

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 007**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

C07K 14/235 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2015 PCT/EP2015/055735**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15140234**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2015 E 15711487 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3119428**

54 Título: **Agonistas y vacunas del receptor tipo Toll 2 y usos de estas**

30 Prioridad:

19.03.2014 EP 14160791

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

18.03.2020

73 Titular/es:

THE PROVOST, FELLOWS, FOUNDATION SCHOLARS, & THE OTHER MEMBERS OF BOARD, OF THE COLLEGE OF HOLY AND UNDIV. (100.0%)

**Trinity of Queen EI, College Green
2 Dublin, IE**

72 Inventor/es:

**MILLS, KINGSTON y
DUNNE, AISLING**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 749 007 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

Agonistas y vacunas del receptor tipo Toll 2 y usos de estas

Campo de la invención

5 La invención se refiere a agonistas del receptor de tipo Toll 2 (TLR2), en particular, a lipoproteínas que activan TLR2, y más particularmente a lipopéptidos que activan TLR2 derivados de la bacteria *Bordetella pertussis*. La invención se extiende además al uso de dichas lipoproteínas que activan TLR2 como agentes terapéuticos o como parte de una composición de vacuna en el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas, cáncer o enfermedades alérgicas.

Antecedentes de la invención

10 La bacteria *Bordetella pertussis* es el agente causante de la tos ferina, una infección grave y debilitante del tracto respiratorio que afecta a bebés y niños pequeños. La tos ferina (tosferina) todavía da cuenta de más de 300.000 muertes infantiles anualmente, principalmente en países en desarrollo. La enfermedad se controló en gran medida en los países desarrollados a través de la vacunación con vacunas de células enteras (Pw) frente a la tos ferina que se introdujeron en la década de 1950. Sin embargo, estas vacunas se asociaron con efectos secundarios inaceptables y se reemplazaron en muchos países en la década de 1990 por vacunas acelulares frente a la tos ferina (Pa), compuestas de antígenos individuales de *B. pertussis* absorbidos a alumbre como el adyuvante. Más recientemente, estudios en niños y ratones han demostrado que Pa promueve la inducción de células Th2 y Th17 y esto se ha atribuido al uso de alumbre como el adyuvante. Por el contrario, Pw induce respuestas Th1 y Th17 y confiere un mayor nivel de protección frente a la infección en ratones y en niños y se cree que esto refleja la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos derivados de *B. pertussis* (PAMPs), que incluyen agonistas de receptores de tipo Toll (TLRs) (Higgs *et al.*).

Las células Th1 se caracterizan por la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ , IL-2 y TNF- β . Las células Th1 están implicadas en la inmunidad mediada por células (CMI), ejerciéndose típicamente la respuesta inmune frente a virus y patógenos intracelulares.

25 Las células Th17 secretan IL-17 y están involucradas en respuestas inmunes a la infección y tumores. Funcionalmente, las células Th17 juegan un papel en la defensa del huésped frente a patógenos extracelulares mediando en el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos a tejidos infectados. Por lo tanto, son en gran parte la respuesta inmune celular junto con las células Th1. La familia de las citoquinas IL-17 es un grupo de citoquinas que incluyen IL17A, B, C, D, IL-17E (IL-25) e IL-17F. Se reconoce cada vez más que, además de las células T, otras células como las células NK y los neutrófilos también podrían ser una fuente importante de IL-17. Además de la IL-17A, la principal citoquina producida por las células Th17, estas células también liberan IL-17F, IL-21 e IL-22.

35 Los receptores de tipo Toll (TLRs) son parte de una familia de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que han evolucionado para el reconocimiento inmune innato de productos microbianos conservados. Los TLRs tienen un papel clave en la modulación de la respuesta inmune innata; están también implicados en la reparación de tejidos, el mantenimiento de la integridad de los tejidos y la tumorigénesis. Hasta la fecha, se han identificado once receptores de tipo Toll en seres humanos. La unión de patrones moleculares asociados a patrones (PAMPs), como ligandos TLR a receptores de reconocimiento de patógenos en células del sistema inmune innato, como macrófagos y células dendríticas (DCs), activa las vías de señalización que dan lugar a la expresión de genes pro-inflamatorios y la inducción de respuestas inmunes innatas. Esto a su vez ayuda a impulsar la inmunidad adaptativa. Por consiguiente, se han aprovechado comercialmente los agonistas de TLR como adyuvantes en vacunas para estimular las respuestas inmunes a antígenos y como agentes inmunoterapéuticos directos para el cáncer. Los miembros de la familia LTR están altamente conservados y la mayoría de las especies de mamíferos tienen entre 10 y 15 receptores de tipo Toll. El receptor de tipo Toll 2 (TLR2, CD282, TLR-2) se puede activar por peptidoglicano, lipoproteínas, ácido lipoteicoico y ligandos endógenos. Las lipoproteínas son ensamblajes bioquímicos que comprenden tanto proteínas como lípidos. La opinión consensuada es que la activación de TLR2 es más antiinflamatoria que otros TLRs; por ejemplo, se ha informado que TLR2 indujo células presentadoras de antígeno reguladoras y tolerancia inmunológica (Dillon *et al.*).

45 Aunque el número de casos de tos ferina continuó disminuyendo después de la introducción de las vacunas de tosferina acelulares (Pa), en los últimos años ha habido un aumento alarmante en la incidencia de la enfermedad no solamente en niños sino también en adolescentes y adultos jóvenes. Esto se ha atribuido a la variación antigénica en antígenos protectores o a la inmunidad en declive e ineficaz inducida con el Pa actual. Por consiguiente, el resurgimiento de la tos ferina ha puesto en duda el nivel de protección proporcionado por las vacunas actuales y ha puesto de manifiesto la necesidad de una vacuna mejor.

Base de datos Uniprot, 9 de enero de 2013 "Subname: Putative lipoprotein (ECO: 0000313)

55 EMBL: CCN22419.1 describe una lipoproteína teórica de *Bordetella bronchiseptica* 1289, que está estrechamente relacionada con *Bordetella pertussis*.

El documento WO2005/032584 describe el lipopolipéptido teórico BASB232 de *Bordetella pertussis* codificado por Off48.

Resumen de la invención

Los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que los nuevos ligandos de lipoproteínas del receptor de tipo Toll 2 de *B. pertussis* son capaces de activar respuestas inmunes inflamatorias innatas que impulsan la inducción de inmunidad adaptativa celular protectora frente a *B. pertussis*. Los presentes inventores han identificado lipopéptidos que mejoran las respuestas Th1 y Th17 y, en particular, proporcionan una inmunidad protectora más eficaz y prolongada frente a *B. pertussis*.

Tras una amplia experimentación, los presentes inventores han identificado y caracterizado nuevos lipopéptidos que activan TLR2 derivados de *B. pertussis*. Los presentes inventores han demostrado que estos nuevos lipopéptidos activan específicamente TLR2 e impulsan sorprendentemente la potente producción de citoquinas pro-inflamatorias. Además, los inventores han demostrado que los lipopéptidos sintéticos correspondientes tienen potentes propiedades adyuvantes, promoviendo respuestas protectoras Th1 y Th17 frente a la infección por *B. pertussis in vivo* cuando se administran conjuntamente con antígenos de tosferina. Estos hallazgos demuestran que la combinación de antígenos protectores con un adyuvante basado en un ligando LTR2 endógeno de *B. pertussis* tiene un potencial considerable para el desarrollo de una vacuna más eficaz capaz de generar una inmunidad celular protectora frente a patógenos y de generar respuestas inmunes Th1/Th17 en relación con otras afecciones como cáncer o enfermedades alérgicas y, en particular, frente al patógeno emergente *B. pertussis*.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona al menos una lipoproteína obtenible de *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) para potenciar una respuesta Th1, la lipoproteína que tiene un péptido señal N terminal de menos de 40 aminoácidos de longitud en donde el péptido señal N terminal comprende una lipo-caja que comprende una secuencia de aminoácidos X1, X2, X3, X4, en donde X1 se puede seleccionar de Leucina, Valina e Isoleucina; X2 se puede seleccionar de Alanina, Serina, Treonina, Valina e Isoleucina; X3 se puede seleccionar de Glicina, Alanina y Serina; y X4 es Cisteína, en donde X4 es capaz de ser acilado, en donde la lipoproteína es un agonista del receptor de tipo Toll 2 (TLR-2), en donde la lipoproteína se selecciona del grupo que consiste en una lipoproteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1; una lipoproteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 y una lipoproteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14; en donde la lipoproteína es para usar en medicina.

Como entenderán los expertos en la técnica, aunque las lipoproteínas de la presente invención se identificaron a partir de *Bordetella pertussis*, tales lipoproteínas o un fragmento o derivado de estas también se pueden obtener mediante rutas sintéticas.

De manera adecuada, se puede obtener una lipoproteína o un fragmento o derivado de esta a partir de *B. pertussis*.

De manera adecuada, se puede obtener una lipoproteína o un fragmento o derivado de esta a partir de una fracción secretada soluble de *B. pertussis*.

En esta memoria se describe una lipoproteína que puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5 y SEQ ID N°: 6 o puede ser un derivado o fragmento de esta.

En esta memoria se describe una lipoproteína que puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5 y SEQ ID N°: 6 o puede ser un derivado o fragmento de esta.

En realizaciones, una lipoproteína de la invención o un fragmento o un derivado de esta puede promover una respuesta Th1 y/o una respuesta Th17 o suprimir una respuesta Th2 frente a un patógeno, cáncer o una enfermedad alérgica.

En esta memoria se describe un derivado que puede ser una lipoproteína agonista del receptor de tipo Toll 2 (TLR-2) de la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5 y SEQ ID N°: 6 de una bacteria Gram negativa que no es *B. pertussis*.

Un derivado de una lipoproteína del primer aspecto de la invención puede ser un lipopéptido que comprende un acilo expuesto acoplado al extremo N-terminal. De manera adecuada, el acilo expuesto acoplado al extremo N terminal se puede formar a partir de la escisión de una lipoproteína de la invención entre el X3 y el X4 de la lipo-caja que comprende una secuencia de aminoácidos X1, X2, X3, X4, en donde X1 se puede seleccionar de Leucina, Valina e Isoleucina; X2 se puede seleccionar de Alanina, Serina, Treonina, Valina e Isoleucina; X3 se puede seleccionar de Glicina, Alanina y Serina; y X4 es Cisteína.

Un derivado o fragmento de una lipoproteína puede ser de la fracción soluble de *B. Pertussis*. Se puede producir un derivado o fragmento de una lipoproteína de manera sintética o recombinante.

En realizaciones, un fragmento de una lipoproteína del primer aspecto de la invención puede ser un fragmento de lipopéptido seleccionado de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14.

SEQ ID N°: 13 (Lipopéptido 1569)

CSDVNQLLGNEESVD

SEQ ID N°: 14 (Lipopéptido 2992)

CANPSASSGVYTYGQ

- 5 En realizaciones, un lipopéptido que comprende o consiste en la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14 comprende un acilo expuesto acoplado al extremo N-terminal, por ejemplo, una cisteína diacilada o triacilada N-terminal, en particular, la cisteína puede ser palmitoilada. Un fragmento puede comprender al menos 10, adecuadamente 20, 50, adecuadamente 100 y adecuadamente 150 o más aminoácidos contiguos de la secuencia relevante y que es funcionalmente activa.
- 10 Un derivado puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70% homóloga a la secuencia relevante, más preferiblemente al menos un 80% homóloga, más preferiblemente al menos un 90% homóloga, incluso más preferiblemente al menos un 95% homóloga, más preferiblemente al menos un 97%, lo más preferiblemente al menos un 99% homóloga. Un derivado abarca una secuencia de polipéptido de la SEQ ID N°: 1 que incluye sustitución de aminoácidos, especialmente una(s) sustitución(es) que se conoce(n) por tener una alta probabilidad de no dar lugar a una modificación significativa de la actividad o configuración biológica, o plegamiento, de la proteína. Se conocen en la técnica estas sustituciones, típicamente conocidas como sustituciones conservadas. Por ejemplo, el grupo de arginina, lisina e histidina son aminoácidos básicos intercambiables conocidos. De manera adecuada en las realizaciones, se pueden sustituir entre sí los aminoácidos de la misma carga, tamaño o hidrofobicidad. De manera adecuada, cualquier sustitución se puede seleccionar en base al análisis de alineamientos de secuencia de aminoácidos de lipoproteínas para proporcionar sustituciones de aminoácidos con aminoácidos que están presentes en otras lipoproteínas en posiciones similares o idénticas cuando se alinean las secuencias. Los híbridos y los derivados y fragmentos de estos se pueden generar usando métodos de biología molecular adecuados como se conocen en la técnica.
- 15 De manera adecuada, el péptido señal N-terminal que incluye la lipo-caja comprende además una región de aminoácidos cargados positivamente y una región de aminoácidos hidrofóbicos. De manera adecuada, el péptido señal N-terminal puede comprender así la estructura, una región de aminoácidos cargados positivamente hacia el extremo N-terminal del péptido señal N-terminal, una lipo-caja en el extremo C-terminal del péptido señal N-terminal y una región de aminoácidos hidrofóbicos interpuestos entre la región de aminoácidos cargada positivamente y la lipo-caja.
- 20 Se entiende por región cargada positivamente aproximadamente 5-7 residuos que comprenden al menos 2 residuos de aminoácidos cargados positivamente, por ejemplo, residuos Lys o Arg. Por región hidrofóbica se entiende un tramo intermedio de residuos de aminoácidos no cargados, por ejemplo, fenilalanina, leucina, alanina, isoleucina, valina, metionina, triptófano, prolina, entre la región cargada positivamente y la lipo-caja.
- 25 Típicamente, la región cargada positivamente y la región hidrofóbica puede abarcar 7 a 22 aminoácidos de longitud. Por lipo-caja se entiende una secuencia distinta en el extremo C-terminal del péptido señal. La lipo-caja contiene la Cys invariante que está modificada con lípidos.
- 30 En realizaciones, la al menos una lipoproteína o lipopéptido que activa LTR2 se puede obtener a partir de la bacteria *Bordetella pertussis*.
- 35 En realizaciones, la al menos una lipoproteína o lipopéptido que activa LTR2 se puede proporcionar por medios recombinantes.
- 40 En realizaciones, el acilo expuesto de un lipopéptido de la invención puede ser un grupo diacilado o un grupo triacilado y preferiblemente un grupo triacilado.
- 45 De manera adecuada, una lipoproteína o fragmento o derivado de esta mejora una respuesta Th1 frente a un patógeno o cáncer o en una enfermedad o afección alérgica.
- 50 De manera adecuada, un patógeno puede ser cualquier agente infeccioso, en particular una bacteria, un virus, un hongo o un parásito.
- En ciertas realizaciones, el patógeno puede ser *B. pertussis*.
- En realizaciones, el cáncer puede ser cáncer hepático, cáncer de pulmón, en particular cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, melanoma, carcinoma de células basales o neoplasias hematológicas.
- En ciertas realizaciones, la enfermedad alérgica puede ser asma.
- También se describe un lipopéptido que activa TLR2 que puede ser un fragmento de una lipoproteína que comprende

la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 o la SEQ ID N°: 2.

La SEQ ID N°: 1 es la secuencia de longitud completa de la lipoproteína BP1569 de *B. pertussis*; la SEQ ID N°: 2 es la secuencia de longitud completa de la lipoproteína BP2992 de *B. pertussis*; la SEQ ID N°: 3 es la secuencia de longitud completa de la lipoproteína BP0205 de *B. pertussis*; la SEQ ID N°: 4 es la secuencia de longitud completa de la lipoproteína BP3342 de *B. pertussis*; la SEQ ID N°: 5 es la secuencia de longitud completa de la lipoproteína BP3819 de *B. pertussis* y la SEQ ID N°: 6 es la secuencia de longitud completa de la lipoproteína BP2508 de *B. pertussis*.

En las secuencias a continuación, los residuos positivamente cargados y la lipo-caja teórica se resaltan en negrita y el residuo de cisteína invariante está subrayado.

SEQ ID N°: 1 (BP1569)

MRM**NKR**HAGASALMALALL**LAGC**SDVNQLLGNEESVDYKSTRRGDPLSIPP
DLTQANNDPRYKAPASGTATYSQFQQQGLQQQASAGQNTNVLPERADMV
ERDGLRWLVIERPPEQLFSKVDFWTDGFTVSVNNPQAGIETDWAEN
RAKIPESWLRQVLGVSLETAWDSGEREKFRTRVERVNGHTEIYITHNQML
EKRVGSDGGQVQWTHGKEDPGLNAAMLARLMVYLGTDVDAARKLVAQAEA
APQAPKVQSVRAEGAMLVVDESFDRAWRRVGVALDSGGFAVDDDRDRSAGE
YFVRYVDTDTGAQNEQPGFFSRLFSSDKKAQAPQYRIRLTGSGTQTQVTV
LDANGQRDSSATAQRMLSVLKDKMV

SEQ ID N°: 2 (BP2992)

NYMHSPSVVAG**RARR**LLAVAAVAGSVAV**LAGC**ANPSASSGVYTYGQAQRE
QIVRTGTVTGVRPITIQNDKSSGVGLVAGGALGGVAGNAVGGGTGRTIATV
GGVILGALAGNAIENRAGKSSGYEITVRLDNGETRVVAQEADVPIVSGQRV
QVISGAGPTRVTPY

SEQ ID N°: 3 (BP0205)

MQLTIRKLAYTLAFSTLVLAG**C**TTASKKTDGQAATPADQASSQASAASV
EFYVAQAKAGDGLMEVKVPDGLYMQRQPVLTRADLTEAAALVDRQGQNF
VGLRFTEAGARKLNDISSKNIGNMLALVIDRELVAAPRIAEPLNRGVLAFL
GVPSAKAASEIAAKIRGDAGAPAAGVPAAPAPKPAPKP

SEQ ID N°: 4 (BP3342)

MKSRIAKSLTIAALAATLAA**C**SSVPLDDKAGQAGGSGQGSASGQILDPFN
PQSILAQQRSVYFDYFDSYTVSEQYRGLVETHARYLASNNQRIKIEGNTD
ERGGAEYNLALGQRRADAVRRMMTLLGVSDNQIETISFGKEKPKATGSSE
ADFAENRRADIVYQR

SEQ ID N°: 5 (BP3819)

MSAPLDTPALRLNTRFATGIVLAGTLALAG**C**AQQRSAGYYDPPGASTITD
AQYQQAAGYRTVVHAPSQLQIELKPNQPARQQNAQAQAGQQSTEDGTAV
PEGQAAPQPQPETASPGAQAIIPQAQTYQGTFFPCFAAGLACEAQRVTLTL
APNGRWSRSTNYLDKQPASAPVAEQGCWDATQERPPRVLLLDGSGNMRA
ELVMTANNVLRVRSVGGRTPNLNYNLTRQPDLDIAI AELDKQAAPKCP

SEQ ID N°: 6 (BP2508)

MIARISLRPLKGLAVAVLAASALTA**C**SSGKWGFYKAGVQQGNWITKEQV
ALLQQGMSREQVRFALGSPTLTSVLHADRWDYPYFKPGYGKAQERQFTV
WFENDHLVRWVGDEQPDLPFQIEKVNKQEEKADAQVDTAEKRQEGIDK
AEKVRPHVDVTTDPNPTLDYPGEPGQTFEPLK

Sin desear limitarse a la teoría, los inventores afirman que las lipoproteínas identificadas en la presente invención contienen un péptido señal N-terminal único característico de lipoproteínas bacterianas de bacterias Gram negativas. En realizaciones, las lipoproteínas de la presente invención se pueden triacilar con ácido palmítico o puede ser un

lípidos diacilados.

5 También se describe un método para la administración simultánea, separada o secuencial de al menos una lipoproteína que activa TLR2, o fragmento o derivado de esta, por ejemplo, un lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14 como parte de una composición de vacuna para el tratamiento de o la profilaxis de una afección causada por un patógeno o tumorigénesis. La al menos una lipoproteína que activa TLR2 o fragmento o derivado de esta, por ejemplo, un lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14 es un adyuvante. El patógeno es la bacteria *B. pertussis*. La composición de la vacuna comprende al menos un antígeno derivado de una enfermedad infecciosa o un tumor, por ejemplo, un antígeno específico de tumor o asociado al tumor. El al menos un antígeno se deriva de *B. pertussis*. La composición de la vacuna comprende un alérgeno.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición para mediar una respuesta inmune en un sujeto, la composición que comprende al menos una lipoproteína que activa TLR2 de la presente invención, por ejemplo, un lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14. En realizaciones, la lipoproteína, por ejemplo, el lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14, es un determinante inmunogénico en dicha composición. En realizaciones, la lipoproteína, por ejemplo, el lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14, puede proporcionar actividad adyuvante en dicha composición.

15 En ciertas realizaciones, la lipoproteína de la presente invención, por ejemplo, composiciones que comprenden un lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14, se usan para mediar una respuesta inmune frente a un patógeno, frente a células tumorales o frente a un alérgeno. Dicha lipoproteína, por ejemplo, las composiciones de vacunas que incluyen la lipoproteína se administran típicamente en mamíferos, en particular en seres humanos, con el fin de conferir inmunidad protectora frente al patógeno/agente infeccioso.

20 En ciertas realizaciones, la composición comprende la al menos una lipoproteína que activa TLR2, por ejemplo, un lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14, como el adyuvante. En ciertas realizaciones, la vacuna o la composición de vacuna comprende la al menos una lipoproteína que activa TLR2, por ejemplo, como el antígeno.

25 En realizaciones, se proporciona una composición que comprende la al menos una lipoproteína que activa TLR2 de la invención, por ejemplo, un lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14, que proporciona inmunidad protectora a un sujeto.

30 En ciertas realizaciones, la composición puede comprender la al menos una lipoproteína que activa TLR2, por ejemplo, un lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14, como el adyuvante y un antígeno de la bacteria *B. pertussis*.

35 En ciertas realizaciones, la composición puede comprender un antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno específico del tumor o asociado al tumor.

En ciertas realizaciones, la composición puede ser una vacuna de tos ferina acelular.

En ciertos aspectos adicionales, la presente invención proporciona una composición de acuerdo con la invención para usar en medicina.

40 También se describe el uso de al menos una lipoproteína que activa TLR2, o un fragmento o un derivado de esta de la invención, por ejemplo, un lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14, en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una afección causada por un patógeno, cáncer o una enfermedad alérgica.

45 En ciertos aspectos adicionales, la presente invención proporciona al menos una lipoproteína que activa TLR2 de la invención, por ejemplo, que comprende un lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14, para usar en el tratamiento o prevención de una afección causada por un patógeno, cáncer o una enfermedad alérgica.

En ciertos aspectos adicionales, la presente invención proporciona al menos una lipoproteína que activa TLR2 de la invención, por ejemplo, que comprende un lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14 para usar en el tratamiento o prevención de una afección causada por un patógeno, cáncer o una enfermedad alérgica.

50 En ciertas realizaciones, un patógeno puede ser cualquier agente infeccioso, en particular una bacteria, un virus, un hongo o un parásito.

En ciertas realizaciones, el patógeno puede ser *B. pertussis*.

En realizaciones, la tumorigénesis puede ser cáncer hepático, cáncer de pulmón, en particular cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, melanoma, carcinoma de células basales

o neoplasias hematológicas.

En ciertas realizaciones, la enfermedad alérgica puede ser asma.

Se describe en esta memoria la al menos una lipoproteína que activa TLR2 o fragmento o derivado de esta, por ejemplo, un lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14, o las composiciones que las contienen, se administra de manera profiláctica a un sujeto. La al menos una lipoproteína que activa TLR2 o fragmento o derivado de esta, por ejemplo, un lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14, o las composiciones que comprenden la misma, se administra de manera terapéutica. Las composiciones profilácticas y terapéuticas se pueden administrar a sujetos que lo necesitan según se requiera.

En varios aspectos adicionales, la presente invención se extiende a la al menos una lipoproteína que activa TLR2 de la invención, por ejemplo, que comprende un lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14, o a preparaciones o mezclas que comprenden la misma, o a composiciones que contienen la misma, para usar como estimulador para mejorar la respuesta inmune generada en un huésped frente a un patógeno al que se ha expuesto previamente el sujeto, típicamente por infección o debido a la administración previa de una vacuna primaria.

También se describe el uso de la al menos una lipoproteína que activa TLR2, o fragmento o derivado de esta, por ejemplo, un lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14 de la invención en un método de vacunación de un sujeto para inducir inmunidad frente a la enfermedad infecciosa y en particular frente a la enfermedad infecciosa derivada de *B. pertussis*.

También se describe un método para mediar en una respuesta inmune en un sujeto frente a una enfermedad infecciosa, que comprende dicho método las etapas de:

- proporcionar una composición que comprende al menos una lipoproteína que activa TLR2, o fragmento o derivado de esta de la invención, por ejemplo, que comprende un lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14, y

- administrar la composición al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz suficiente para desencadenar una respuesta inmune en el sujeto frente a la enfermedad infecciosa.

También se describe una lipoproteína o fragmento o derivado de esta, de un primer aspecto de la invención para usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección que requiere una mejora de la respuesta Th1 y/o Th17 en particular un patógeno o una afección maligna/cáncer.

En ciertas realizaciones de los aspectos de la presente invención, la composición puede incluir un antígeno del patógeno que causa una enfermedad infecciosa. En ciertas realizaciones, la composición puede incluir un antígeno de un patógeno que causa tétanos, difteria, virus de la hepatitis B, polio, haemophilus influenza B, influenza, enfermedad meningocócica por Mycobacterium tuberculosis. En ciertas realizaciones, la composición puede incluir un antígeno de un patógeno que causa una infección del tracto respiratorio. En ciertas realizaciones, la infección del tracto respiratorio es de *B. pertussis* y causa la tos ferina.

También se describe un método para mediar en una respuesta inmune en un sujeto con cáncer, dicho método que comprende las etapas de:

- proporcionar una composición que comprende al menos una lipoproteína que activa TLR2 o fragmento o derivado de esta, por ejemplo, que comprende un lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14, y

- administrar la composición al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz.

También se describe en donde el antígeno puede ser una proteína o péptido específico de tumor o células tumorales o extractos o células tumorales completas muertas. En ciertas realizaciones, el antígeno puede ser un antígeno asociado a tumor, un antígeno específico de tumor, una proteína de shock térmico y péptido antigénico o un antígeno peptídico sintético derivado de o correspondiente al de la célula cancerosa.

También se describe en donde el cáncer puede ser melanoma o carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer hepático, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, melanoma, carcinoma de células basales o neoplasias hematológicas.

También se describe un método de mediar una respuesta inmune en un sujeto con una enfermedad alérgica, que comprende dicho método las etapas de:

- proporcionar una composición que comprende al menos una lipoproteína que activa TLR2 o fragmento o derivado de esta, por ejemplo, que comprende un lipopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos

de la SEQ ID N°: 13 o la SEQ ID N°: 14, y

- administrar la composición al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz.

La enfermedad alérgica puede ser asma.

- 5 La composición puede ser una composición de vacuna.

De acuerdo con otro aspecto adicional, se proporciona una lipoproteína o fragmento o derivado de esta, del primer aspecto de la invención para usar en la mediación de un sistema inmune en un sujeto en particular para usar en el tratamiento o afecciones que requieren la mejora de las respuestas Th1 y/o Th17, en particular un patógeno o una afección maligna/cáncer.

- 10 Como se usa en esta memoria, el término "composición de vacuna" significa cualquier composición que contiene un determinante inmunogénico que estimula el sistema inmune de una manera que pueda responder mejor a desafíos posteriores o infecciones patógenas o un tumor. Se apreciará que una vacuna generalmente contiene un determinante inmunogénico y opcionalmente un adyuvante, el adyuvante que sirve para mejorar la respuesta inmune no específica al determinante inmunogénico.

- 15 También se describe en donde se puede proporcionar la composición en combinación con un inmunomodulador. El inmunomodulador puede ser un inhibidor de la fosfoinosítido quinasa 3 (PI3K), un inhibidor de la quinasa activada por mitógenos (MAP) o inhibidores de puntos de control inmunes. Los inhibidores de puntos de control inmunes pueden ser antígeno 4 anti-citotóxico de linfocito T (CTLA4) o un anti- muerte no programada 1 (PD1)/ ligando 1 de muerte programada (PDL1).

- 20 La fosfoinosítido quinasa-3 (PI3K) es un proto oncogen que regula la longevidad celular. El inhibidor de p13K puede ser LY294002, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este, o un análogo de este, en donde el análogo tiene actividad inhibitora de p13K. Alternativamente, el inhibidor de p13K puede ser wortmanina (WMN) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este, o un análogo de este.

- 25 Las MAP quinasas son proteínas que están implicadas en las respuestas celulares, la inflamación y el crecimiento. La quinasa P38 (p38) es un miembro del grupo de la proteína quinasa activada por estrés (SAPK) de las MAP quinasas. El inhibidor es un inhibidor de la quinasa p38. Preferiblemente, el inhibidor de la p38 quinasa es SB203580 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este, o un análogo de este, en donde el análogo tiene actividad inhibitora de p38. Alternativamente, el inhibidor puede ser SB220025 o SB239063 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este, o un análogo de este, en donde el análogo tiene actividad inhibitora de la quinasa p38.

30 **Breve descripción de las figuras**

Las realizaciones de la presente invención se describirán ahora a modo de ejemplo solo con referencia a las figuras que se describen a continuación.

- 35 La Figura 1A muestra las SEC ID Nos: 1-6 que son secuencias de longitud completa de las lipoproteínas BP1569, BP2992, BP0205, BP3342, BP3819 y BP2508 de *B. pertussis*. La Figura 1B muestra las SEQ ID Nos: 7-12 que son secuencias de péptido señal N-terminal de lipoproteínas teóricas de *B. pertussis* (los residuos positivamente cargados y la lipo-caja teórica están resaltados en negrita, el residuo de cisteína invariante está subrayado). La Figura 1C muestra la SEQ ID N°: 13 y la SEQ ID N°: 14 que son las secuencias de las lipoproteínas de *B. pertussis*.

- 40 La Figura 2A muestra un análisis de SDS-PAGE de la lipoproteína BP1569 de *Bordetella pertussis* (carril 1: 10 ng de BP1569, Carril 2: marcadores de peso molecular) seguido de cromatografía de afinidad de níquel y de intercambio iónico. La Figura 2B muestra la producción de citoquinas (TNF-alfa, IL-6, IL-12p70, IL-23) medidas mediante ELISA cuando se cultivan células dendríticas de ratones C3H/HeJ con BP1569 (100 y 1000 ng/ml) durante 24 h. La Figura 2C muestra la expresión en superficie de MHCII, CD80 y CD86 determinada mediante citometría de flujo seguido de tratamiento de las células dendríticas C3H/HeJ con BP1569 (100 ng/ml; línea negrita) o solamente con el medio (línea gris) durante 24 h. La Figura 2D muestra la producción de TNF- α medida mediante ELISA cuando se trataron las células dendríticas de ratones C3H/HeJ con BP1569 (100 ng/ml) durante 24 h con y sin la adición de anticuerpo anti-TLR2 (T2,5; 2,5 μ g/ml). La Figura 2E muestra las concentraciones de IL-6 en sobrenadantes cuantificadas mediante ELISA cuando se trató BP1569 con lipasa de *Aspergillus* (As) o de *Pseudomonas* (Ps) a las concentraciones indicadas durante 18 h a 37°C. Se usó BP1569 tratada o sin tratar con lipasa (100 ng/ml) para estimular BMDC de ratones C3H/HeJ.

- 50 La Figura 3 demuestra la activación de las rutas de NF- κ B y MAP quinasa por BP1569. La Figura 3A muestra la actividad luciferasa de células HEK-293T que expresan de forma estable TLR2 humano que se transfectaron con un constructo de NF- κ B con luciferasa de marcador antes de la estimulación con dosis crecientes de BP1569. La actividad luciferasa se cuantificó después de 24 h. La Figura 3B muestra la producción de IL-8 de células HEK-293T que expresan de forma estable TLR2 humano que se transfirieron con un constructo de NF- κ B con luciferasa de marcador antes de la estimulación con dosis crecientes de BP1569. Se cuantificó la producción de IL-8 después de 24 h. La Figura 3C muestra la fosforilación de p38 que se evaluó después de la estimulación de células de bazo de ratones

C3H/HeJ con BP1569 con o sin la adición de anticuerpo anti-TLR2 de (T2,5 2,5 $\mu\text{g/ml}$) o un control de isotipo. La figura 3D muestra las concentraciones de IL-6 en sobrenadantes de PBMC humanos que se trataron con BP1569 (100 ng/ml) en presencia y ausencia de anticuerpos neutralizantes anti-TLR1 o anti-TLR6. Después de 24 h, se determinaron mediante ELISA las concentraciones de IL-6 en sobrenadantes.

5 La Figura 4 demuestra como BP1569 induce citoquinas innatas e IL-17 específica de antígeno y la producción de IFN- γ in vivo. La Figura 4A muestra las concentraciones de IL-12 e IL-6 cuando se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) ratones C3H/HeJ con BP1569 en PBS (70 μg) o solo PBS. Después de 3 h se cuantificaron las concentraciones de IL-12 e IL-6 mediante ELISA. La Figura 4B muestra la concentración de IFN- γ específico de antígeno cuantificado mediante ELISA cuando se inyectaron en la almohadilla plantar ratones C3H/HeJ con PBS o con 10 μg de BP1569.
10 Después de siete días se recogió el nódulo linfático de drenaje y se estimularon las células con BP1569 (2 $\mu\text{g/ml}$). La Figura 4C muestra la concentración de IFN- γ específico de antígeno cuantificado mediante ELISA cuando se inyectaron en la almohadilla plantar ratones C3H/HeJ con PBS o con 10 μg de BP1569. Después de siete días se recogió el nódulo linfático de drenaje y se estimularon las células con *B. pertussis* inactivado totalmente por calor (1-100 x 10⁶/ml).

15 La Figura 5 demuestra como el lipopéptido sintético LP1569 induce la producción de citoquinas por células dendríticas y macrófagos de ratón y PBMC humanos. La Figura 5A muestra la producción de TNF- α , IL-12p40, IL-12p70, IL-6 e IL1 α por células dendríticas de ratones C57BL/6 que se estimularon con concentraciones crecientes de lipopéptidos LP1569. Se co-incubó anti-TLR2 (T2,5 2,5 $\mu\text{g/ml}$) con la dosis más alta de péptido. Después de 24 h de cultivo, se cuantificó la producción de citoquinas mediante ELISA. La Figura 5B muestra la producción de TNF- α por células dendríticas de ratones C57BL/6 estimulados con LP1569 o LP1569 con anti-TLR2 (α TLR2; T2.5: 2,5 $\mu\text{g/ml}$). Después de 24 h, se cuantificó la producción de TNF- α mediante ELISA. La Figura 5C muestra la producción de TNF α de PBMC humanos que se trataron con concentraciones crecientes de LP1569 durante 24 h y la producción de TNF α e IL-6 mediante ELISA. La Figura 5D muestra las citoquinas séricas de ratones C57BL/6 que se inyectaron i.p. con 50 o 100 μg de LP1569. Después de 3 h se cuantificaron la IL-6 y la IL-12p40 séricas mediante ELISA.

25 La Figura 6 demuestra cómo LP1569 mejora la activación de las células T $\gamma\delta$ y las células T CD4. La Figura 6A muestra células de bazo de ratones C57BL/6 estimulados con LP1569 (100 ng/ml) o medio con o sin anticuerpos bloqueantes anti-IL-12p40 (α p40) o anti-IL-23p19 (α p19). Después de 72 h, se probaron los sobrenadantes para IFN- γ mediante ELISA. La Figura 6B muestra células de bazo de ratones C57BL/6 estimulados con LP1569 (100 ng/ml) o medio con o sin IL-1 β o IL-23. Después de 72 h, se probaron los sobrenadantes para IL-17 mediante ELISA. La Figura 6C muestra la tinción intracelular de citoquinas para IFN- γ haciendo ventana en células T CD4 de cultivos de células de bazo estimuladas con LP1569 (100 ng/ml), IL-1 β o ambas. La Figura 6D muestra la tinción intracelular de citoquinas para IFN- γ haciendo ventana en células T CD8 de cultivos de células de bazo estimuladas con LP1569 (100 ng/ml), IL-1 β o ambas. La Figura 6E muestra la tinción intracelular de citoquinas para IL-17 haciendo ventana en células T $\gamma\delta$ de cultivos de células de bazo estimuladas con LP1569 (100 ng/ml), IL-23 o ambas.

35 La Figura 7 demuestra cómo LP1569 actúa como un adyuvante para una vacuna acelular experimental de *pertussis* y promueve inmunidad celular protectora frente a *B. pertussis*. Se inmunizaron dos veces ratones C57BL/6 (0 y 4 semanas) con PTD, FHA y pertactina sola o se formularon con LP1569 o PBS como control. Dos semanas después de la segunda inmunización, los ratones se desafiaron mediante exposición en aerosol a *B. pertussis*. La Figura 7A muestra los recuentos de CFU que se realizaron en homogeneizados de pulmón, 3, 7 y 10 días después del desafío. La Figura 7B muestra los títulos séricos de anticuerpo IgG1 e IgG2a específicos de FHA que se determinaron mediante ELISA en suero preparado en el día del desafío. La Figura 7C muestra las concentraciones de IL-17, IFN- γ e IL-5 en sobrenadantes de células de bazo de ratones inmunizados en el día del desafío estimulados con FHA y después de 3 días se cuantificaron mediante ELISA las concentraciones de IL-17, IFN- γ e IL-5 en los sobrenadantes.

45 La Figura 8 demuestra cómo LP1569 como un adyuvante mejora las respuestas Th1 y la eficacia protectora de la vacuna acelular frente a la tos ferina. Los ratones se inmunizaron i.p. dos veces (0 y 28 días) con una vacuna acelular de la tos ferina absorbida sobre alumbre solo (Pa) o con LP1569 añadido a Pa con alumbre. 14 días después de la segunda inmunización, los ratones se desafiaron por exposición a un aerosol de *B. pertussis* vivo. Se cuantificó el número de CFU en los pulmones a intervalos después del desafío. Los resultados de dos experimentos independientes se muestran en la Figura 8A y en la Figura 8B. La Figura 8C muestra la producción de IFN- γ específica de FHA-*B. pertussis* por las células de bazo en el día del desafío.

55 La Figura 9 demuestra cómo la lipoproteína de *Bordetella pertussis* BP2992 induce la maduración y la producción de citoquinas pro-inflamatorias por células dendríticas (DCs). La Figura 9A muestra el análisis mediante SDS-PAGE de BP2992 después de cromatografía de afinidad en níquel y de intercambio iónico. Carril 1: 5 ng de BP2992; carril 2: 10 ng de BP2992. La Figura 9B muestra la producción de citoquinas cuando, las células dendríticas de ratones C3H/HeJ que se cultivaron con BP2992 (50, 100 y 1000 ng/ml) durante 24 h, se midió la producción de citoquinas mediante ELISA. La Figura 9C muestra la expresión en superficie de MHC de clase II, CD80 y CD86 que se determinó mediante citometría de flujo después del tratamiento de DC de C3H/HeJ con BP2992 (100 ng/ml; línea en negrita) o medio solo (línea gris) durante 24 h.

La Figura 10 demuestra cómo BP2992 induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias por células dendríticas (DCs) de una manera dependiente de TLR2. La Figura 10A muestra la producción de IL-6 cuando se trataron células dendríticas de ratones C3H/HeJ con BP2992 (100 ng/ml) o PAM₃Cys₄ con o sin la adición de anticuerpo anti-TLR2 (T2.5; 2,5 µg/ml). Después de 24 horas se midió la producción de IL-6 mediante ELISA. La Figura 10B muestra la producción de TNF-α cuando se trataron células dendríticas de ratones C3H/HeJ con BP2992 (2,5-500 ng/ml) o con 500 ng/ml de BP2992 con un anticuerpo anti-TLR2 (T2.5; 2,5 µg/ml). Después de 24 h se midió la producción de TNF-α mediante ELISA.

La Figura 11 demuestra cómo BP2992 induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias a partir de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). Se trataron PBMCs de dos donantes humanos (A y B) con BP2992 (0,01- 1 µg/ml). Después de 24 horas se determinaron las concentraciones de TNF-α en sobrenadantes mediante ELISA.

La Figura 12 demuestra cómo los lipopéptidos sintéticos LP1569 y LP2992 mejoran la activación de células T CD4 y células T γδ. La Figura 11A muestra el ELISA para IL-17 e IFN-γ en sobrenadantes de células de bazo estimuladas con LP1569, LP2992 o Pam₃Cys₄ con o sin IL-1β o IL-23 durante 3 días. La Figura 12B muestra la tinción intracelular de citoquinas para IL-17 haciendo ventana en células T γδ de cultivos de células de bazo estimuladas con LP1569, LP2992 o Pam₃Cys en presencia o ausencia de IL-23. La Figura 12C muestra la tinción CFSE de células T CD4⁺ estimuladas con anti-CD3 solo (histograma sombreado) o en presencia de LP1569, LP2992 o Pam₃Cys (línea continua).

La Figura 13 demuestra cómo LP1569 y LP2992 actúan como adyuvantes in vivo, promoviendo las respuestas Th1 y Th17 a los antígenos inyectados conjuntamente. Se inmunizaron ratones C57BL/6 (día 0 y 21) i.p. con KLH (10 µg) mezclado con LP1569 o LP2992 (10 µg). Siete días después de la segunda inmunización se recogieron células de bazo y se volvieron a estimular con concentraciones crecientes de KLH durante 3 días. Se detectaron IL-17 e IFN-γ en los sobrenadantes de células de bazo mediante ELISA.

La Figura 14 demuestra cómo la administración terapéutica de LP1569 ralentiza el crecimiento tumoral y mejora la supervivencia de los ratones desafiados con células de carcinoma de colon CT26. Se inyectaron subcutáneamente (s.c.) ratones BALB/c con 3 x 10⁵ células de carcinoma de colon CT26 en el día 0. La Figura 14A muestra el volumen del tumor y la Figura 14B muestra la supervivencia que se monitorizó en los ratones inyectados en el sitio del tumor con LP1569 (50 µg) en DMSO y PBS o DMSO y PBS solo en los días 3, 10 y 17. Los resultados de la Figura 14A son representativos de dos experimentos (n=6) y los resultados de la Figura 14B son datos agrupados de 2 experimentos (n=12).

Descripción detallada de la invención

Administración de las composiciones de vacuna

Se describe en esta memoria en donde las composiciones de vacuna de la invención pueden comprender un adyuvante adicional. El adyuvante se selecciona del grupo que consiste en, pero no se limita a, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, Quil A, Detox, ISCOMs y escualeno. Otros adyuvantes adecuados incluyen geles minerales o una sal de aluminio como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, pero también pueden ser una sal de calcio, hierro o zinc, o pueden ser una suspensión insoluble de tirosina acilada o azúcares acilados o pueden ser sacáridos derivatizados catiónicamente o aniónicamente, polifosfacenos, microesferas biodegradables, monofosforil lípido A (MPL), derivados de lípido A (p. ej., de toxicidad reducida), MPL 3-0 desacilado, quil A, Saponina, QS21, Adyuvante Incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI), Adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., EE.UU.), AS-2, AS01, AS03, AS04, AS15 (GSK, EE.UU.), MF59 (Novartis, Siena, Italia), oligonucleótidos CpG, bioadhesivos y mucoadhesivos, micropartículas, liposomas, vesículas de membrana externa, formulaciones de éter de polioxietileno, formulaciones de éster de polioxietileno, péptidos de muramilo o compuestos de imidazoquinolona.

La lipoproteína que activa TLR2 de la presente invención se puede administrar a un paciente que necesite el tratamiento a través de cualquier ruta adecuada. Típicamente, una composición de la invención se puede administrar parenteralmente mediante inyección o infusión. Ejemplos de rutas de administración parenteral preferidas incluyen, pero no se limitan a, intravenosa, intracardial, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intracavitaria, subcutánea, transmucosal, por inhalación o transdérmica. Las rutas de administración pueden incluir además tópica y enteral, por ejemplo, mucosal (que incluye pulmonar), oral, nasal, rectal.

En realizaciones donde la composición se administra como una composición inyectable, por ejemplo, en aplicación intravenosa, intradérmica o subcutánea, el ingrediente activo puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica son capaces de preparar soluciones adecuadas que usan, por ejemplo, vehículos isotónicos como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer o inyección de Ringer Lactato. Se pueden incluir conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y otros aditivos, según sea necesario.

La composición también se puede administrar a través de microesferas, liposomas, otros sistemas de distribución en

micropartículas o formulaciones de liberación sostenida colocadas en ciertos tejidos, incluida la sangre.

Se pueden encontrar ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente que se pueden usar de acuerdo con la invención en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Gennaro, A.R., Lippincott Williams & Wilkins; 20ª edición ISBN 0-912734-04-3 y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems; Ansel, H. C., et al. 7ª edición ISBN 0-683305-72-7, cuyas descripciones completas se incorporan en esta memoria como referencia.

La composición de la invención se administra típicamente a un sujeto en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta una cantidad suficiente para mostrar beneficio al sujeto a quien se le administra la composición. La dosis real administrada y la velocidad y el tiempo de administración dependerán de la naturaleza y la gravedad de la afección que se está tratando, así como de factores como la edad, el sexo y el peso del sujeto a tratar, así como la ruta de administración. Se deben tener en cuenta además las propiedades de la composición, por ejemplo, su actividad de unión y la vida plasmática in vivo, la concentración del anticuerpo o miembro de unión en la formulación, así como la ruta, sitio y velocidad de distribución.

Los regímenes de dosificación pueden incluir una administración única de la composición o múltiples dosis de administración de la composición. Las composiciones se pueden además administrar secuencialmente o por separado con otros agentes terapéuticos y medicamentos que se usan para el tratamiento de la afección para la que se administra la lipoproteína que activa TLR2 de la presente invención a tratar.

Los ejemplos de regímenes de dosificación que se pueden administrar a un sujeto se pueden seleccionar del grupo que comprende, pero no se limita a, 1 µg/kg/día hasta 20 mg/kg/día, 1 µg/kg/día hasta 10 mg/kg/día, 10 µg/kg/día hasta 1 mg/kg/día. En ciertas realizaciones, la dosificación será tal que se obtenga una concentración plasmática de 1 µg/ml a 100 µg/ml de la lipoproteína. Sin embargo, la dosis real de la composición administrada y la velocidad y el tiempo de administración dependerán de la naturaleza y gravedad de la afección a tratar. La prescripción del tratamiento, p. ej., las decisiones sobre la dosificación, etc., es, en última instancia, responsabilidad y a discreción de los médicos de medicina general y otros médicos, y generalmente tienen en cuenta el trastorno a tratar, la condición del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos por los practicantes.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en esta memoria tienen el significado comúnmente entendido por una persona experta en la técnica en el campo de la presente invención.

A lo largo de la especificación, a menos que el contexto exija lo contrario, los términos "comprenden" o "incluyen", o variaciones como "comprende" o "que comprende", "incluye" o "que incluye" se entenderá que implican la inclusión de un número entero establecido o grupo de enteros, pero no la exclusión de ningún otro entero o grupo de enteros.

Como se usa en esta memoria, términos como "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en singular y plural a menos que el contexto claramente exija lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un agente activo" o "un agente farmacológicamente activo" incluye un único agente activo, así como dos o más agentes activos diferentes en combinación, mientras que la referencia a "un vehículo" incluye mezclas de dos o más vehículos, así como un único vehículo y similares.

Como se usa en esta memoria, el término "tratamiento" y los términos asociados como "tratar" y "que trata" significan la reducción de la progresión, gravedad y/o duración de la tos ferina o al menos un síntoma de esta, en donde dicha reducción o mejora surge de la administración de una lipoproteína que activa TLR2 de *B. pertussis*. El término "tratamiento", por lo tanto, se refiere a cualquier régimen que pueda beneficiar a un sujeto. El tratamiento puede ser con respecto a una afección existente o puede ser profiláctico (tratamiento preventivo). El tratamiento puede incluir efectos curativos, aliviantes o profilácticos. Las referencias en esta memoria a tratamientos "terapéutico" y "profiláctico" se deben considerar en su contexto más amplio. El término "terapéutico" no implica necesariamente que un sujeto se trate hasta la recuperación total. Del mismo modo, "profiláctico" no significa necesariamente que el sujeto no contraiga finalmente una condición de enfermedad.

Como se usa en esta memoria, el término "sujeto" se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero y en particular un ser humano. En una realización particular, el sujeto es un mamífero, en particular un ser humano. El término "sujeto" es intercambiable con el término "paciente" como se usa en esta memoria.

Como se usa en esta memoria, los términos "organizar", "organizada", "provocar" o "provocada" cuando se usan en relación con una respuesta inmune significan una respuesta inmune que se genera frente al determinante inmunogénico de una composición de vacuna que se administra a un sujeto. Generalmente el determinante inmunogénico de la composición de vacuna comprende la al menos una lipoproteína de la presente invención.

Como se usa en esta memoria, el término "respuesta inmune" incluye las respuestas inmunes mediadas por células T y/o mediadas por células B que están influenciadas por la modulación de la co-estimulación de células T. El término respuesta inmune incluye además respuestas inmunes que se ven indirectamente afectadas por la activación de células T como la producción de anticuerpos (respuestas humorales) y la activación de células sensibles a citoquinas,

como los macrófagos.

Los inventores de la presente invención han identificado nuevos ligandos de la lipoproteína TLR2 de *B. pertussis* capaces de activar respuestas inmunes innatas que dan lugar a la inducción de inmunidad celular adaptativa protectora. Adicionalmente, los presentes inventores han demostrado que estas nuevas proteínas activan específicamente TLR2 y dan lugar a la potente producción de citoquinas pro-inflamatorias.

Se ha demostrado que un número de bacterias Gram negativas expresan ligandos para TLR2. TLR2 forma un heterodímero con TLR1 o TLR6 para reconocer lipoproteínas triaciladas o diaciladas, respectivamente. Estas lipoproteínas contienen una secuencia señal N-terminal común que comprende una región cargada positivamente seguida de una región hidrofóbica de 7-22 residuos y finalmente una lipo-caja dentro de los 40 primeros residuos a partir del extremo N-terminal con la secuencia consenso [LVI][ASTVI][ASG][C]. Sin estar obligados por la teoría, los inventores afirman que, durante la biosíntesis de la lipoproteína de la presente invención, se une de forma covalente un grupo acilo como ácido palmítico o un lípido diacilado al residuo de cisteína conservada en la lipo-caja y la secuencia señal se escinde enzimáticamente, dejando un extremo N-terminal acoplado al acilo expuesto. El grupo acilo en un lipopéptido interacciona físicamente con TLR2 para activar el receptor y las rutas de señalización corriente abajo correspondientes. Preferiblemente las lipoproteínas de la presente invención se pueden triacilar ya que la actividad se puede bloquear con anticuerpos neutralizantes para TLR1 y TLR2, pero no para TLR6. Esto es porque los heterodímeros TLR1/2 reconocen lipoproteínas triaciladas mientras que los heterodímeros TLR2/6 reconocen lipoproteínas diaciladas.

Las proteínas identificadas en la presente invención contienen un péptido señal N-terminal único característico de lipoproteínas bacterianas de bacterias Gram negativas. Está demostrado que BP1569 y BP2992 tienen potente actividad inmunoestimuladora, lo que da lugar a la maduración de DC y a la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Además, los presentes inventores han demostrado que el lipopéptido sintético correspondiente agonista de TLR2, LP1569, es un adyuvante eficaz para una vacuna acelular experimental frente a la tos ferina (Pa) que indujo respuestas Th1 y Th17 y confirió un alto nivel de protección frente a la infección por *B. pertussis* del tracto respiratorio en ratones.

La inmunidad del huésped a *B. pertussis* implica una combinación de respuestas inmunes innata y adaptativa. La inducción de células Th1 y Th17 es dependiente de la maduración de células dendríticas y de la producción de citoquinas innatas, que incluyen IL-12 e IL-1, IL-6 e IL-23, respectivamente. La inducción de la maduración de DC y de la producción de citoquinas es impulsada por la activación a través de PRR, que incluye TLRs y NLRs. De hecho se ha demostrado que TLR4 juega un papel crítico en la inmunidad celular protectora natural e inducida por la vacuna frente a *B. pertussis*. Sorprendentemente, durante la infección por *B. pertussis*, las respuestas Th1 fueron más fuertes en ratones que carecían de TLR4 en comparación con ratones de tipo salvaje y esto se atribuyó a respuestas de células Treg más débiles debido a la pérdida de IL-10 innata inducida por TLR4 (Higgins SC, *et al.*). Se ha sugerido que *B. pertussis* debe contener otros PAMPs que inducen IL-12 que promueven respuestas Th1. El presente estudio demuestra que los ligandos TLR2 que incluyen BP1569 inducen la potente producción de IL-12 por DC y macrófagos y promueven respuestas Th1 frente a un Pa experimental y, por lo tanto, pueden impartir impulsores de respuestas Th1 protectoras en la inmunidad natural del huésped frente a *B. pertussis*.

Además de la función bien establecida de las células Th1 en la inmunidad protectora frente a *B. pertussis*, en virtud de su papel en la activación de macrófagos y la producción de anticuerpos opsonizantes, está surgiendo la evidencia de que las células Th17 también juegan un papel en la inmunidad frente a *B. pertussis* a través del reclutamiento y activación de neutrófilos en el tracto respiratorio (Ross PJ, *et al.*). Los presentes inventores han demostrado que la Toxina Adenilato Ciclasa (ACT) de *B. pertussis* promueve las respuestas Th17 induciendo la producción de IL-1 β a través de la activación del inflammasoma NLRP3 y la caspasa-1 que es necesaria para la escisión de la pro-IL-1 β (Dunne A, *et al.*). La inducción de la pro-IL-1 β es impulsada a través de la vía NF κ B inducida por TLR. La IL-1 β sinergiza con la IL-23 para inducir la expansión de las células Th17 pero también promueve la producción innata de IL-17 por células T $\gamma\delta$. También se ha demostrado que los agonistas de TLR inducen la producción de IL-17 por células T $\gamma\delta$. Las células T $\gamma\delta$ que secretan IL-17 juegan un papel temprano importante en la infección y ayudan a impulsar la producción de IL-17 por las células T CD4. Los presentes inventores han demostrado que el lipopéptido de TLR2, LP1569, induce IL-12 que promueve la producción de IFN- γ por células T CD4 y CD8. El LP1569 indujo IL-17 significante en combinación con la IL-23. Se requieren IL-1 e IL-23 para inducir la producción de IL-17 por las células T $\gamma\delta$ y la carencia de producción de IL-17 in vitro sin IL-23 exógena puede reflejar el hecho de que el LP1569 es más eficaz induciendo IL-1 que IL-23. Además, promovió la producción de IL-17 por las células T CD4 in vivo cuando se usaron como un adyuvante para una Pa experimental.

La inmunidad a la infección por *B. pertussis* conferida por la vacunación con Pa disminuye significativamente durante un periodo relativamente corto; se ha demostrado que la eficacia de las vacunas es tan baja como un 24% en niños de 8 a 12 años (y esto puede explicar el reciente resurgimiento de la tos ferina). La Pa actual administrada con alumbre como adyuvante y los estudios en ratones y seres humanos han demostrado que estas vacunas inducen preferencialmente respuestas de tipo Th2. Sin embargo, estudios recientes en ratones y babuinos han sugerido que un fallo de Pa para inducir respuestas Th1 o Th17 puede explicar su limitada capacidad para prevenir la infección por *B. pertussis* (Ross PJ, *et al.*). Los presentes inventores demuestran que el uso de un adyuvante promotor de Th1/Th17 como los agonistas de TLR2, BP1569 o BP2992, o sus correspondientes lipopéptidos sintéticos LP1569 y LP2992,

tienen la capacidad de mejorar la eficacia de la Pa actual al promover la inducción de inmunidad celular protectora. Además, dado que estas lipoproteínas son antígenos de *B. pertussis*, así como agonistas de TLR2 adyuvantes, tienen un potencial considerable para su inclusión en una vacuna más eficaz frente a *B. pertussis*.

5 Los inventores de la presente invención han usado espectroscopía de masas y enfoques bioinformáticos para identificar seis lipoproteínas que activan TLR teóricas de *B. pertussis* (Tabla 1).

Tabla 1. Lipoproteínas teóricas de *Bordetella pertussis*.

Nombre	Acceso Primario	Anotación electrónica	Tamaño	Similar a
BP0205	Q7W0D8	Lipoproteína teórica	~19 kDa	Proteína hipotética Q56428 de <i>Thermus thermophilis</i>
BP1569	Q7VXZ9	Lipoproteína teórica	~40 kDa	Lipoproteína NMB0928 de <i>Neisseria meningitidis</i>
BP3342	Q7VU04	Lipoproteína teórica	~16 kDa	Lipoproteína Omp P6 de <i>Haemophilus influenzae</i> (Agonista verificado de TLR2 (14); 39% de identidad de secuencia)
BP3819	Q7VSV3	Sin caracterizar	~25 kDa	Malos emparejamientos
BP2508	Q9X6Z0	Lipoproteína teórica Sinónima: Om1A	~19 kDa	Lipoproteína Om1A de <i>Burkholderia pseudomallei</i>
BP2992	Q7VUT2	Lipoproteína teórica	~16 kDa	Lipoproteína PCP de membrana externa de <i>H. influenzae</i> (Agonista TLR2 verificado (14); 40% de identidad de secuencia)

10 Los inventores demuestran que al menos dos de estas nuevas proteínas activan específicamente TLR2 e impulsan una potente producción de citoquinas pro-inflamatorias (BP1569 y BP2992). Estas proteínas contienen un péptido señal N-terminal característico que es único en bacterias Gram negativas. La Tabla 2 muestra las SEQ ID Nos: 7-12 que son péptidos señal N-terminales de estas lipoproteínas teóricas de *B. pertussis*.

SEQ ID N°: 7 (LP1569)

MRMNK R HAGASALMALAL **LAGC**

SEQ ID N°: 8 (LP2992)

15 MNMHSPSVVAGRARRLLAVAAVAGSVAV **LAGC**

SEQ ID N°: 9 (LP0205)

MQLTIR K LAYTLAFSTLV **LAGC**

SEQ ID N°: 10 (LP3342)

MKSRIA K SLTIAALAAT **LAAC**

20 SEQ ID N°: 11 (LP3819)

MSAPLDTPALRLNTRFATGIVLAGTLA **LAGC**

SEQ ID N°: 12 (LP2508)

MIARISLRPL K GLAVAVLAASA **LTAC**

Tabla 2. Péptido señal N-terminal de lipopéptidos teóricos de *B. pertussis*

Nombre	Péptido señal N-terminal
LP1569	MRMNK R HAGASALMALAL LAGC (SEQ ID N°: 7)
LP2992	MNYMHSPSVVAGRARRLLAVAAVAGSVAV LAGC (SEQ ID N°: 8)
LP0205	MQLTIR K LAYTLAFSTLV LAGC (SEQ ID N°: 9)
LP3342	MKSRIA K SLTIAALAAAT LAAC (SEQ ID N°: 10)
LP3819	MSAPLDTPALRLNTRFATGIVLAGTLA LAGC (SEQ ID N°: 11)
LP2508	MIARISLRPL K GLAVAVLAASA LTAC (SEQ ID N°: 12)

- 5 Los presentes inventores han demostrado que BP1569 y BP2992 activan células dendríticas y macrófagos murinos y células mononucleares humanas a través de TLR2. Además, los inventores han demostrado que los lipopéptidos LP1569 y LP2992 sintéticos correspondientes tienen potentes propiedades inmunomoduladoras y adyuvantes, capaces de mejorar las respuestas de anticuerpos Th1, Th17 e IgG2a inducidas en ratones con una vacuna de tosferina acelular experimental y la inmunidad protectora conferida frente a la infección respiratoria con *B. pertussis*.
- 10 Además, los inventores consideran que las lipoproteínas de la presente invención se pueden utilizar con inhibidores de quinasa y/o antígenos asociados a tumor para proporcionar una respuesta mediada Th1/Th17 frente a tumores.

Los presentes inventores han demostrado que la administración terapéutica del lipopéptido LP1569 sintético ralentiza el crecimiento tumoral y aumenta la supervivencia en un modelo de cáncer de colon murino. Las lipoproteínas de la presente invención tienen potencial considerable como agentes terapéuticos solo o en combinación con los inhibidores de la PI3K quinasa u otros inhibidores de respuestas reguladoras o para la inclusión en vacunas profilácticas y/o terapéuticas para el tratamiento y prevención del cáncer.

Los presentes inventores predicen que los polipéptidos de la presente invención se pueden usar como un agente terapéutico o como una composición de vacuna en el tratamiento y/o prevención de enfermedades alérgicas como el asma. Esto puede estar relacionado con la supresión mediada por IFN-gamma de la respuesta Th2/Th17 o la supresión mediada por IL-10. En experimentos llevados a cabo por los inventores, las células dendríticas activadas por TLR2 detectan la inducción de IFN-gamma y la producción de IL-10. También hay informes de que los agonistas de TLR2 pueden inducir/activar las células Treg.

La presente invención ahora describirá con referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan para el propósito de ilustración y nos se pretenden interpretar como limitantes de la presente invención.

25 Ejemplos

Materiales y Métodos

Ratones

Se obtuvieron ratones C57BL/6 y C3H/HeJ que contienen la mutación en el gen *tlr4* de Harlan UK y se mantuvieron en el Trinity College de Dublín en una instalación específica libre de patógenos.

30 Reactivos

Las lipasas de *Aspergillus* y *Pseudomonas* se obtuvieron de Sigma. Los ELISAs para TNF, IL-23, IL-10 e IL-17 se obtuvieron de R&D. Los ELISA para IFN- γ , IL-6 e IL-12p40 se obtuvieron de BD Biosciences. El lipopéptido LP1569 se sintetizó por EMC Microcollections.

Clonaje y purificación de BP1569 y BP2992

35 El ADN que codifica BP1569 y BP2992 se amplificó a partir de ADN genómico de *B. pertussis* y se clonó en un vector de expresión bacteriana pET21a (Invitrogen) seguido de la verificación de la secuencia. Se generaron versiones de histidina C-terminal en células pLysS BL21 de *E. coli* seguido de inducción con IPTG 0,2 mM durante 18 horas a 30°C. Las células se lisaron usando Bugbuster (Novagen) y las proteínas se purificaron posteriormente mediante afinidad por níquel seguido de cromatografía de intercambio iónico en DEAE. Después del desalado en columnas PD10 (GE Healthcare), se determinó la pureza de la proteína mediante PAGE-SDS y tinción con coomassie o transferencia de western para las proteínas con cola de histidina.

40

Preparación y estimulación celular

Se prepararon células dendríticas derivadas de médula ósea (DCs) cultivando células de médula ósea obtenidas del fémur y la tibia de ratones en RPMI completo (cRPMI, RPMI que contiene suero de ternera fetal al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, l-glutamina 2 mM (Invitrogen) y 2-ME 50 µM (Sigma-Aldrich) suplementado con 40 ng/ml de GM-CSF. Las células se volvieron a cultivar con medio fresco que contiene 40 ng/ml de GM-CSF cada 3 días durante un periodo de 8 días. Las DC se sembraron a 1×10^6 células por ml 24 h antes de la estimulación. Los ensayos de ELISA se realizaron usando los kits de R&D de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se sembraron células de bazo de ratones C3H/HeJ a 2×10^6 células por ml y se estimularon con Pam₃Cys₄ (120 nM) o BP1569 (120 nM) durante los tiempos indicados, con o sin la adición de anticuerpo T2.5 anti-TLR2 o un control de isotipo (Hycult Biotech). Para los ensayos de activación de p38, se lisaron muestras con tampón RIPA y se realizó PAGE-SDS seguida de transferencia de Western con anticuerpos anti-fosfo-p38 y β-actina (Cell Signaling).

Ensayo de luciferasa

Se transfectaron células HEK 293T que expresan TLR2 humano de forma estable con un constructo de NF-κB luciferasa como se describió previamente (21) y se estimularon durante toda la noche con las concentraciones indicadas de BP1569.

Citometría de flujo

Después de la estimulación, las DC se estimularon con CD11c (clon N418; eBioscience), MHCII (clon M5/114.15.2 ebioscience), CD80 (clon 16-10A1 eBioscience) y CD86 (clon 16-10A1 eBioscience). Las muestras se analizaron con paquete informático FACS DIVA y FloJo.

Inducción de citoquinas in vivo

Se trataron ratones C3H/HeJ intraperitonealmente con BP1569 (70 µg) o control de PBS y se midieron citoquinas séricas mediante ELISA después de 3 h. Se detectaron concentraciones significativas de IL-6 e IL-12 en el suero de ratones tratados con BP1569 frente a los controles de PBS (Figura 4A).

Antigenicidad de BP1569

Se inyectaron ratones C3H/HeJ en la almohadilla de la pata con BP1569 (10 µg) diluido en PBS o solo con PBS. Después de siete días se recogió el nódulo de drenaje linfático y se estimularon las células de nódulo linfático con BP1569 (2 µg/ml) o *B. pertussis pertussis* inactivado por calor ($1-100 \times 10^6$ /ml). Después de 3 días de cultivo, se cuantificó la concentración de IFN-γ en sobrenadantes mediante ELISA. Se indujo IFN-γ específico de BP1569 a niveles significativos en ratones inmunizados con BP1569 pero no en ratones inmunizados con PBS (Figura 4B). Además, las células de ratones inmunizados produjeron IFN-γ tras la re-estimulación con *B. pertussis* inactivado por calor, proporcionando así evidencia de que BP1569 es un componente antigénico de la bacteria (Figura 4C).

Actividad adyuvante de BP1569

Se inmunizaron ratones i.p. dos veces (semanas 0 y 4) con un Pa preparado experimental de laboratorio usando dos antígenos purificados, PT detoxificado y FHA (1 y 2,5 µg/ratón, respectivamente). El PT se detoxificó con formaldehído como se describe (Sutherland *et al.*). El FHA se compró en Katetsuken, Kumamoto, Japón. Ambas preparaciones estaban altamente purificadas, según lo determinado mediante cromatografía en gel con SDS y estaban libres de LPS detectable. Los ratones se desafiaron con *B. pertussis* mediante inoculación por aerosol o se sacrificaron 2 semanas después de la segunda inmunización.

Desafío respiratorio de *B. pertussis*

Los ratones se infectaron con *B. pertussis* mediante exposición a un aerosol de *B. pertussis* vivo como se describió anteriormente (22). Se siguió el curso de la infección por *B. pertussis* realizando el recuento de CFU en los pulmones de grupos de 4 ratones a intervalos después del desafío. Se retiraron los pulmones de manera aséptica y se homogeneizaron en 1 ml de solución salina fisiológica estéril con caseína al 1% en hielo. El homogeneizado sin diluir y diluido en serie (100 µl) de pulmones individuales se detectó por triplicado sobre placas de agar Bordet-Gengou y se calculó el número de CFU después de 5 días de incubación a 37°C. El límite de detección fue de aproximadamente $0,3 \log_{10}$ CFU por pulmón por grupos de 4 ratones en cada punto de tiempo.

Producción de citoquinas de células T

Se cultivaron células de bazo (2×10^6 /ml) de ratones inmunizados a 37°C y CO₂ al 5% con *B. pertussis* inactivado por calor o FHA purificado. La estimulación con PMA (250 ng/ml; Sigma) y anti-CD3 de ratón (1 µg/ml; Pharmingen, San Diego, EE.UU.) o medio solo se usó como controles positivo y negativo, respectivamente. Se recogieron los sobrenadantes después de 72 h y se determinaron las concentraciones de IL-4, IL-13, IL-17 e IFN-γ mediante ELISA de dos sitios.

Producción de anticuerpo específico de FHA

Se cuantificaron las respuestas de anticuerpos séricos a *B. pertussis* mediante ELISA usando FHA unido a la placa (5 µg/ml). Los anticuerpos unidos se detectaron usando IgG1 o IgG2a anti-ratón conjugados con biotina (Caltag) y estreptavidina conjugada con peroxidasa (BD Pharmingen). Los niveles de anticuerpo se expresan como el título medio a punto final (± SE), determinado mediante extrapolación de la parte lineal de la curva de titulación a 2 SE por encima del valor de fondo obtenido con suero de ratón no inmune.

Ejemplo 1: Identificación, clonaje, expresión y purificación de lipoproteínas que activan TLR2 de *B. pertussis*

Se identificaron las lipoproteínas de *B. pertussis* teóricas usando la base de datos DOLOP (<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/dolop>) que busca la presencia del péptido señal N-terminal encontrado en lipoproteínas de bacterias Gram-negativas. Se usaron las secuencias de proteínas no caracterizadas identificadas en un análisis de espectroscopía de masas de proteínas secretadas de *B. pertussis* como una fuente de este examen con el fin de asegurar que las proteínas identificadas son de hecho proteínas expresadas. Las proteínas con puntuación más alta están enumeradas en la Tabla 1 junto con homólogos teóricos de otras especies bacterianas.

Las seis proteínas contienen la región característica cargada positivamente seguida de un tramo de aminoácidos hidrofóbicos y la lipo-caja que contiene el residuo de cisteína invariante al que se une el grupo acilo durante la biosíntesis (Figura 1). BR1569, BP2509 y BP2992 comparten una similitud de secuencia con lipoproteínas de *Neisseria Meningitidis*, *Burkholderia pseudomallei* y *Haemophilis Influenzae*, respectivamente.

Se construyeron las versiones de histidina C-terminal de las lipoproteínas teóricas y se expresaron en *E. coli* mediante inducción por IPTG. BP1569 y BP2992 se expresaron satisfactoriamente y se purificaron mediante afinidad de níquel seguido de cromatografía de intercambio iónico. Aunque se encontró que BP2992 era un ligando inmunológicamente activo para TLR2 (datos no mostrados), los presentes inventores decidieron centrarse en BP1569 ya que sus niveles de expresión eran más altos y podían generar cantidades significativas de la lipoproteína para estudios in vitro e in vivo más extensos. El análisis de la pureza de la preparación de BP1569 reveló una fuerte banda a 40 kDa, con una banda más débil a aproximadamente 35 kDa (Figura 2A). La transferencia de Western sugirió que la segunda banda es un producto de ruptura de la proteína de longitud completa como resultado de una proteólisis que no se previno mediante la presencia de inhibidores de proteasas. Las lipoproteínas se purificaron conjuntamente con LPS, algunos de los cuales se pudieron eliminar usando columnas de polimixina B, pero, debido a la naturaleza pegajosa de los lipopéptidos, resultó imposible obtener una preparación completamente libre de LPS. Por lo tanto, los inventores adoptaron una estrategia de llevar a cabo todos los estudios iniciales con lipoproteínas en células o ratones deficientes en TLR4 y luego versiones de lipopéptidos sintetizados de las lipoproteínas para un análisis inmunológico más exhaustivo.

Ejemplo 2: BP1569 induce la maduración de DC y la producción de citoquinas de una forma dependiente de TLR2

Los presentes inventores examinaron la capacidad de la lipoproteína de tos ferina para activar las células inmunes innatas in vitro usando DCs derivadas de médula ósea de ratones C3H/HeJ deficientes en TLR4. BP1569 indujo una fuerte producción de IL-6, IL-12, IL-23 y TNF-α por DC de ratones C3H/HeJ (Figura 2B). Además, la estimulación de DC con BP1569 durante 24 horas mejoró la expresión en superficie de MHC de clase II, CD80 y CD86 detectable por citometría de flujo (figura 2C).

Se usaron anticuerpos bloqueantes frente a TLR2 para determinar si las proteínas pueden activar específicamente TLR2. La producción de TNF-α inducida por BP1569 a partir de DC de C3H/HeJ se abolió por completo en presencia del anticuerpo bloqueante (Figura 2D). El tratamiento con lipasa se usó para confirmar que los efectos de inmunoestimulación de BP1569 se debieron a la presencia de la cadena lateral de acilo característica de la lipoproteína. La lipoproteína recombinante se incubó con dos lipasas por separado durante 18 h antes de la estimulación de DC. El tratamiento con lipasa abolió la producción de IL-12p40 e IL-6 inducida por BP1569 (Figura 2E), pero no tuvo ningún efecto sobre la producción de citoquinas inducida por el agonista de TLR9 CpG (datos no mostrados), confirmando que BP1569 contiene cadenas laterales lipídicas capaces de desencadenar la producción de citoquinas inflamatorias inducidas por TLR2. Estos datos demuestran que BP1569 es una lipoproteína agonista para TLR2 y activa la maduración y la producción de citoquinas inflamatorias por DC murinas.

Ejemplo 3: BP1569 activa las vías de NF-κB y de la MAP quinasa corriente debajo de TLR2

La producción de citoquinas por TLR2 requiere la activación de los factores de transcripción NF-κB y la MAP quinasa p38. Para determinar si BP1569 activa NF-κB, se transfectaron células T HEK 293 que expresaban TLR2 de manera estable pero carentes de TLR4, con un constructo de NF-κB con luciferasa como reportero. La estimulación de estas células con BP1569 (100 ng/ml) dio como resultado un aumento significativo en la actividad de luciferasa (Figura 3A). La producción de IL-8 por células T HEK 293 transfectadas con TLR2 también aumentó después de la estimulación con BP1569 ligando la activación de la vía de NF-κB con la producción de citoquinas (Figura 3B). Para evaluar la activación de la vía MAP quinasa, se estimularon células de bazo de ratones C3H/HeJ con BP1569. Este tratamiento mejoró la fosforilación de p38 15 minutos después de la estimulación, que se inhibió mediante la adición de anticuerpo bloqueante anti-TLR2 (Figura 3C). Estos resultados demuestran que BP1569 induce la activación dependiente de

TLR2 de NF- κ B y p38, dos vías que se muestran necesarias para la producción de citoquinas inducida por TLR2. Los agonistas de TLR se pueden unir a los heterodímeros TLR1/2 o TLR2/6, por lo tanto, se examinó el papel de estos TLRs que usan anticuerpos bloqueantes específicos para TLR1 y TLR6 humanos. La incubación de PBMC humanos con un anticuerpo bloqueante TLR1 redujo significativamente la producción de IL-6 inducida por BP1569, mientras que un anticuerpo anti-TLR6 tuvo poco efecto, lo que sugiere que BP1569 es triacilado en lugar de diacilado (Figura 3D).

Ejemplo 4: BP1569 induce citoquinas inflamatorias innatas y es inmunogénico *in vivo*

Habiendo demostrado que BP1569 es capaz de activar TLR2 *in vitro*, se determinó si la lipoproteína puede inducir o no respuestas de citoquinas pro-inflamatorias *in vivo*.

Se trataron ratones C3H/HeJ intraperitonealmente con BP1569 (70 μ g) y se midieron las citoquinas séricas después de 3 h. Se detectaron concentraciones significativas de IL-6 e IL-12 en el suero de ratones tratados con BP1569 frente a controles de PBS (Figura 3A).

Se examinó la posibilidad de que BP1569 fuera inmunogénico *in vivo* y capaz de inducir respuestas inmunes específicas de *B. pertussis*. Se inyectaron ratones C3H/HeJ en la almohadilla de la pata con BP1569 (10 μ g) diluido en PBS o con PBS solo. Después de siete días, se recogió el nódulo de drenaje linfático y las células del nódulo linfático se estimularon con BP1569 (2 μ g/ml) o *B. pertussis* inactivado por calor. Se indujo IFN- γ específico de BP1569 a niveles significativos en ratones inmunizados con BP1569 pero no en ratones inmunizados con PBS (Figura 3B). Además, las células de ratones inmunizados produjeron IFN- γ tras la re-estimulación con *B. pertussis* inactivado por calor, proporcionando así evidencia de que BP1569 es un componente antigénico de las bacterias (Figura 3C).

Ejemplo 5: El lipopolipéptido sintético LP1569 induce citoquinas inflamatorias por células inmunes innatas humanas y murinas

Los resultados anteriores demuestran que BP1569 tiene propiedades inmunomoduladoras así como antigénicas, y la primera se debe a su capacidad para activar TLR2. Se generó una versión de lipopéptido sintético de BP1569 con el fin de proporcionar evidencia de la actividad inmunomoduladora mediada por TLR2 y de examinar las propiedades adyuvantes de las lipoproteínas de *B. pertussis in vivo* en ratones convencionales. El lipopéptido, denominado LP1569, para distinguirlo de la proteína de longitud completa, tiene el residuo de cisteína conservada palmitilada y seguido de 11 aminoácidos de la secuencia de la proteína de BP1569. Esto representa el extremo N-terminal maduro de la lipoproteína después de la eliminación del péptido señal durante la biosíntesis.

Se demostró primero que este lipopéptido activa específicamente TLR2 estimulando las DC murinas con LP1569 en presencia y ausencia de un anticuerpo bloqueante de TLR2. LP1569 indujo la producción de TNF- α , que se bloqueó por anti-TLR2 (Figura 5A). Además, LP1569 indujo la fuerte expresión de TNF- α , IL-10 e IL-6 por macrófagos murinos (Figura 5B). LP1569 también estimuló la producción de TNF- α por PBMC humanos (Figura 5C). Finalmente, se demostró que LP1569 indujo la producción de citoquinas pro-inflamatorias *in vivo*. La inyección de ratones con LP1569 dio como resultado una mejora significativa de las concentraciones séricas de IL-12 e IL-6 sobre la observada en ratones inyectados con PBS (Figura 5D). Estos hallazgos demuestran que el péptido sintético LP1569 es un agonista de TLR2 y activa las respuestas inmunes innatas *in vitro* e *in vivo*.

Ejemplo 6: LP1569 aumenta la activación de células T

Los presentes inventores han mostrado que BP1569 y LP1569 promueven la producción de citoquinas inflamatorias por DCs, que incluyen IL-12, IL-6 e IL-23 que promueven la inducción o expansión de células Th1 y Th17.

La estimulación de células de bazo con LP1569 indujo la producción de IFN- γ detectado por ELISA, que se inhibió mediante la incubación conjunta con y anti-IL-12p40 pero no con un anticuerpo anti-p19, lo que indica un papel para LP1569 impulsado por IL-12p70 en la producción de IFN- γ (Figura 6A). Además, LP1569 indujo la producción de IL-17 por células de bazo después de la adición de IL-23 exógena (Figura 6B). La tinción de citoquinas intracelulares y el análisis mediante FACS reveló que las células T CD4⁺ y CD8⁺ producen IFN- γ después de la estimulación de las células de bazo con LP1569, que estaba ligeramente aumentado por la adición de IL-1 β (Figura 6C y Figura 6D). Además, la tinción de citoquinas intracelulares mostró que la combinación de LP1569 e IL-23, pero LP1569 o IL-23 solos, indujo una clara población de células T $\gamma\delta$ que secretan IL-17 (Figura 6E).

Ejemplo 7: LP1569 es un adyuvante eficaz en promover inmunidad celular protectora frente a *B. pertussis*

Habiendo demostrado que LP1569 tiene actividad inmunoestimuladora promoviendo las citoquinas innatas que impulsan las respuestas de células T, los presentes inventores evaluaron su actividad adyuvante *in vivo* usando antígenos protectores de *B. pertussis* y un modelo de infección respiratoria establecida. Los estudios previos de los inventores que usaron este modelo han demostrado un papel crítico para las células Th1 y Th17 en la inmunidad natural e inducida por la vacuna frente a *B. pertussis* (Ross PJ et al.). Se inmunizaron ratones con antígenos de *B. pertussis*, FHA, PTd y pertactina solos o con LP1569 o con PBS solo y se estimularon 4 semanas más tarde. Los ratones se desafiaron mediante la exposición a aerosol de *B. pertussis* vivo 2 semanas después de la segunda inmunización. La evaluación del recuento de CFU en los pulmones reveló que la inmunización con antígenos de *B.*

pertussis sin un adyuvante confirió una limitada protección frente al desafío a *B. pertussis* (Figura 6A). Por el contrario, la inmunización con las vacunas experimentales acelulares para la tos ferina (Pa) formuladas con LP1569 confirió un alto nivel de protección frente a *B. pertussis*; las bacterias fueron indetectables en ratones inmunizados 3, 7 y 10 días después del desafío (Figura 7A).

5 Se evaluaron las respuestas de anticuerpos y células T específicas para uno de los antígenos de *B. pertussis*, FHA, en ratones inmunizados el día del desafío. La inmunización con antígenos de *B. pertussis* solos indujo una IgG1 sérica específica de FHA leve y una IgG2a indetectable. Por el contrario, la inmunización con antígenos de *B. pertussis* en combinación con LP1569 genera unos altos títulos de IgG2a específicos de FHA en suero (Figura 7B). Además, las vacunas acelulares experimentales de tos ferina (Pa) con LP1569 generaron potentes respuestas Th1 y Th17 con
10 altas concentraciones de IFN- γ e IL-17 detectados en sobrenadantes de células de bazo estimuladas con FHA de ratones inmunizados (Figura 7C). Por el contrario, la inmunización con antígenos de *B. pertussis* en ausencia del lipopéptido generaron respuestas de tipo Th2, con alta IL-5, pero concentraciones sustancialmente más bajas de IL-17 e IFN- γ que las generadas con la vacuna experimental formulada con LP1569. Estos hallazgos demuestran que LP1569 es un potente adyuvante para la inducción de respuestas de tipo Th1/Th17 y la protección frente a *B. pertussis*.

15 Ejemplo 8: La administración terapéutica de LP1569 ralentiza el crecimiento tumoral y mejora la supervivencia

Los presentes inventores demostraron cómo la administración terapéutica de LP1569 ralentiza el crecimiento tumoral y mejora la supervivencia de ratones expuestos a células de carcinoma de colon CT26. Los ratones se inyectaron subcutáneamente (s.c.) con células de carcinoma de colon CT26 y luego se trataron en los días 3, 10 y 17 con LP1569 o con vehículo solo. Los datos muestran que la tasa de crecimiento tumoral es más lenta en ratones tratados con
20 LP1569. Además, la supervivencia de los ratones portadores de tumores aumenta después del tratamiento con LP1569. Estos datos demostraron que LP1569 tiene propiedades antitumorales, muy probablemente debidas a la inducción de respuestas inmunes innatas y adaptativas contra el tumor. Además, esto se podría mejorar bloqueando las respuestas antiinflamatorias o reguladoras también inducidas con los agonistas de TLR2, que usan inhibidores de la Pi3 quinasa o la MAP quinasa p38 o inhibidores de puntos de control inmunes, p. ej., Antígeno 4 de Linfocito T Citotóxico (CTLA4) o anti-muerte programada 1 (PD1)/Ligando 1 de muerte programada (PDL1).
25

Referencias

- Dillon *et al* (2006) Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest*; 116(4): 916-28.
- 30 Dunne A, *et al.* (2010) Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against *Bordetella pertussis*. *J Immunol* 185(3): 1711-1719.
- Higgs R, Higgins SC, Ross PJ, & Mills KH (2012) Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol* 5(5): 485-500.
- Higgins SC, *et al.* (2003) Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to *Bordetella pertussis* by inhibiting inflammatory pathology. *J Immunol* 171(6): 3119-3127.
- 35 Ross PJ, *et al.* (2013) Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to *Bordetella pertussis*: towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine. *PLoS Pathog* 9(4): e1003264.
- Sutherland *et al.* (2011) Antibodies Recognizing Protective Pertussis Toxin Epitopes Are Preferentially Elicited by Natural Infection versus Acellular Immunization *Clin Vaccine Immunol*; 18(6): 954-962.

Listado de secuencias

- 40 <110> The Provost, Fellows, Foundation Scholars, & the other members of Board, of the College of the Holy & Undivided Trinity of Queen Elizabeth near Dublin
- <120> AGONISTAS Y VACUNAS DEL RECEPTOR TIPO TOLL 2 Y USOS DE ESTAS
- <130> P165630.WO.01
- <150> EP14160791.1
- 45 <151> 19-03-2014
- <160> 14
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 375
- 50 <212> PRT
- <213> *Bordetella pertussis*

ES 2 749 007 T3

<400> 1

Met Arg Met Asn Lys Arg His Ala Gly Ala Ser Ala Leu Met Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Ala Gly Cys Ser Asp Val Asn Gln Leu Leu Gly Asn Glu
 20 25 30

Glu Ser Val Asp Tyr Lys Ser Thr Arg Arg Gly Asp Pro Leu Ser Ile
 35 40 45

Pro Pro Asp Leu Thr Gln Ala Asn Asn Asp Pro Arg Tyr Lys Ala Pro
 50 55 60

Ala Ser Gly Thr Ala Thr Tyr Ser Gln Phe Gln Gln Gln Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Gln Gln Ala Ser Ala Gly Gln Asn Thr Asn Val Leu Pro Glu Arg Ala
 85 90 95

Asp Met Arg Val Glu Arg Asp Gly Asp Leu Arg Trp Leu Val Ile Glu
 100 105 110

Arg Pro Pro Glu Gln Leu Phe Ser Lys Val Val Asp Phe Trp Thr Asp
 115 120 125

Thr Gly Phe Thr Val Ser Val Asn Asn Pro Gln Ala Gly Ile Ile Glu
 130 135 140

Thr Asp Trp Ala Glu Asn Arg Ala Lys Ile Pro Glu Ser Trp Leu Arg
 145 150 155 160

ES 2 749 007 T3

Gln Val Leu Gly Ser Val Leu Glu Thr Ala Trp Asp Ser Gly Glu Arg
 165 170 175

Glu Lys Phe Arg Thr Arg Val Glu Arg Val Asn Gly His Thr Glu Ile
 180 185 190

Tyr Ile Thr His Asn Gln Met Leu Glu Lys Arg Val Gly Ser Asp Gly
 195 200 205

Gly Gln Val Gln Trp Thr His Gly Lys Glu Asp Pro Gly Leu Asn Ala
 210 215 220

Ala Met Leu Ala Arg Leu Met Val Tyr Leu Gly Thr Asp Val Asp Ala
 225 230 235 240

Ala Arg Lys Leu Val Ala Gln Ala Glu Ala Ala Pro Gln Ala Pro Lys
 245 250 255

Val Gln Ser Val Arg Ala Glu Gly Ala Met Leu Val Val Asp Glu Ser
 260 265 270

Phe Asp Arg Ala Trp Arg Arg Val Gly Val Ala Leu Asp Ser Gly Gly
 275 280 285

Phe Ala Val Asp Asp Arg Asp Arg Ser Ala Gly Glu Tyr Phe Val Arg
 290 295 300

Tyr Val Asp Thr Asp Thr Gly Ala Gln Asn Glu Gln Pro Gly Phe Phe
 305 310 315 320

Ser Arg Leu Phe Ser Ser Asp Lys Lys Ala Gln Ala Pro Gln Tyr Arg
 325 330 335

Ile Arg Leu Thr Gly Ser Gly Thr Gln Thr Gln Val Thr Val Leu Asp
 340 345 350

Ala Asn Gly Gln Arg Asp Ser Ser Ala Thr Ala Gln Arg Met Leu Ser
 355 360 365

Val Leu Lys Asp Lys Met Val
 370 375

<210> 2

<211> 166

<212> PRT

5 <213> Bordetella pertussis

<400> 2

ES 2 749 007 T3

Asn Tyr Met His Ser Pro Ser Val Val Ala Gly Arg Ala Arg Arg Leu
1 5 10 15

Leu Ala Val Ala Ala Val Ala Gly Ser Val Ala Val Leu Ala Gly Cys
20 25 30

Ala Asn Pro Ser Ala Ser Ser Gly Val Tyr Thr Tyr Gly Gln Ala Gln
35 40 45

Arg Glu Gln Ile Val Arg Thr Gly Thr Val Thr Gly Val Arg Pro Ile
50 55 60

Thr Ile Gln Asn Asp Lys Ser Ser Gly Val Gly Leu Val Ala Gly Gly
65 70 75 80

Ala Leu Gly Gly Val Ala Gly Asn Ala Val Gly Gly Gly Thr Gly Arg
85 90 95

Thr Ile Ala Thr Val Gly Gly Val Ile Leu Gly Ala Leu Ala Gly Asn
100 105 110

Ala Ile Glu Asn Arg Ala Gly Lys Ser Ser Gly Tyr Glu Ile Thr Val
115 120 125

Arg Leu Asp Asn Gly Glu Thr Arg Val Val Ala Gln Glu Ala Asp Val
130 135 140

Pro Ile Ser Val Gly Gln Arg Val Gln Val Ile Ser Gly Ala Gly Pro
145 150 155 160

Thr Arg Val Thr Pro Tyr
165

<210> 3

<211> 188

<212> PRT

5 <213> Bordetella pertussis

<400> 3

Met Gln Leu Thr Ile Arg Lys Leu Ala Tyr Thr Leu Ala Phe Ser Thr
1 5 10 15

Leu Val Leu Ala Gly Cys Thr Thr Ala Ser Lys Lys Thr Asp Gly Gln
20 25 30

Ala Ala Thr Pro Ala Asp Gln Ala Ser Ser Gln Gln Ala Ser Ala Ala
35 40 45

ES 2 749 007 T3

Ser Val Glu Phe Tyr Val Ala Gln Ala Lys Ala Gly Asp Gly Leu Met
50 55 60

Glu Val Lys Val Pro Asp Gly Ser Leu Tyr Met Gln Arg Gln Pro Val
65 70 75 80

Leu Thr Arg Ala Asp Leu Thr Glu Ala Ala Ala Leu Val Asp Arg Gln
85 90 95

Gly Gln Asn Phe Val Gly Leu Arg Phe Thr Glu Ala Gly Ala Arg Lys
100 105 110

Leu Asn Asp Ile Ser Ser Lys Asn Ile Gly Asn Met Leu Ala Leu Val
115 120 125

Ile Asp Arg Glu Leu Val Ala Ala Pro Arg Ile Ala Glu Pro Leu Asn
130 135 140

Arg Gly Val Leu Ala Phe Gly Val Pro Ser Ala Lys Ala Ala Ser Glu
145 150 155 160

Ile Ala Ala Lys Ile Arg Gly Asp Ala Gly Ala Pro Ala Ala Gly Val
165 170 175

Pro Ala Ala Pro Ala Pro Lys Pro Ala Pro Lys Pro
180 185

<210> 4

<211> 165

<212> PRT

5 <213> Bordetella pertussis

<400> 4

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

Thr Leu Ala Ala Cys Ser Ser Val Pro Leu Asp Asp Lys Ala Gly Gln
20 25 30

Ala Gly Gly Ser Gly Gln Gly Ser Ala Ser Gly Gln Ile Leu Asp Pro
35 40 45

Phe Asn Pro Gln Ser Ile Leu Ala Gln Gln Arg Ser Val Tyr Phe Asp
50 55 60

Phe Asp Ser Tyr Thr Val Ser Glu Gln Tyr Arg Gly Leu Val Glu Thr
65 70 75 80

ES 2 749 007 T3

His Ala Arg Tyr Leu Ala Ser Asn Asn Gln Gln Arg Ile Lys Ile Glu
85 90 95

Gly Asn Thr Asp Glu Arg Gly Gly Ala Glu Tyr Asn Leu Ala Leu Gly
100 105 110

Gln Arg Arg Ala Asp Ala Val Arg Arg Met Met Thr Leu Leu Gly Val
115 120 125

Ser Asp Asn Gln Ile Glu Thr Ile Ser Phe Gly Lys Glu Lys Pro Lys
130 135 140

Ala Thr Gly Ser Ser Glu Ala Asp Phe Ala Glu Asn Arg Arg Ala Asp
145 150 155 160

Ile Val Tyr Gln Arg
165

<210> 5

<211> 247

<212> PRT

5 <213> Bordetella pertussis

<400> 5

Met Ser Ala Pro Leu Asp Thr Pro Ala Leu Arg Leu Asn Thr Arg Phe
1 5 10 15

Ala Thr Gly Ile Val Leu Ala Gly Thr Leu Ala Leu Ala Gly Cys Ala
20 25 30

Gln Gln Arg Ser Ala Gly Tyr Tyr Asp Pro Pro Gly Ala Ser Thr Ile
35 40 45

Thr Asp Ala Gln Tyr Gln Gly Gln Ala Ala Gly Tyr Arg Thr Val Val
50 55 60

His Ala Pro Ser Gln Leu Gln Ile Glu Leu Lys Pro Asn Gln Pro Ala
65 70 75 80

Arg Gln Gln Asn Ala Gln Ala Gln Ala Gly Gln Gln Ser Thr Glu Asp
85 90 95

Gly Thr Ala Val Pro Glu Gly Gln Ala Ala Pro Gln Pro Gln Pro Glu
100 105 110

Thr Ala Ser Pro Gly Ala Gln Ala Ile Ile Pro Gln Ala Gln Thr Tyr
115 120 125

ES 2 749 007 T3

Gln Gly Thr Phe Pro Cys Phe Ala Ala Gly Leu Ala Cys Glu Ala Gln
 130 135 140

Arg Val Thr Leu Thr Leu Ala Pro Asn Gly Arg Trp Arg Ser Arg Thr
 145 150 155 160

Asn Tyr Leu Asp Lys Gln Pro Gln Ala Ser Ala Pro Val Ala Glu Gln
 165 170 175

Gly Cys Trp Asp Ala Thr Gln Glu Arg Pro Pro Arg Val Leu Leu Leu
 180 185 190

Asp Gly Ser Gly Asn Met Arg Ala Glu Leu Val Met Thr Ala Asn Asn
 195 200 205

Val Leu Arg Val Arg Ser Val Gly Gly Arg Thr Pro Asn Leu Asn Tyr
 210 215 220

Asn Leu Thr Arg Gln Pro Asp Leu Asp Ala Ile Ala Glu Leu Asp Lys
 225 230 235 240

Gln Ala Ala Pro Lys Cys Pro
 245

<210> 6

<211> 182

<212> PRT

5 <213> Bordetella pertussis

<400> 6

Met Ile Ala Arg Ile Ser Leu Arg Pro Leu Lys Gly Leu Ala Val Ala
 1 5 10 15

Val Leu Ala Ala Ser Ala Leu Thr Ala Cys Ser Ser Gly Lys Trp Gly
 20 25 30

Phe Pro Tyr Lys Ala Gly Val Gln Gln Gly Asn Trp Ile Thr Lys Glu
 35 40 45

Gln Val Ala Leu Leu Gln Gln Gly Met Ser Arg Glu Gln Val Arg Phe
 50 55 60

Ala Leu Gly Ser Pro Thr Leu Thr Ser Val Leu His Ala Asp Arg Trp
 65 70 75 80

Asp Tyr Pro Tyr Tyr Phe Lys Pro Gly Tyr Gly Lys Ala Gln Glu Arg
 85 90 95

ES 2 749 007 T3

Gln Phe Thr Val Trp Phe Glu Asn Asp His Leu Val Arg Trp Ser Gly
 100 105 110

Asp Glu Gln Pro Asp Leu Gln Pro Phe Gln Ile Glu Lys Val Asn Ala
 115 120 125

Lys Gln Glu Glu Lys Ala Asp Ala Gln Val Asp Thr Ala Glu Lys Arg
 130 135 140

Gln Glu Gly Ile Asp Lys Ala Glu Lys Val Arg Pro His Val Asp Val
 145 150 155 160

Thr Thr Pro Asp Asn Pro Thr Leu Asp Tyr Pro Gly Glu Pro Gly Gln
 165 170 175

Thr Phe Glu Pro Leu Lys
 180

<210> 7
 <211> 22
 <212> PRT

5 <213> Bordetella pertussis

<400> 7
 Met Arg Met Asn Lys Arg His Ala Gly Ala Ser Ala Leu Met Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Ala Gly Cys
 20

<210> 8
 <211> 33
 <212> PRT

10 <213> Bordetella pertussis

<400> 8
 Met Asn Tyr Met His Ser Pro Ser Val Val Ala Gly Arg Ala Arg Arg
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Val Ala Ala Val Ala Gly Ser Val Ala Val Leu Ala Gly
 20 25 30

Cys

<210> 9
 <211> 22
 <212> PRT

15 <213> Bordetella pertussis

<400> 9
 Met Gln Leu Thr Ile Arg Lys Leu Ala Tyr Thr Leu Ala Phe Ser Thr
 1 5 10 15

Leu Val Leu Ala Gly Cys
 20

20 <210> 10
 <211> 21
 <212> PRT

<213> Bordetella pertussis

<400> 10

ES 2 749 007 T3

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

Thr Leu Ala Ala Cys
 20

<210> 11

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Bordetella pertussis

<400> 11

Met Ser Ala Pro Leu Asp Thr Pro Ala Leu Arg Leu Asn Thr Arg Phe
 1 5 10 15

Ala Thr Gly Ile Val Leu Ala Gly Thr Leu Ala Leu Ala Gly Cys
 20 25 30

<210> 12

<211> 26

<212> PRT

10 <213> Bordetella pertussis

<400> 12

Met Ile Ala Arg Ile Ser Leu Arg Pro Leu Lys Gly Leu Ala Val Ala
 1 5 10 15

Val Leu Ala Ala Ser Ala Leu Thr Ala Cys
 20 25

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

15 <213> Bordetella pertussis

<400> 13

Cys Ser Asp Val Asn Gln Leu Leu Gly Asn Glu Glu Ser Val Asp
 1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

20 <213> Bordetella pertussis

<400> 14

25 Cys Ala Asn Pro Ser Ala Ser Ser Gly Val Tyr Thr Tyr Gly Gln
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Una lipoproteína obtenible de *Bordetella pertussis* para mejorar una respuesta Th1, la lipoproteína que tiene un péptido señal N-terminal de menos de 40 aminoácidos de longitud en donde el péptido señal N-terminal comprende una lipo-caja que comprende una secuencia de aminoácidos X1, X2, X3, X4, en donde X1 se puede seleccionar de Leucina, Valina e Isoleucina; X2 se puede seleccionar de Alanina, Serina, Treonina, Valina e Isoleucina; X3 se puede seleccionar de Glicina, Alanina y Serina y X4 es Cisteína, en donde X4 es capaz de ser acilado, en donde la lipoproteína es un agonista del receptor de tipo Toll 2, en donde la lipoproteína se selecciona del grupo que consiste en una lipoproteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1; un lipopéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13; y un lipopéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14; en donde la lipoproteína es para usar en medicina.
2. La lipoproteína para usar de acuerdo con la reivindicación 1 para usar en el tratamiento o prevención de una afección causada por un patógeno, cáncer o una enfermedad alérgica.
3. Una composición para mediar una respuesta inmune en un sujeto que comprende al menos una lipoproteína obtenible de *Bordetella pertussis* para mejorar una respuesta Th1, la lipoproteína que tiene un péptido señal N-terminal de menos de 40 aminoácidos de longitud en donde el péptido señal N-terminal comprende una lipo-caja que comprende una secuencia de aminoácidos X1, X2, X3, X4, en donde X1 se puede seleccionar de Leucina, Valina e Isoleucina; X2 se puede seleccionar de Alanina, Serina, Treonina, Valina e Isoleucina; X3 se puede seleccionar de Glicina, Alanina y Serina y X4 es Cisteína, en donde X4 es capaz de ser acilado, en donde la lipoproteína es un agonista del receptor de tipo Toll 2, en donde la lipoproteína se selecciona del grupo que consiste en una lipoproteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1; un lipopéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13; y un lipopéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14, que comprende opcionalmente un antígeno de un patógeno, de una célula tumoral o un alérgico; en donde la composición es para usar en medicina.
4. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la al menos una lipoproteína es un determinante inmunogénico.
5. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la al menos una lipoproteína es un adyuvante.
6. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde la composición es para usar en la mediación de una respuesta inmune frente a un patógeno.
7. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde la composición es una composición de vacuna acelular de tos ferina.
8. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 para usar en el tratamiento o prevención de una afección causada por un patógeno o tumorigénesis.
9. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 en un método de vacunación de un sujeto para inducir inmunidad frente a un patógeno.
10. Una composición que comprende al menos una lipoproteína obtenible de *Bordetella pertussis* para mejorar una respuesta Th1, la lipoproteína que tiene un péptido señal N-terminal de menos de 40 aminoácidos de longitud en donde el péptido señal N-terminal comprende una lipo-caja que comprende una secuencia de aminoácidos X1, X2, X3, X4, en donde X1 se puede seleccionar de Leucina, Valina e Isoleucina; X2 se puede seleccionar de Alanina, Serina, Treonina, Valina e Isoleucina; X3 se puede seleccionar de Glicina, Alanina y Serina y X4 es Cisteína, en donde X4 es capaz de ser acilado, en donde la lipoproteína es un agonista del receptor de tipo Toll 2 y la composición es para usar como un estímulo para mejorar la respuesta inmune generada en un huésped frente a un patógeno al que se ha expuesto previamente el sujeto, en donde la lipoproteína se selecciona del grupo que consiste en una lipoproteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1; un lipopéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13; y un lipopéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14.
11. La lipoproteína para usar como se reivindicó en la reivindicación 2, o la composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, o la composición para usar de acuerdo con la reivindicación 10 en donde el patógeno es un agente infeccioso.
12. La lipoproteína para usar de acuerdo con la reivindicación 11 o la composición para usar de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el agente infeccioso es una bacteria, un virus, un hongo o un parásito.
13. La lipoproteína para usar de acuerdo con la reivindicación 12 o la composición para usar de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la bacteria es *B. pertussis*.

BP1569 (SEQ ID Nº: 1)

MRMNKRHAGASALMALALLAGCSDVNQLLGNEESVDYKSTRRGDPLSIPDLTQANNDP
 RYKAPASGTATYSQFQQQLQQASAGQNTNVLPERADMRVERDGDRLRWLVIERPPEQLF
 SKVVDFTDTGFTVSVNNPQAGIETDWAENRAKIPESWLRQVLGSLVLETAWDSGEREKF
 RTRVERVNGHTEIYITHNQMLEKRVGSDGGQVQWTHGKEDPGLNAAMLARLMVYLGTDV
 DAARKLVAQAEAAPQAPKVQSVRAEGAMLVVDESFDRAWRRVGVALDSGGFAVDDRDRS
 AGEYFVRYVDTDTGAQNEQPGFFSRLFSSDKKAQAPQYRIRLTGSGTQTQVTVLDANGQRD
 SSATAQRMLSVLKDKMV

BP2992 (SEQ ID Nº: 2)

MNYMHSPSVVAGRARRLLAVAAVAGSVAVLAGCANPSASSGVYTYGQAQREQIVRTGTVTG
 VRPITIQNDKSSGVLVAGGALGGVAGNAVGGGTGRTIATVGGVILGALAGNAIENRAGKSSG
 YEITVRLDNGETRVVAQEADVPISVGQRVQVISGAGPTRVTPY

BP0205 (SEQ ID Nº: 3)

MQLTIRKLAYTLAFSTLVLAGCTTASKKTDGQAATPADQASSQASAASVEFYVAQAKAGD
 GLMEVKVPDGSLYMQRQPVLTRADLTEAAALVDRQGQNFVGLRFTEAGARKLNDISSKNIG
 NMLALVIDRELVAAPRIAEPNLRGVLAFGVPSAKAASEIAAKIRGDAGAPAAGVPAAPAPKP
 APKP

BP3342 (SEQ ID Nº: 4)

MKSRIAKSLTIAALAATLAACCSSVPLDDKAGQAGGSGQGSASGQILDPFNPQSILAQQRSVY
 FDFDSYTVSEQYRGLVETHARYLASNNQQRRIKIEGNTDERGGAEYNLALGQRRADAVRRM
 MTLGVSNDNIETISFGKEKPKATGSSEADFAENRRADIVYQR

BP3819 (SEQ ID Nº: 5)

MSAPLDTPALRLNTRFATGIVLAGTLALAGCAQQRSAGYYDPPGASTITDAQYQGQAAGYR
 TVVHAPSQLQIELKPNQPARQNAQAQAGQSTEDGTAVPEGQAAPQPQPETASPGAQAH
 PQAQTYQGTFPCFAAGLACEAQRVTLTLAPNGRWRSRNTNYLDKQPQASAPVAEQGCWDAT
 QERPPRVLLLDGSGNMRAELVMTANNVLRVRSVGGRTPNLNYNLTRQPDLDIAIELDKQA
 APKCP

BP2508 (SEQ ID Nº: 6)

MIARISLRPLKGLAVAVLAASALTACSSGKWGFYPYKAGVQQGNWITKEQVALLQQGMSREQ
 VRFALGSPTLTSVLHADRWDPYFYFKPGYGKAQERQFTVWFENDHLVRWSGDEQPDLP
 FQIEKVNAKQEEKADAQVDTAEKRQEGIDKAEKVRPHVDVTTDPNPTLDYPGEPGQTFEP
 LK

FIGURA 1A

Nombre	Péptido Señal N-terminal:
LP0205	MQLTIR K LAYTLAFSTLV LAGC (SEQ ID Nº: 9)
LP1569	MRMNK R HAGASALMALAL LAGC (SEQ ID Nº: 7)
LP3342	MKSRIA K SLTIAALAAT LAAC (SEQ ID Nº: 10)
LP3819	MSAPLDTPALRLNTRFATGIVLAGTLA LAGC (SEQ ID Nº: 11)
LP2508	MIARISLRPL K GLAVAVLAASA LTAC (SEQ ID Nº: 12)
LP2992	MNYMHSPSVVAGRARRLLAVA AVAGSVAV LAGC (SEQ ID Nº: 8)

FIGURA 1B

Lipopéptido	1569
	CSDVNQLLGNEESVD (SEQ ID Nº: 13)
Lipopéptido	2992
	CANPSASSGVYTYGQ (SEQ ID Nº: 14)

FIGURA 1C



FIGURA 2A

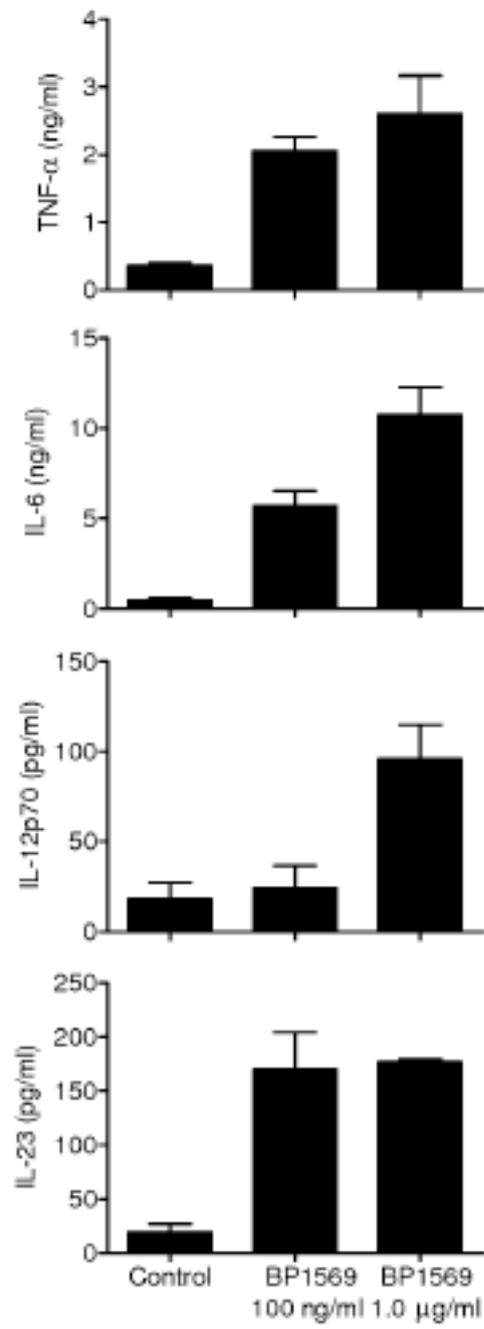


FIGURA 2B

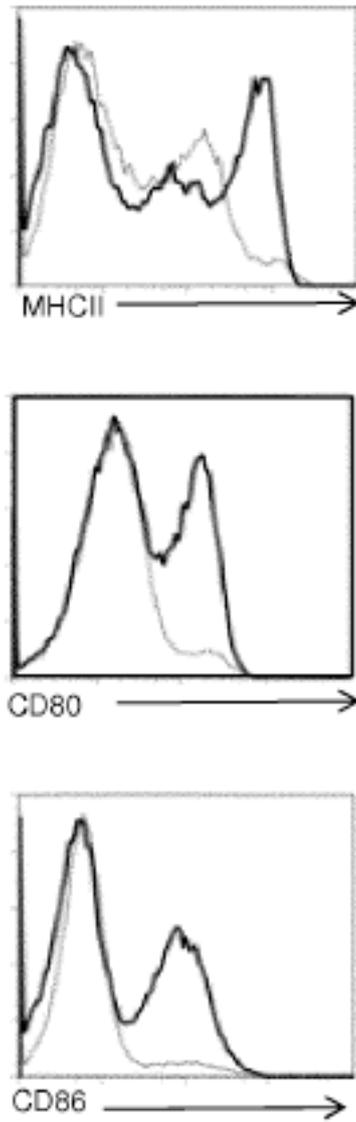


FIGURA 2C

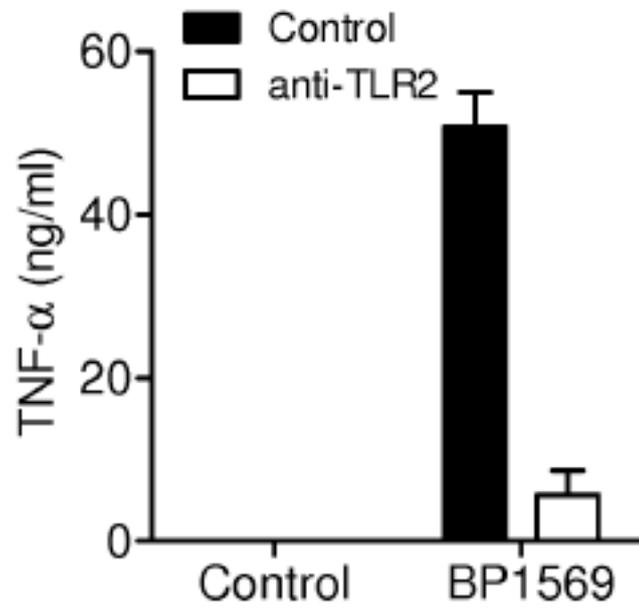


FIGURA 2D

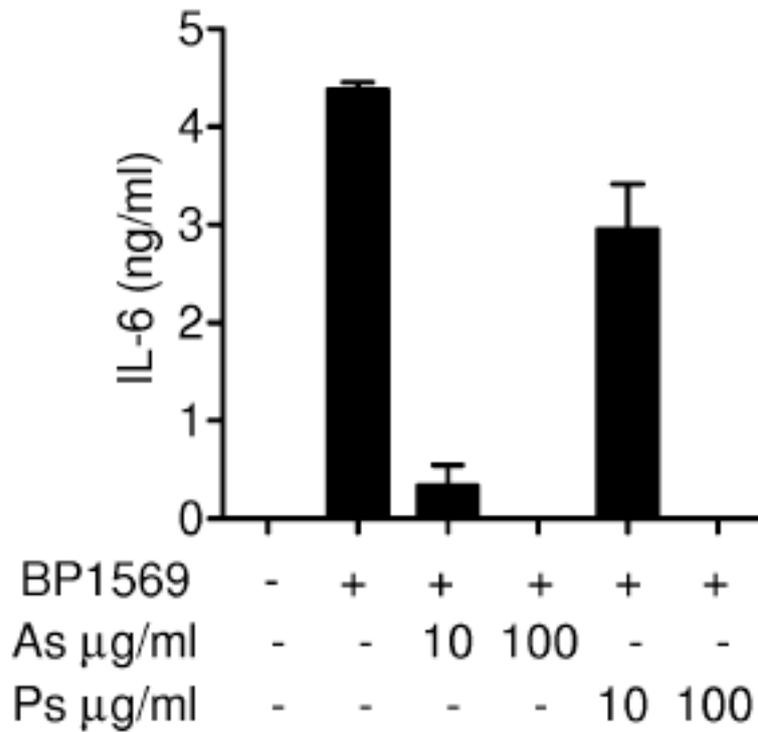


FIGURA 2E

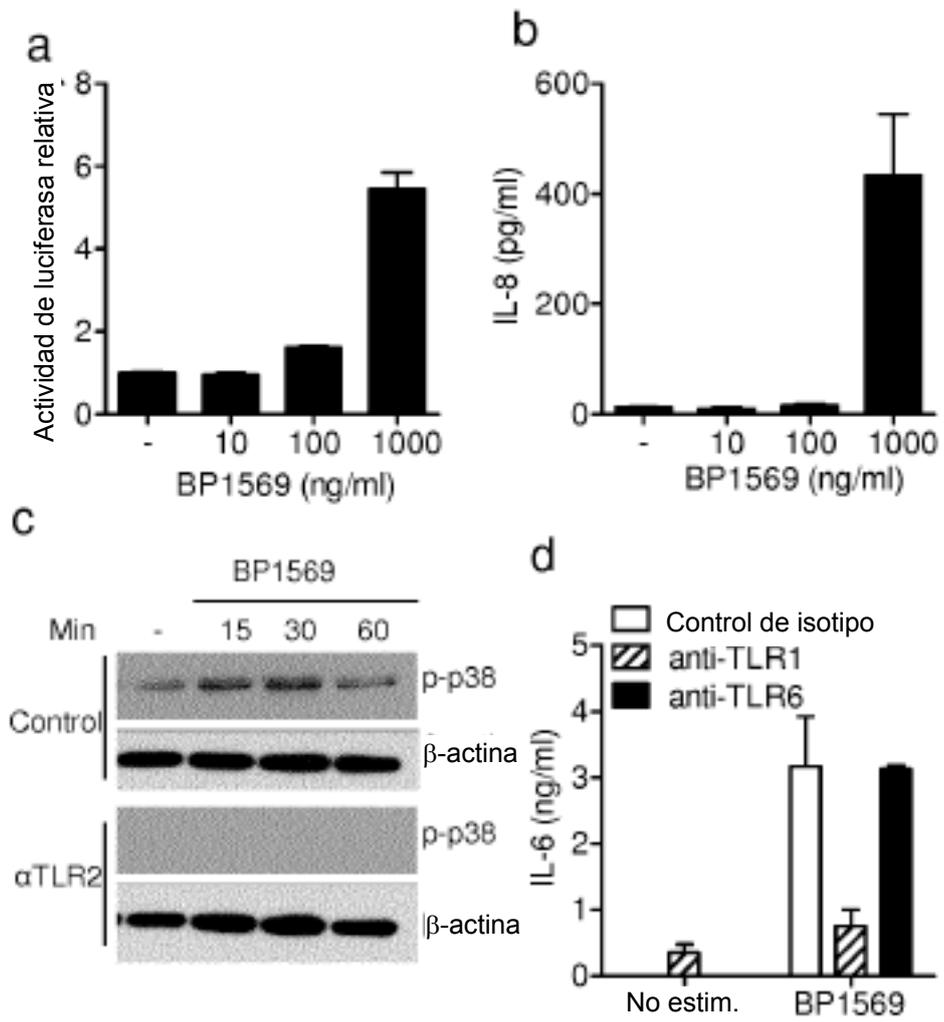


FIGURA 3A, 3B, 3C, 3D

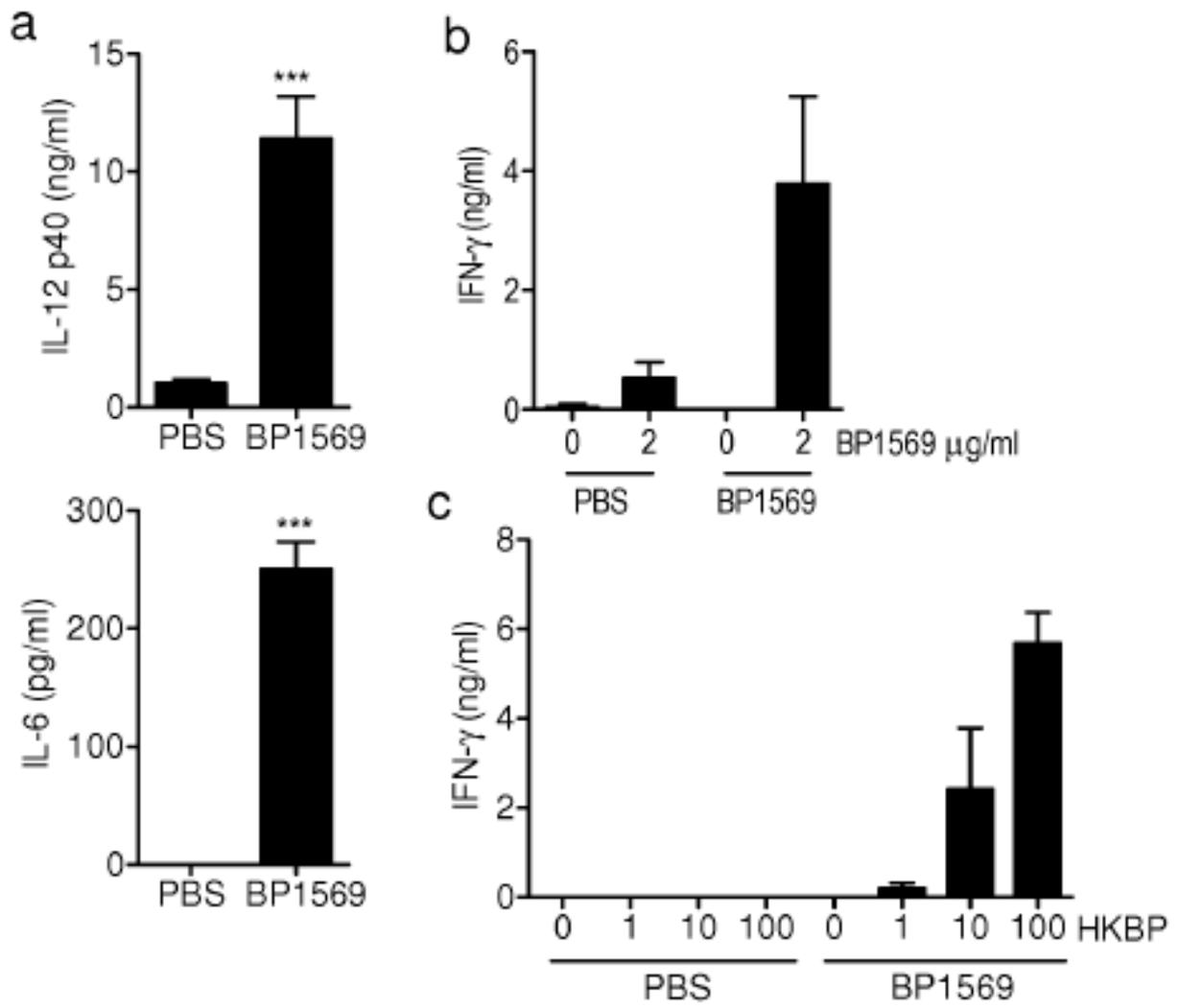


FIGURA 4A, 4B, 4C

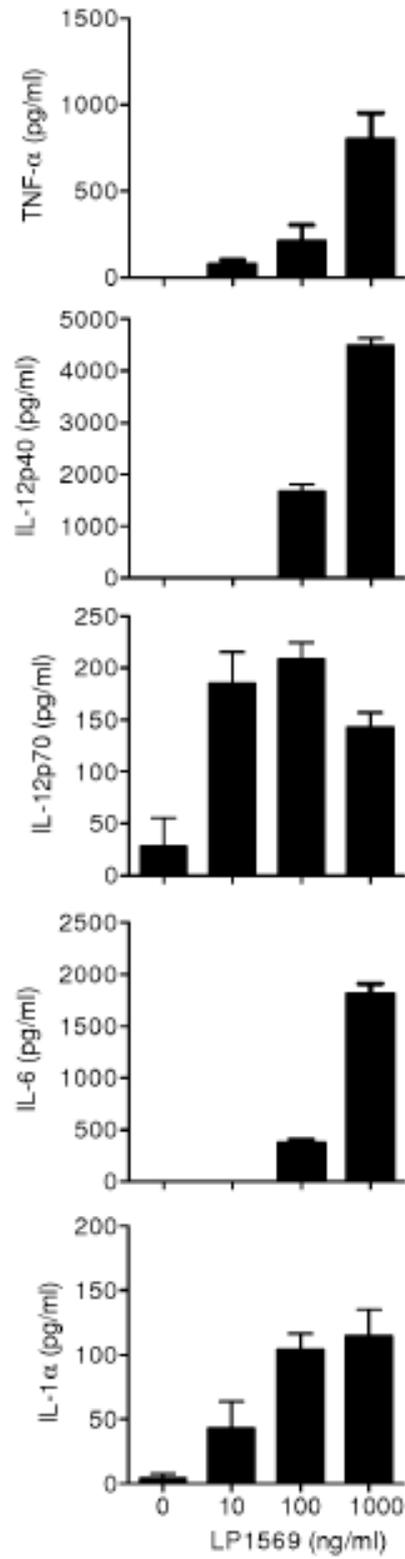


FIGURA 5A

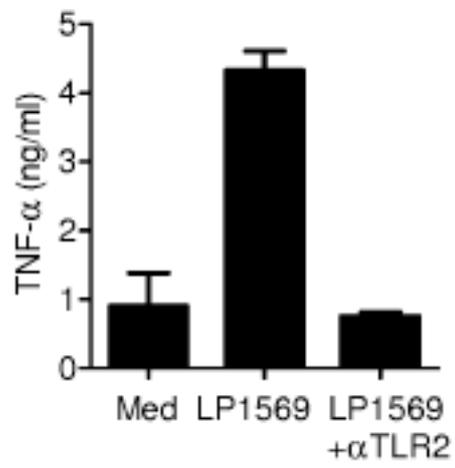


FIGURA 5B

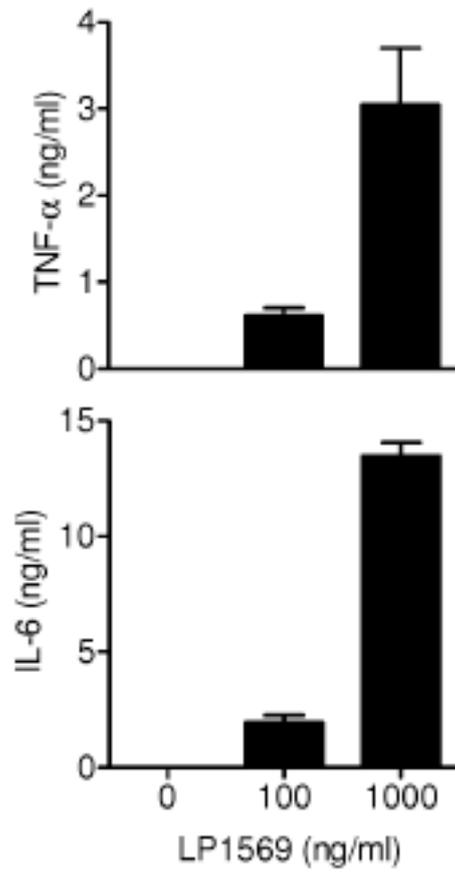


FIGURA 5C

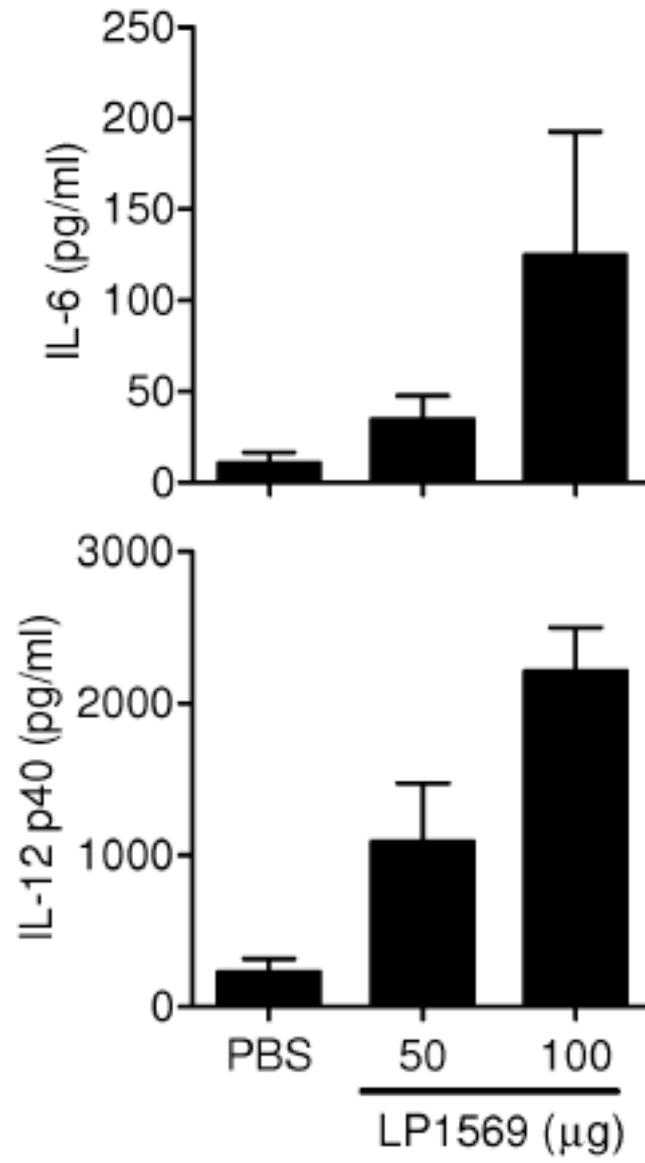


FIGURA 5D

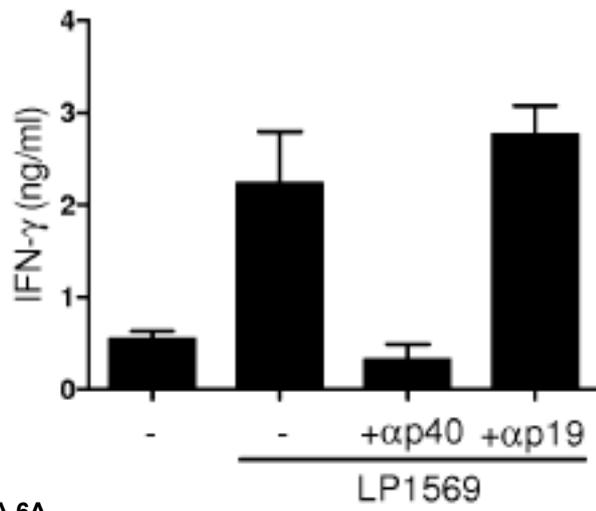


FIGURA 6A

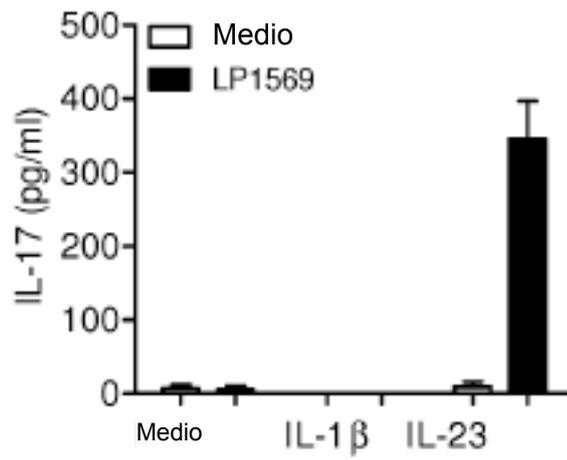


FIGURA 6B

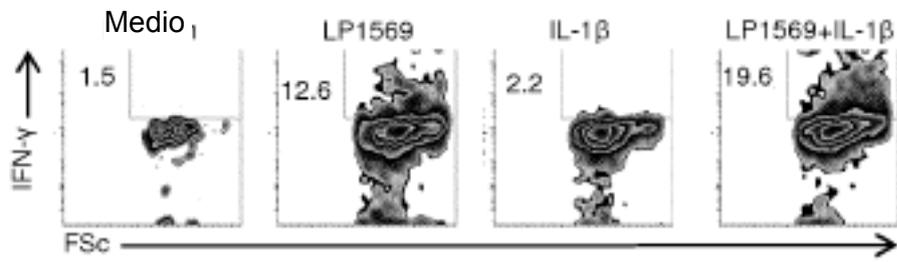


FIGURA 6C

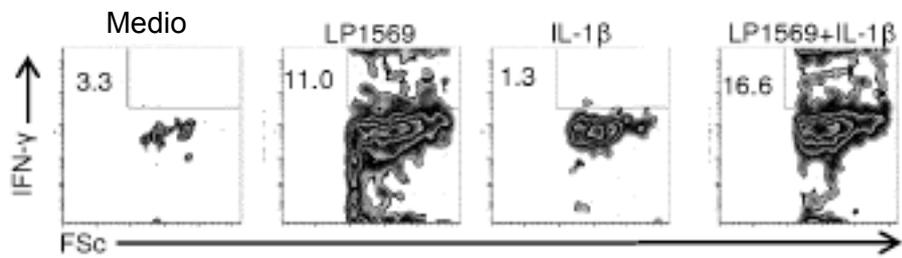


FIGURA 6D

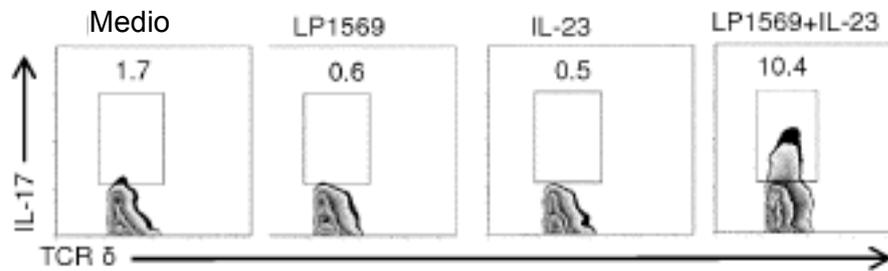


FIGURA 6E

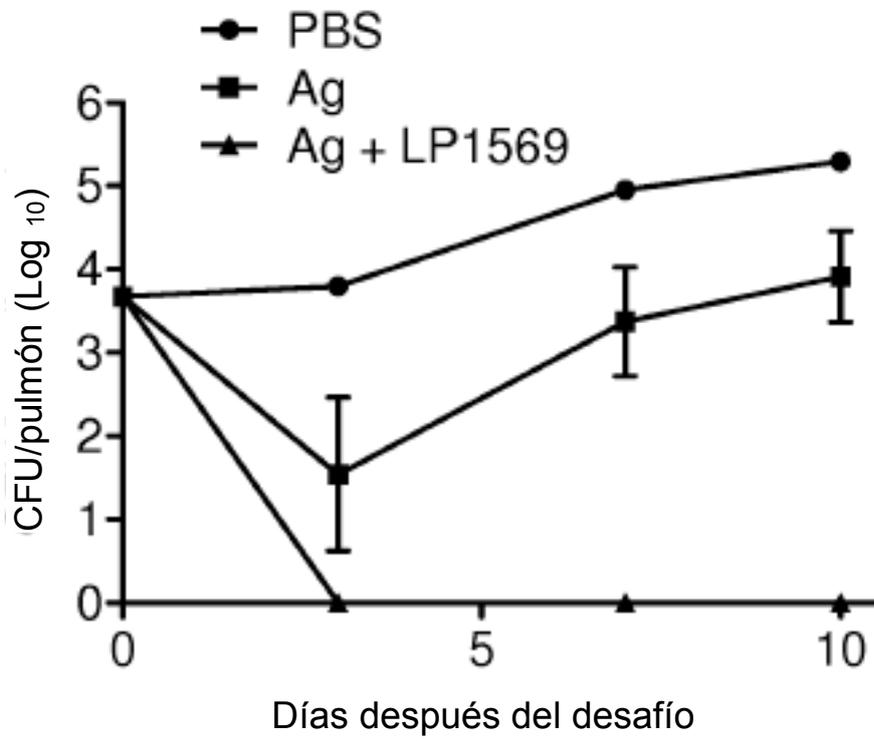


FIGURA 7A

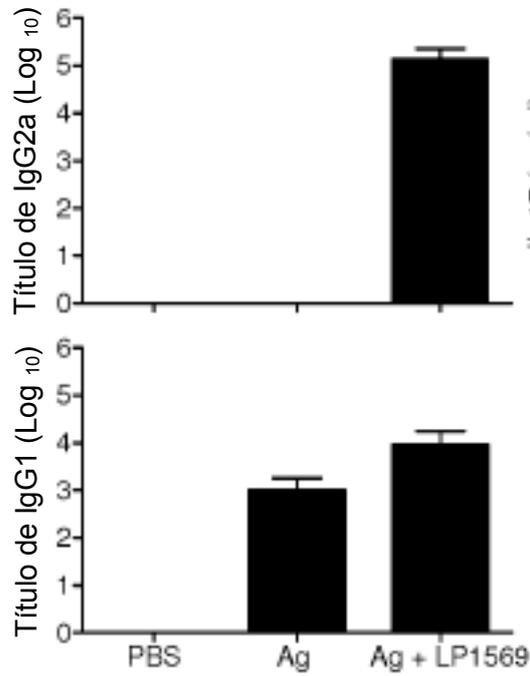


FIGURA 7B

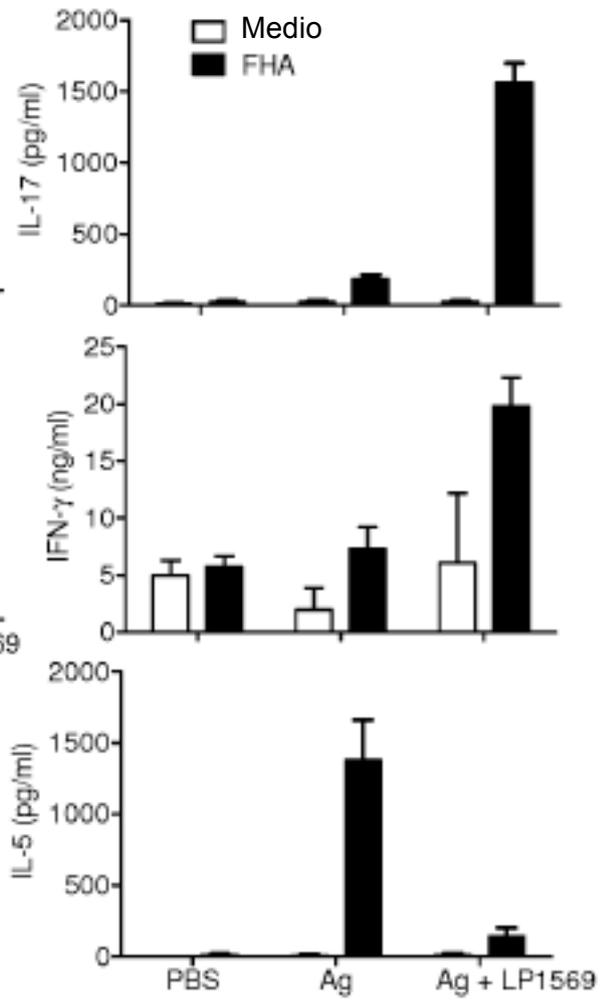


FIGURA 7C

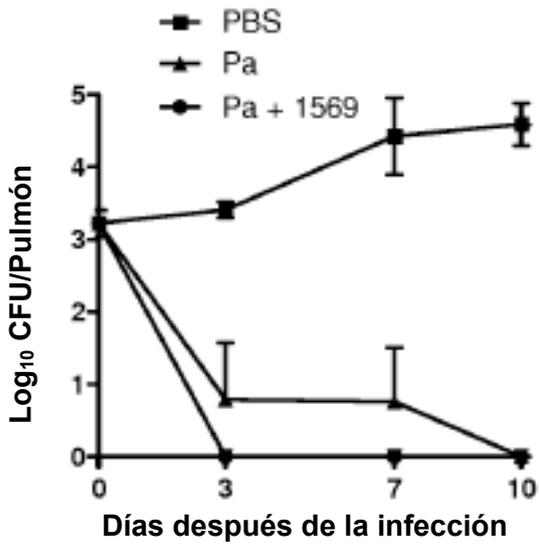


FIGURA 8A

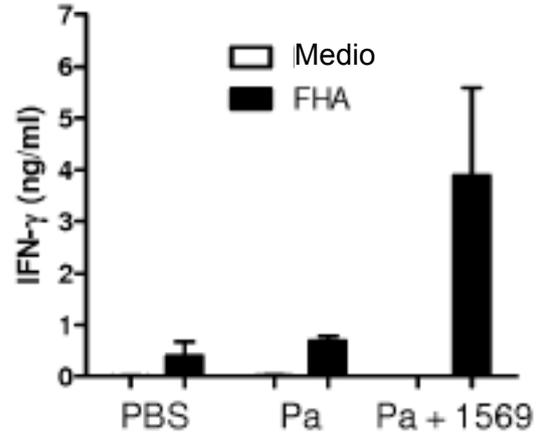


FIGURA 8C

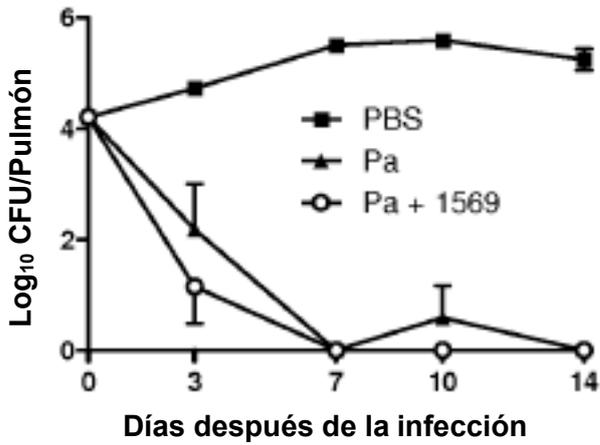


FIGURA 8B

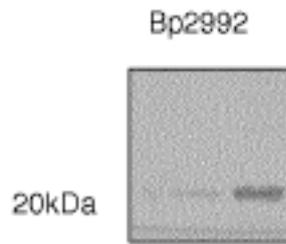


FIGURA 9A

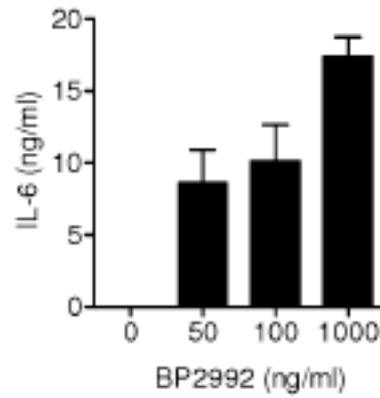
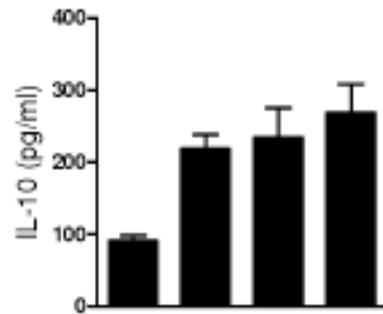
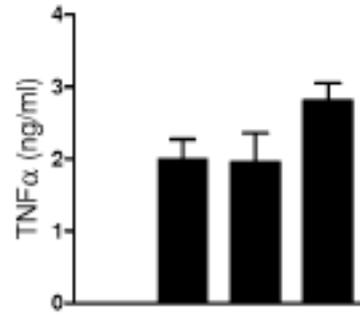


FIGURA 9B

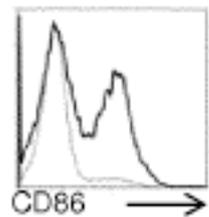
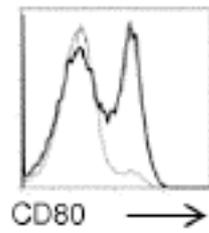
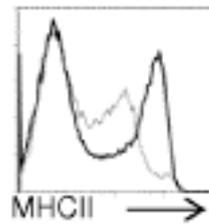


FIGURA 9C

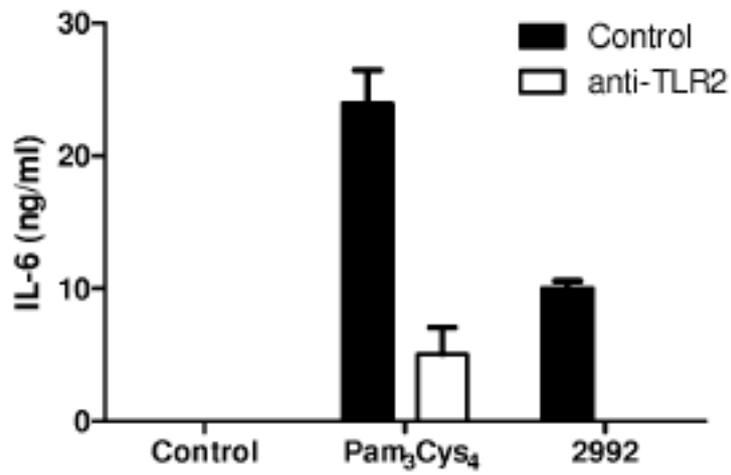


FIGURA 10A

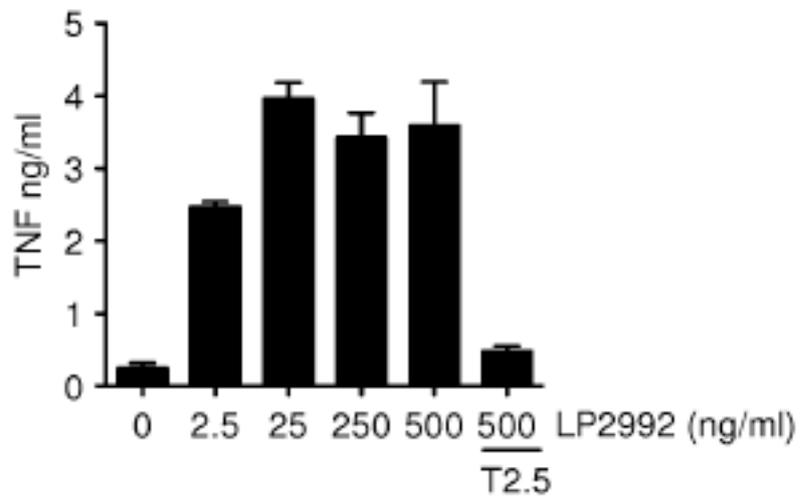


FIGURA 10B

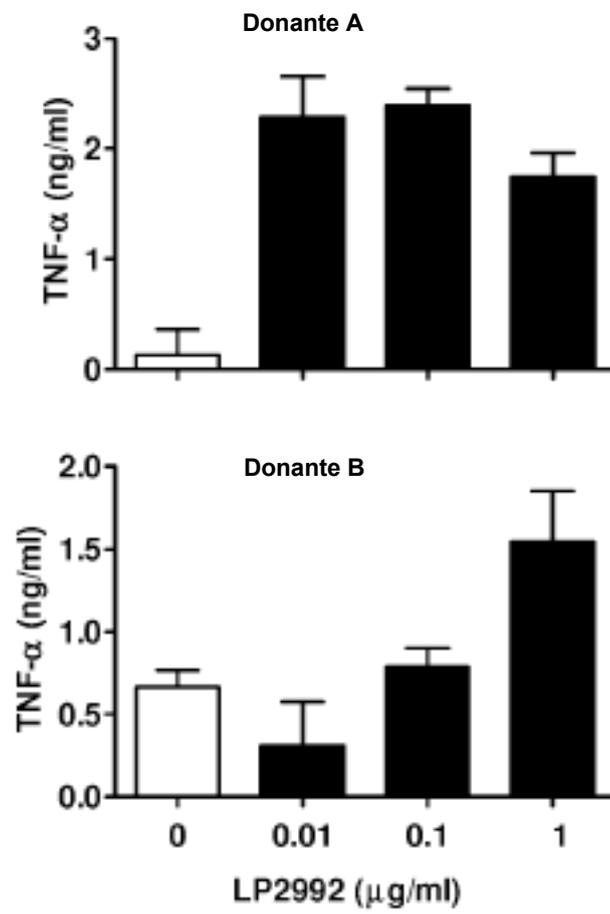


FIGURA 11

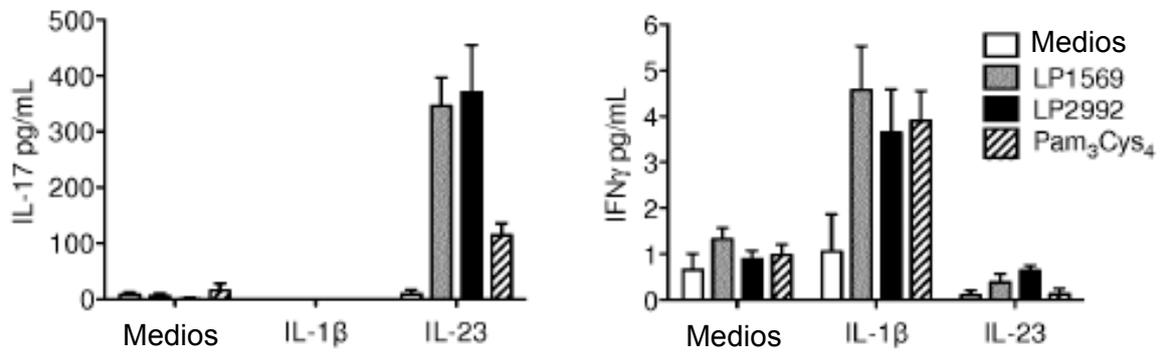


FIGURA 12A

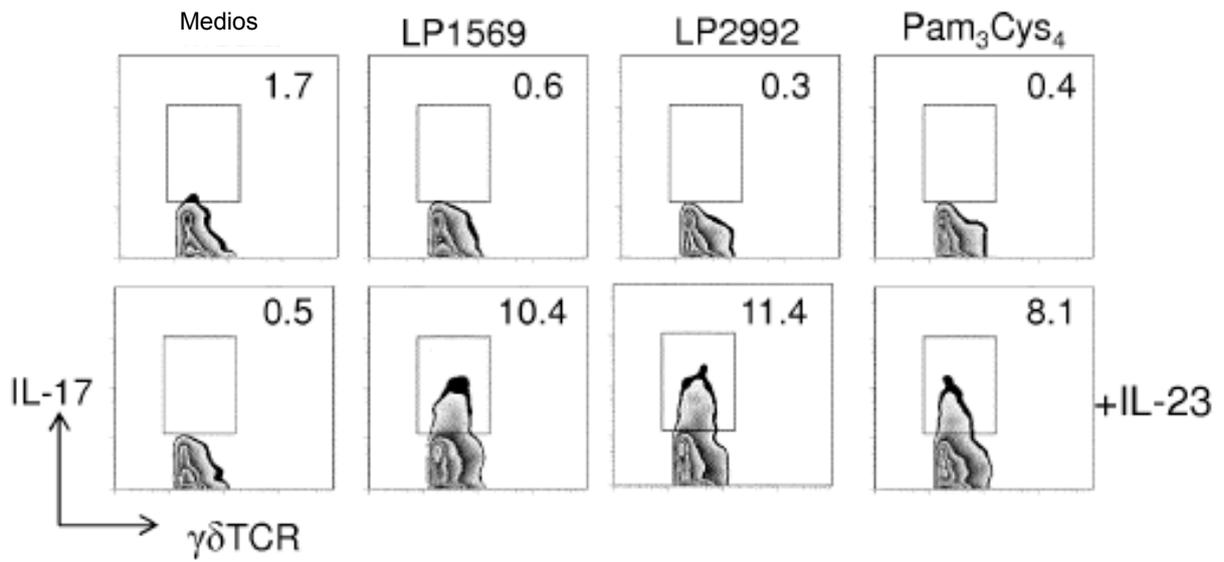


FIGURA 12B

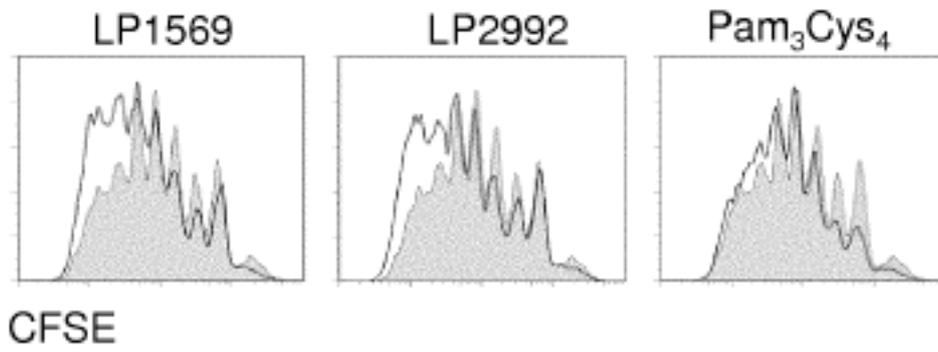


FIGURA 12C

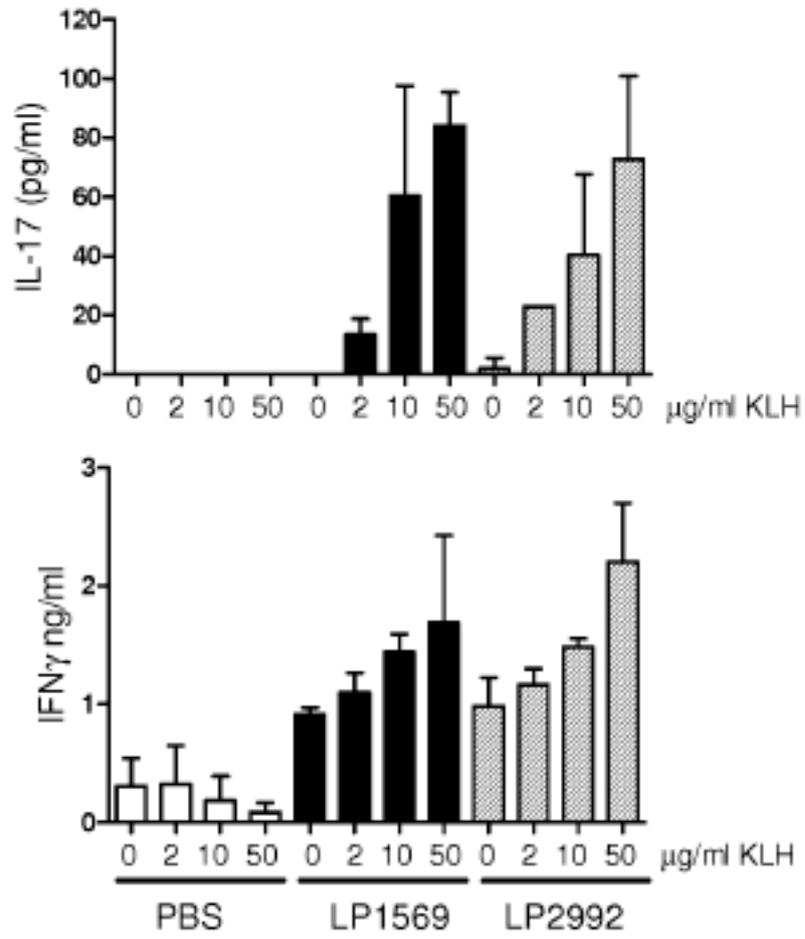


FIGURA 13

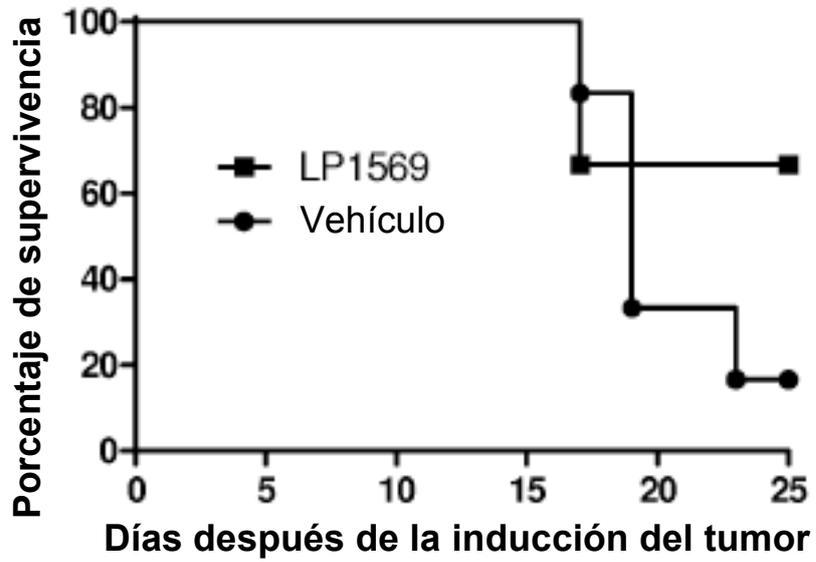
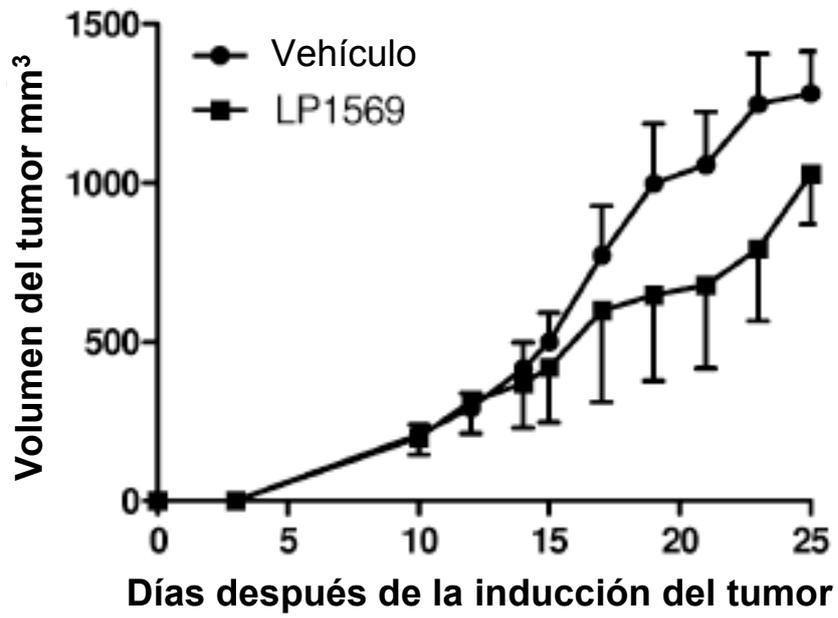


FIGURA 14