptido sintético

<400> 24

Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu

1 5 10 15

25 Val Ile Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser Thr Ile Val Pro Tyr Ile Gly

20 25 30

Pro Ala Leu Asn Ile

35

<210> 25

30 <211> 37

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

35 <400> 25

Ile Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser Thr Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro

1 5 10 15

Ala Leu Asn Ile Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln

20 25 30

Ala Ile Pro Leu Val

35

5 <210> 26

<211> 42

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> polipéptido sintético

<400> 26

Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu

1 5 10 15

Val Pro Met Gly Leu Pro Ile Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser Thr Ile

15 20 25 30

Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile

35 40

<210> 27

<211> 42

20 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 27

25 Ile Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser Thr Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro

1 5 10 15

Ala Leu Asn Ile Pro Met Gly Leu Pro Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser

20 25 30

Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val

30 35 40

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

35 <220>

<223> polipéptido sintético

<400> 28

Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr

1 5 10

<210> 29

<211> 19

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 29

10 Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val

1 5 10 15

Ala Ser Ser

<210> 30

15 <211> 14

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

20 <400> 30

Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile

1 5 10

<210> 31

<211> 16

25 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 31

30 Thr Ser Leu Tyr Val Arg Ala Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys

1 5 10 15

<210> 32

<211> 20

<212> PRT

35 <213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 32

Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser Asp

1 5 10 15

Gln Ile Cys Ile

5 20

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

10 <220>

<223> polipéptido sintético

<400> 33

Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala

1 5 10 15

15 Ile Met Val Ala

20

<210> 34

<211> 24

<212> PRT

20 <213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 34

Met Val Thr Gly Ile Val Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Met Ile

25 1 5 10 15

Ser Ile Trp Val Ser His Ser Ile

20

<210> 35

<211> 17

30 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 35

35 Glu Asp Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser

1 5 10 15

Val

<210> 36

<211> 19

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 36

Cys Ser Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu Lys Leu Ser

10 1 5 10 15

Ile Glu Asp

<210> 37

<211> 17

15 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 37

20 Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu Thr Leu Ala Arg Ser Ile Cys

1 5 10 15

Glu

<210> 38

25 <211> 21

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

30 <400> 38

Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn

1 5 10 15

Phe Ser Met Glu Leu

20

35 <210> 39

<211> 31

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 39

5 Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Lys Val Ser Val

1 5 10 15

Arg Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile

20 25 30

<210> 40

10 <211> 31

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

15 <400> 40

Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Lys Val

1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg

20 25 30

20 <210> 41

<211> 33

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> polipéptido sintético

<400> 41

Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile

1 5 10 15

Lys Val Ser Val Arg Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu

30 20 25 30

Arg

<210> 42

<211> 33

35 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 42

Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Lys Val Ser Val

1 5 10 15

5 Arg Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala

20 25 30

Ile

<210> 43

10 <211> 32

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

15 <400> 43

Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Lys Val Ser Val

1 5 10 15

Arg Cys Ser Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu Lys Leu

20 25 30

20 <210> 44

<211> 32

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> polipéptido sintético

<400> 44

Cys Ser Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu Lys Leu Lys

1 5 10 15

Val Ser Val Arg Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg

30 20 25 30

<210> 45

<211> 38

<212> PRT

<213> secuencia artificial

35 <220>

<223> polipéptido sintético

<400> 45

ES 2 641 892 T3

Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn

1 5 10 15

Phe Ser Met Glu Leu Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu Thr Leu

20 25 30

5 Ala Arg Ser Ile Cys Glu

35

<210> 46

<211> 38

<212> PRT

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 46

Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu Thr Leu Ala Arg Ser Ile Cys

15 1 5 10 15

Glu Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala

20 25 30

Asn Phe Ser Met Glu Leu

35

20 <210> 47

<211> 60

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> oligonucleótido sintético

<400> 47

aataatttta ccgtagctt ttggtgagg gttcctaaag tatctgctag tcatttagaa 60

<210> 48

<211> 63

30 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 48

35 aacaactca ccgtagcctt ctggctgaga gtgcccaagg tgagcgccag ccacctggag 60

acc 63

<210> 49

<211> 26  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 49  
 acgcttctct atgttctgtt cgaagt 26  
 <210> 50  
 <211> 27  
 10 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 50  
 15 accctgctgt acgtgctgtt cgagggtg 27  
 <210> 51  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 51  
 attttaatgc agtatataaa agcaaattct aaatttatag gtata 45  
 <210> 52  
 25 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 30 <400> 52  
 atcctgatgc agtacaatcaa ggccaacagc aagttcatcg gcatc 45  
 <210> 53  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 35 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético

ES 2 641 892 T3

<400> 53  
caatcgatag cttatcgtc ttaatgggt gctcaagcta taccattggt aggagagcta 60  
<210> 54  
<211> 60  
5 <212> ADN  
<213> secuencia artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido sintético  
<400> 54  
10 cagagcatcg ccctgagcag cctgatggg gcccaggcca tccccctggt gggcgagctg 60  
<210> 55  
<211> 90  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial  
15 <220>  
<223> oligonucleótido sintético  
<400> 55  
accctgctgt acgtgctgtt cgaggatgaac aactcaccg tgagcttctg gctgagagtg 60  
ccaaggatga ggcagcca cctggagacc 90  
20 <210> 56  
<211> 72  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial  
<220>  
25 <223> oligonucleótido sintético  
<400> 56  
accctgctgt acgtgctgtt cgaggatgac ctgatgcagt acatcaaggc caacagcaag 60  
ttcatcggca tc 72  
<210> 57  
30 <211> 105  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido sintético  
35 <400> 57  
atcctgatgc agtacctcaa ggccaacagc aagttcatcg gcatccagag catcgccctg 60  
agcagcctga tggggccca ggccatccc ctggtgggag agctg 105

ES 2 641 892 T3

<210> 58  
<211> 105  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial  
5 <220>  
<223> oligonucleótido sintético  
<400> 58  
cagagcatcg ccctgagcag cctgatggcg gccagggcca tcccctggt gggcgagctg 60  
atcctgatgc agtacatcaa ggccaacagc aagttcatcg gcatc 105  
10 <210> 59  
<211> 81  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial  
<220>  
15 <223> oligonucleótido sintético  
<400> 59  
atcctgatgc agtacatcaa ggccaacagc aagttcatcg gcatccagag catcgccctg 60  
agcagcctga tggggccca g 81  
<210> 60  
20 <211> 87  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido sintético  
25 <400> 60  
cagagcatcg ccctgagcag cctgatggcg gccagggcca tcatcctgat gcagtacatc 60  
aaggccaaca gcaagttcat cggcatc 87  
<210> 61  
<211> 87  
30 <212> ADN  
<213> secuencia artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido sintético  
<400> 61  
35 accctgctgt atgtgctgtt tgaagtgccg atgggcctgc cgattctgat gcagtatatt 60  
aaagcgaaca gcaaatttat tggcatt 87  
<210> 62

<211> 87  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 62  
 accctgctgt acgtgctgtt cgaggtgcc atgggcctgc ccatcctgat gcagtacatc 60  
 aaggccaaca gcaagttcat cggcatc 87  
 <210> 63  
 10 <211> 87  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 15 <400> 63  
 accctgctgt atgtgctgtt tgaagtgaag gtgagcgtgc gcattcctgat gcagtatatt 60  
 aaagcgaaca gcaaatttat tggcatt 87  
 <210> 64  
 <211> 87  
 20 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 64  
 25 accctgctgt acgtgctgtt cgaggtgaag gtgagcgtga gaatcctgat gcagtacatc 60  
 aaggccaaca gcaagttcat cggcatc 87  
 <210> 65  
 <211> 96  
 <212> ADN  
 30 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 65  
 attcctgatgc agtatattaa agcgaacagc aaatttattg gcattccgat gggcctgccg 60  
 35 cagagcattg cgctgagcag cctgatggtg gcgcag 96  
 <210> 66  
 <211> 96

<212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 5 <400> 66  
 atcctgatgc agtacatcaa ggccaacagc aagttcatcg gcatcccat gggcctgccc 60  
 cagagcatcg cctgagcag cctgatggtg gccag 96  
 <210> 67  
 <211> 96  
 10 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 67  
 15 attctgatgc agtatattaa agcgaacagc aaatttattg gcattaaagt gagcgtgcg 60  
 cagagcattg cgctgagcag cctgatggtg ggcag 96  
 <210> 68  
 <211> 96  
 <212> ADN  
 20 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 68  
 atcctgatgc agtacatcaa ggccaacagc aagttcatcg gcatcaaggt gagcgtgaga 60  
 25 cagagcatcg cctgagcag cctgatggtg gccag 96  
 <210> 69  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 69  
 ccgatggcc tacca 15  
 <210> 70  
 35 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 70

aaggtctcag tgagaac 17

5 <210> 71

<211> 30

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> polipéptido sintético

<400> 71

Glu Glu Ser Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Lys Val Ser Val

1 5 10 15

Arg Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Lys

15 20 25 30

<210> 72

<211> 30

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> polipéptido sintético

<400> 72

Glu Ser Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Lys Val Ser Val Arg

1 5 10 15

25 Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Lys Glu

20 25 30

<210> 73

<211> 30

<212> PRT

30 <213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 73

Lys Glu Ser Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Lys Val Ser Val

35 1 5 10 15

Arg Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Glu

20 25 30

- <210> 74  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial
- 5 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 <400> 74  
 Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr  
 1 5 10
- 10 <210> 75  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>
- 15 <223> polipéptido sintético  
 <400> 75  
 Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Ser
- 20 <210> 76  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial
- 25 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 <400> 76  
 Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile  
 1 5 10
- 30 <210> 77  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>
- 35 <223> polipéptido sintético  
 <400> 77  
 Thr Ser Leu Tyr Val Arg Ala Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys

1            5            10            15  
 <210> 78  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 5 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 <400> 78  
 Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser Asp  
 10 1            5            10            15  
 Gln Ile Cys Ile  
           20  
 <210> 79  
 <211> 20  
 15 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 <400> 79  
 20 Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala  
 1            5            10            15  
 Ile Met Val Ala  
           20  
 <210> 80  
 25 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 30 <400> 80  
 Met Val Thr Gly Ile Val Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Met Ile  
 1            5            10            15  
 Ser Ile Trp Val Ser His Ser Ile  
           20  
 35 <210> 81  
 <211> 17  
 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 81

5 Glu Asp Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser

1 5 10 15

Val

<210> 82

10 <211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

15 <400> 82

Cys Ser Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu Lys Leu Ser

1 5 10 15

Ile Glu Asp

20 <210> 83

<211> 17

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> polipéptido sintético

<400> 83

Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu Thr Leu Ala Arg Ser Ile Cys

1 5 10 15

Glu

30

<210> 84

<211> 21

<212> PRT

<213> secuencia artificial

35 <220>

<223> polipéptido sintético

<400> 84

Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn

1 5 10 15

Phe Ser Met Glu Leu

20

5 <210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> polipéptido sintético

<400> 85

Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser Thr Val Leu Gly Val

1 5 10 15

<210> 86

15 <211> 31

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

20 <400> 86

Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Lys Val Ser Val

1 5 10 15

Arg Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile

20 25 30

25 <210> 87

<211> 31

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

30 <223> polipéptido sintético

<400> 87

Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Lys Val

1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg

35 20 25 30

<210> 88

<211> 33

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

5 <400> 88

Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile

1 5 10 15

Lys Val Ser Val Arg Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu

20 25 30

10 Arg

<210> 89

<211> 33

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 89

Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Lys Val Ser Val

20 1 5 10 15

Arg Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala

20 25 30

Ile

25 <210> 90

<211> 32

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

30 <223> polipéptido sintético

<400> 90

Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Lys Val Ser Val

1 5 10 15

Arg Cys Ser Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu Lys Leu

35 20 25 30

<210> 91

<211> 32

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

5 <400> 91

Cys Ser Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu Lys Leu Lys

1 5 10 15

Val Ser Val Arg Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg

20 25 30

10 <210> 92

<211> 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> polipéptido sintético

<400> 92

Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser Asp

1 5 10 15

Gln Ile Cys Ile

20 20

<210> 93

<211> 36

<212> PRT

<213> secuencia artificial

25 <220>

<223> polipéptido sintético

<400> 93

Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser Thr Val Leu Gly Val Thr

1 5 10 15

30 Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe

20 25 30

Ser Met Glu Leu

35

<210> 94

35 <211> 36

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 94

Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn

5 1 5 10 15

Phe Ser Met Glu Leu Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser Thr

20 25 30

Val Leu Gly Val

35

10 <210> 95

<211> 38

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> polipéptido sintético

<400> 95

Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn

1 5 10 15

Phe Ser Met Glu Leu Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu Thr Leu

20 20 25 30

Ala Arg Ser Ile Cys Glu

35

<210> 96

<211> 38

25 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 96

30 Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu Thr Leu Ala Arg Ser Ile Cys

1 5 10 15

Glu Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala

20 25 30

Asn Phe Ser Met Glu Leu

35 35

<210> 97

<211> 37

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

5 <400> 97

Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser Thr Val Leu Gly Val Lys

1 5 10 15

Val Ser Val Arg Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu Thr Leu Ala

20 25 30

10 Arg Ser Ile Cys Glu

35

<210> 98

<211> 37

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 98

Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu Thr Leu Ala Arg Ser Ile Cys

20 1 5 10 15

Glu Lys Val Ser Val Arg Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser

20 25 30

Thr Val Leu Gly Val

35

25 <210> 99

<211> 5

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

30 <223> polipéptido sintético

<400> 99

Pro Met Gly Leu Pro

1 5

<210> 100

35 <211> 5

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>  
 <223> polipéptido sintético  
 <400> 100  
 Lys Val Ser Val Arg  
 5 1 5  
 <210> 101  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 <400> 101  
 Met Met Met Thr Phe Glu  
 1 5  
 15 <210> 102  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> polipéptido sintético  
 <400> 102  
 Thr Phe Glu Met Met Met  
 1 5  
 <210> 103  
 25 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 30 <400> 103  
 Thr Phe Glu Ile Arg Gly  
 1 5  
 <210> 104  
 <211> 6  
 35 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>

<223> polipéptido sintético  
 <400> 104  
 Ile Arg Gly Thr Phe Glu  
 1        5  
 5 <210> 105  
    <211> 7  
    <212> PRT  
    <213> secuencia artificial  
    <220>  
 10 <223> polipéptido sintético  
    <400> 105  
    Met Met Met Lys Ile Arg Gly  
    1        5  
    <210> 106  
 15 <211> 7  
    <212> PRT  
    <213> secuencia artificial  
    <220>  
    <223> polipéptido sintético  
 20 <400> 106  
    Ile Arg Gly Lys Met Met Met  
    1        5  
    <210> 107  
    <211> 32  
 25 <212> PRT  
    <213> secuencia artificial  
    <220>  
    <223> polipéptido sintético  
    <400> 107  
 30 Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe  
    1        5            10            15  
    Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Thr Gly Cys  
           20            25            30  
    <210> 108  
 35 <211> 36  
    <212> PRT  
    <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> polipéptido sintético  
 <400> 108  
 Ser Lys Asn Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile  
 5 1 5 10 15  
 Gly Ile Pro Met Gly Leu Pro Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met  
 20 25 30  
 Val Ala Gln Lys  
 35  
 10 <210> 109  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> polipéptido sintético  
 <400> 109  
 Ser Lys Asn Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile  
 1 5 10 15  
 Gly Ile Pro Met Gly Leu Pro Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met  
 20 20 25 30  
 Val Ala Gln Lys Glu  
 35  
 <210> 110  
 <211> 35  
 25 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 <400> 110  
 30 Lys Asn Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly  
 1 5 10 15  
 Ile Pro Met Gly Leu Pro Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val  
 20 25 30  
 Ala Gln Lys  
 35 35  
 <210> 111  
 <211> 36

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

5 <400> 111

Lys Asn Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly

1 5 10 15

Ile Pro Met Gly Leu Pro Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val

20 25 30

10 Ala Gln Lys Glu

35

<210> 112

<211> 32

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20 <222> (32)..(32)

<223> PEGilación

<400> 112

Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr

1 5 10 15

25 Ser Gly Thr Ser Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln

20 25 30

<210> 113

<211> 32

<212> PRT

30 <213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 113

Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Gly

35 1 5 10 15

Glu Gly Asp Asp Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln

20 25 30

<210> 114  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 <400> 114  
 Ser Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
 1 5 10 15  
 10 Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln  
 20 25  
 <210> 115  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 15 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 <400> 115  
 Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Lys  
 20 1 5 10 15  
 Lys Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln  
 20 25  
 <210> 116  
 <211> 33  
 25 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 <400> 116  
 30 Lys Asn Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly  
 1 5 10 15  
 Ile Lys Lys Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Lys  
 20 25 30  
 Glu  
 35  
 <210> 117  
 <211> 29

<212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(17)  
 <223> enlazante de disulfuro  
 <400> 117  
 10 Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Cys  
 1 5 10 15  
 Cys Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln  
 20 25  
 <210> 118  
 15 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(16)  
 <223> enlazante de hidrazona (escisión sensible a ácido)  
 <400> 118  
 25 Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln  
 20 25  
 <210> 119  
 30 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 35 <400> 119  
 Ser Lys Val Ser Val Arg  
 1 5

- <210> 120  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial
- 5 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 <400> 120  
 Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Leu  
 1 5
- 10 <210> 121  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>
- 15 <223> polipéptido sintético  
 <400> 121  
 Thr Leu Leu Tyr Leu Leu Phe Glu Leu  
 1 5
- <210> 122
- 20 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polipéptido sintético
- 25 <400> 122  
 Thr Leu Leu Phe Leu Leu Phe Glu Leu  
 1 5
- <210> 123  
 <211> 15
- 30 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polipéptido sintético  
 <400> 123
- 35 Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Leu Gly Leu  
 1 5 10 15  
 <210> 124

<211> 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

5 <223> polipéptido sintético

<400> 124

Ile Ile Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Leu Gly Leu

1 5 10 15

<210> 125

10 <211> 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

15 <400> 125

Ile Ile Met Gln Tyr Ile Arg Ala Asn Ser Arg Phe Leu Gly Leu

1 5 10 15

<210> 126

<211> 32

20 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 126

25 Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Gly

1 5 10 15

Glu Gly Asp Asp Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln

20 25 30

<210> 127

30 <211> 30

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

35 <400> 127

Glu Glu His Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Lys Val Ser Val

1 5 10 15

Arg Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Lys

20 25 30

<210> 128

<211> 30

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 128

10 Glu His Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Lys Val Ser Val Arg

1 5 10 15

Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Lys Glu

20 25 30

<210> 129

15 <211> 30

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

20 <400> 129

Lys Glu His Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Glu Val Lys Val Ser Val

1 5 10 15

Arg Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Glu

20 25 30

25

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende nanoportadores sintéticos que comprende:

A – x – B; y

un excipiente farmacéuticamente aceptable;

5 en donde x comprende un sitio de escisión de catepsina que comprende KVSVR;

en donde A comprende un primer péptido de unión a MHC II, comprendiendo el primer péptido de unión a MHC II un péptido que tiene al menos 70%, 80% o 90% de identidad con: un péptido de unión a HLA-DP natural, un péptido de unión a HLA-DQ natural o un péptido de unión a HLA-DR natural;

10 en donde B comprende un segundo péptido de unión a MHC II, comprendiendo el segundo péptido de unión a MHC II un péptido que tiene al menos 70%, 80% o 90% de identidad con: un péptido de unión a HLA-DP natural, un péptido de unión a HLA-DQ natural o un péptido de unión a HLA-DR natural, y

en donde A y B no tienen 100% de identidad entre sí.

2. La composición de la reivindicación 1, que además comprende uno o más antígenos.

3. La composición de la reivindicación 2, en donde al menos uno de los antígenos no está conjugado con A – x – B.

15 4. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición comprende:

A – x – B – y – C; y

un excipiente farmacéuticamente aceptable;

en donde y puede comprender un enlazante o puede no comprender un enlazante;

20 en donde C comprende un tercer péptido de unión a MHC II, comprendiendo el tercer péptido de unión a MHC II un péptido que tiene al menos 70%, 80% o 90% de identidad con: un péptido de unión a HLA-DP natural, un péptido de unión a HLA-DQ natural, o un péptido de unión a HLA-DR natural; y

en donde A, B y C no tienen 100% de identidad entre sí.

5. La composición de la reivindicación 4, en donde:

25 (a) y comprende un enlazante que comprende un enlazante de amida, un enlazante de disulfuro, un enlazante de sulfuro, un enlazante de 1,2,3-triazol 1,4-disustituido, un enlazante de éster de tiol, un enlazante de hidrazida, un enlazante de imina, un enlazante de tiourea, un enlazante de amidina o un enlazante de amina; o

(b) y comprende un enlazante que comprende una secuencia de péptidos, un sitio de escisión de proteasa lisosomal, un polímero biodegradable, un enlazante de alcano, alqueno, aromático o heterocíclico sustituido o insustituido, un polímero sensible al pH, enlazantes heterobifuncionales o un separador de glicol oligomérico; o

30 (c) y no comprende enlazante, y A – x – B y C comprenden una mezcla presente en la composición.

6. Una composición que comprende:

uno o más ácidos nucleicos aislados, por ejemplo, ADN o ARN, que codifican A – x – B tal como se define en la reivindicación 1 o A – x – B – y – C tal como se define en la reivindicación 4, en donde cuando hay más de un ácido nucleico aislado, los ácidos nucleicos aislados juntos codifican A – x – B o A – x – B – y – C, y

35 en donde, cuando está presente, y comprende un enlazante de amida, ningún enlazante o un enlazante peptídico.

7. La composición de la reivindicación 6 según depende de la reivindicación 4, en donde: (a) y es un enlazante peptídico que comprende un sitio de escisión de proteasa lisosomal, opcionalmente, en donde A – x – B y C están codificados por ácidos nucleicos aislados separados en la composición o por el mismo ácido nucleico aislado en la composición; (b) y no es un enlazante, y A – x – B y C están codificados por dos o más ácidos nucleicos aislados separados en la composición; o (c) y no es un enlazante, y A – x – B y C están codificados por el mismo ácido nucleico aislado en la composición.

40 8. Una composición que comprende uno o más ácidos nucleicos aislados que son complementos de largo completo del ácido o ácidos nucleicos aislados de la reivindicación 6 o la reivindicación 7.

45 9. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde: (a) al menos una porción de la composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores está presente en una superficie del nanoportador

sintético; o (b) al menos una porción de la composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores está encapsulada por el nanoportador sintético.

5 10. Una composición que comprende A – x – B, en donde x comprende un sitio de escisión de catepsina que comprende KVSVR y en donde A – x – B comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75% de identidad con cualquiera de las secuencias de aminoácidos indicadas como SEQ ID NOs: 12, 14, 17, 19 y 39-44; opcionalmente en donde:

(a) la secuencia de aminoácidos tiene al menos 85% o 95% de identidad con cualquiera de las secuencias de aminoácidos indicadas como SEQ ID NOs: 12, 14, 17, 19 y 39-44; o

10 (b) la secuencia de aminoácidos tiene cualquiera de las secuencias de aminoácidos indicadas como SEQ ID NOs: 12, 14, 17, 19 y 39-44.

11. Una forma de dosificación que comprende: (a) la composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores; o (b) una vacuna que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que opcionalmente comprende además: (i) un adyuvante o (ii) un portador conjugado a dicha composición.

15 12. La composición o forma de dosificación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un método que comprende administrar la composición o forma de dosificación a un sujeto.

20 13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y 12 o la forma de dosificación de la reivindicación 11 o 12, en donde el péptido de unión a HLA-DP, DQ o DR natural comprende una secuencia de péptidos obtenida o derivada de Clostridium tetani, virus de la Hepatitis B, virus del herpes humano, virus de la Influenza, virus Vaccinia, virus del Epstein-Barr, virus de la varicela, virus del sarampión, virus del sarcoma de Rous, Citomegalovirus, virus Varicella zoster, virus de paperas, Corynebacterium diphtheria, adenovirus humanos, virus de la viruela o un organismo infeccioso capaz de infectar a humanos y generar células de memoria CD4+ humanas específicas del organismo infeccioso después de que se haya iniciado la infección.

25 14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y 12-13 o la forma de dosificación de cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde A y B o A y B y C comprenden cada uno: (a) secuencias de péptidos obtenidas o derivadas de diferentes organismos infecciosos; o (b) secuencias de péptidos obtenidas o derivadas de organismos infecciosos idénticos; o (c) péptidos que tienen diferentes repertorios de unión a MHC II.

30 15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y 12-14 o la forma de dosificación de cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde: (a) A, x o B; o (b) A, x, B, y o C comprenden modificaciones químicas o de secuencias que aumentan la solubilidad acuosa de A – x – B o A – x – B – y – C, respectivamente, en donde las modificaciones químicas o de secuencia comprenden la adición de aminoácidos hidrófilos de los extremos N- y/o C-terminal, aminoácidos hidrófobos de los extremos N- y/o C-terminal, sustitución de aminoácidos para lograr un pI de aproximadamente 7,4 y para lograr una carga positiva neta a un pH de aproximadamente 3,0 y sustitución de aminoácidos susceptibles a redistribución.

35 16. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y 12-15 o la forma de dosificación de cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en donde el primer y/o segundo péptido de unión a MHCII y/o el tercer péptido de unión a MHC II tiene un largo en el rango de: (a) 5-mer a 50-mer; (b) 5-mer a 30-mer; (c) 6-mer a 25-mer.

Ejemplo representativo de los datos de citometria de flujo que muestra la expresion de IFN- $\gamma$  en células T de memoria central CD4+/CD45RAbaja/CD62Lalta estimuladas por péptidos

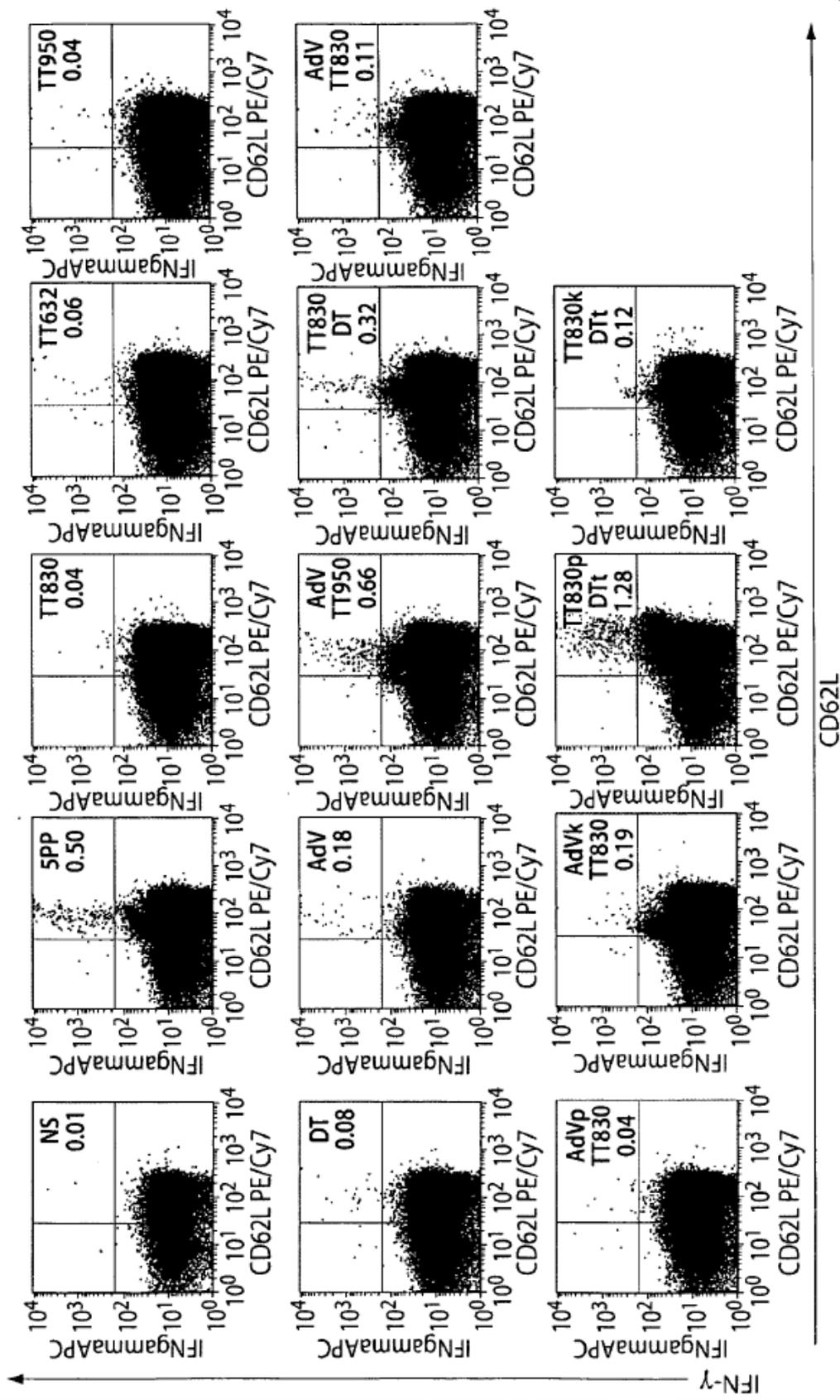
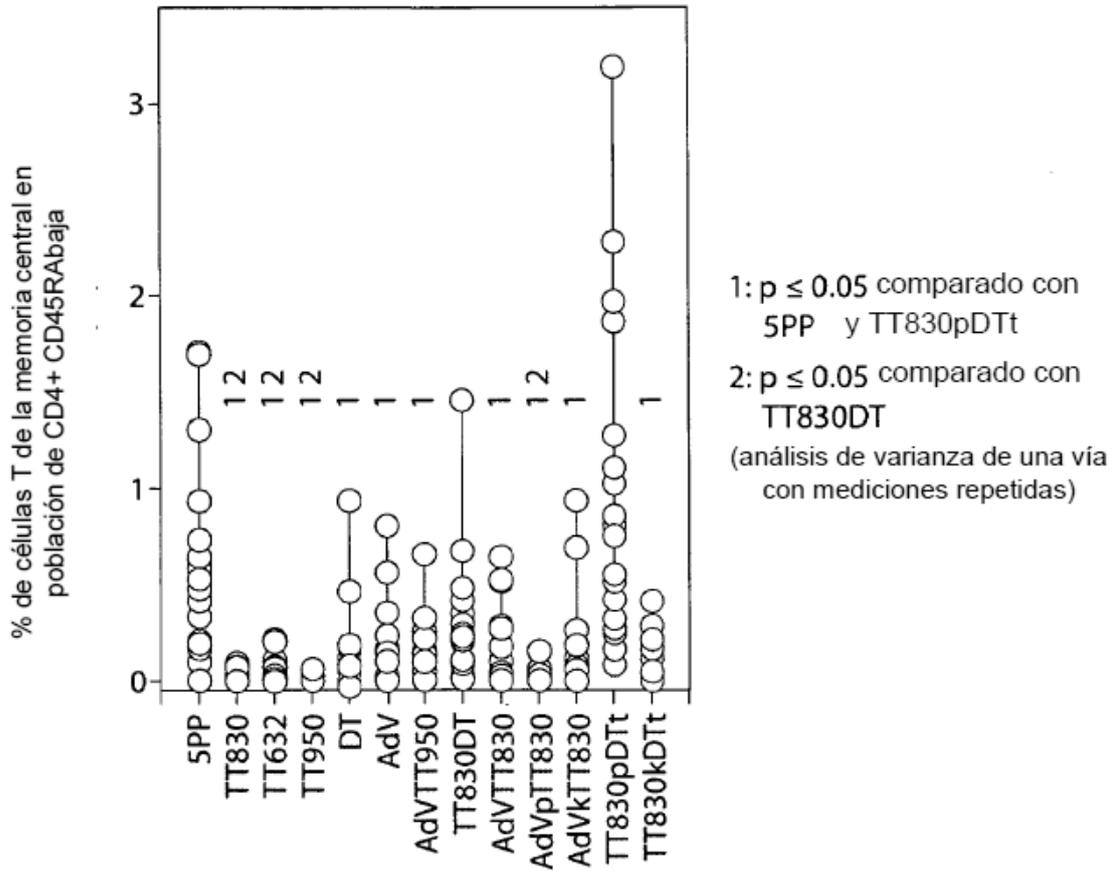
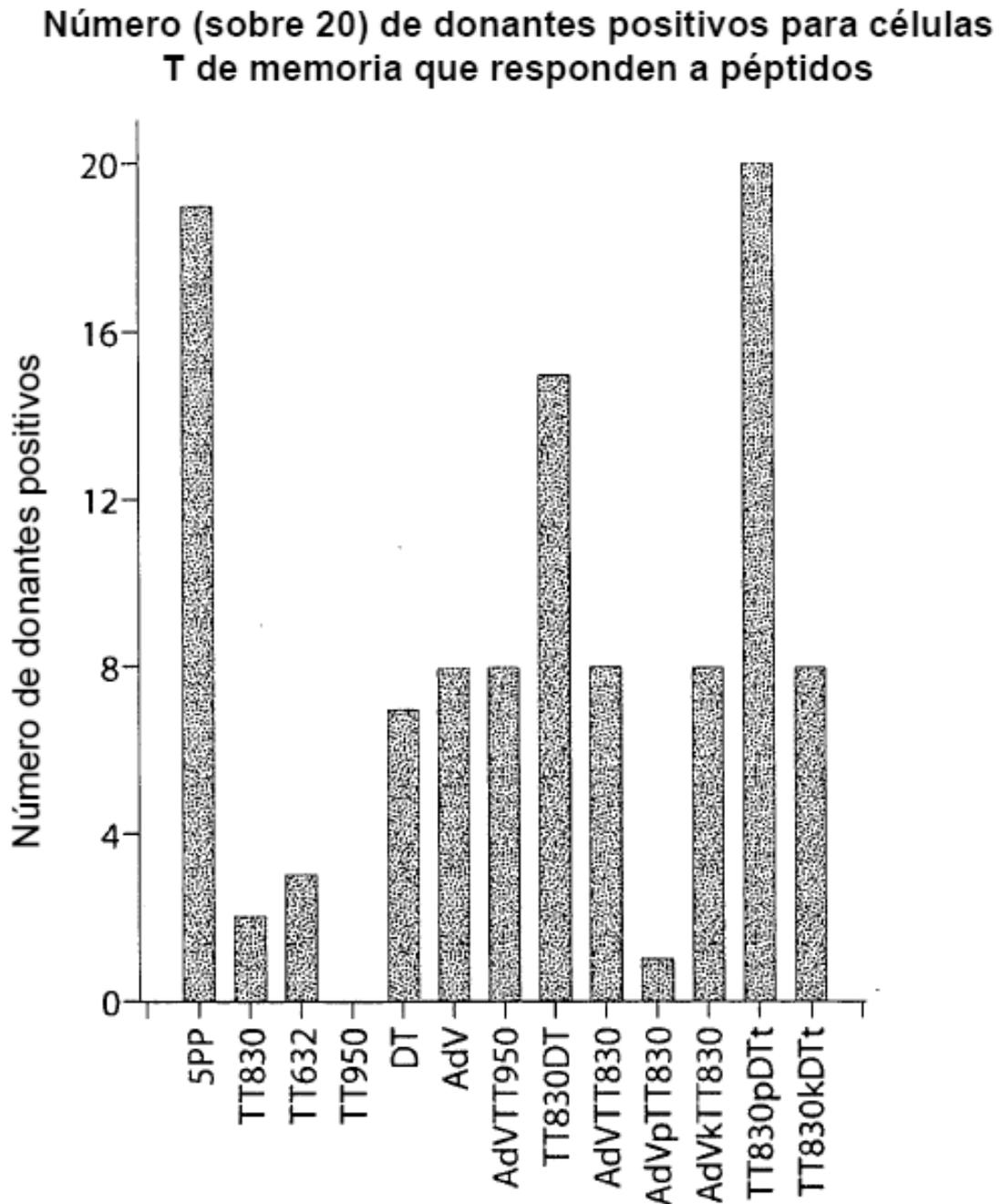


Fig. 1

**Porcentaje de células T de la memoria central normalizadas a células T CD4+/CD45RAmed/CD62Lalta/IFN-γ+ no estimuladas**



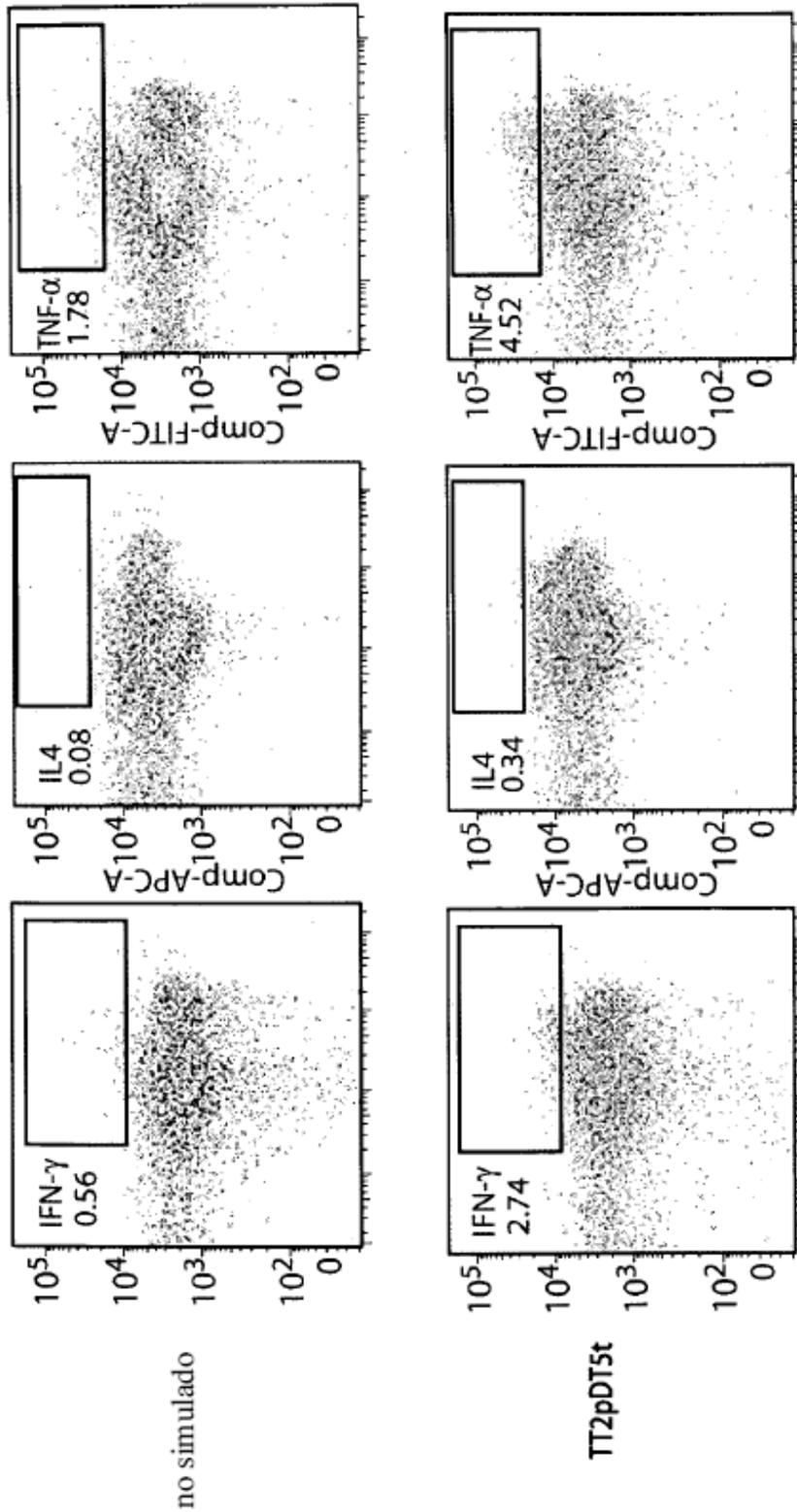
**Fig. 2**



Los donantes se consideraron positivos si los valores son mayores que 0,08% de respuesta de células T de la memoria central en la población de CD4+CD45RAbaja

**Fig. 3**

Ejemplos representativos de los datos de citometría de flujo que muestran la expresión de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en células T de la memoria central CD4+/CD45RAbaja/CD62Lalta específica de péptidos



CD62L

Fig. 4

Expresión porcentual de IL-4, TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  en células T de la memoria central CD4+/ CD45RAbaja/ CD62Lalta específicas de péptidos

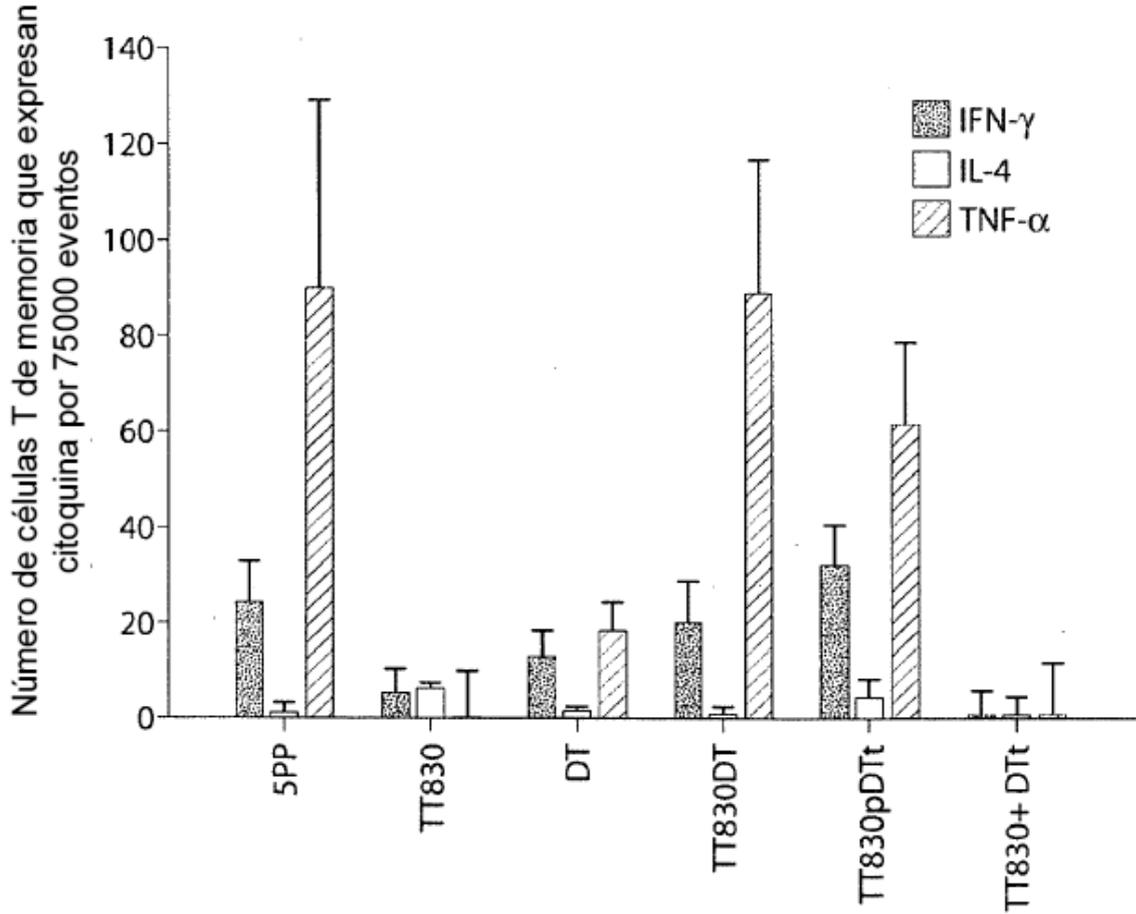


Fig. 5

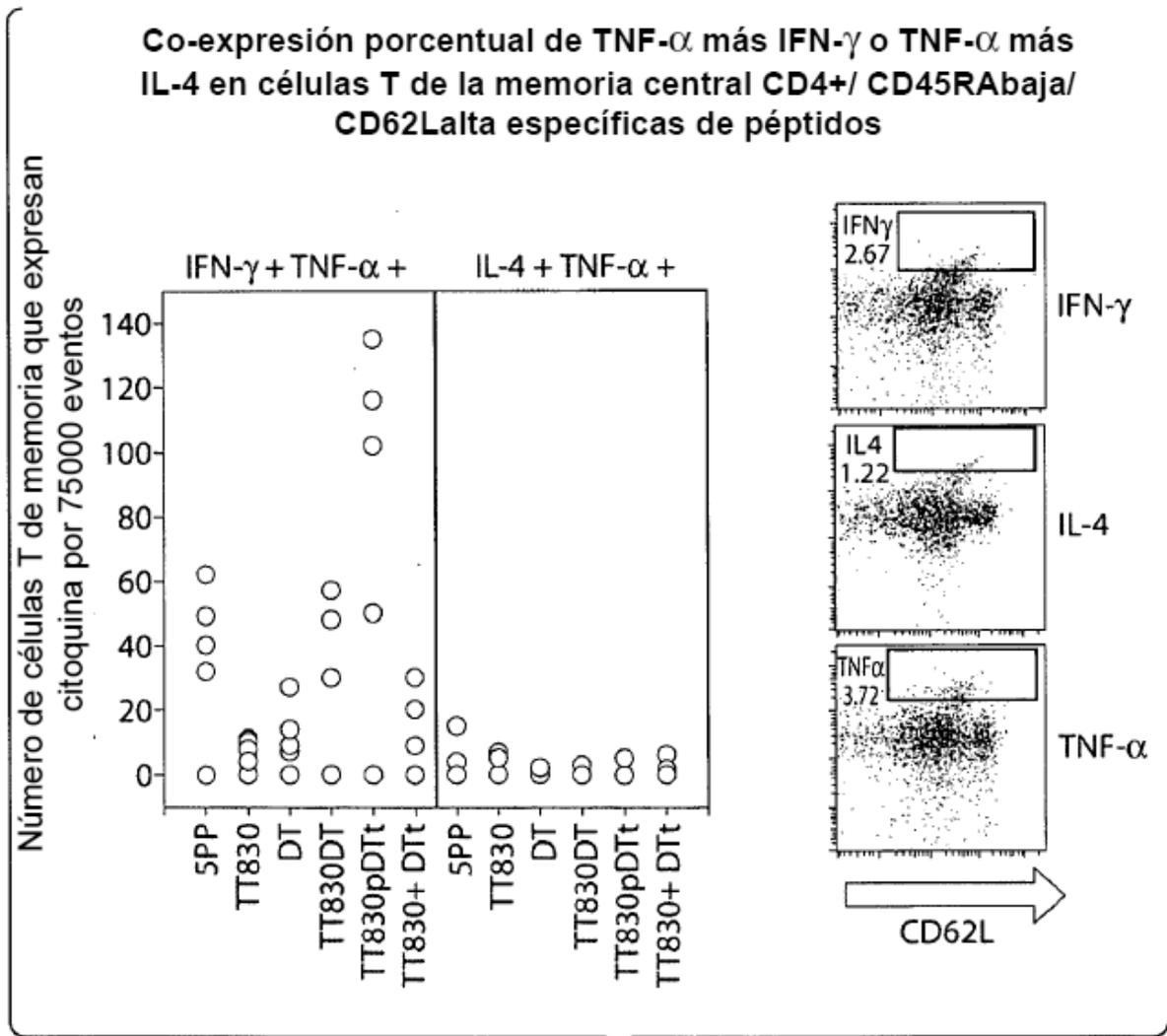


Fig. 6

## Variantes de TT830pDTt

## Molécula base

ILMQYIKANSKFIGIPMGLPQSIALSSLMVAQ	GRAVY .797	pl 9.7
----------------------------------	---------------	-----------

## Péptidos propuestos

## 1. Adición-1 del extr. N- y C-terminal

SKNILMQYIKANSKFIGIPMGLPQSIALSSLMVAQK	.372	10.6
--------------------------------------	------	------

## 2. Adición-2 del extr. N- y C-terminal

SKNILMQYIKANSKFIGIPMGLPQSIALSSLMVAQKE	.268	10.3
---------------------------------------	------	------

## 3. Adición-3 del extr. N- y C-terminal

KNILMQYIKANSKFIGIPMGLPQSIALSSLMVAQK	.406	10.6
-------------------------------------	------	------

## 4. Adición-4 del extremo N- y C-terminal

KNILMQYIKANSKFIGIPMGLPQSIALSSLMVAQKE	.297	10.3
--------------------------------------	------	------

## 5. PEG para aumentar la solubilidad

ILMQYIKANSKFIGIPMGLPQSIALSSLMVAQ-Pegylated

## 6. Enlazante de unión a H

ILMQYIKANSKFIGITSGTSQSIALSSLMVAQ	.625	9.7
----------------------------------	------	-----

## 7. Enlazante de solubilidad

ILMQYIKANSKFIGIGEGDDQSIALSSLMVAQ	.378	4.6
----------------------------------	------	-----

## 8. Péptido TT Delta 2aa + TEL (Ser para evitar pyroglu)

SQYIKANSKFIGITELQSIALSSLMVAQ	.662	8.3
------------------------------	------	-----

## 9. Enlace de catepsina B

ILMQYIKANSKFIGIKKQSIALSSLMVAQ	.538	10.2
-------------------------------	------	------

## 10. Enlace de catepsina B con adición del extr. N- y C-terminal

KNILMQYIKANSKFIGIKKQSIALSSLMVAQKE	0.02	10.1
-----------------------------------	------	------

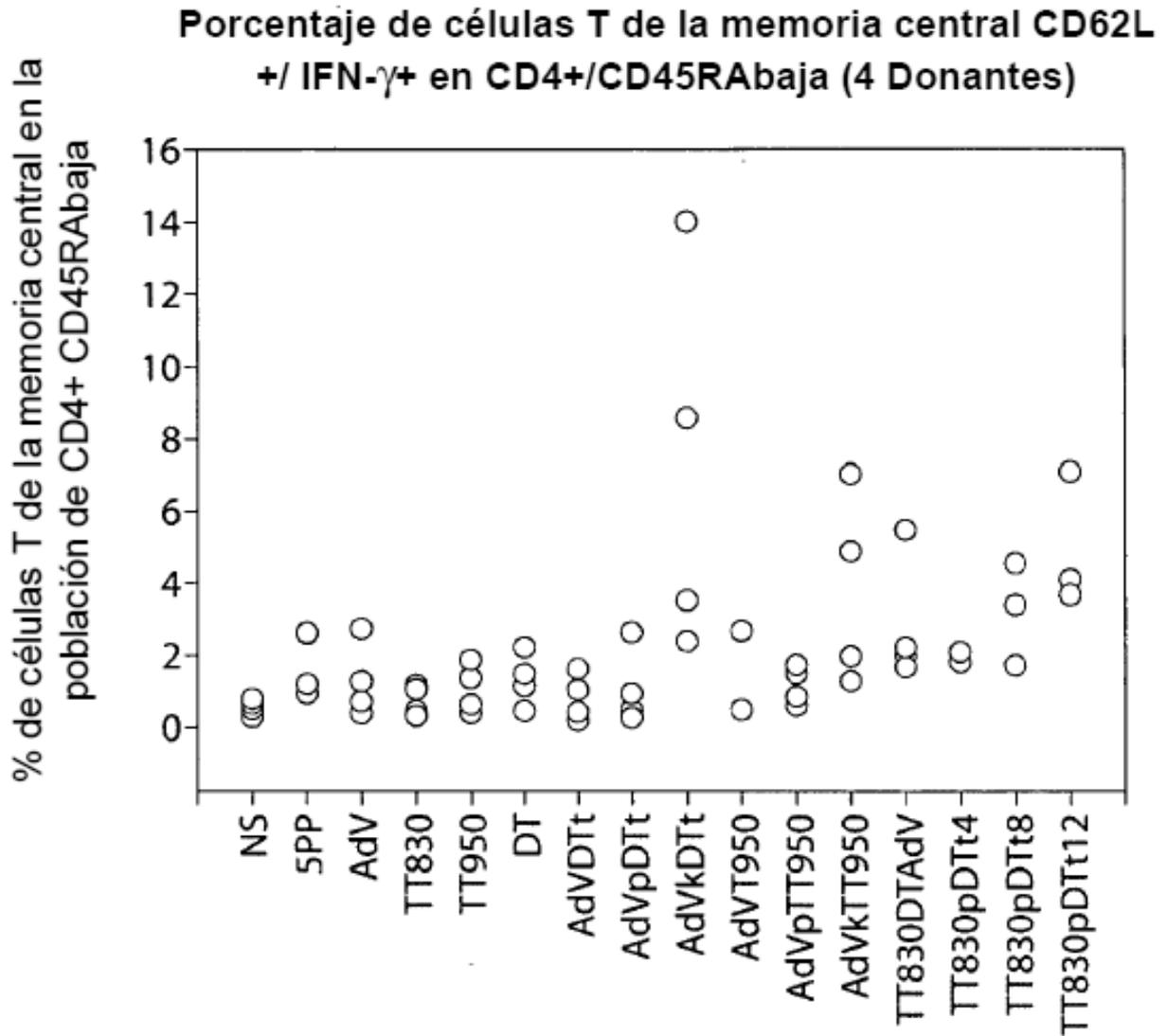
## 11. Enlazante de disulfuro

ILMQYIKANSKFIGIC CQSIALSSLMVAQ S S	.812	8.9
---------------------------------------	------	-----

## 12. Enlazante de hidrazona (escisión sensible a ácido)

ILMQYIKANSKFIGI (NHNH<sub>2</sub>+COCH<sub>2</sub>) QSIALSSLMVAQ

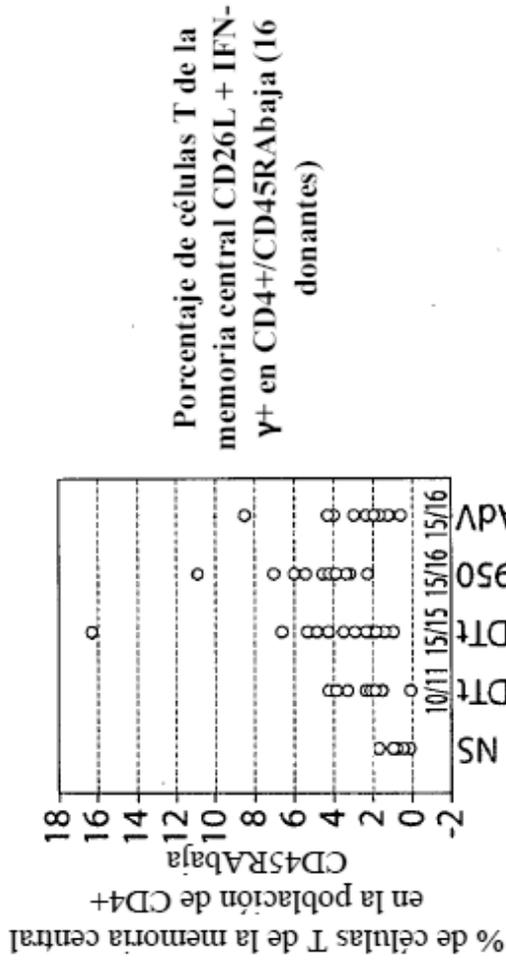
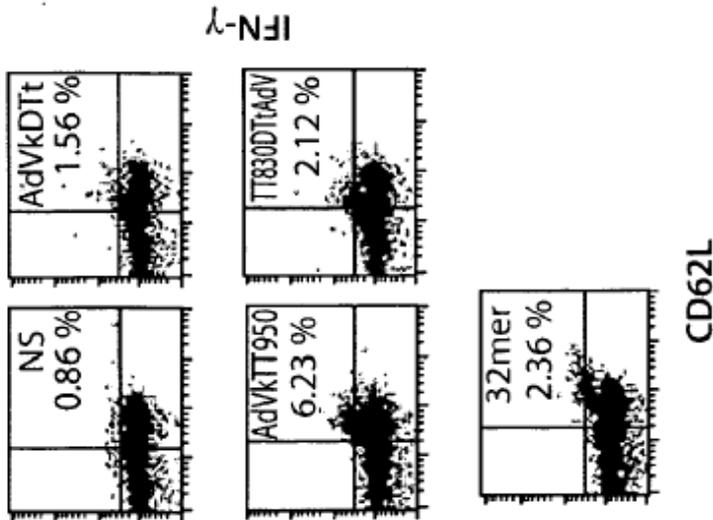
Fig. 7



**Fig. 8**

Porcentaje de células T de la memoria central CD4+/ CD45RAbaja/ CD62Lalta  
(16 donantes) utilizando péptidos quiméricos con un epítipo adenoviral

DONANTE No. 5



Péptido

- TT830pDt: ILMQYIKANSKFIGlpmglpQSIALSSLMVAQ (32)
- AdvkDt: TLLYVLFVEVksvvrQSIALSSLMVAQ (26)
- AdvkTT950: TLLYVLFVEVksvvrNFTVSWLVRVPKVSASHLET (35)
- TT830DtAdv: ILMQYIKANSKFIGIQSIALSSLMVAQTLLYVLEEV (36)

Fig. 9

**Porcentaje de células T de la memoria central CD4+/ CD45RAbaja/  
CD62Lalta (16 donantes) en variantes de AdVkDTt adenoviral**

Variantes de AdVkDTt:

Adiciones de aminoácidos para generar un AdVkDTt para  
generación de nanopartículas

<b>AdVkDTd1</b>	<b>EESTLLYVLFEVkvsvrQSIALSSLMVAQK (30), pI = 6.6-7.1</b>
<b>AdVkDTd2</b>	<b>ESTLLYVLFEVkvsvrQSIALSSLMVAQKE (30), pI = 6.6-7.1</b>
<b>AdVkDTd3</b>	<b>KESTLLYVLFEVkvsvrQSIALSSLMVAQE (30), pI = 6.6-7.1</b>
<b>AdVkDTd4</b>	<b>EEHTLLYVLFEVkvsvrQSIALSSLMVAQK (30), pI = 7.5-7.7</b>
<b>AdVkDTd5</b>	<b>EHTLLYVLFEVkvsvrQSIALSSLMVAQKE (30), pI = 7.5-7.7</b>
<b>AdVkDTd6</b>	<b>KEHTLLYVLFEVkvsvrQSIALSSLMVAQE (30), pI = 7.5-7.7</b>

% de células T de memoria en CD4CD45RAbaja

	<u>Exp1</u>	<u>Exp2</u>	<u>Exp3</u>
NS	.98	.52	.49
AdVkDTd1	2.12	2.34	1.36
AdVkDTd2	2.44	2.31	.86
AdVkDTd3	1.72	1.96	.39
AdVkDTt	7.08	6.32	1.23

**Fig. 10**

**Epítomos quiméricos para influenza, seleccionados para perfiles de pan HLA-DR conservados.**

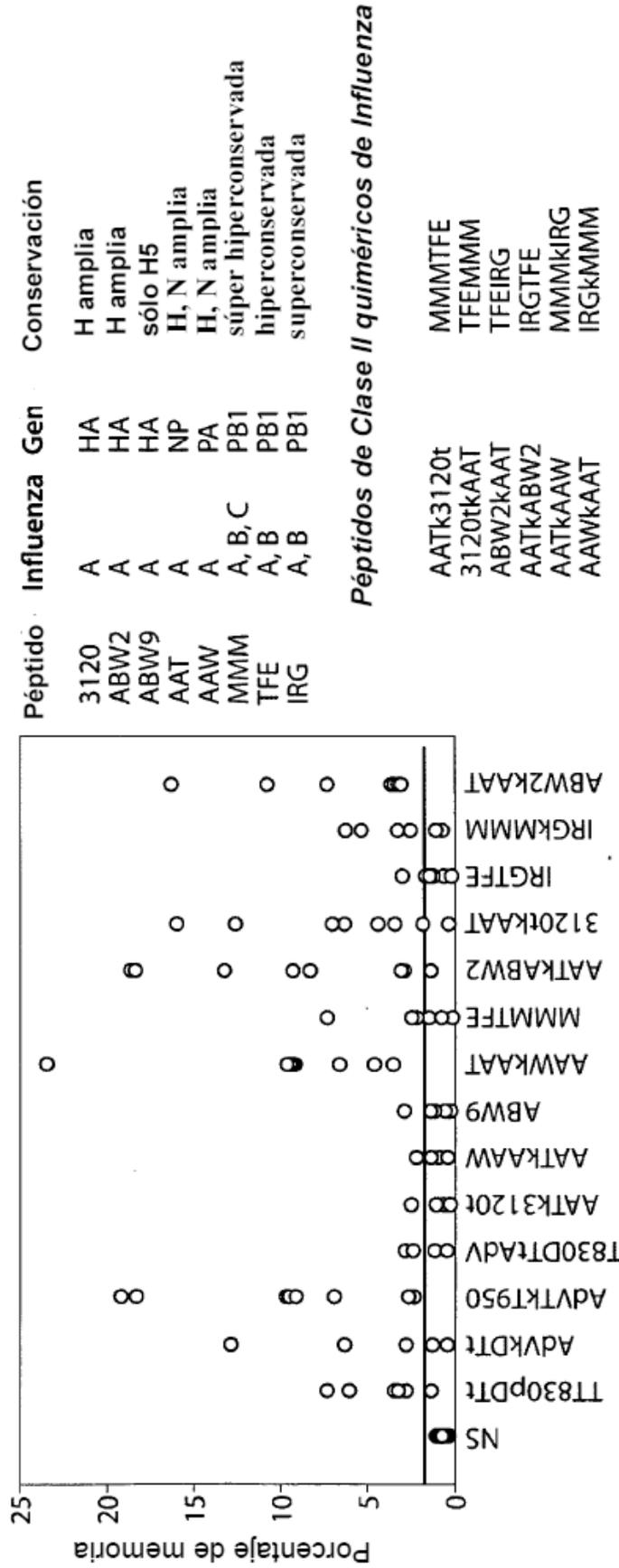
<b>AATk3120t</b>	LIFLARSALILR <b>kvsvr</b> NAELLVALENQHTI
<b>3120tkAAT</b>	NAELLVALENQHTI <b>kvsvr</b> LIFLARSALILR
<b>ABW2kAAT</b>	ILSIYSTVASSLALAI <b>kvsvr</b> LIFLARSALILR
<b>AATkABW2</b>	LIFLARSALILR <b>kvsvr</b> ILSIYSTVASSLALAI
<b>AATkAAW</b>	LIFLARSALILR <b>kvsvr</b> CSQRSKFLMDALKL
<b>AAWkAAT</b>	CSQRSKFLMDALKL <b>kvsvr</b> LIFLARSALILR
<b>ABW9hema</b>	EKIVLLFAIVSLVKSDQICI
<b>MMMTFE:</b>	MMMGFMNMLSTVLGV TFEFTSFFYRYGFVANFSMEL
<b>TFEMMM:</b>	TFEFTSFFYRYGFVANFSMEL MMMGMFNMLSTVLGV
<b>TFEIRG:</b>	TFEFTSFFYRYGFVANFSMEL IRGFVYFVETLARSICE
<b>IRGTFE:</b>	IRGFVYFVETLARSICE TFEFTSFFYRYGFVANFSMEL
<b>MMMkIRG:</b>	MMMGFMNMLSTVLGV <b>kvsvr</b> IRGFVYFVETLARSICE
<b>IRGkMMM:</b>	IRGFVYFVETLARSICE <b>kvsvr</b> MMMGMFNMLSTVLGV

**Fig. 11**

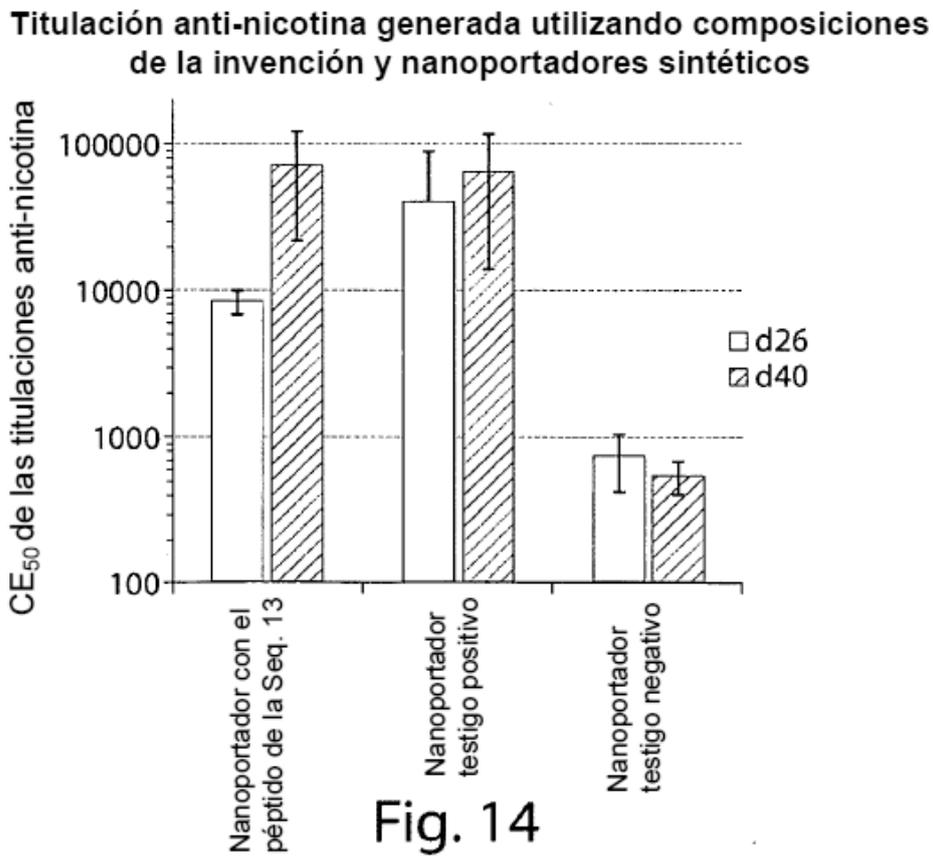
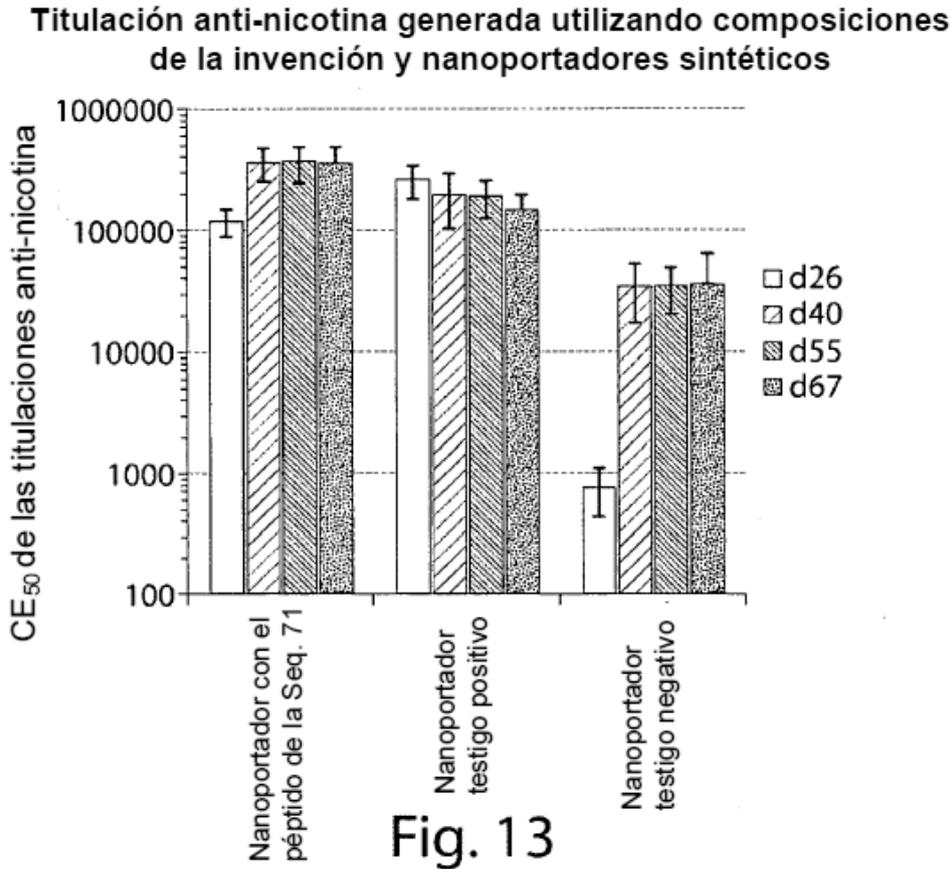
**Porcentaje de células T de la memoria central CD4+/ CD45RAbaja/ CD62Lalta (5 donantes) en epítomos de influenza conservados quiméricos**

Respuesta de memoria por parte de 5 donantes de péptidos de influenza quiméricos altamente conservados

**Péptidos de Clase II de Influenza**



**Fig. 12**



**Cobertura de población de HLA-DR proyectada de epítomos simples y quiméricos - Europa**

	alelo HLA-DRB1									
	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	1101	1302	1501
% frec. en la pob. (26,44 % total)	8.00	1.93	1.43	4.25	0.31	2.24	0.12	2.94	3.13	2.09
<b>Epitopo</b>	<b>Rango percentil de consenso</b>									
TT950	2.8	14	5.4	4.1	3.0	4.1	0.3	0.8	10.3	3.2
TT830	2.2	10	2.0	0.6	3.8	0.9	0.1	3.1	0.8	3.4
DT	0.57	1.3	3.0	2.6	7.5	2.6	13.2	6.5	2.8	9.9
AdVTT950	2.8	9.2	1.2	1.6	5.2	1.3	0.3	0.8	0.5	2.5
AdVTT830	2.2	6.4	2.0	0.4	0.27	0.9	0.1	2.9	0.8	0.37
TT830DT	0.24	1.3	1.5	0.6	0.8	0.9	0.1	2.0	0.7	3.4
DTTT830	0.57	1.3	2.0	0.6	3.8	0.9	0.1	2.9	0.8	0.37
TT830DTtrunc	0.24	1.3	1.5	0.6	0.8	0.9	0.1	2.0	0.7	3.4
DTtruncTT830	0.57	0.8	2.0	0.49	3.8	0.9	0.1	2.9	0.8	0.37

**Fig. 15**

**Cobertura de población de HLA-DR proyectada de epítomos simples y quiméricos - Europa**

	alelo HLA-DRB1									
	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	1101	1302	1501
% frec. en la pob. (26,44 % total)	8.00	1.93	1.43	4.25	0.31	2.24	0.12	2.94	3.13	2.09
<b>Epítomo</b>										
DT	3.5	2.3	6.24	5.4	5.38	2.2	2.01	3.7	3.3	5.1
DTt-3	3.5	2.8	5.9	7.5	7.5	3.7	2.01	3.7	2.8	2.7
TT632	48.5	15	16.1	17.4	17.4	15.2	4.45	12.5	10.6	1.1
DTt-3TT632	3.5	0.05	5.9	7.5	7.5	3.7	2.01	3.7	3.3	1.1
TT632DTt-3	3.5	1.54	3.5	7.5	7.43	3.5	.55	1.24	3.3	1.1
DTt-3pTT632	3.5	1.69	5.9	7.5	7.5	3.7	2.01	3.7	3.3	1.1
TT632pDTt-3	3.5	7.0	5.9	7.5	7.5	3.7	2.01	3.7	3.3	1.1

**Fig. 16**

**Análisis de unión previsto de epítomos de Clase II individuales para Influenza A**

	alelo HLA-DRB1									
	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	1101	1302	1501
% frec. en la pob. (26,44 % total)	8.00	1.93	1.43	4.25	0.31	2.24	0.12	2.94	3.13	2.09
<b>Epítopo</b>	<b>Rango percentil de consenso</b>									
18546 (21)	11.25	6.62	1.56	7.61	10.27	8.43	3.38	.62	4.26	10.9
6798 (24)	11.25	6.62	1.57	7.61	6.79	8.51	3.38	0.62	4.16	11.07
66325 (16)	4.82	1.05	14.86	18.49	20.82	4.25	3.41	3.58	13.74	5.98
7430 (19)	2	10.09	1.1	3.33	2.18	10.91	5.47	.89	48.01	6.89
31201 (21)	6.8	14.24	2.54	0.84	2.71	9.46	11.97	9.09	12.33	4.06
ABW90135.1  hemaglutinina EKIVLLFAIVSLVKSDQ ICI	0.5	0.97	1.16	0.35	1.3	0.82	0.75	0.06	1.55	0.99
QILSIYSTVASSLALAI MVA	1.7	5.24	0.79	1.44	2.14	0.3	0.55	6.64	8.78	2.25
ABP52008.1  neuraminidasa MVTGIVSLMLQIGNM ISIWVSHSI	2.8	6.03	1.7	0.66	5.15	1.95	2.97	1.39	3.77	0.67
AAT70630.1  nucleocápside EDLIFLARSALILRGSV	0.82	2.98	3.3	5.87	7.83	0.58	1.42	3.38	2.99	2.25
AAW80714.1  polimerasa CSQRSKFLLMDALKL SIED	0.025	0.18	1.33	1.91	2.21	1.00	4.16	0.34	9.28	1.59

Fig. 17

## Análisis de unión previsto de epítomos quiméricos para Influenza A

	alelo HLA-DRB1									
	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	1101	1302	1501
% frec. en la pob. (26,44 % total)	8.00	1.93	1.43	4.25	0.31	2.24	0.12	2.94	3.13	2.09
Epítopo	Rango percentil de consenso									
7430minX	1.7	3.76	1.1	1.06	1.36	6.44	3.38	0.62	3.94	5.37
minX7430	2	5.2	1.1	3.33	2.18	10.91	4.78	0.89	11.49	6.89
31201tminX	11.25	6.58	1.57	0.84	2.81	8.3	3.38	0.62	4.06	4.06
minX3120	6.43	6.62	2.54	0.84	2.7	7.68	3.38	2.18	4.85	4.06
66325minX	4.82	1.05	1.46	18.49	17.29	4.25	3.38	0.62	4.0	5.98
minX66325	4.38	1.05	1.81	10.79	6.24	4.23	2.18	2.18	10.43	5.93
31201.6798t	6.8	6.62	1.55	0.84	2.71	8.15	3.38	0.62	4.13	4.06
6798t.31201	6.8	1.26	2.54	0.84	2.71	8.41	3.38	0.67	8.78	4.06
ABW2minX	1.7	5.24	0.79	1.44	2.14	0.3	0.55	0.62	3.94	2.17
minXABW2	1.7	2.3	0.79	1.16	1.8	0.3	0.55	0.68	9.31	1.93
AAWminX	.025	0.18	1.33	1.91	2.21	1.0	3.38	0.34	3.88	1.91
minXAAW	.025	0.18	1.33	1.91	2.21	1.0	4.16	0.34	9.28	1.91
ATT3120t	0.82	2.98	2.54	0.84	2.7	0.58	1.29	3.38	2.99	2.25
3120tATT	0.82	2.98	2.53	0.84	2.7	0.58	1.42	3.38	2.99	1.98
ABW2AAT	1.7	1.55	0.79	1.44	2.14	0.3	0.55	3.38	2.99	2.01
AATABW2	0.82	1.67	0.79	1.15	1.8	0.3	0.55	2.02	2.99	1.4
AATAAW	0.82	0.18	1.33	1.91	2.21	0.58	1.19	0.34	2.99	1.91
AAWAAT	0.025	0.18	1.33	1.91	2.21	0.58	1.42	0.34	2.99	1.91
ABW90135.1	0.5	0.97	1.16	0.35	1.3	0.82	0.75	0.06	1.55	0.99

Fig. 18

**Péptidos quiméricos PB1 Clase II pan conservados para Influenza A+B**

	alelo HLA-DRB1											
	0101	0301	0401	0404	0405	0701	0802	1101	1302	1501	DP0401	DP0402
% frec. en la pob. (26,44 % total)	8.00	1.93	1.43	4.25	0.31	2.24	0.12	2.94	3.13	2.09		
<b>Epítipo</b>												
MMMTFE	1.1	.66	1.37	.08	1.52	2.17	.71	.89	5.98	6.34	1.65	1.7
TFEMMM	1.1	.63	.9	.02	1	2.17	0.82	.89	5.65	2.87	1.65	5.01
TFEIRG	3.16	.62	2.37	1.18	2.2	.96	2.97	1.2	5.72	1.55	1.25	.59
IRGTFE	3.16	.66	2.37	1.19	2.2	.96	2.97	1.2	5.98	4.06	1.36	.59
MMMKIRG	1	1.11	1.33	.08	1.52	.96	.72	.89	10.57	2.83	1.23	.59
IRGKMMM	1.1	2.52	.9	.02	1.02	.96	.82	.78	11.71	4.06	1.5	.59

**Fig. 19**

**Sustitución de aminoácidos sin pérdida de afinidad de unión a la Clase II prevista.**

	%ID	Rango percentil de consenso	
<b>ParteA</b>			
<u>Adv</u>		<i>HLA DPA1*01-DPB1*0401</i>	
TLLYVLFEV	100%	4.71	
TLLYVLFEL	90%	1.67	
TLLYLLFEL	80%	2.43	
TLLFLLFEL	70%	4.42	
<b>ParteB</b>			
<u>IT 830-841</u>		<i>HLADR0101</i>	<i>HLADR0404</i>
ILMQYIKANSKFIGI	100%	4.80	3.57
ILMQYIKANSKFLGL	90%	3.90	2.55
IIMQYIKANSKFLGL	80%	1.98	2.84
IIMQYIRANSRFLGL	70%	4.20	2.29

**Fig. 20**