



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 265 672**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98958314 .1**
86 Fecha de presentación : **02.12.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **1035866**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.09.2000**

54 Título: **Micelas mixtas de lipopéptidos para la inducción de una respuesta inmunitaria.**

30 Prioridad: **03.12.1997 FR 97 15246**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2007

73 Titular/es: **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cédex 13, FR
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE y
INSTITUT PASTEUR DE LILLE**

72 Inventor/es: **Gras-Masse, Hélène;
Bossus, Marc;
Lippens, Guy;
Wieruszkeski, Jean-Michel;
Tartar, André;
Guillet, Jean-Gérard y
Bourgault-Villada, Isabelle**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 265 672 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

Micelas mixtas de lipopéptidos para la inducción de una respuesta inmunitaria.

5 La presente solicitud tiene por objeto unas micelas mixtas de lipopéptidos para la producción de una respuesta inmunitaria.

La invención tiene además por objeto la utilización de estas micelas con fines terapéuticos.

10 Existen dos tipos de respuesta inmunitaria eficaz: la respuesta humoral debida a los anticuerpos y la respuesta citotóxica debida a los linfocitos T CD8⁺.

15 Una respuesta citotóxica eficaz requiere la presentación de los antígenos a los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL), en asociación con las moléculas de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), pero también a los linfocitos T auxiliares CD4⁺ (HTL) en asociación con las moléculas de clase II del MHC.

20 La utilización de lipopéptidos para la introducción de una respuesta citotóxica, es decir la generación *in vivo* de linfocitos T citotóxicos ya ha sido descrita. En particular, la solicitud FR-90 15870 publicada con el nº 2.670.787 (Institut Pasteur de Lille, Institut Pasteur, INSERM) describe lipopéptidos constituidos por una parte peptídica que comprende de 10 a 40 aminoácidos y por una parte lipídica que puede proceder de ácidos grasos o de grupos esteroides.

25 Estos lipopéptidos muestran una buena aptitud para inducir una respuesta citotóxica. Convenía sin embargo hacerles capaces de introducir una respuesta de mayor calidad por la adición de una respuesta T auxiliar cuya importancia es conocida para la introducción eficaz y el mantenimiento de la respuesta citotóxica. Convenía además hacerles capaces de inducir una respuesta en el mayor número de individuos.

BOURGAULT *et al.* (1994, *J. Immunol.*, 2530-2537) han inducido una respuesta CTL y HTL a partir de la mezcla de lipopéptidos, en forma de una emulsión con un adyuvante oleoso.

30 No obstante, era necesario añadir adyuvante incompleto de Freund (IFA). La inmunogenicidad de la preparación vacunal utilizada implicaba necesariamente la presentación funcional conjunta de los motivos CTL y HTL situados en uno o varios lipopéptidos de la mezcla. Sin embargo, la eficacia de la presentación conjunta de diferentes motivos implicados dependía de la asociación con el adyuvante incompleto de Freund en el seno de una emulsión muy fina.

35 Un artículo a nombre de VITIELLO *et al.* (1995, *J. Clin. Invest.* 95, 341-349) evoca la posibilidad de inducir una respuesta CTL en una población humana seleccionada (HLA-A2) utilizando un lipopéptido que comprende una asociación secuencial entre un epítipo CTL HLA-A2 y un epítipo auxiliar (HTL) multivalente. Obsérvese que este estudio ha sido realizado en una población genéticamente restringida.

40 Este artículo da cuenta asimismo de un experimento en el curso del cual se han comparado dos tipos de asociaciones entre el epítipo HTL y el epítipo CTL: por una parte una asociación covalente secuencial en el seno de un mismo lipopéptido y por otra parte una asociación por simple mezcla de un lipopéptido que comprende el motivo CTL con un péptido que comprende el motivo HTL. Los resultados de este estudio muestran una ventaja muy neta de la asociación covalente en relación a la mezcla, tal como ha sido realizada por estos autores, es decir por mezcla de soluciones que comprenden DMSO y tampón PBS (los péptidos o lipopéptidos se mantienen en soluciones madre a una concentración de 10 a 20 mg/ml y diluidos improvisadamente con PBS antes de la utilización).

45 Sin embargo, la combinación en una misma molécula lipopeptídica de los epítipos citotóxico y auxiliar, aunque puede inducir una respuesta inmunitaria eficaz, necesita la síntesis de secuencias de aminoácidos largos que presentan múltiples epítipos susceptibles de asociarse con varios HLA o superfamilias de HLA de clase I y de clase II. La asociación covalente de todos estos motivos en el seno de una única molécula representa dificultades técnicas difícilmente superables, tanto desde el punto de vista de los métodos de síntesis como de los métodos de caracterización analítica.

50 En todo caso, este artículo menciona la asociación de un lipopéptido y de un péptido y no de dos lipopéptidos. Por ello, no puede tener lugar ninguna formación de micelas mixtas.

55 Otro artículo, publicado por DON DIAMOND *et al.* (1997, *Blood*; 90, nº 5), menciona la inmunogenicidad de una mezcla entre un péptido que lleva un epítipo CTL mínimo (pp65, secuencia 495-503 de la proteína de matriz del citomegalovirus) y un péptido dipalmitoílo que contiene un epítipo HTL. La mezcla se realiza por mezclado de las soluciones en el ácido acético diluido o en el DMSO, utilizando un tratamiento por ultrasonidos durante 15 a 30 segundos.

60 Este artículo no describe por tanto la mezcla de lipopéptidos que contiene independientemente un epítipo CTL y un epítipo HTL, sino la mezcla de un lipopéptido que contiene un epítipo HTL y de un nonapéptido correspondiente a un epítipo CTL mínimo. Además no se menciona la formación de micelas mixtas o de microagregados. Sin embargo, en este caso particular, la posibilidad de asociación directa del nonapéptido con los CMH de clase I expresados en la superficie de las células puede explicar el éxito del enfoque seguido. La inmunogenicidad de la preparación significa que ha habido efectivamente presentación conjunta de los epítipos HTL y CTL por la misma célula presentadora del

ES 2 265 672 T3

antígeno: sin embargo, el nonapéptido mínimo utilizado presenta la capacidad de unirse directamente con los CMH de clase I en la superficie de la célula presentadora del antígeno, sin que sea necesario su preparación por la célula.

5 Los autores concluyen reconociendo que existen todavía varios obstáculos para obtener una inmunidad a largo plazo, lo que confirma el carácter experimental de este estudio.

10 La difícil obtención de una respuesta inmunitaria que depende de una doble preparación de los péptidos que presentan separadamente los epítomos HTL y CTL, es explicada ahora por una publicación de STUHLER (1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 622-627). Para poder observar la producción de una respuesta CTL, es absolutamente necesario que los epítomos HTL y CTL sean presentados en la superficie de la misma célula presentadora del antígeno (CPA) para poder ser reconocido a la vez por los linfocitos T auxiliares que reconocen el epítomo HTL y los linfocitos T citotóxicos que reconocen el epítomo CTL.

15 Se deduce de lo que precede por tanto que las composiciones que contienen en el seno las mismas micelas, o los mismos microagregados, por una parte los lipopéptidos que presentan un epítomo CTL y por otra parte los lipopéptidos que comprenden un epítomo T auxiliar, es decir las micelas o microagregados mixtos, según le consta al solicitante, nunca han sido descritas.

20 O, como se ha indicado anteriormente, es absolutamente necesario que los dos epítomos, citotóxico y T auxiliar, sean presentados en la superficie de la misma célula presentadora del antígeno.

25 Además de la necesidad de una presentación conjunta de los dos epítomos en la superficie de la misma célula, también es indispensable solubilizar los lipopéptidos, a fin de permitir su administración a los pacientes, y su esterilización por filtración.

El solicitante está por tanto interesado en encontrar una solución a estos diversos problemas.

30 Ha demostrado que para obtener micelas formadas individualmente de todos los péptidos presentes en la mezcla, que contengan epítomos HTL o CTL, era necesario asociar los diferentes polipéptidos después de haberlos dispersado previamente en estado molecular en un disolvente adaptado.

La presente invención tiene por tanto por objeto las micelas o microagregados para la producción de una respuesta inmunitaria que contienen por lo menos:

- 35 - un primer lipopéptido que comprende por lo menos un epítomo CTL, o epítomo citotóxico, y por lo menos un motivo lipídico, y
- un segundo lipopéptido que comprende por lo menos un epítomo auxiliar y por lo menos un motivo lipídico, cuya naturaleza puede ser diferente del motivo del primer lipopéptido.

40 En el sentido de la presente invención, la expresión "respuesta inmunitaria" designa la totalidad de la respuesta inmunitaria inducida, que comprende la respuesta citotóxica y la respuesta humoral.

45 Las micelas según la presente invención no se limitan a dos lipopéptidos, sino que pueden comprender otros lipopéptidos que presentan independientemente los epítomos HTL o CTL.

Se entiende, para la comprensión de la presente invención, por epítomo T auxiliar, una secuencia de aminoácidos capaz de asociarse a por lo menos un receptor HLA de clase II, y capaz de ser reconocida por los linfocitos T auxiliares.

50 Se entiende por epítomo CTL una secuencia de aminoácidos capaz de asociarse a por lo menos un receptor HLA de clase I y capaz de ser reconocida por los linfocitos T citotóxicos.

Los epítomos T auxiliares capaces de asociarse a varios receptores HLA de clase II diferentes se denominan epítomos auxiliares multivalentes (HTL multivalentes).

55 Además, se entiende por micelas o por microagregados unos agregados de lipopéptidos que presentan un tamaño que les hace asimilables simultáneamente por cualquier célula presentadora del antígeno (CPA) y preferentemente de un tamaño inferior a aproximadamente 1 μm .

60 Las micelas mixtas según la presente invención, es decir que comprenden lipopéptidos que comprenden epítomos citotóxicos y lipopéptidos que comprenden epítomos T auxiliares, presentan la ventaja de asociar en el seno del mismo microvolumen asimilable por una sola CPA una gran variedad de epítomos CTL y HTL sin que sea necesario su asociación covalente, respetando el criterio de definición química requerido. Unas micelas constituidas cada una por una sola variedad de lipopéptido, que contienen un epítomo CTL o un epítomo HTL no permiten obtener una presentación conjunta eficaz correspondiente a la producción de una respuesta eficaz fuerte.

Además, la obtención de una respuesta CTL gracias al empleo de microagregados o micelas mixtas permite evitar la utilización de emulsiones con adyuvantes oleosos, tales como el adyuvante incompleto de Freund, cuyo empleo

ES 2 265 672 T3

no se admite en terapéutica humana. Las micelas y microagregados según la presente invención son compatibles sin embargo con el empleo de emulsiones con excipientes oleosos clínicamente aceptables.

5 Otra ventaja de los microagregados o micelas mixtas según la presente invención, que comprenden individualmente por lo menos dos tipos de lipopéptidos, reside en el hecho que la solubilización de lipopéptidos que presentan una débil solubilidad en el agua o en disolventes clínicamente aceptables, o lipopéptidos insolubles, puede ser facilitada por su combinación con otro(s) lipopéptido(s) que presenta(n) una mejor solubilidad.

10 Las micelas según la presente invención presentan todavía la ventaja, con relación a los lipopéptidos en los cuales los motivos HTL y CTL están asociados de manera covalente y cuyo tamaño está limitado, tales como los descritos por VITIELLO *et al.* (1995, citado anteriormente), de permitir la asociación de una gran diversidad de motivos y por consiguiente poder ser utilizados para la vacunación de poblaciones humanas o animales no seleccionadas basándose en la restricción genética.

15 Las micelas según la presente invención pueden comprender un lipopéptido que presenta por lo menos un epítipo CTL y otro lipopéptido que comprende por lo menos un epítipo auxiliar. No obstante dichas micelas pueden contener también varios lipopéptidos diferentes que comprenden diferentes epítipos citotóxicos y diferentes lipopéptidos que presentan diferentes epítipos auxiliares.

20 Los motivos lipídicos de los lipopéptidos pueden ser independientemente uno o varios motivos en C₄ a C₁₈, y en particular una o varias cadenas derivadas de ácidos grasos, o de alcoholes grasos, en C₄ a C₁₈, eventualmente ramificadas e insaturadas o derivarse de un esteroide.

25 Pueden comprender una o dos cadenas lipídicas en C₄ a C₁₈ asociadas por enlace covalente a uno o dos aminoácidos de la parte peptídica. Pueden de este modo estar constituidas por dos cadenas de ácido palmítico ligadas a los grupos NH₂, alfa y epsilon de una lisina.

30 Estos motivos lipídicos pueden también estar constituidos por, o comprender un resto de ácido palmítico, de ácido 2-amino-hexadecanoico, de ácido oleico, de ácido linoleico, de ácido linoléico, de pimelautida, de trimexautida o un derivado del colesterol, o cualquier otro constituyente lipídico natural de las membranas celulares.

35 De manera ventajosa, los lipopéptidos que constituyen las micelas o los microagregados mixtos son hidrosolubles en una proporción de por lo menos el 30% (en peso). Estos lipopéptidos hidrosolubles poseen propiedades de tensioactivos catiónicos, apropiadas para ejercer un efecto solubilizante frente a otros lipopéptidos en medio ácido débil.

40 La parte no lipídica comprende por su parte entre 10 y 100, y preferentemente entre 10 y 50 aminoácidos. El número de aminoácidos depende del número de epítipos que constituye la parte no lipídica del lipopéptido y de sus dimensiones, de la naturaleza de la parte lipídica y de las proporciones de las partes lipídicas y no lipídicas.

De manera ventajosa, los epítipos HTL y CTL empleados son epítipos capaces de asociarse a varios HLA diferentes, o epítipos multivalentes ("promiscuous epitopes" en inglés).

45 El epítipo HTL empleado está preferentemente constituido por el péptido multivalente 830-843 de la toxina tetánica, QYIKANSKFIGITE.

La glutamina (Q) de esta secuencia puede eventualmente acetilarse.

50 Otros epítipos HTL multivalentes pueden ser el epítipo multivalente de la hemaglutinina (PREVOST-BLONDEL *et al.* 1995, *J. Virol.*, vol. 62, n° 12, páginas 8046-8055) o incluso el epítipo PADRE de secuencia AKFVAAWTL-KAAA (ALEXANDER *et al.*, 1994, *Immunity*, 1, 751).

El epítipo CTL puede por su parte ser cualquier epítipo capaz de activar linfocitos T citotóxicos CD8⁺.

55 Es preferentemente un epítipo CTL de una proteína presentada por una célula tumoral y en particular por un melanoma, de una proteína del VIH, del virus de la hepatitis B (VHB) o del papilomavirus, o incluso de la proteína p53.

Puede ser en particular uno de los epítipos siguientes:

60 - epítipos de la proteína BCR-ABL, resultantes de la transposición BCR-Abelson (leucemia mieloide crónica) tales como los mencionados en la tabla 1,

65 - epítipos de la proteína p53, tales como los mencionados en la tabla 2.

Los epítipos de la proteína p53 pueden ser además seleccionados en las secuencias 25-35, 63-73, 129-156, 149-156, 187-205, 187-234, 226-264 ó 249-264 de esta proteína.

ES 2 265 672 T3

- epítomos de las proteínas E₆ o E₇ del papilomavirus humano (VPH), tales como los mencionados en la tabla 3,
- epítomos de las proteínas del virus VIH-1 tales como los mencionados en la tabla 4,
- epítomos del melanoma o de otros tumores, tales como los mencionados en las tablas 5, 6 y 7 y en particular los epítomos del antígeno melan-A/mart-1 del melanoma.

5

Otros epítomos CTL plurivalentes que presentan una capacidad de asociación con los HLA de clase 1 pueden ser los comprendidos en el péptido 43-57 de HPV (GQAEPDRAHNIVTF) que contienen epítomos HLA A2, A24, B7 y B18.

Los epítomos CTL pueden incluso ser los de antígenos parasitarios, y en particular de *Plasmodium falciparum*.

15

Los microagregados o micelas mixtas de lipopéptidos según la presente invención pueden estar liofilizados, y después ser recuperados por cualquier tampón clínicamente aceptable para ser administrados a los pacientes en tratamiento, en particular a las personas a vacunar.

20

Pueden ser administrados por cualquier vía de administración empleada en terapéutica y a título no limitativo, por vía parenteral, percutánea, oral, sublingual o por nebulizado intrapulmonar.

25

Otro objeto de la presente invención es por tanto la utilización de estos lipopéptidos para la preparación de un medicamento o de una vacuna para la producción de una respuesta inmunitaria específica, y en particular, para la producción de una respuesta inmunitaria contra cánceres tales como el melanoma, los virus VIH y VHB, papilomavirus, la p53 o la malaria.

30

La presente solicitud tiene por objeto incluso una composición farmacéutica caracterizada porque contiene una cantidad farmacológicamente activa de uno o varios de los polipéptidos descritos anteriormente, así como excipientes farmacéuticamente compatibles.

35

Los lipopéptidos que forman las micelas según la presente invención pueden ser fabricados mediante cualquier procedimiento adecuado conocido por el experto en la materia. Pueden en particular obtenerse por los métodos Boc-bencilo o Fmoc-tertiobutilo, en particular como los descritos en la solicitud FR-90 15 870, cuyo contenido está incorporado como referencia a la presente solicitud.

40

La introducción de la cadena lipídica puede realizarse en fase sólida, tras la desprotección selectiva de la o las función(es) relacionada(s), tal como se describe en el artículo de DEPREZ *et al.* (1996, *Vaccine*, volumen 14, nº 5.375-382). La cadena lipídica puede ser introducida en la función ϵ -NH₂ de una lisina protegida en la función α -NH₂ por un grupo F-moc. La Fmoc-lys (Palm) obtenida puede utilizarse a continuación en la síntesis en fase sólida para elaborar el lipopéptido.

45

Las micelas y microagregados según la presente invención pueden obtenerse dispersando cada lipopéptido en una solución de ácido acético concentrado a aproximadamente 80% mezclando después las soluciones obtenidas de este modo.

50

La calidad de la disolución, es decir la dispersión eficaz en el estado molecular de cada lipopéptido antes de la preparación de la mezcla se verifica por el método de resonancia magnética nuclear en dos dimensiones (RMN2D). La resolución de la señal obtenida en las experiencias en dos dimensiones homonucleares en un campo de 600 Mhz confirma la dispersión completa, en estado molecular, de los lipopéptidos en solución. La transparencia de la mezcla no es un criterio suficiente: en particular, la recuperación de los polipéptidos por el DMSO o una mezcla de DMSO/agua no permite, en la mayoría de los casos, obtener este estado de dispersión, lo que explica la ineficacia de la mezcla estudiada por VITIELLO *et al.* (1995, citado anteriormente). La disolución por mezclas de ácido acético/agua más diluidas en ácido acético no permite ya preparar en todos los casos una mezcla de microagregados o micelas mixtas que comprende una proporción estadística de cada constituyente de la mezcla en estado de microvolumen. En estos dos casos, incluso en presencia de una mezcla aparentemente transparente, la filtración esterilizante sobre la membrana de 0,22 μ m es imposible o irregular, con rendimientos de filtración diferentes según los constituyentes, lo que significa que a escala de una partícula de estas dimensiones, no se obtiene la representación de cada uno de los constituyentes de la mezcla. Esta microheterogeneidad compromete la inmunogenicidad de la mezcla, puesto que compromete la captura y la presentación simultánea de todos los constituyentes por una sola célula presentadora del antígeno (CPA), en el caso de los epítomos CTL y HTL presentes en lipopéptidos distintos.

60

La presente invención está ilustrada, sin que por tanto esté limitada, por los ejemplos siguientes.

65

La figura 1 representa la estructura química de la resina de tipo KNORR-MBHA.

Las figuras 2 y 3 representan espectros de resonancia magnética nuclear en dos dimensiones (RMN 2D), respectivamente de un lipopéptido solo (lipopéptido ENV) y de una mezcla de lipopéptidos.

ES 2 265 672 T3

La figura 4 ilustra la respuesta auxiliar de ocho macacos inmunizados con una mezcla de lipopéptidos.

Las figuras 5A a 5F ilustran la respuesta citotóxica del macaco nº 109.

5 Las figuras 6A a 6D ilustran la respuesta citotóxica del macaco nº 129.

Las figuras 7A y 7B ilustran la respuesta citotóxica del macaco nº 127.

Las figuras 8, 9, 10 y 11 ilustran las respuestas citotóxicas de los macacos nº 102, nº 105, nº 120 y nº 125.

10 Las figuras 12A, 12B y 12C representan respectivamente las actividades citolíticas anti-N1, anti-G2 y anti-E de las PBMC, de las células CD8⁺ y de las células CD4⁺ del individuo V4.1.

15 En cuanto a la figura 13, ilustra la actividad citolítica de PBMC del individuo V4.5 recogida veinte semanas después del comienzo de la inmunización, estimulada *in vitro* con el péptido N2, analizada después su actividad CTL frente a la vacuna natural (WT) o de este mismo virus que expresa una proteína NEF recombinante (NEF, NEF-2, NEF-MN, NEF-A, NEF-ROD).

Ejemplo 1

20 *Preparación de micelas o microagregados según la invención*

1 - Descripción de los lipopéptidos empleados en la mezcla

denominación	fórmulas:	peso molecular
NEF 66	VGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLK (Pam)-NH ₂	3862,77
NEF117	TQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWYKLVPK (Pam)- NH ₂	4017,754
NEF182	EWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNK (Pam)- NH ₂	3451,04
30 GAG 183 NH ₂	DLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRK (Pam)-	3983,65
GAG 253	NPPIPVGEIYKRWILGLNKIVRMYSPTSILDK (Pam)- NH ₂ -	4063,05
ENV	TRPNNNTRKSIHGPGRAFYATGEIIGDIRQAHK (Pam)- NH ₂	4027,69

35 epítomos CTL representados

RPNNNTRKSI	HLA-B27	T Q G Y F P D W Q N Y	HLA-B62
PPIPVGGEIY	HLA-B35	Y F P D W Q N Y T	HLA-B17, B35
40 K R W I I L G L N K	HLA-B27	T P G P G V R Y P L	HLA-B7
L G L N K I V R M Y	HLA-B62	R Y P L T F G W	HLA-B27.2
Q V P L R P M T Y K	HLA-A3, A11, B27.2	Y P L T F G W C	HLA-B18
V P L R P M T Y	HLA-B35	A F H H V A R E L	HLA-B52
A V D L S H F L	HLA-B62	F L K E K G G L	HLA-B8
45 A V D L S H F L K	HLA-A11		

El conjunto de los epítomos representados permitía esperar la producción de respuestas CTL en una importante producción de la población humana, a condición de poder beneficiarse del efecto auxiliar de los epítomos HTL no definidos, pero muy probablemente presentes por simples razones estadísticas en cualquiera de los lipopéptidos a condición no obstante de reunir todos los epítomos, y por consiguiente, todos los péptidos constituyentes de la mezcla en cada microunidad de volumen.

2- Síntesis

55 Se ha seleccionado el enfoque en fase sólida, utilizando la estrategia Fmoc para la protección de la función a-amina y *t* Bu para la protección de las cadenas laterales. El protocolo utilizado es un protocolo estándar basado en los métodos de síntesis descritos por ATHERTON (*Solid-Phase synthesis a practical approach*. IRL press, 1989) y FIELDS y NOBLE (*Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1990, 35, 161-214).

60 La Fmoc-Lys(Palm)-OH está acoplada a una resina de tipo KNORR-MBHA (figura 1). Tras la desprotección de la función alfa-amina, se acopla el primer aminoácido (Fmoc-Leu-OH en el caso de NEF 66, por ejemplo). El agente de acoplamiento ha sido el TBTU (3 eq.) en presencia de DIPEA (4,5 eq.), verificando los acoplamientos mediante una prueba colorimétrica. Se ha realizado una acetilación sistemática después de obtener una reacción a esta prueba, para minimizar al máximo el riesgo de obtener péptidos por eliminación. Se repite esta sucesión de operaciones hasta que
65 se hayan introducido todos los aminoácidos constituyentes de la secuencia.

ES 2 265 672 T3

Después de la síntesis, y desprotección del grupo Fmoc terminal, los péptidos se desprotegen y escinden mediante una mezcla TFA/agua/DTT (NEF 66, ENV), TFA/agua/DTT/Ac-Trp-OH (GAG 183, GAG 253, NEF 117) o TFA/agua/EDT/Ac-Trp-OH (NEF 182).

5 Los péptidos se purifican cada uno en una columna Vydac C18 que se ha utilizado exclusivamente a este efecto, a temperatura ambiente, con un sistema disolvente agua-acetonitrilo, en tampón perclorato o TFA.

Se ponen a continuación en forma de acetato mediante intercambio de iones sobre columna Dowex SBR, después se liofilizan en ácido acético al 40%.

10 Cada péptido proviene de un lote único de síntesis y purificación. No se ha practicado ninguna operación de reciclado de fracciones de purificación.

3 - Estudios de solubilidad de lipopéptidos

15

3-1) Utilización de agua pura

Los péptidos NEF 66, NEF 117, NEF 182 y ENV pueden disolverse en agua pura, a concentraciones que alcanzan hasta 5 mg/ml. El péptido NEF 117 proporciona sin embargo una solución muy ligeramente opalescente. Los péptidos 20 GAG 182 y GAG 253 no son solubles en estas condiciones.

La mezcla de lipopéptidos sin embargo es soluble en agua pura, lo que indica una función potencialmente solubilizante de los lipopéptidos hidrófilos frente a los péptidos poco solubles.

25 3-2) Utilización del DMSO

La puesta en solución de los lipopéptidos se realiza frecuentemente con ayuda de soluciones acuosas de DMSO (sulfóxido de dimetilo). Este disolvente orgánico muy potente es compatible en efecto tras la dilución con la mayor parte de los ensayos biológicos realizados en células o en animales, es decir en el hombre. Se demuestra que la 30 utilización de DMSO es eficaz para una buena recuperación de los péptidos GAG 182 y GAG 253; las soluciones obtenidas se han podido diluir a continuación con agua para alcanzar una concentración final de 1 mg/ml en el DMSO al 20% en agua; en estas condiciones, la mayor parte de los péptidos dan soluciones transparentes, excepto GAG 183, para el que se obtiene una suspensión.

35 Es interesante subrayar que incluso en el caso de solución transparente, y a pesar de la compatibilidad del DMSO con los filtros Durapore, las soluciones de lipopéptidos en DMSO no son filtrables en filtros de porosidad 0,22 μm , porque imponen una presión incompatible con la resistencia mecánica de los filtros. Esta observación indica la formación de agregados de tamaño superior a 0,22 μm . En determinados casos, se ha observado incluso una imposibilidad de filtración en los filtros resistentes a los disolventes, de una porosidad de 1 μm , en razón de la formación de geles (esta 40 dimensión del filtro se utiliza en efecto para filtrar soluciones concentradas de lipopéptidos antes de la purificación por RP-HPLC).

3-3) Utilización de ácido acético concentrado al 25%

45 La realización de la etapa indispensable de filtración esterilizante necesita por consiguiente el empleo de un disolvente orgánico más apto para disociar los agregados, compatible después de la dilución con la liofilización, y no tóxico a dosis débil. Se ha probado el ácido acético.

50 En un primer momento, se ha puesto en acción una cantidad mínima de este disolvente, que está definida como la cantidad que permite la obtención de soluciones transparentes a concentraciones de 5 mg/ml: para los péptidos GAG 183 y GAG 253 se ha introducido el 25% de ácido acético; para los demás péptidos, se ha realizado una puesta en solución en agua pura.

55 Las soluciones se han sometido a un análisis por Resonancia Magnética Nuclear en un campo de 600 Mhz. Se ha comprobado que, a pesar de la aparente transparencia de las soluciones los lipopéptidos de esta serie, incluso los lipopéptidos más hidrófilos, forman agregados de tamaño importante que impiden este tipo de estudio, en ausencia de señales resueltas.

60 La puesta en solución en estas condiciones no permite la dispersión estática, en estado molecular, de cada uno de los constituyentes, a pesar de la aparente transparencia de las soluciones.

3-4) Utilización de ácido acético concentrado al 80%

65 La utilización de ácido acético concentrado al 80%, se ha probado a continuación. Los péptidos se han puesto en solución a una concentración de 1 mM en 1 ml de ácido acético al 80% (correspondiente a: NEF 66: 3,86 mg/ml; NEF 117: 4,02 mg/ml; NEF182: 3,45 mg/ml; GAG 183: 3,98 mg/ml; GAG 253: 4,063 mg/ml; ENV: 4,027 mg/ml).

ES 2 265 672 T3

Análisis de lipopéptidos por RMN de protón a 600 Mhz

Se han preparado muestras de lipopéptidos disolviendo los lipopéptidos en una solución de ácido acético (CD₃COOD, 99,5%, atom D. EURISO-TOP, Francia)/H₂O ; 80:20 (v:v). Se añaden 4 μ l de una solución 50 mM de TMSP [3-(trimetilsilil)-propano sulfonato de sodio] en D₂O para referenciar los desplazamientos químicos. La concentración final de cada péptido es de 1 mM en por lo menos 2 ml de disolvente, que se transfieren en tubos R.M.N. de 8 mm de diámetro (WILMAD 513A-7PP, Interchim, Francia).

Los espectros de R.M.N. del protón se han realizado en un espectrómetro RMN BRUKER DMX600 equipado con una sonda BBI 8 mm con gradiente z, a una temperatura de la muestra de 310°K.

Los experimentos en dos dimensiones homonucleares NOESY (Nuclear-Overhauser effect spectroscopy) según Kumar *et al.* (1980, *Biochem. Biophys. Res.; Comm.*, 95, 1-6) y TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) según Bax y Davis (1985, *J. Magn. Reson.*, 6, 355-360) y Griesinger *et al.* (1988 J.A.C.S., 110, 7870-7872) se han obtenido con 2.048 \times 512 puntos complejos y tratados tras la multiplicación en las dos dimensiones por un seno desplazado de $\pi/4$ con 2.048 \times 1.024 puntos, esto para una ventana espectral de 12 ppm. Los tiempos de mezcla eran de 300 ms para la NOESY y 160 ms para la TOCSY. Durante el tiempo de mezclado del TOCSY, se ha aplicado un MLEV 16 con un campo B1 de 7,8 Khz. A fin de estar en las mismas condiciones de temperatura, el tiempo de "spin-lock" de TOCSY se aplicó fuera de resonancia (+ o - 1 Mhz) en la NOESY. La supresión del agua se completa utilizando una ligera presaturación de esta señal durante el tiempo de reposo y el tiempo de mezcla de la NOESY.

El análisis por RMN en alto campo de las soluciones ha presentado señales perfectamente resueltas, lo que permite experimentos TOCSY-NOESY, y la atribución secuencial completa de cada lipopéptido. Este resultado significa la dispersión completa, a escala molecular, de lipopéptidos en ácido acético al 80%.

En la figura 2 se representa el espectro RMN 2D del péptido ENV. Los espectros de todos los péptidos se han podido obtener en las mismas condiciones y ser interpretados. A fin de verificar si la mezcla de las soluciones entre ellas no alteraba la dispersión de los lipopéptidos, se ha obtenido un espectro RMN 2D de la mezcla virtual, por superposición sobre una misma representación de 6 espectros obtenidos individualmente. Se ha comparado con el espectro RMN 2D obtenido efectivamente por mezclado de las soluciones (figura 3). La resolución de las señales ha sido comparable, comprobando que cada uno de los péptidos no ha alterado la solubilidad de los demás constituyentes de la mezcla.

El análisis de las secuencias ha necesitado una acumulación de señales durante 120 horas para cada lipopéptido, periodo en cuyo curso no ha podido detectarse ninguna alteración sensible de los péptidos, ni por RMN, ni por RP-HPLC. Esta observación ha permitido por tanto examinar la utilización de este disolvente para la solubilización de los lipopéptidos, su mezcla, tras la filtración, incluso con un tiempo de estancia del orden de 1 ó 2 horas, eventualmente necesaria en la manipulación de volúmenes relativamente importantes.

4 - Estudios de la etapa de filtración esterilizante

4-1) Lipopéptidos aislados

Se han realizado ensayos de filtración esterilizante a partir de soluciones de 5 mg/ml de cada lipopéptido en agua para los péptidos NEF 66, NEF 117, NEF 182 y ENV y en ácido acético al 25% para los péptidos GAG 183 y GAG 253. Los rendimientos de la filtración en 1 ml sobre filtros Millex GV SLGV 0130S (0,22 μ m) Millipore, seguido de una liofilización figuran en la tabla 8 (con la precisión de la dosis tomada).

Estos resultados están de acuerdo con los estudios de las soluciones realizadas por RMN, y dan indicaciones sobre el tamaño de los agregados o de las micelas detectadas: determinados péptidos forman agregados de tamaño superior a 0,22 μ m, y conducen por consiguiente a mezclas que comprenden microheterogeneidades y una captura simultánea poco probable a escala de la célula presentadora de los antígenos.

4-2) Preparación de diversas mezclas de lipopéptidos

a) Preparación del lote CK2. Mezcla simple de soluciones y obtención de una mezcla transparente, pero microheterogénea

Para la puesta en solución de los lipopéptidos y la preparación de la mezcla, se han mezclado entre ellas soluciones de aspecto totalmente límpido, a fin de evaluar la contribución eventual del carácter tensioactivo de los lipopéptidos ENV, NEF 66, NEF 117 y NEF 182. Las condiciones se resumen en la tabla 9.

Las soluciones obtenidas se han sometido a la acción de ultrasonidos para facilitar la dispersión de los agregados, se han mezclado para dar un volumen final de 5,5 ml, la mezcla se ha sometido de nuevo a la acción de ultrasonidos, después se ha diluido para 9,5 ml de agua para obtener una concentración final de aproximadamente 8% en ácido acético (AcOH), compatible con una liofilización de buena calidad. Esta solución, tras una última estancia en un baño con ultrasonidos, se ha filtrado en filtros Millex GV SLGV 0103S (0,22 μ m) de Millipore. Se han calculado los

ES 2 265 672 T3

rendimientos de la filtración de los péptidos en la mezcla para cada lipopéptido, para dar los resultados representados en la tabla 9 en la última columna (con la precisión de la dosificación tomada).

5 La heterogeneidad de los rendimientos según los péptidos demuestra la heterogeneidad de la solución. Cada péptido se comprende como si filtrase individualmente: este entendimiento es particularmente evidente con el péptido GAG 253, cuyo rendimiento de filtración a partir de esta solución al 8% de ácido acético es inferior al rendimiento de filtración observado cuando se filtra solo a partir de una solución al 25% de ácido acético. Este resultado confirma que, a pesar de la aparente transparencia de la mezcla en solución acética diluida, la mezcla entre los polipéptidos no ha proporcionado microagregados o micelas mixtas, incorporando especialmente los péptidos más hidrófobos. Los cambios de lipopéptidos entre micelas se hacen mal en estas condiciones, y la función tensioactiva de los polipéptidos ENV, NEF 66, NEF 117 y NEF 182 no puede manifestarse.

15 b) *Preparación del lote CK3: preparación de micelas o de microagregados mixtos que no comprenden heterogeneidad*

Para garantizar la mezcla real a nivel de cada microunidad de volumen de diferentes lipopéptidos, se ha seguido una estrategia diferente:

- 20 - cada lipopéptido se ha puesto en solución en ácido acético al 80% a fin de aprovechar las propiedades disociadoras de este disolvente.
- 25 - a fin de aprovechar las propiedades de tensioactivo catiónico alcanzadas los péptidos ENV, NEF 66, NEF 117 y NEF 182 en medio ácido débil en la etapa de dilución, se han dispersado los lipopéptidos en solución de ácido acético al 80% según el reparto siguiente: 1: ENV, 2: NEF 66, 3: NEF 117, 4: NEF 182, terminando por la dispersión de los dos lipopéptidos más hidrófobos en una solución ya concentrada en agentes disociantes: ácido acético y detergentes catiónicos. El quinto lipopéptido producido ha sido GAG 183 y el sexto: GAG 253. Los ultrasonidos se utilizan en cada etapa para asegurar una dispersión eficaz de los agregados.

30 Se mezclan las soluciones, después se filtran en filtros Millex GV SLGV 0130S (0,22 μ m). La filtración necesita una presión más débil que en la filtración de la solución al 8%. Los recipientes utilizados y el filtro se enjuagan a continuación con agua, en cantidad suficiente para obtener una concentración final en ácido acético del 8% (volumen final 15 ml como anteriormente), a fin de asegurar la calidad de la etapa de liofilización. Los rendimientos de la filtración de los péptidos en la mezcla se han calculado para cada lipopéptido, para dar los resultados proporcionados en la tabla 10 en la última columna (con la precisión de la dosis tomada).

35 La homogeneidad de los rendimientos confirma la homogeneidad de la solución resultante de la dispersión a escala molecular en el momento de la dispersión en ácido acético concentrado. La dilución ulterior no puede participar en un reagrupamiento de cada péptido en entidades monovalentes, en aplicación de la ley de la entropía. Este método de preparación de la mezcla ha permitido por consiguiente la obtención de micelas mixtas, comprendiendo cada una necesariamente una representación estadística de cada lipopéptido. Las propiedades tensioactivas de los lipopéptidos pueden ejercerse y garantizar la solubilidad en agua de las dosis de vacunas tras la liofilización así como la estabilidad de las soluciones durante el tiempo de las manipulaciones.

45 c) *Preparación del lote CK9*

El procedimiento utilizado es el mismo que para el lote anterior, en las cantidades tomadas. La solución del péptido (20 mg/ml en ácido acético al 80%) se ha filtrado 4 veces, con cambio de filtro antes de su saturación, utilizando membranas idénticas (unidades estériles STERIVEX GV 0,22 μ m Durapore (Millipore), a continuación se completa con agua utilizada para enjuagar los filtros y diluir. El volumen final alcanzado era de 1.516 ml (de los cuales 154 ml son de ácido acético: solución final al 10%). El volumen de reparto fue de 1,3 ml por dosis. Las dosis repartidas se han liofilizado y dosificado utilizando un método de dosificación validado por HPLC. El rendimiento de filtración para cada lipopéptido se indica más adelante en la Tabla 11, y tiene en cuenta la sensibilidad de dosificación de cada lipopéptido.

55 En la preparación de este lote, se observa todavía una buena homogeneidad de rendimientos de filtración que confirma la formación de micelas o de microagregados mixtos, comprendiendo cada microunidad una proporción equivalente de cada constituyente de la mezcla.

60 La mezcla tras la dilución y liofilización proporciona un polvo blanco que forma una torta compacta y homogénea, muy fácilmente redisoluble en agua pura, o en un disolvente capaz de restablecer la osmolaridad de la solución (glucosa al 5%, manitol al 5%). La solución presenta una opalescencia muy ligera. El pH obtenido en la redisolución por un disolvente no tamponado es de 4,90. La elevación del pH de 1 punto provoca la formación lenta de un precipitado. Este entendimiento contribuye a la formación de un depósito en el momento de la inyección subcutánea o intramuscular.

65 d) *Ensayo de uniformidad de contenido en el lote CK9*

Según la Farmacopea, los polvos para utilización parenteral se someten a la obligación de uniformidad de contenido. El ensayo debe realizarse en 10 unidades tomadas al azar, para las cuales se realiza individualmente una

ES 2 265 672 T3

dosificación del principio activo mediante un método analítico apropiado. La preparación satisface el ensayo si el contenido de cada unidad está comprendido entre 85 y 115% del contenido medio.

5 El ensayo se ha realizado en 15 muestras tomadas al azar, redisueltas y diluidas en ácido acético al 80% según un procedimiento operatorio normalizado, de manera que se inyecte una proporción siempre idéntica de aproximadamente 15 µg, definida en el momento de la obtención de la recta patrón. Cada muestra se ha inyectado tres veces, correspondiendo la dosis de cada principio activo a la media de tres valores obtenidos.

10 Los valores obtenidos figuran en la tabla 12 a continuación. El reparto de los valores es claramente estadístico. Se observa todos los valores en el interior de un espacio definido por una prueba bilateral con un $P = 0,975$ (salvo tres valores aberrantes, encontrados todos en el frasco nº 1, pudiendo corresponder a un error de dilución). Los valores mínimos y máximos definidos se sitúan en el interior de límites impuestos por la Farmacopea (la desviación observada se sitúa entre 4 y 14,95% según los péptidos, variación ligada a la imprecisión inherente a la dosificación).

15 La ausencia de microheterogeneidad de la solución se confirma por el hecho de que se satisfacen las dosis de vacunas repartidas en el ensayo de uniformidad de contenido.

Ejemplo 2

20 *Preparación de una mezcla de lipopéptidos (SIV-Mortara 1) y ensayo de inmunogenicidad en el macaco*

1) Preparación del lote SIV-Mortara 1

25 Este lote de pequeño tamaño se ha preparado para realizar un estudio preclínico en el macaco, para verificar la tolerancia y la inmunogenicidad. Este lote resulta de la mezcla de los polipéptidos siguientes:

denominación fórmulas:

30	NEF 101	SVRPKVPLRAMTYKLAIDMSHFIKEKK(Pam)-NH ₂
	NEF 125	EKGGLEGIYYSARRHRILDMYLEK(Pam)- NH ₂
	NEF155	DWQDYTSGPGIRYPKTFGWLWKLVK(Pam)- NH ₂
35	NEF 201	SKWODPWGEVLAWKFDPTLAYTYEAK(Pam)- NH ₂
	NEF221	YTYEAYARYPEELEASQACQRKRLEEGK(Pam)- NH ₂
	GAG165	KFGAEVVPGFQALSEGCTPYDINQMLNCVGDK(Pam)- NH ₂
40	GAG246	QIQWMYRQQNPVGNIRRRWIQLGLQKVRMYNPTNK(Pam)- NH ₂
	TT	Ac-QYIKANSKFIGITELKKK(Pam)- NH ₂

45 Su mezcla se ha realizado a partir de soluciones en ácido acético concentrado, como en la preparación del lote CK3.

2) Inmunogenicidad en el macaco

50 a) Materiales y métodos

Los macacos, enumerados respectivamente 102, 105, 109, 117, 120, 125, 127 y 129 se han inmunizado por inyección subcutánea del lote preparado anteriormente (500 µg), en agua esterilizada y se han reinyectado en un plazo de treinta días y de sesenta días.

55 Estas inmunizaciones se han efectuado de acuerdo con las directivas de la Unión Europea.

Obtención de líneas CTL

60 Se han aislado células sanguíneas (PBMC) por centrifugación en un gradiente de densidad a través de un medio de separación de linfocitos (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Se han utilizado inmediatamente, o se han almacenado a -180°C en nitrógeno líquido. Las líneas CTL anti-péptido se han obtenido cultivando las PBMC de monos (2×10^6 células/ml) en placas de microvaloración, en RPMI 1640 enriquecido con penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 µg/ml), glutamina (2 mM), aminoácidos no esenciales (1%), piruvato de sodio (1 mM), tampón HEPES (10 mM), 2-mercaptoetanol (2×10^{-5} M) y suero de ternera fetal inactivado por el calor (FCS) al 10%.

ES 2 265 672 T3

Se ha añadido en cada uno de los pozos la mezcla de siete péptidos libres, es decir sin motivo lipídico (5 μm de cada uno) correspondiente a las secuencias lipopeptídicas.

5 Las placas se han incubado entonces durante tres días a 37°C y se ha añadido interleucina-2 en cada placa (10 UI/ml).

Después de siete y catorce días, se han estimulado las células efectoras añadiendo nuevas PBMC autólogas, que se han puesto en contacto durante dos horas con la mezcla de péptido (5 μm de cada una), después se han lavado e irradiado (4.000 rads).

10

Puesta en evidencia de la proliferación de linfocitos T

15 Las células PBMC (2×10^5 en 200 μl por pocillo) se han cultivado en placas que contienen 1 $\mu\text{g/ml}$ de lipopéptido TT (830-846), y 10 $\mu\text{g/ml}$ del péptido extraído de la toxina tetánica (TT).

15

Tras cinco días de cultivo, se ha añadido 1 μCi de [^3H]TdR en cada pozo y se ha proseguido la incubación durante dieciocho horas. Las células se han recogido entonces con ayuda de un recogedor automático de células, después se ha cuantificado la incorporación de la timidina tritiada con ayuda de un contador de centelleo.

20

Análisis fenotípico de las líneas celulares CTL

El fenotipo de las líneas celulares se ha determinado el día en que se ha efectuado la prueba de consumo de cromo, incubando las células con anti-CD4 conjugados en FITC (OKT4, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ) y con un anti-CD8 conjugado con ficoeritrina (Leu-2a, Becton Dickinson, Mountain View, CA) durante treinta minutos a 4°C. 25 Se han lavado las células con tampón PBS después de determinar el porcentaje de células coloreadas con ayuda de un citómetro de flujo Epics Elite (Coulter, Margency, Francia). Se han utilizado como testigos los anticuerpos que presentan una mezcla de isótopos.

30

Transformación in vitro de líneas celulares B (B-LCL)

Se han obtenido líneas celulares B (B-LCL) incubando diluciones en serie de PBMC con ayuda del sobrenadante de la línea celular S 594. Esta línea está infectada por el virus del herpes de babuino que inmortaliza las células (*herpes virus papio*). Las B-LCL se han cultivado a continuación en medio de cultivo enriquecido con 10% de FCS.

35

Prueba de consumo del cromo

Se han sensibilizado células diana con los péptidos. 10^6 células B-LCL se han incubado ya sea durante la noche o durante 1 hora, respectivamente con péptidos largos o cortos (gama de concentración 10^{-5} M- 10^8 M) a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO_2 . A fin de obtener las células diana que presentan los productos del gen SIVmac, se han incubado las B-LCL a una concentración de 10^6 células/ml con un virus de la vacuna recombinante (20 PFU/célula) durante dieciocho horas en las mismas condiciones. Las BLCL se han lavado y marcado a continuación con 100 μm Ci $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (NEN Life Science Products, Courtaboeuf Les Ullis, Francia) durante 1 hora, se ha lavado dos veces y utilizado como células diana. El consumo de ^{51}Cr se ha efectuado en placas de microvaloración. Se ha medido la actividad citolítica de las líneas celulares anti-SIV mezclando 5×10^3 células diana marcadas con cromo 45 con células efectoras, en relaciones diversas de células efectoras/células diana, en un volumen final de 200 μl /pozo. Las placas se han incubado durante 4 horas a 37°C, a continuación se han tomado 100 μl de sobrenadante en cada pocillo y se han analizado en un contador de rayos gamma.

El consumo espontáneo del cromo se ha determinado incubando las células diana con medio solo. No excede nunca del 20% de cromo total incorporado.

50

El consumo específico de cromo se ha medido de la manera siguiente:

55

$$100 \times (\text{cpm experimentales} - \text{cpm espontáneo}) / (\text{cpm máximo} - \text{cpm espontáneo})$$

La variación en el interior de una muestra no excede nunca del 5%.

b) Resultados

60

La figura 4 ilustra la respuesta T auxiliar de ocho macacos.

Las figuras 5 a 11 ilustran la respuesta citotóxica de los macacos.

En la tabla 13 se resumen los resultados de las inmunizaciones con diversos péptidos.

65

Demuestran que siete de los ocho macacos examinados reconocían diversos péptidos, los macacos n° 109, 129 y 127 muestran una respuesta particularmente importante.

ES 2 265 672 T3

La eficacia de la producción de una respuesta CTL confirma que las CPA de los animales han podido capturar y presentar uno y varios epítomos CTL, y simultáneamente el epítomo auxiliar está muy presente en la anatoxina tetánica y es reconocido por determinados animales.

5 Ejemplo 3

Preparación de una mezcla de lipopéptidos (lote HG 1) con vistas de un análisis clínico en el hombre

10 Una mezcla de lipopéptidos se ha definido con vistas de la realización de un análisis clínico (VAC10), que asocia en el seno de micelas el mismo péptido TT con secuencias seleccionadas sobre el principio de selección desarrollado para VAC04 (existencia de uno o varios epítomos CTL por secuencia).

- 15 - la cisteína del péptido NEF117 se ha sustituido por una leucina: después de la síntesis y análisis en la prueba celular de varios análogos del nonapéptido epítomo CTL que encierra este aminoácido, se ha observado en efecto que esta sustitución era posible; esta modificación permite evitar los problemas de estabilidad debidos a la formación del puente disulfuro.
- 20 - el péptido GAG 17 se ha seleccionado entre otros candidatos por su carácter netamente tensioactivo catiónico susceptible de ayudar al mantenimiento en solución de otros péptidos, y en particular de GAG253, siempre presente en la mezcla, en razón de su inmunogenicidad en el hombre.

La composición de esta mezcla en la que Pam representa un motivo derivado del ácido palmitoico y Ac el grupo acetilo, es la siguiente:

25	GAG 17	EKIRLRPGGKKKYKLVK K (Pam)-NH ₂
	GAG 253	NPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPSILD K(Pam)-NH ₂
	POL 325	AIFQSSMTKILEPFRKQNPDIYQYMDDLY K(Pam)-NH ₂
30	NEF 66	VGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGL K(Pam)-NH ₂
	NEF 116	HTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWLYKL K(Pam)-NH ₂
35	TT	Ac-CIYIKANSKFIGITELKK K(Pam)-NH ₂

El conjunto de estos péptidos se ha sintetizado como se indica en los ejemplos anteriores. La mezcla de soluciones se ha realizado en una muestra de 5 mg de cada péptido, disuelto en una concentración de 20 mg/ml en ácido acético al 80%, mezclado a continuación en el orden siguiente: 1 : GAG17; 2 : NEF66; 3 : NEF116; 4 : TT; 5 : GAG253; 6 :
40 POL 325.

Los rendimientos de la operación de filtración de las soluciones de ácido acético concentradas, seguida de una dilución por agua se han demostrado comparables a los rendimientos observados para las mismas operaciones con la mezcla CK3 (con precisión de la dosis tomada). La homogeneidad de las solubilidades y de los comprendimientos
45 frente a la filtración esterilizante a pesar de las heterogeneidades de comprendimiento químico en estado individual traduce la formación de micelas mixtas.

Ejemplo 4

50 *Preparación de una mezcla de lipopéptidos derivados del antígeno LSA3 con vistas de un análisis preclínico de vacunación contra el estado intrahepático de Plasmodium falciparum, realizado en el ratón y el chimpancé, después de un ensayo clínico en el hombre*

55	LSAE CT1	LLSNIEEPKENIIDNLLNNIK(Pam)-NH ₂
	LSA3	NRI Ac-DELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQK(Pam)-NH ₂
	LSA3	NR II Ac-LEESOVNDDIFNSLVKSVQQEQQHNVK(Pam)-NH ₂
60	LSA3	RE K(Pam)VESVAPSVEESVAPSVEESVAENVEESVAENV-NH ₂

El conjunto de estos péptidos se ha sintetizado como se indica en el ejemplo 1. La mezcla de las soluciones se ha realizado en una muestra de 5 mg de cada péptido previamente disuelto a una concentración de 20 mg/ml en ácido acético al 80%, mezclados a continuación en el orden siguiente: 1 LSA3 NRI; 2:LSA3 NR II; 3:LSA3 CT1; 4:LSA3
65 RE. Los rendimientos de la operación de filtración de las soluciones de ácido acético concentrados, seguido de una dilución con agua, se han demostrado comparables para todos los lipopéptidos.

ES 2 265 672 T3

Ejemplo 5

Estudio de la respuesta inmunitaria en el hombre tras la inyección de micelas del lote CK9

5 1. *Materiales y métodos*

Micelas utilizadas

Las micelas que se han inyectado se han obtenido tal como se describe en el ejemplo 1 para el lote CK9.

10

Péptidos largos y péptidos cortos

Se han sintetizado los péptidos largos siguientes que corresponden a los lipopéptidos inmunógenos (las posiciones de los aminoácidos en las proteínas NEF, GAG y ENV se indican entre paréntesis): N1 (NEF 66 a 97), N2 (NEF 117 a 147), N3 (NEF 182 a 205), G1 (GAG 183 a 214), G2 (GAG 253-284) y E (ENV 303 a 335).

15

Los péptidos cortos siguientes que recubren las secuencias de lipopéptidos, ya conocidos por ser epítomos CTL mínimos, han sido sintetizados por Neosystem (Estrasburgo, Francia):

20

NEF 121-128, NEF 137-145, NEF 184-191 y NEF 195-202 restringidos a HLA-A1.

NEF 136-145, NEF 190-198 y GAG 183-191 restringidos a HLA-A2.

25

NEF 73-82, NEF 84-92 y EBN 416-424 HLA restringidos a HLA-A11.

NEF 90-97 y NEF 182-189 restringidos a HLA-B8.

NEF 134-141 y GAG 263-272 restringidos a HLA-B27.

30

NEF 135-143 restringidos a HLA-B18.

Protocolo de inmunización

Se han inmunizado voluntarios por inyección subcutánea de micelas, o de seis lipopéptidos correspondientes, en presencia de adyuvante QS21. Los lipopéptidos o las micelas se han inyectado de manera diferente en función de los individuos.

35

Los voluntarios V4.6, V4.15, V4.16, V4.17, V4.18 y V4.28 se han inmunizado con los seis lipopéptidos en forma de micelas.

40

El voluntario denominado V4.6 ha recibido 250 μg de cada uno de los lipopéptidos.

Los voluntarios denominados V4.15, V4.16, V4.17, V4.18 y V4.28 se han inmunizado con 500 μg de cada uno de los seis lipopéptidos.

45

Los voluntarios V4.5, V4.1, V4.19, V4.21, V4.32 y V4.34 se han inmunizado con los seis lipopéptidos en presencia de adyuvante QS21.

50

El voluntario V4.5 ha recibido 100 μg de 6 lipopéptidos, mientras que los voluntarios V4.1, V4.19, V4.21, V4.32 y V4.34 han recibido cada uno 500 μg de seis lipopéptidos.

Todos los voluntarios se han inmunizado tres veces con la mezcla de seis lipopéptidos, efectuándose las dos últimas inyecciones 4 semanas y 16 semanas respectivamente después de la primera inyección.

55

Se han recogido muestras de sangre después de la primera inyección (denominada más adelante semana 0) y 20 semanas después de la primera inyección (semana 20).

Se han aislado células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por métodos clásicos y se han congelado.

60

Detección por ELISA de los anticuerpos anti-péptidos del VIH, de tipo inmunoglobulina G (IgG)

Se han recubierto pocillos de placas de poliestireno con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de péptidos (N1, N2, N3, G1, G2 o E) durante una noche a 4°C. La saturación se ha efectuado con ayuda de una solución de PBS que contiene 0,1% de Tween 20 y 3% de suero de albúmina bovino (BSA). Se han incubado sueros diluidos (1/100) en los pocillos recubiertos durante una noche a 4°C y los anticuerpos ligados se han detectado con ayuda de IgG de cabra anti-humana conjugadas con la fosfatasa alcalina (1/5.000, Sigma). La actividad de la fosfatasa se ha medido utilizando el fosfato de 4-metilumbeliferilo como sustrato (Sigma) y se ha efectuado la medida de la fluorescencia a 360/460 nm en un Cytofluor 2300 (Millipore).

65

ES 2 265 672 T3

Medida de las respuestas celulares T dirigidas contra péptidos del VIH

Se han cultivado PBMC (10^5 por pocillo) en un medio completo con $1 \mu\text{g/ml}$ o $0,2 \mu\text{g/ml}$ de péptidos solubles (N1, N2, N3, G1, G2 o E). La proliferación se ha determinado después de 5 días de cultivo añadiendo $1 \mu\text{Ci/pocillo}$ de timidina tritiada (NEN, París) 12 horas antes de su recogida.

Se ha verificado la capacidad de las PBMC para proliferar *in vitro* con ayuda de cultivos independientes efectuados durante 5 días con fitohemaglutinina A (PHA) del PPD (Tuberculin purified derivate Référence Statens Serumins Institute n° 2390) de la toxina tetánica (TT) y del SEB (enterotoxina B del estafilococo dorado, referencia SIGMA S4881), respectivamente a $1 \mu\text{g/ml}$ y $10 \mu\text{g/ml}$.

La eliminación de los linfocitos T CD4^+ y CD8^+ de las PBMC se ha efectuado con ayuda de inmunoglobulinas anti-ratón y mediante activación del complemento. En resumen se han incubado 10^7 PBMC en 1 ml de medio desprovisto de suero de albúmina bovina durante 30 minutos a 4°C con $2 \mu\text{g}$ de anticuerpos monoclonales OKT4 u OKT8 (Orthodiagnostic Systems).

Se ha añadido 1 ml de complemento de suero de conejo diluido (Hoechst Behring, RUEIL, Francia) durante 45 minutos a 37°C . La suspensión celular se ha lavado dos veces a fin de eliminar el complemento no ligado. Las células resuspendidas se han analizado utilizando la citometría de flujo. El análisis de los fenotipos con ayuda de anticuerpos anti- CD4^+ y anti- CD8^+ se ha efectuado a fin de verificar el enriquecimiento. Finalmente, las células resultantes de la eliminación de las células CD4^+ y CD8^+ se han determinado en una prueba de proliferación.

Obtención de líneas celulares CTL

La estimulación *in vitro* de las PBMC se ha efectuado mezclando 10^6 PBMC (células que responden al tratamiento) con 10^6 células estimulantes irradiadas (PBMC autólogas incubadas durante 2 horas a diferentes péptidos) en un medio de cultivo RPMI completo (RPMI 1640 completado con 100 U/ml de penicilina, $100 \mu\text{g/ml}$ de estreptomina, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, Hepes 10 mM, aminoácidos no esenciales y 10% de suero de albúmina bovino inactivado térmicamente).

Se han añadido 10 U/ml de interleucina-2 después de 3 días. Las células que responden al tratamiento se han vuelto a estimular cada semana durante 3 ó 4 semanas con ayuda de péptidos incubados con PBMC autólogas (preparadas de la misma manera que el día 0), en un medio enriquecido con 10 U/ml de interleucina-2. Después de 3 ó 4 estimulaciones, las células CTL se han ensayado utilizando como diana la línea celular autóloga EBV incubada durante la noche con $10 \mu\text{g}$ de diferentes péptidos (N1, N2, N3, G1, G2 o E) para 10^6 células.

Para obtener células diana que presenten los productos del gen HIV, se han infectado las células diana EBV, a razón de 10^6 células/ml con un virus de la vacuna de tipo natural (WT) o con virus de la vacuna recombinantes HIV-1/LAI, HIV-1/MN, HIV/A o HIV/ROD NEF; durante una noche (20 PFU/células).

Las diferentes células diana se han lavado a continuación y marcado con $100 \mu\text{Ci}$ de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (NEN Life Science Products, Les Ullis, Francia).

Se ha medido la actividad citolítica en una prueba de consumo de ^{51}Cr , durante 4 horas. El consumo espontáneo medio no excede del 20% de la incorporación total de ^{51}Cr .

Los resultados se expresan de la manera siguiente:

consumo específico de cromo = $100 \times (\text{número de golpes medidos/número de golpes espontáneos por minuto}) / (\text{número máximo de golpes por minuto} - \text{número de golpes espontáneos por minuto})$

La eliminación de las células CD4^+ o CD8^+ a partir de las PBMC se ha efectuado como se describió anteriormente.

Prueba ELISPOT interferón- γ

Se han recubierto placas de nitrocelulosa de 96 pocillos (MultiScreen-HA, Millipore S.A., Molsheim, Francia) con $5 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpos de ratón anti-interferón- γ humano, en tanto que anticuerpos de captura (Genzyme Corporation, Cambridge, Massachussets, USA) durante una noche a 4°C .

Después del lavado, se han saturado los pozos con medio completo RMPI y las PBMC aisladas recientemente, o conservadas en frío, se han añadido (2×10^5 células por pocillo) con diferentes péptidos correspondientes a epítomos mínimos CD8^+ ($10 \mu\text{g/ml}$).

Después de 24 horas de incubación a 37°C en una incubadora (5% de CO_2), se han lavado e incubado las placas durante 2 horas con $100 \mu\text{l}$ de anticuerpos policlonales de conejo anti-interferón- γ humano (1/250, Genzyme). Después del lavado, se ha incubado un conjugado anti-IgG de conejo-biotina (1/500, Boehringer Mannheim Francia S.A.,

ES 2 265 672 T3

Meylan, Francia) durante 1 hora. Por último, se ha añadido extravidina marcada por fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich Chimie S.A.R.L. St. Quentin Fallavier, Francia) durante 1 hora.

5 Se han añadido 100 μ l de sustrato cromogénico de la fosfatasa alcalina (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) para desarrollar las manchas. Se han contado a continuación las manchas azules utilizando un microscopio.

El testigo negativo consiste en las PBMC incubadas solas en el medio, o incubadas con un péptido correspondiente a un epítipo CD8⁺ derivado del virus VIH presente para las HLA adaptadas.

10 El testigo positivo consiste en activar las PBMC con 50 mg/ml de PMA (miristato acetato de forbol, referencia SIGMA P 8139) y 500 ng/ml de yonomicina (se han añadido 100 a 300 PBMC por pocillo).

Este fuerte estímulo mitógeno permite medir la viabilidad de los linfocitos T y comprobar de este modo la calidad de su conservación en frío.

15 2. Resultados

Tolerancia del tratamiento

20 Los efectos secundarios resultantes de la inyección de los lipopéptidos han resultado poco consecuentes. Se ha observado una reacción epidérmica en el lugar de la inyección. Las reacciones locales consisten en pequeños eritemas que no duran más que 24 a 48 horas. En ningún caso estos efectos han sido asociados con síntomas sistémicos. Estas observaciones indican que los lipopéptidos son bien tolerados en los individuos normales.

25 *Inducción específica de una respuesta humoral contra péptidos del VIH-1*

Se han recogido muestras de suero antes del comienzo de la vacunación (semana 0) y a la vigésima semana, después de la tercera inyección.

30 Se han analizado por ELISA los sueros de los voluntarios inmunizados para la presencia de anticuerpos IgG dirigidos contra péptidos de NEF (N1, N2, N3), GAG (G1, G2) y ENV (E).

No se ha detectado ninguna IgG específica de los péptidos del VIH antes de la inyección en los doce pacientes presentados en la tabla 14.

35 En la vigésima semana, los anticuerpos IgG anti-N1 se han detectado solamente en cinco de los pacientes vacunados (V4.6, V4.28, V4.1 (SQ21), V4.32 (QS21) y V4.34 (QS21)) y se han detectado anticuerpos IgG anti-N2 en los sueros de diez sujetos, entre los doce vacunados. No se ha detectado ningún anticuerpo de tipo IgG anti-N3. El título en los anticuerpos anti-N2 es negativo en los sueros de los individuos V4.17 y V4.18. El título en los anticuerpos es tres a cinco veces superior al testigo negativo en los sueros de V4.15, V4.16, V4.1 (QS21), V4.5 (QS21) y V4.21 (QS21). El título en anticuerpos es de 5 a 10 veces superior al del testigo negativo para los sueros de individuos V4.6, V4.19 (QS21) y V4.28. Finalmente, los sueros de los pacientes V4.32 (QS21) y V4.34 (QS21) presentan un título de anticuerpo por lo menos 10 veces superior al del testigo negativo.

45 Después de 3 inyecciones, no se ha detectado ningún anticuerpo IgG anti-G1, pero se han detectado los anticuerpos IgG anti-G2 en los sueros de los 12 individuos vacunados. El título en anticuerpo anti-G2 es 2 a 3 veces superior al testigo negativo para el paciente V4.18 (QS21), el título en anticuerpos es 5 a 10 veces superior al testigo negativo para los individuos V4.16, V4.17, V4.5 (QS21) y V4.19 (QS21) y V4.21 (QS21). Los sueros de los pacientes V4.6, V4.15, V4.28, V4.1 (QS21), V4.32 (QS21) y V4.34 (QS21) presentan un título en anticuerpos más de diez veces superior al testigo negativo. Los sueros de 6 de los 12 individuos examinados, V4.28, V4.1 (QS21), V4.5 (QS21), V4.19 (QS21), V4.32 (QS21) y V4.34 (QS21) contienen anticuerpos anti-E específicos.

Respuesta T celular auxiliar específica de los péptidos del virus VIH-1

55 Las respuestas proliferantes frente a péptidos solubles obtenidas con las células PBMC de diferentes individuos vacunados aparecen en la tabla 15.

60 Los péptidos NEF, GAG y ENV llevan consigo una proliferación en las PBMC de donantes solamente, después de la vacunación. Las PBMC de individuos inmunizados con lipopéptidos (con o sin el adyuvante QS21) proliferan por lo menos contra un péptido después de 20 semanas, (4 semanas después de la tercera inyección para 8 sujetos de los 10 presentados en la tabla 15).

No se observa ninguna proliferación para las PBMC de los individuos V4.15 y V4.17.

65 Las PBMC del individuo V4.6 proliferan en respuesta a los péptidos N3, G1 y G2 con un índice de proliferación comprendido entre 4 y 10. Se observa una producción de la proliferación en respuesta a G1, G2 y E con las PMBC del individuo V4.16. Las PBMC del individuo V4.28 son capaces de proliferar en respuesta a los péptidos N1, N3, G2 y E. Una respuesta proliferante, contra los péptidos N1, G2 y E se observa para las PBMC del individuo V4.5 vacunado.

ES 2 265 672 T3

Se observa una fuerte proliferación en respuesta a los péptidos N1, G2 y E con las PBMC del individuo V4.19 (QS21), que son además también capaces de proliferar en presencia de N2 y N3.

5 Las PBMC del individuo V4.21 proliferan en presencia de N1 y de G2, mientras que las del individuo V4.32 proliferan solamente en presencia de G2.

Una respuesta proliferante se observa en presencia de N1, N3, G2 y E con las PBMC del individuo V4.34 (QS21).

10 De manera global la tercera inmunización con los lipopéptidos produce una respuesta proliferante contra el péptido N1 para cinco de los diez sujetos tratados, contra N2 para uno de los diez sujetos tratados, N3 para cuatro de los diez sujetos tratados, G1 para dos de los diez sujetos tratados, G2 para ocho de los diez sujetos tratados y finalmente E para cinco de los diez sujetos tratados.

15 Los experimentos de eliminación efectuados con las PBMC de diferentes individuos vacunados muestran que la proliferación de las PBMC recuperadas después de veinte semanas se hace preferentemente por intermedio de las células T CD4⁺ auxiliares.

Producción de la actividad CTL específica del VIH

20 Las PBMC obtenidas antes y después de las inmunizaciones han sido estimuladas *in vitro* y analizada su actividad CTL específica del VIH.

Los resultados de los experimentos representativos se presentan en la tabla 16.

25 La actividad CTL específica se ha determinado contra la línea celular EBV autóloga, incubada con o sin los péptidos NEF, GAG, ENV. No se ha detectado ninguna respuesta anti-HIV con las PBMC recuperadas antes de la inmunización. Se ha detectado una actividad específica CTL en las PBMC recogidas tres semanas después de la inmunización en nueve de los doce individuos.

30 La tabla 16 resume la actividad citotóxica de ocho de los individuos vacunados, estando representada en la figura 12 la actividad de otro de estos individuos.

Por lo menos un péptido contenido en la vacuna linfopeptídica produce células efectoras CTL específicas que reconocen péptidos HIV.

35 Por ejemplo las PBMC del individuo V4.6 que reconocen en una prueba citotóxica las células EBV autólogas impulsadas con los péptidos G2 y E. Las PBMC del individuo V4.16 que reconocen el péptido N3 y E. El porcentaje de lisis es variable, débil para el individuo V4.16 que reconoce el péptido N3, intermedio para el individuo V4.18 con el péptido N1 y fuerte para el individuo V4.5 (QS21) con los péptidos N2 y G2.

40 Obsérvese que una actividad CTL específica se generaba también contra péptidos que contienen un epítipo mínimo CD8⁺ HIV (individuos V4.16 y V4.28).

45 A fin de evaluar si las células efectoras son linfocitos T CD8⁺, como puede conseguirse de ello para los CTL específicos de antígenos restringidos de clase I, los linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺ han sido eliminados de las PBMC y se ha efectuado una prueba de citotoxicidad.

50 En los experimentos representativos efectuados con las PBMC del individuo V4.1 (figura 12), se ha observado una lisis eficaz de las células EBV autólogas incubadas con péptidos del VIH, para las PBMC y las células CD8⁺. El enriquecimiento en células CD8⁺ permite aumentar el porcentaje de lisis específica. Estos resultados confirman que la actividad citotóxica anti-HIV pasa por el intermedio de los linfocitos T CD8⁺.

55 Es también importante determinar si estos linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocen y lisan células infectadas por virus.

También en las PBMC del individuo V4.5 recogidas 20 semanas después de la inmunización y estimuladas *in vitro* con el péptido N2 se ha determinado su actividad CTL contra dianas autólogas infectadas con diferentes virus que expresan la proteína NEF recombinante. Los resultados de experimentos representativos están indicados en la figura 13. Las CTL anti-péptido N2 obtenidas a partir del individuo V4.5 (QS21) reconocen un antígeno modificado naturalmente por las EBV-LCL autólogas infectadas por virus recombinantes de la vacuna que codifica genes HIV-NEF obtenidos a partir de diferentes cepas de HIV.

60 Para la misma relación efector-diana, las CTL específicas del virus HIV que reconocen NEF-LAI y NEF-MN con la misma eficacia. Un porcentaje muy débil de lisis específica se obtiene para la proteína NEF-A o la proteína NEF-ROD.

65 Estos resultados indican que las CTL obtenidas después de la vacunación por lipopéptidos son capaces de reconocer diferentes fuentes de virus VIH.

ES 2 265 672 T3

Linfocitos T CD8⁺ que segregan ex vivo interferón- γ , específicos del virus VIH

Los linfocitos T CD8⁺ efectores pueden ejercer una actividad lítica y/o producir linfocinas. También la cantidad de linfocitos T CD8⁺ que segregan interferón- γ se ha evaluado mediante una prueba ELISPOT específica.

Un estudio reciente ha mostrado que la inactivación intracelular del virus de la hepatitis B se realiza por medio de los linfocitos T CD8⁺ que segregan interferón- γ específicos y citotóxicos, que producen una inmunidad protectora. Este método permite identificar epítomos de linfocitos T CD8⁺ mínimos por sensibilización de PBMC con péptidos cortos. Todos los péptidos cortos utilizados están ya descritos como que son epítomos CTL (véase anteriormente).

Se ha cuantificado también por un ELISPOT *ex vivo* el número de linfocitos T CD8⁺ que segregan interferón- γ específico de los péptidos del VIH en PBMC de sujetos vacunados (tabla 17).

Conclusión

Este estudio ha permitido mostrar que una vacuna lipopeptídica en forma de micelas, y desprovista de adyuvante, que contiene diferentes epítomos VIH, contenido en las proteínas víricas NEF, GAG y ENV del virus VIH, es capaz de producir una fuerte y persistente respuesta multiepitópica B y T en el hombre.

TABLA 1

Epítomos de BCR-ABL

	Péptido	Secuencia	Fijación al HLA
	247-255	EDAELNPRF	B44
	488-496	SELDLEKGL	B44
30	768-776	DELEAVPNI	B44
	901-934 b2a2	KEDALQRPV	B44
	902-935 b2a2	EDALQRPVA	B44
	986-994	GEKLRVLGY	B44
35	1176-1184	EDTMEVEEF	B44
	1252-1260	MEYLEKKNF	B44
	1691-1699	NEEAADVEF	B44
	49-57	VNQERFRMI	B8
40	580-588	LFQKLASQL	B8
	722-730	ARKLRHVFL	B8
	786-794	ALYLKISQI	B8
	886-893	CVKLQTVH	B8
45	928-936 b3a2	KALQRPVAS	B8
	1830-1838	GAKTKATSL	B8
	1975-1983	IQQMRNKFA	B8
	1977-1984	QMRNKFAF	B8
	252-260	NPRFLKDNL	B7
50	329-338	TPDCSSNENL	B7
	693-701	TPRRQSMTV	B7
	1058-1066	SPGQRSISL	B7
	1196-1205	HPNLVQLLGV	B7
55	1560-1569	SPKPSNGAGV	B7
	1717-1725	KFLRRQVTV	B7
	1878-1884	SPAPVPSTL	B7
	36-44	ERCKASIRR	B27
60	71-79	DRQRWGFRR	B27
	575-583	QRVGDLFQK	B27
	834-842	FRVHSRNGK	B27
	642-650	LLYKPVDRV	A2
65	684-692	FLSSINEEI	A2

ES 2 265 672 T3

TABLA 1 (continuación)

	Péptido	Secuencia	Fijación al HLA
5	708-716	QLLKDSFMV	A2
	714-722	FMVELVEGA	A2
	817-825	KLSEQESLL	A2
	881-889	MLTNSCVKL	A2
10	908-917	GLYGFLNVIV	A2
	912-920	FLNVTVHSA	A2
	1240-1248	VLLYMATQI	A2
	1903-191	FIPLISTRV	A2
15	1932-1940	VVLDSTEAL	A2
	50-58	NQERFRMIY	A1
	223-231	VGDASRPPY	A1
	549-558	KVPELYEIHK	A3/A11
20	583-591	KLASQLGVY	A3/A11
	715-724	MVELVEGARK	A3/A11
	916-923	IVHSATGFK	A3/A11
	920-928 b3a2	ATGFKQSSK	A3/A11
25	924-932 b3a2	KQSSKALQR	A3/A11
	1156-1165	EVYEGVWKKY	A3/A11
	1311-1320	SLAYNKFS1K	A3/A11
	1499-1509	NLFSALIKK	A3/A11
30	1724-1734	TVAPASGLPHK	A3/A11
	1905-1914	USTRVSLRK	A3/A11
	1922-1930	RIASGAIK	A3/A11

TABLA 2

Epítomos de la p53

40 - epítomos de la p53 que se ligan al HLA-A1:

45 RVEGNLARVEY (196-205)
GSDCTTIHY (226-234)

- epítomos de la p53 que se ligan al HLA-A2:

50 LLPENNVLSPL (25-35)
RMPEAAPPV (65-73)
RMPEAAPRV
ALNKMFCQL (129-137)
55 STPPPGTRV (149-157)
GLAPPQHLIRV (187-197)
LLGRNSFEV (264-272)
PLDGEYFTL (322-330)

60 - epítomos de la p53 que se ligan al HLA-A3:

65 RVRAMAIYK (156-164)
RRTEENLR (282-290)
ELPPGSTKR (298-306)

ES 2 265 672 T3

TABLA 2 (continuación)

- epítomos de la p53 que se ligan al HLA-B7:

5 LPENNVLSPL (26-35)
APRMPEAAPPV (63-73)
APRMPEAAPRV
10 APPQHLIRV (189-197)
RPILTIITL (249-257)
KPLDGETYFTL (321-330)

- epítomos de la p53 que se ligan al HLA-B8:

15 CQLAKTCPV (135-143)
GLAPPQHLI (187-195)
NTRHRSVVV (210-218)

- epítomos de la p53 que se ligan al HLA-B51:

25 LLPENNVLSPL (25-35)
RMPEAAPPV (65-73)
LIRVEGNLRV (194-203)

TABLA 3

Epítomos de las proteínas E₆ y E₇

35 YMLDLQPETT (E7 11-20)
LLMGTLGIV (E7 82-90)
TLGIVCPI (E7 86-93)
40 TIHDIILECV (E6 29-38)
KLPQLCTEL (E6 18-26)
RPPKLPQL (E6 8-15)
LRREVYDFAFRDLCIVYRDGNPY (E6 45-67)
ISEYRHYCY (E6 80-88)
45 EKQRHLDDKKQRFHNIRGRWT (E6 121-140)
GQAEPDRAHYNIVTF (E7 43-57)
QAEPDRAHY (E7 44-52)
50 EPDRAHYNIV (E7 46-55)

TABLA 4

Epítomos del virus VIH-1

HLA-A1

60 (Nef 96-106: GLEGLIHSQRR)
(Nef 121-128: FPDWQNYT)
(Nef 137-145: LTFGWCYKL)
(Nef 184-191: RFDSRLAF)
65 (Nef 195-202: ARELHPEY)

ES 2 265 672 T3

TABLA 4 (continuación)

HLA-A2

5 Gp120 121-129: KLTPLCVTL
P17 77-85: SLYNTVATL
RT 200-208: ALVEICTEM
RT 275-285 VLDVGDAYFSV
10 RT 346-354: KRYQYMDDL
RT 368-376: KIEELRQHL
RT 376-387: LLRWGLTTPDK
RT 476-484 :ILKEPVHGV
15 RT 588-596: PLVKLWYQL
RT 683-692: ELVNQIIEQL
Nef 136-145: PLTFGWCFKL
Nef 180-189: VLOWRFDSRL
20 Nef 180-188: ALHHVAREL
Gp41 818-826: SLLNATVDI
P24 185-193: DLNTMLNTV
RT 146-354: VIYQYMDDL
25 RT 588-596: PLVKLWYQL
Pro 143-152: VLVGPTPVNI
(Gp120 37-44: TVYYGVPV
(Gp120 115-122: SLKPCVKL
30 (Gp120 313-321: RIQRGPGRA
(Gp120 197-205: TLTSCNTSV
(Gp120 428-435: FINMWQEV
(Gp41 836-844: VVQGAYRAI
(p24 219-228: HAGPIAPGQM
35 (p15 422-431: QMKDCTERQA
(p15 448-456: FLQSRPETA
(RT 681-691: ESELVNQIIEG

HLA-A3

P17 18-26: KIRLRPGGK

HLA-A3

45 P17 20-28: RLRPGGKKK
RT 200-210: ALVEICTEMEK
RT 325-333: AIFQSSMTK
50 RT 359-368: DLEIGQHRTK
Nef 73-82: QVPLRPMTYK
Gp120 37-46: TVYYGVPVWK
Gp41 775-785: RLRDLLLIVTR
55 P17 18-26: KIRLRPGGK

HLA-A11

60 RT 325-333: AJFQSSMTK
RT 507-517: QIYQEPFKNLK
Nef 73-82: QVPLRPMTYK
Nef 84-92: AVDLSHFLK
65 p24 349-359: ACQVGGPGHK
P17 83-91: ATLYCVHQR

ES 2 265 672 T3

TABLA 4 (continuación)

5	HLA-A24 (A9)
	Gp120 52-61: LFCASDAKAY Gp41 591-598: YLKDQQLL o 590-597: RYLKDQQLL (RT 484-492: VYYDPSKDL 10 (RT 508-516: IYQEPFKNL (RT 681-691: ESELVNQIEG
15	HLA-A25 (A10)
	P24 203-212: ETINEEAAEW
20	HLA-A26 (A10)
	P24 167-175: EVIPMFSAL
25	HLA-A30 (A19)
	(Gp41 845-852: RAIRHIPRR
30	HLA-A31 (A19)
	Gp41 775-785: RLRDLLLLIVTR
35	HLA-A32 (A19)
	Gp120 424-432: RIKQIINMW Gp41 774-785: HRLRDLLLI: RT 559-568: PIQKETWETW
40	HLA-A33 (A19)
	(P24 266-275: IILGLNKIVR
45	HLA-B7
	RT 699-707: YLAWVPAHK Nef 68-77: FPVTQVPLR Nef 12S-137: TPGPGVRYPL Gp120 303-312: RPNNNTRKSI 50 Gp41 848-856: IPRRIRQGL RT 699-707: YLAWVPAHK
55	HLA-B8
	Gp120 2-10: RVKEKYQHL P17 24-32: GGKKKYKLLK Nef 90-97: FLKEKGGL = P24 259-267: GETYKRWII 60 Gp41 591-598: YLKDQQLL (Gp41 849-856: PRRIRQGL o 851-859: RIRQGLERIL (P24 329-337: DCKTILKAL 65 (RT 185-193: GPKVKQWPL (Nef 182-189: EWRFDSRL

ES 2 265 672 T3

TABLA 4 (continuación)

	HLA-B14
5	Gp41 589-597: ERYLKDQQL
	P24 29S-306: DRFYKTLRA
	(P24 183-191 ? : DLNTMLNTV
10	(p24 304-313: LRAEQASVQEV
	(p24 305-313: RAEQASVQEV
	HLA-B15
15	Nef 135-143: YPLTFGWCY
	Nef 135-143: YPLTFGWCF
	HLA-B27
20	P24 263-272: KRWILGLNK
	Nef 73-82: QVPLRPMTYK
	Nef 134-141: RYPLTFGW
	o 133-141: YPLTFGW
25	Gp41 589-597. ERYLKDQQL
	(Gp41 791-800: GRRGWEALKY
	HLA-B35
30	Gp120 78-86: DPNPQEVVL
	Gp120 257-265: RPWSTQLL
	RT 285-294: VPLDKDFRKY
	RT 323-331: SPAIFQSSM
35	RT 342-350: NPDIVIYQY (consensus clade B)
	RT 460-468: IPLTEEAEL
	RT 598-608: EPIVGAETFY
40	Nef 68-76: FPVRPQVPL
	HLA-B35
45	Nef 74-81: VPLRPMTY
	Gp41 611.619: TAVPWNASW
	Gp120 42-52: VPVWKEATTTL
	P17 124-132: NSSOVSQNY (consensus clade B)
	P24 254-262: PPIPVGGEIY (consensus clade B)
50	HLA-B37
55	Nef 120-128: YFPDWQNYT
	HLA-B44(B12)
	P24 178-186: SEGATPQDL
	(p24 175-184: LESGATPQDL
	HLA-B51 (B5)
60	gp41 562-570: RAIEAQQHL
	RT 200-208: ALVEICTEM
	RT 209-217: EKEGKISKI
65	RT 295-302.: TAFTIPSI

ES 2 265 672 T3

TABLA 4 (continuación)

5	<p>HLA-B52 (B5)</p> <p style="text-align: center;">Nef 190-198: AFHHVAREL</p>
10	<p>HLA-B55 (B22)</p> <p style="text-align: center;">Gp120 42-51: VPVWKEATTTL</p>
15	<p>HLA-B57 y B58 (B17)</p> <p style="text-align: center;">P24 240-249: TSLTQEQIGW Nef 116-125: HTQGYFPDWQ o 116-124: HTQGYFPDW Nef 120-128: YFPDWQN (P24 147-155: ISPRTLNAW (P24 164-172: FSPEVIPMF</p>
20	<p>HLA-Bw62 (B15)</p> <p style="text-align: center;">P17 20-29: RLRPGGKKKY P24 268-277: LGLNKIVRMY RT 427-438: LVGKLNWASQIY Nef 84-91: AVDLSHFL Nef 117-127: TQGYFPDWQNY</p>
25	<p>HLA-Cw4</p> <p style="text-align: center;">gp 120 380-388: SFNCGGEFF</p>
30	<p>HLA-Cw8</p> <p style="text-align: center;">RT 663-672: VTDSQYALGI</p>
35	<p>HLA-Cw8</p> <p style="text-align: center;">P24 305-313: RAEQASQEV Nef 82-91: KAALDLSHPL</p>
40	<p>HLA-Cw8</p> <p style="text-align: center;">P24 305-313: RAEQASQEV Nef 82-91: KAALDLSHPL</p>
45	<p>HLA-Cw?</p> <p style="text-align: center;">P24 308-316: QATQEVKNW</p>
50	<p>HLA-Cw?</p> <p style="text-align: center;">P24 308-316: QATQEVKNW</p>

TABLA 5

Epítomos del melanoma humano

55

60

65

Gen/proteína	MHC de restricción	Péptido	Posición de los aminoácidos
Tirosinasa	HLA-A2	MNNAVLYCL	1-9
	HLA-A2	YMNGTMSQV	369-377
	HLA-A24	YMDGTMSQV	
	HLA-B44	AFPLWHRLF	206-214
	HLA-DR4	SEIWRDIDF	192-200
		QNILLSNAPLGPQFP	56-70
		SYLQSDPDSFQD	450-462

ES 2 265 672 T3

TABLA 5 (continuación)

Gen/proteína	MHC de restricción	Péptido	Posición de los aminoácidos
Pmel17 ^{sp100}	HLA-A2	KTWGQYWQV	154-162
	HLA-A2	AMLGHTHTMEV	177-186
	HLA-A2	MLGHTHTMEV	178-186
	HLA-A2	ITDQVPFSV	209-217
	HLA-2	YLEPGPVTA	280-288
	HLA-A2	ILLDGTATLRL	457-466
	HLA-A2	VLYRYGSFSV	476-485
	HLA-A2	SLADTNSLAV	570-579
	HLA-A3	ALLAVGATK	17-25
Melan-A ^{MART-1}	HLA-A2	(E)AAGIGILTV	26(7)-35
	HLA-A2	ILTVILGVL	32-40
gp ^{75TRP-1}	HLA-A31	MSLQRFLR	
TRP-2	HLA-A31	LLGPGRPYR	197-205

TABLA 6

Epítomos de tumores resultantes de mutaciones

Gen/proteína	Tumor	MHC de restricción	Péptido	Posición de los aminoácidos
MUM-1	Melanoma	HLA-B44	EEKLIVVLF	30-38
CDK4	Melanoma	HLA-A2	ACDPHSGHFV	23-32
β -catenina	Melanoma	HLA-A24	SYLDSGIHF	29-37
HLA-A2	Carcinoma renal	-	-	-
CASP-8	Carcinoma escamoso de cabeza y de cuello	HLA-B35	FPSDSWCYF	476-484

TABLA 7

Antígenos comunes a diversos tumores

Gen	Tejido donde tiene lugar la expresión normal	MHC de restricción	Péptido antigénico	Posición de los aminoácidos
MAGE-1	testículos	HLA-A1	EADPTGHSY	161-169
		HLA-Cw16	SAYGEPRKL	238-238
MAGE-3	testículos	HLA-A1	EVDPIGHLY	168-176
		HLA-A2	FLWGPRLV	271-279
		HLA-B44	MEVDPGHLY	167-176
BAGE	testículos	HLA-Cw16	AARAVFLAL	2-10
GAGE-1/2	testículos	HLA-Cw6	YRPRPRRY	9-16

ES 2 265 672 T3

TABLA 7 (continuación)

5	Gen	Tejido donde tiene lugar la expresión normal	MHC de restricción	Péptido antigénico	Posición de los aminoácidos
	RAGE-1	retina	HLA-B7	SNSSNRIRNT	11-20
10	GnTV	ninguno	HLA-A2	VLPDVFIRC	38-64
	mucina	senos en la lactación	sin restricción	PDTRPAPGSTAPPA HGVTSA*	
15	* transcrito aberrante de la N-acetil glucosamil transferasa V (GnTV) encontrado únicamente en los melanomas.				

TABLA 8

Lipopéptidos	Rendimiento de filtración
NEF 66	cuantitativo
NEF 117	80%
NEF 182	cuantitativo
GAG 183	80%
GAG 253	77%
ENV	cuantitativo

TABLA 9

1 Péptido	Disolvente	Concentración (mg/ml)	Volumen extraído (ml)	Rendimiento de filtración (%) tras la mezcla
NEF 66	agua	5	1	95
NEF 117	AcOH 25%	5	1	81
NEF 182	AcOH 25%	5	1	92
GAG 183	AcOH 80%	10	0,5	73
GAG 253	AcOH 25%	5	1	31
ENV	agua	5	1	95

ES 2 265 672 T3

TABLA 10

Péptido	Disolvente	Concentración (mg/ml)	Volumen extraído (ml)	Rendimiento de filtración (%) después de la mezcla*
NEF 66	AcOH 80%	20	0,250	cuantitativo
NEF 117	AcOH 80%	20	0,250	cuantitativo
NEF 182	AcOH 80%	20	0,250	cuantitativo
GAG 183	AcOH 80%	120	0,250	cuantitativo
GAG 253	AcOH 25%	20	0,250	cuantitativo
ENV	AcOH 80%	20	0,250	cuantitativo

* teniendo en cuenta la precisión de la dosis

TABLA 11

Péptido	Pesada exacta*** (mg)	Péptido neto	Cantidad alcanzada* (μg por dosis)	Cantidad*** obtenida (μg por dosis)	Rendimiento** (%)
NEF 66	764	641	550	505 \pm 15	89,14 - 94,6
NEF 117	739	641	550	621 \pm 21	109,08 - 116,72
NEF 182	742	641	550	545 \pm 16	96,23 - 102,05
GAG 183	741	642	550	478 \pm 13	84,50 - 89,23
GAG 253	790	641	550	571 \pm 28	98,76 - 108,95
ENV	810	642	550	593 \pm 17	104,71 - 110,89

* La dosis objetivo era de 500 μg por péptido; una sobredosis del 10% se ha previsto deliberadamente en el momento de la pesada, considerando los rendimientos obtenidos en la preparación del lote CK6.

** Los intervalos de los rendimientos reflejan la precisión de la dosificación, y no una variación importante de un frasco al otro.

*** Los valores en exceso son debidos a las imprecisiones de las pesadas de los polvos electrostáticos por un operador revestido de escafandra estándar.

TABLA 12 – Ensayo de uniformidad de contenido

	nel 66	nel 117 total	nel 182	gag 183	gag 253	env 303
muestra 1	14.40	17.74	16.19	13.28	16.74	17.53
	14.38	17.75	16.21	13.27	17.27	17.63
	14.67	16.36	16.61	13.41	16.89	18.36
	14.49	17.28	16.34	13.32	16.97	17.64
muestra 2	13.42	17.11	15.32	12.66	15.56	16.36
	13.81	17.04	15.32	12.67	15.89	16.51
	13.77	17.06	15.33	12.45	15.16	16.41
	13.67	17.07	15.32	12.59	15.54	16.43
muestra 3	13.58	17.08	15.33	12.68	15.64	16.29
	13.70	17.08	15.31	12.62	15.82	16.28
	13.59	17.05	15.31	12.32	14.85	16.37
	13.62	17.07	15.32	12.54	15.44	16.31
muestra 4	13.20	16.80	15.14	12.23	16.05	16.15
	14.53	17.34	15.74	13.06	15.93	17.17
	13.49	16.86	15.17	12.31	15.44	16.15
	13.74	17.00	15.35	12.53	15.80	16.49
muestra 5	13.88	17.21	15.40	12.52	14.78	16.80
	13.94	17.17	15.39	12.59	15.20	16.72
	13.98	17.19	15.47	12.96	15.49	16.71
	13.94	17.19	15.42	12.69	15.16	16.74
	14.03	17.26	15.75	11.62	15.78	16.97
	13.99	17.20	15.73	11.39	15.77	17.02
	14.20	17.26	15.74	12.19	15.90	16.80

TABLA 12 – Ensayo de uniformidad de contenido (continuación)

muestra 6	14,07	17,24	15,74	11,73	15,81	16,93
	13,78	17,29	15,67	12,69	16,13	18,04
	13,94	17,22	15,57	12,67	16,40	17,50
	13,95	17,23	15,55	12,28	16,19	17,37
muestra 7	13,89	17,25	15,60	12,55	16,24	17,64
	13,84	17,06	15,38	12,50	15,62	17,90
	13,65	17,09	15,45	12,44	16,02	17,73
	13,73	16,94	15,37	nd	16,21	17,54
muestra 8	13,74	17,03	15,40	12,47	15,95	17,73
	14,03	17,40	15,66	12,77	16,46	18,56
	14,07	17,33	15,72	11,92	16,61	18,41
	13,89	17,39	15,72	12,68	15,94	18,37
muestra 9	14,00	17,37	15,70	12,46	16,34	18,45
	13,34	16,88	15,33	12,07	14,70	17,92
	13,71	17,24	15,66	12,36	15,12	18,50
	13,53	16,93	15,44	12,28	14,44	18,01
muestra 10	13,53	17,02	15,48	12,24	14,76	18,14
	13,72	17,22	15,64	12,41	14,89	18,32
	13,75	17,33	15,72	12,36	14,82	18,31
	13,67	17,21	15,72	11,86	14,61	18,69
muestra 11	13,71	17,25	15,69	12,21	14,77	18,44
	13,62	17,11	15,60	12,28	14,75	18,42
	13,74	17,13	15,70	12,44	14,98	18,31
	13,75	17,16	15,63	12,51	15,37	18,32
muestra 12	13,70	17,13	15,65	12,41	15,03	18,35
	13,32	16,36	14,74	12,47	16,17	15,44
	13,31	16,41	14,68	12,51	16,26	15,56
	13,34	16,38	14,67	12,53	16,17	15,43

TABLA 12 – Ensayo de uniformidad de contenido (continuación)

muestra 13	13,32	16,38	14,70	12,50	16,20	15,48
	13,76	16,72	14,75	12,67	16,10	15,59
	13,56	16,35	14,75	12,64	16,16	15,64
	13,60	16,67	14,76	12,64	16,06	15,64
muestra 14	13,64	16,58	14,76	12,65	16,10	15,62
	13,36	16,40	14,53	12,48	15,90	15,64
	13,41	16,35	14,57	12,52	15,84	15,80
	13,44	16,43	14,50	12,46	15,77	15,60
muestra 15	13,40	16,39	14,53	12,49	15,84	15,68

m	13,69	16,91	15,28	12,49	15,81	16,82
desviación típica	0,27	0,37	0,42	0,28	0,59	1,19
s^2	0,58	0,79	0,89	0,59	1,24	2,51
min.	13,11	16,12	14,39	11,91	14,57	14,30
máx.	14,27	17,70	16,18	13,08	17,05	19,33

l = 2,110 3 valores aberrantes sobre la muestra 1 (probable error de dilución)
 ensayo de uniformidad de contenido

min aceptado (-15%)	11,64	14,37	12,99	10,62	13,44	14,29
máx. aceptado (+15%)	15,74	19,45	17,58	14,37	18,18	19,34
desviación observada	4,23%	4,67%	5,84%	4,70%	7,84%	14,95%

ES 2 265 672 T3

TABLA 13

	Líneas CTL anti-7 péptidos	Péptidos reconocidos	Pequeños péptidos reconocidos
5	92102	GAG 2466281	
	92105	NEF 125-147	
10	92109	NEF 101-126	NEF 101-110 NEF 116-126
		NEF 125-147	NEF 128-136
15		NEF 155-178	NEF 169-178
		NEF 201-225	NEF 215-225
20		GAG 246-281	
	92120	GAG 246-281	
	92125	NEF 155-178	NEF 169-178
25	92129	NEF 125-147 NEF 155-178 NEF 201-225	NEF 128-136 NEF 169-178 NEF 201-211 NEF 211-219
30	92117	negativo	
35	92127	NEF 101-126 NEF 125-147 NEF 155-178	

TABLA 14

40 *Detección de anticuerpos específicos de péptidos de las proteínas NEF, GAG y ENV del virus VIH, en el suero de voluntarios inmunizados con una mezcla de seis lipopéptidos*

	Voluntario ^a	Periodo de recuperación	Péptido reconocido					
			N1	N2	N3	G1	G2	E
45	V4.6	W20	2,1	7;2	1,0	1,0	10,2	1,2
	V4.15	W20	1,3	4,8	1,2	1,3	11,2	1,5
	V4.16	W20	1,2	4,7	1,2	1,1	9,7	1,3
50	V4.17	W20	1,7	1,8	1,0	1,1	8,0	1,2
	V4.18	W20	1,1	1,2	1,0	1,3	2,2	1,1
	V4.28	W20	7,8	8,8	1,5	1	15	5,7
	V4.1 (QS21)	W20	3,1	3,2	1,1	1,2	11,5	4,7
55	V4.5 (QS21)	W20	1,2	4,2	1,3	1,1	8,1	2,1
	V4.19(QS21)	W20	1,2	5,3	1,2	1,3	5,1	3,8
	V4.21(QS21)	W20	1,2	4,7	1,0	1,2	9,3	1,9
	V4.32(QS21)	W20	6,6	14	1,8	1,9	21	4
60	V4.34(QS21)	W20	7,1	21,2	1,2	1,8	36	8

^a Los voluntarios han sido inmunizados con seis lipopéptidos en forma de micelas, o con un adyuvante (QS21).

^b Los sueros de voluntarios se han recuperado antes de la inyección de lipopéptidos, y veinte semanas después. Las tres inyecciones de seis lipopéptidos se han administrado a las 0, 4 y 16 semanas.

65 ^c La detección de anticuerpos específicos de los péptidos del virus VIH se ha efectuado con ayuda de un análisis ELISA con una dilución de suero de 1/100. Las placas del análisis ELISA se han recubierto con NEF 66-97 (N1), NEF 117-147 (N2), NEF 182-205 (N3), GAG 183-214 (G1), GAG 253-284 (G2) o V3 ENV 303-335 (E).

ES 2 265 672 T3

TABLA 15

Respuestas proliferantes de PBMC de voluntarios a los lipopéptidos NEF, GAG y ENV

Voluntario ^a	Periodo de recuperación	Índice de proliferación ^c			
		N1	N2	N3	G1
V4.6	W0	1,3	1,0	1,0	1,3
	W20	2,4	3,1(±1)	10(±7)	4,5(±1,1)
V4.15	W0	1,0	1,0	1,3	1,0
	W20	1,9	2,2	1,6	1,2
V4.16	W0	1,0	1,2	1,3	1,3
	W20	1,1	1,1	2,2	4,6(± 0,6)
V4.17	W0	2,5	1,3	1,4	1,9
	W20	1,5	1,1	1,6	2,0
V4.18	W0	1,0	1,3	1,5	1,8
	W20	nd	nd	nd	nd
V4.28	W0	1,3	2,2	1,7	1,2
	W20	3,8(±0,6)	1,2	21(±2)	1,2
	W0	1,0	1,1	1,0	1,1

^a Los voluntarios han sido inmunizados con seis lipopéptidos en forma de micelas, o con un adyuvante (QS21)

^b Las PBMC de los voluntarios se han recuperado antes de la inyección de lipopéptidos (W0) y en el transcurso de la vigésima semana (W20)

^c Se han cultivado 2×10^5 células con 1 µg/ml de lipopéptidos del VIH y la proliferación se ha medido por incorporación de la timidina tritiada el día 6. Los lipopéptidos son: N1, N2, N3, G1, G2 y E. El índice de proliferación obtenido con el medio de cultivo solo es igual a 1.

^d Se proporciona la respuesta proliferante (cpm) de las PBMC de voluntarios cultivadas en el medio solo. Todas las muestras de PBMC han proliferado en respuesta a 1 µg/ml de PHA, PPD y SEB.

ES 2 265 672 T3

TABLA 15 (continuación)

Voluntario ^a	Periodo de recuperación	Índice de proliferación ^c		
		G2	E	Proliferación inducida por el medio de cultivo ^d
	W0	1,0	1	871 (±25)
V4.6	W20	7,2(±0,7)	3,6(±0,9)	280 (±32)
	W0	1,4	1,5	1657 (±182)
V4.15	W20	1,6	2,1	252 (±30)
	W0	1,8	1,5	3830 (±232)
V4.16	W20	3,6(±0.5)	3,9(±0,7)	1000 (±168)
	W0	2,0	2,3	5708 (±470)
V4.17	W20	2,0	2,8	1228 (±54)
	W0	3,3(±0.7)	1,3	460 (±49)
V4.18	W20	nd	nd	nd
	W0	1,2	1,2	869 (±36)
V4.28	W20	8,2(± 1.6)	7,6(± 2,2)	2558 (±186)
	W0	1,0	1,0	3107 (±521)

^a Los voluntarios han sido inmunizados con seis lipopéptidos en forma de micelas, o con un adyuvante (QS21)

^c Las PBMC de los voluntarios se han recuperado antes de la inyección de lipopéptidos (W0) y en el transcurso de la vigésima semana (W20)

^c Se han cultivado 2×10^5 células con 1 µg/ml de lipopéptidos del VIH y la proliferación se ha medido por incorporación de la timidina tritiada el día 6. Los lipopéptidos son: N1, N2, N3, G1, G2 y E. El índice de proliferación obtenido con el medio de cultivo solo es igual a 1.

^c Se proporciona la respuesta proliferante (cpm) de las PBMC de voluntarios cultivadas en el medio solo. Todas las muestras de PBMC han proliferado en respuesta a 1 µg/ml de PHA, PPD y SEB.

ES 2 265 672 T3

TABLA 15 (continuación)

Voluntario ^a	Periodo de recuperación	Índice de proliferación ^c			
		N1	N2	N3	G1
V4.1 (QS21)	W20	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	W0	1,5	1,6	1,5	1,6
V4.5 (QS21)	W20	4,6(±1,2)	3,1(±0,3)	1,5	2,0
	W0	1,0	1,1	1,2	1,1
V4.19 (QS21)	W20	24,3(±3,1)	8,5(±5)	4.4(±1,2)	3,1(±2,5)
	W0	1,3	1,3	1,2	3,9(±1)
V4.21 (QS21)	W20	6,5(±3)	1,4	2,3	2,8
	W0	1,0	1,0	1,1	1,3
V4.32 (QS21)	W20	1,0	1,0	1,7	1,2
	W0	1,0	1,1	1,1	1,2
V4.34 (QS21)	W20	3,4(±0,2)	1,1	3,3(±0,1)	2,2

^a Los voluntarios han sido inmunizados con seis lipopéptidos en forma de micelas, o con un adyuvante (QS21)

^b Las PBMC de los voluntarios se han recuperado antes de la inyección de lipopéptidos (W0) y en el transcurso de la vigésima semana (W20)

^c Se han cultivado 2×10^5 células con 1 µg/ml de lipopéptidos del VIH y la proliferación se ha medido por incorporación de la timidina tritiada el día 6. Los lipopéptidos son: N1, N2, N3, G1, G2 y E. El índice de proliferación obtenido con el medio de cultivo solo es igual a 1.

^c Se proporciona la respuesta proliferante (cpm) de las PBMC de voluntarios cultivadas en el medio solo. Todas las muestras de PBMC han proliferado en respuesta a 1 µg/ml de PHA, PPD y SEB.

ES 2 265 672 T3

TABLA 15 (continuación)

Voluntario ^a	Periodo de recuperación	Índice de proliferación ^c		
		G2	E	Proliferación inducida por el medio de cultivo ^c
V4.1 (QS21)	W20	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	W0	1,5	1,3	341 (±20)
V4.5 (QS21)	W20	3,9(±0,3)	5,0(±2,2)	776 (±60)
	W0	1,0	1,0	918 (±102)
V4.19 (QS21)	W20	11,0(±2,7)	9,4(±2,8)	497 (±168)
	W0	1,3	1,4	322 (±21)
V4.21 (QS21)	W20	11,3(±4)	3,3(±1,9)	1052 (±82)
	W0	1,2	1,2	4448 (±75)
V4.32 (QS21)	W20	10,1(±1.5)	0,9	245 (±30)
	W0	1,2	1,2	5383 (±309)
V4.34 (QS21)	W20	4,4(±0,6)	3,1(±0,1)	7381 (±280)

^a Los voluntarios han sido inmunizados con seis lipopéptidos en forma de micelas, o con un adyuvante (QS21)

^c Las PBMC de los voluntarios se han recuperado antes de la inyección de lipopéptidos (W0) y en el transcurso de la vigésima semana (W20)

^c Se han cultivado 2×10^5 células con 1 µg/ml de lipopéptidos del VIH y la proliferación se ha medido por incorporación de la timidina tritiada el día 6. Los lipopéptidos son: N1, N2, N3, G1, G2 y E. El índice de proliferación obtenido con el medio de cultivo solo es igual a 1.

^c Se proporciona la respuesta proliferante (cpm) de las PBMC de voluntarios cultivadas en el medio solo. Todas las muestras de PBMC han proliferado en respuesta a 1 µg/ml de PHA, PPD y SEB.

ES 2 265 672 T3

TABLA 16

Especificidad de los CTL en los voluntarios inmunizados

Lipopéptido incubado con células diana	% de lisis específica de las células							
	V4.6 ^a		V4.16		V4.18		V4.28	
	W0	W20	W0	W20	W0	W20	W0	W20
Relación E/T	70/1		50/1		80/1		10/1	
Ninguna	5%	11%	2%	12%	8%	14%	5%	8%
NEF 66-97	9%	17%	8%	18%	11%	40%	12%	19%
NEF 117-147	9%	16%	2%	13%	6%	6%	19%	12%
NEF 182-205	4%	15%	2%	24%	6%	6%	2%	4%
Relación E/T	70/1		30/1		55/1		10/1	
Ninguna	4%	18%	5%	5%	8%	6%	2%	2%
GAG 183-214	7%	14%	9%	10%	nd	nd	2%	2%
GAG 253-284	9%	49%	11%	20%	6%	26%	2%	2%

^a Los voluntarios han sido inmunizados con seis lipopéptidos en forma de micelas, o con un adyuvante (QS21).

^b Las células diana son PBMC autólogas sensibilizadas con 10 µM de cada uno de los lipopéptidos, irradiadas y marcadas con ayuda de ⁵¹Cr.

^c La prueba de consumo de cromo se ha efectuado tras tres estimulaciones *in vitro*. La actividad citotóxica contra las células autólogas EBV incubadas con péptidos o sin péptidos se ha medido en una prueba de consumo de 4 horas. La actividad citotóxica se ha considerado como positiva cuando el consumo de cromo es superior al 10% del observado con las células diana solas. A1 y A3 corresponden a células EBV incubadas con un conjunto de péptidos A1 en 137-145, n195-202, n184-191, n121-128 para V4.16 o n183-191, n121-128 para V4.28) y el péptido A3 (n73-82).

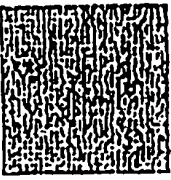
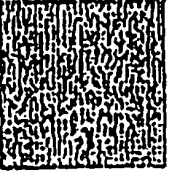
^d La relación E/T (relación efectores/células diana) corresponde a 5×10³ células diana marcadas, incubadas con cantidades variables de células efectoras.

TABLA 16 (continuación)

		% de lisis específica de las células							
Lipopéptido incubado con células diana	V4.5 (QS21)		V4.19 (QS21)		V4.21 (QS21)		V4.34 (QS21)		
	W0	W20	W0	W20	W0	W20	W0	W20	
Relación E/T	<i>100/1</i>		<i>60/1</i>		<i>40/1</i>		<i>35/1</i>		
Ninguna	16%	31%	2%	6%	2%	2%	10%	2%	
NEF 66-97	10%	23%	0%	15%	2%	2%	2%	2%	
NEF 117-147	18%	47%	2%	27%	2%	2%	2%	2%	
NEF 182-205	10%	31%	0%	0%	2%	2%	2%	2%	
Relación E/T	<i>140/1</i>		<i>60/1</i>		<i>46/1</i>		<i>35/1</i>		
Ninguna	23%	11%	0%	0%	2%	2%	2%	2%	
GAG 183-214	21%	11%	0%	0%	2%	2%	2%	23%	
GAG 253-284	20%	68%	0%	9%	2%	2%	5%	5%	
<p>^a Los voluntarios han sido inmunizados con seis lipopéptidos en forma de micelas, o con un adyuvante (QS21).</p> <p>^b Las células diana son PBMC autólogas sensibilizadas con 10 µM de cada uno de los lipopéptidos, irradiadas y marcadas con ayuda de ⁵¹Cr.</p> <p>^c La prueba de consumo de cromo se ha efectuado tras tres estimulaciones <i>in vitro</i>. La actividad citotóxica contra las células autólogas EBV incubadas con péptidos o sin péptidos se ha medido en una prueba de consumo de 4 horas. La actividad citotóxica se ha considerado como positiva cuando el consumo de cromo es superior al 10% del observado con las células diana solas. A1 y A3 corresponden a células EBV incubadas con un conjunto de péptidos A1 en 137-145, n195-202, n184-191, n121-128 para V4.16 o n183-191, n121-128 para V4.28) y el péptido A3 (n73-82).</p> <p>^d La relación E/T (relación efectores/células diana) corresponde a 5×10³ células diana marcadas, incubadas con cantidades variables de células efectoras.</p>									

ES 2 265 672 T3

TABLA 16 (continuación)

Lipopéptido incubado con células diana	% de lisis específica de las células							
	V4.6 ^a		V4.16		V4.18		V4.28	
	W0	W20	W0	W20	W0	W20	W0	W20
Relación E/T	70/1		25/1				10/1	
Ninguna	3%	6%	32%	23%	nd	nd	2%	2%
V3 ENV 303-335	2%	36%	12%	49%	nd	nd	2%	17%
Relación E/T			50/1				10/1	
Ninguna			13%	23%			2%	2%
anti-A1			2%	48%			5%	34%
anti-A3			nd	nd			nd	nd

^a Los voluntarios han sido inmunizados con seis lipopéptidos en forma de micelas, o con un adyuvante (QS21).

^b Las células diana son PBMC autólogas sensibilizadas con 10 µM de cada uno de los lipopéptidos, irradiadas y marcadas con ayuda de ⁵¹Cr.

^c La prueba de consumo de cromo se ha efectuado tras tres estimulaciones *in vitro*. La actividad citotóxica contra las células autólogas EBV incubadas con péptidos o sin péptidos se ha medido en una prueba de consumo de 4 horas. La actividad citotóxica se ha considerado como positiva cuando el consumo de cromo es superior al 10% del observado con las células diana solas. A1 y A3 corresponden a células EBV incubadas con un conjunto de péptidos A1 en (n37-145, n195-202, n184-191, n121-128 para V4.16 o n183-191, n121-128 para V4.28) y el péptido A3 (n73-82).

^d La relación E/T (relación efectores/células diana) corresponde a 5×10³ células diana marcadas, incubadas con cantidades variables de células efectoras.

ES 2 265 672 T3

TABLA 16 (continuación)

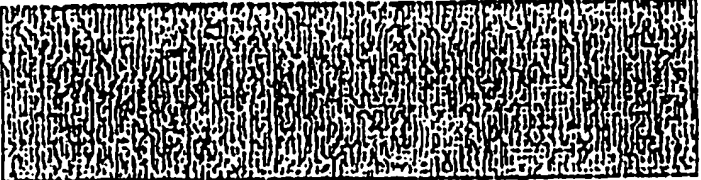
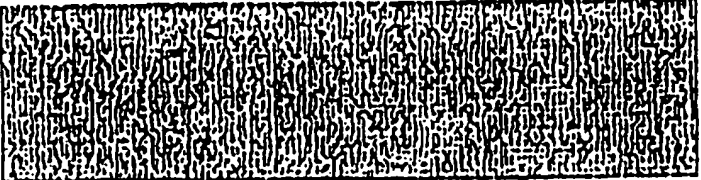
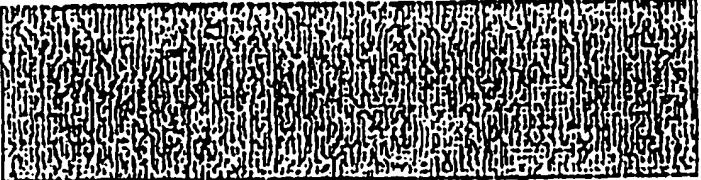
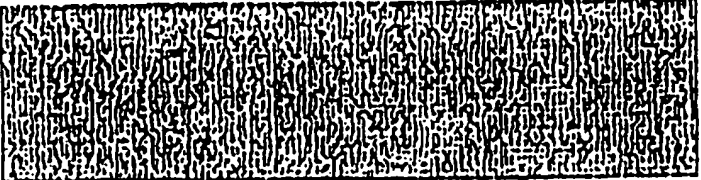
Lipopéptido incubado con células diana	V4.5 (QS21)		V4.19 (QS21)		V4.21 (QS21)		V4.34 (QS21)	
	W0	W20	W0	W20	W0	W20	W0	W20
Relación E/T	60/1		60/1		86/1		35/1	
Ninguna	22%	14%	0%	2%	7%	13%	5%	3%
V3 ENV 303-335	24%	16%	2%	6%	2%	23%	3%	3%
Relación E/T							35/1	
Ninguna							2%	2%
anti-A1							nd	nd
anti-A3							2%	2%
<p>^a Los voluntarios han sido inmunizados con seis lipopéptidos en forma de micelas, o con un adyuvante (QS21).</p> <p>^b Las células diana son PBMC autólogas sensibilizadas con 10 µM de cada uno de los lipopéptidos, irradiadas y marcadas con ayuda de ⁵¹Cr.</p> <p>^c La prueba de consumo de cromo se ha efectuado tras tres estimulaciones <i>in vitro</i>. La actividad citotóxica contra las células autólogas EBV incubadas con péptidos o sin péptidos se ha medido en una prueba de consumo de 4 horas. La actividad citotóxica se ha considerado como positiva cuando el consumo de cromo es superior al 10% del observado con las células diana solas. A1 y A3 corresponden a células EBV incubadas con un conjunto de péptidos A1 en 137-145, n195-202, n184-191, n121-128 para V4.16 o n183-191, n121-128 para V4.28) y el péptido A3 (n73-82).</p> <p>^d La relación E/T (relación efectores/células diana) corresponde a 5×10³ células diana marcadas, incubadas con cantidades variables de células efectoras.</p>								

TABLA 17

Linfocitos T CD8⁺ que segregan interferón-γ/Prueba ex vivo
Número de células que segregan interferón-γ/1x10⁶ células

	V4.18 A2/11 B44/60		V4.5 (QS21) A2/11 B18/27		V4.21 (QS21) A1 B8	
	W0	W20	W0	W20	W0	W20
HLA-A1	NEF 121-128 NEF 137-145 NEF 184-191 NEF 195-202			4 16 16	1 1 6 1	41 6 26 1
HLA-A2	NEF 136-145 NEF 190-198 GAG 183-191	0 nd nd	0 4 2	4 16 16		
HLA-A11	NEF 73-82 ^c NEF 84-92 EDN 416-424	0 0 500	0 nd 66	0 nd 63		
HLA-B8	NEF 90-97 NEF 182-189	15 55 500	0 nd 66	0 nd 63	1 1	51 26
HLA-B27	NEF 134-141 GAG 203-272		2 0	14 9		
HLA-B18	NEF 135-143		0	9		

REIVINDICACIONES

1. Micelas mixtas o microagregados para la producción de una respuesta inmunitaria que contiene por lo menos:

- un primer lipopéptido que comprende por lo menos un epítipo CTL, y por lo menos un motivo lipídico, y
- un segundo lipopéptido que comprende por lo menos un epítipo T auxiliar y por lo menos un motivo lipídico, cuya naturaleza puede ser diferente del motivo del primer lipopéptido.

2. Micelas o microagregados según la reivindicación 1, **caracterizadas** porque los lipopéptidos comprenden independientemente uno o varios motivos lipídicos en C₄ a C₁₈.

3. Micelas o microagregados según una de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizadas** porque los lipopéptidos comprenden independientemente una o dos cadenas lipídicas en C₄ a C₁₈ asociadas por enlace covalente a uno o dos aminoácidos de la parte peptídica.

4. Micelas o microagregados según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizadas** porque los motivos lipídicos de los lipopéptidos están constituidas por dos cadenas de ácido palmítico ligadas a los grupos NH₂ de una lisina.

5. Micelas o microagregados según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizadas** porque los motivos lipídicos de los lipopéptidos comprenden independientemente un resto de ácido palmítico, de ácido 2-amino-hexadecanoico, de ácido oleico, de ácido linoleico, de ácido linolénico, de pimelautida, de trimexautida o un derivado del colesterol.

6. Micelas o microagregados según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizadas** porque la parte no lipídica de los lipopéptidos, que comprende los epítipos comprende entre 10 y 100, y preferentemente entre 10 y 50 aminoácidos.

7. Micelas o microagregados según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizadas** porque el epítipo T auxiliar es un epítipo multivalente.

8. Micelas o microagregados según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizadas** porque el epítipo T auxiliar es el péptido 830-843 de la toxina tetánica que presenta la secuencia siguiente QYIKANSKFIGITE.

9. Micelas o microagregados según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizadas** porque el epítipo T auxiliar es el epítipo de la hemaglutinina o el epítipo PADRE de secuencia "AKFVAAWTLKAAA".

10. Micelas o microagregados según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizadas** porque los lipopéptidos contienen por lo menos un epítipo CTL de una proteína específica del melanoma de una proteína del VIH, del VHB, del papilomavirus, de la proteína p-53 o de una proteína específica de *Plasmodium falciparum*.

11. Micelas o microagregados según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizadas** porque comprenden los lipopéptidos siguientes:

GAG 17	EKIRLRPGGKKKYKLVK K (Pam)-NH ₂
GAG 253	NPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILD K(Pam)-NH ₂
POL 325	AIFQSSMTKILEPFRKQNPDIYQYMDDLY K(Pam)-NH ₂
NEF 66	VGFPVTPQVPLRPMYKAAVDLSHFLKEKGGL K(Pam)-NH ₂
NEF 116	HTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWLYKL K(Pam)-NH ₂
TT	Ac-CIYIKANSKFIGITELKK K(Pam)-NH ₂

en los que Pam representa un motivo derivado del ácido palmitoico.

12. Micelas o microagregados según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizadas** porque comprenden los lipopéptidos siguientes:

LSAE CT1	LLSNIEEPKENIIDNLLNNIK(Pam)-NH ₂
LSA3	NRI Ac-DELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQK(Pam)-NH ₂
LSA3	NR II Ac-LEESOVNDDIFNSLVKSVQQEQHNVK(Pam)-NH ₂
LSA3 RE	K(Pam)VESVAPSVEESVAPSVEESVAENVEESVAENV-NH ₂

13. Micelas o microagregados según una de las reivindicaciones 1 a 12 para la utilización como medicamento o vacuna.

ES 2 265 672 T3

14. Micelas o microagregados según una de las reivindicaciones 1 a 12 para la utilización como medicamento o vacuna contra el VIH, el VHB, el papilomavirus, la p53, el melanoma o la malaria inducida por Plasmodium falciparum.

5 15. Composición farmacéutica, **caracterizada** porque contiene una dosis farmacológicamente eficaz de micelas o de microagregados según una de las reivindicaciones 1 a 12 y excipientes farmacéuticamente compatibles.

10 16. Medicamento o vacuna, **caracterizado** porque contiene micelas o microagregados según una de las reivindicaciones 1 a 12.

17. Procedimiento de fabricación de micelas o de microagregados según una de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende las etapas siguientes:

15 - dispersión de cada uno de los lipopéptidos que los constituyen en una solución de ácido acético concentrada a aproximadamente 80%

- mezcla de las soluciones así obtenidas.

20 18. Procedimiento según la reivindicación 17, **caracterizado** porque la obtención de una dispersión de lipopéptidos puestos en solución en ácido acético se verifica mediante el método de resonancia magnética nuclear en dos dimensiones.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

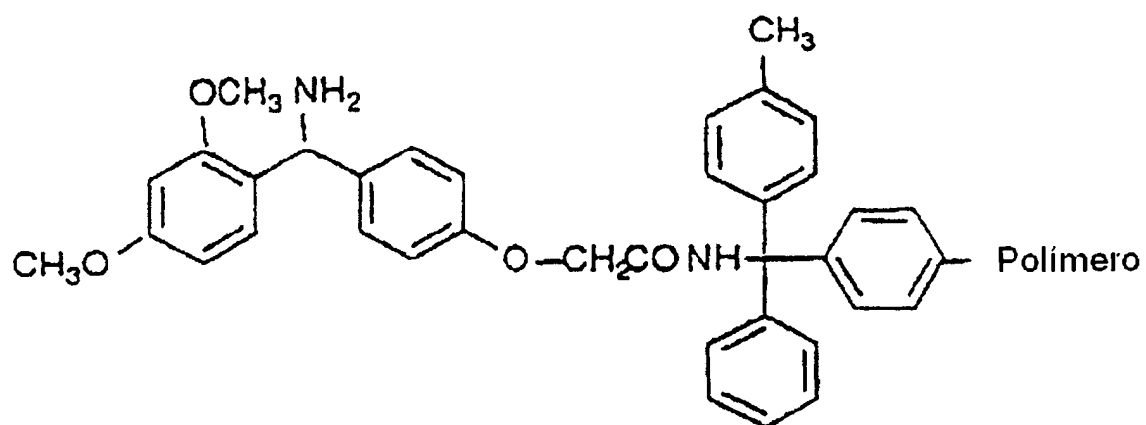


FIGURA 1

FIGURA 2

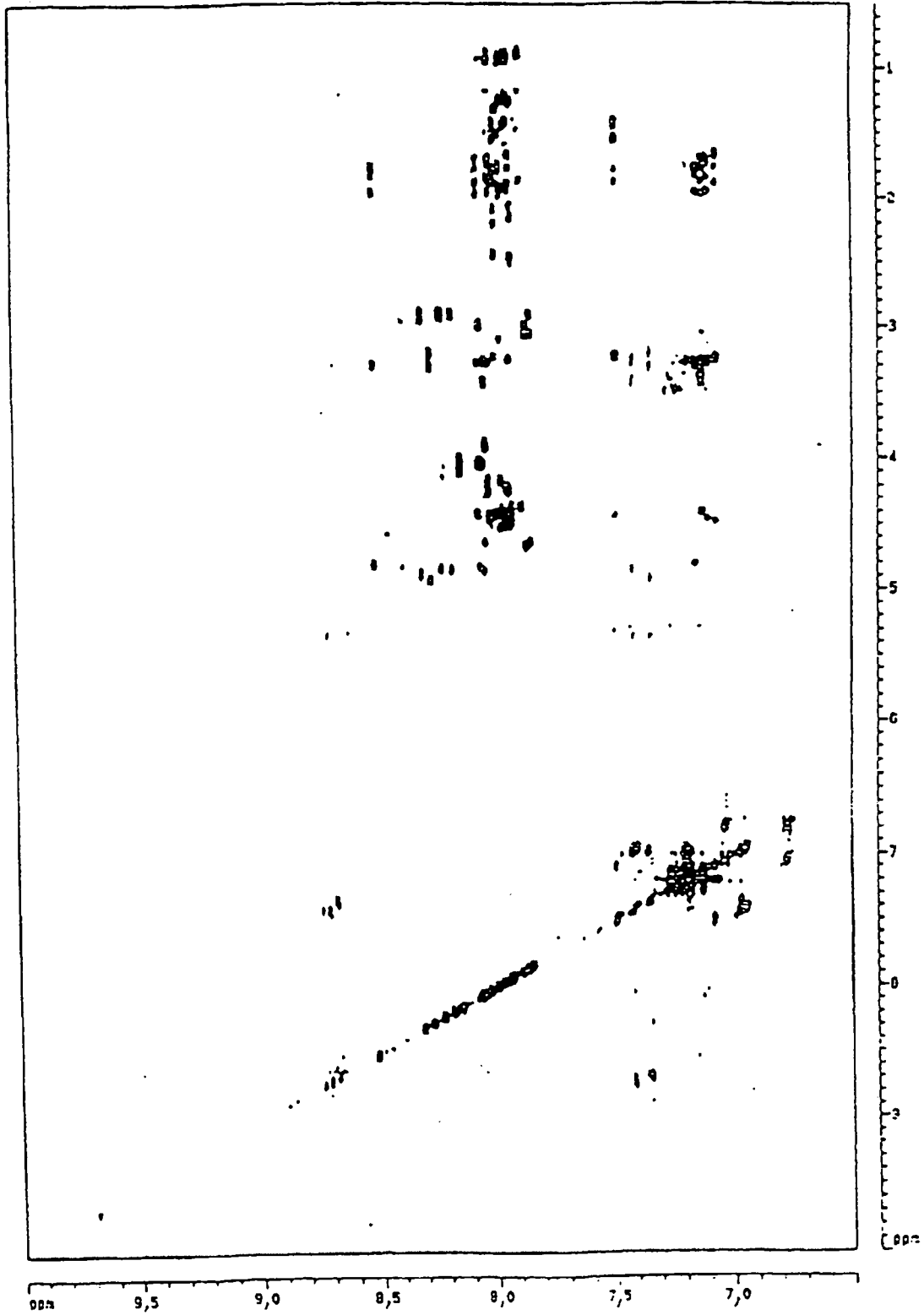


FIGURA 3

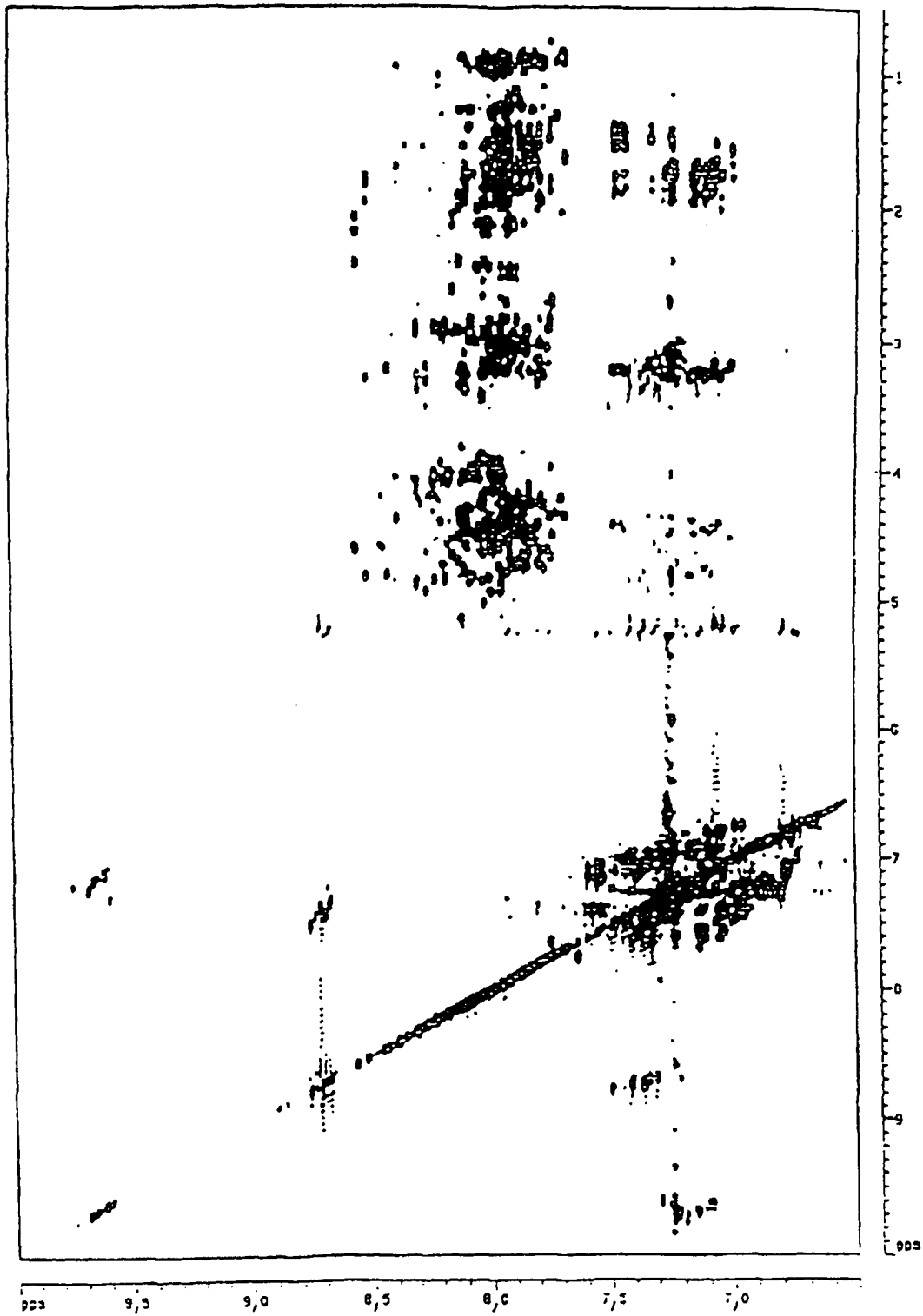
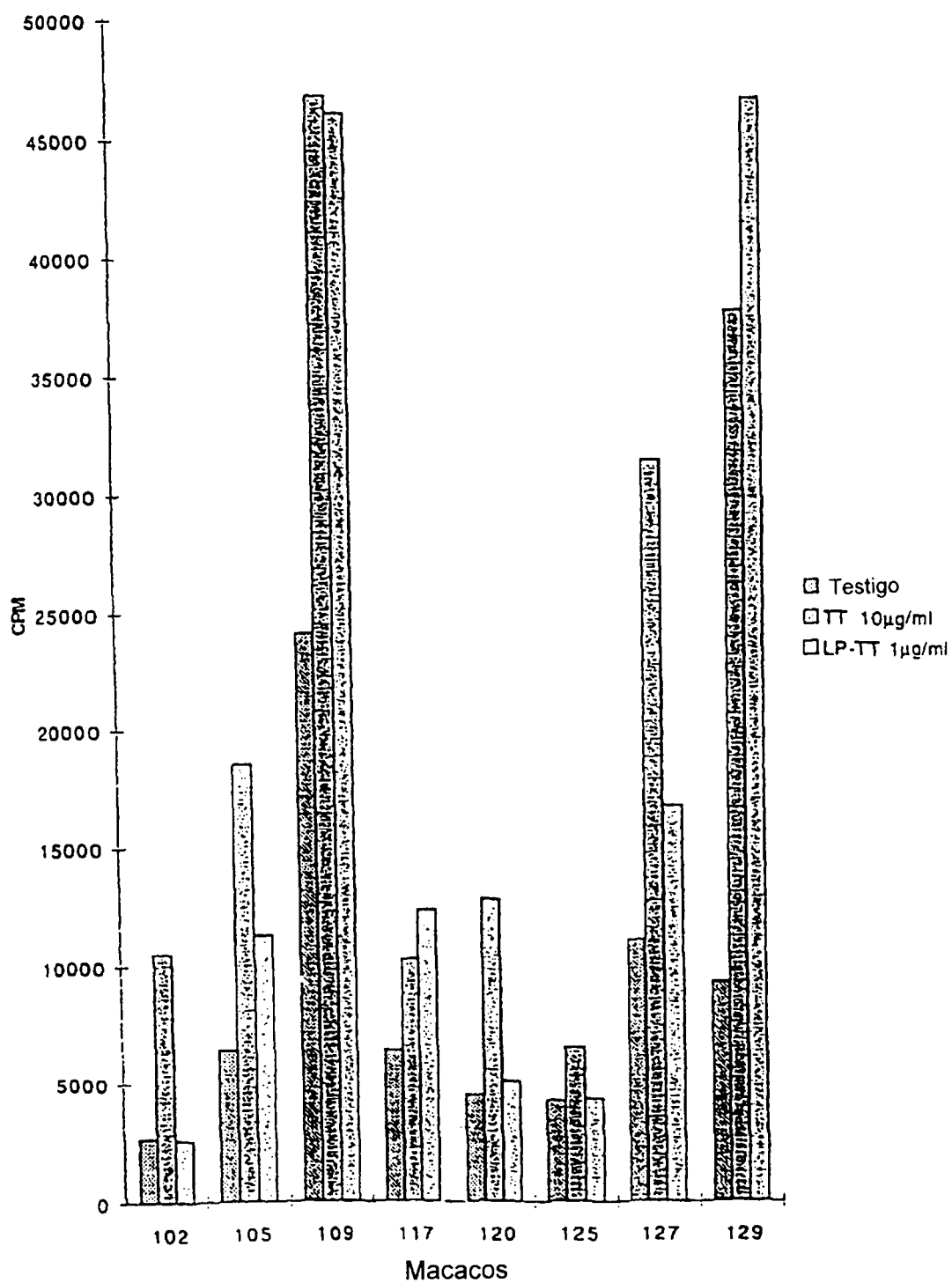


FIGURA 4



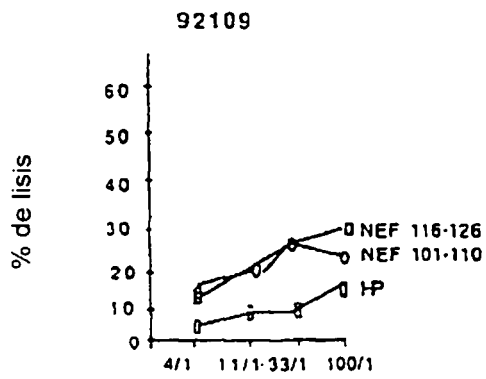


FIGURA 5A

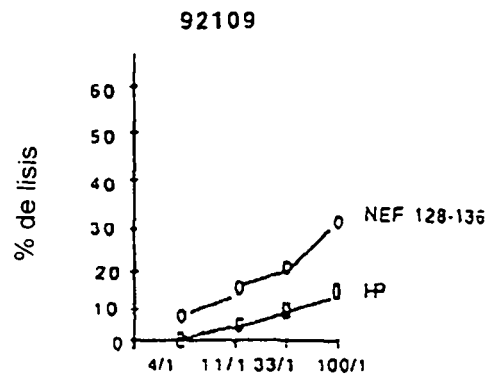


FIGURA 5B

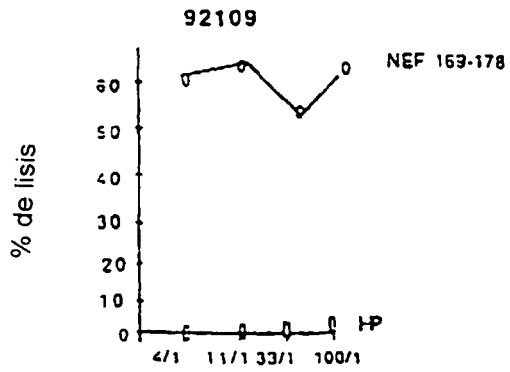


FIGURA 5C

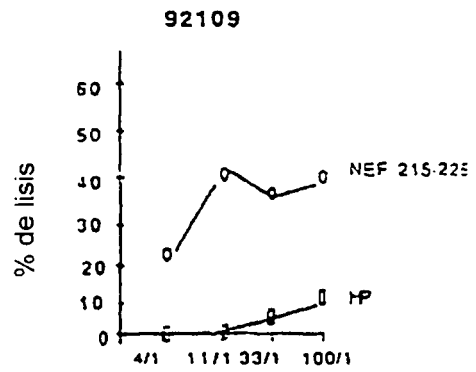


FIGURA 5D

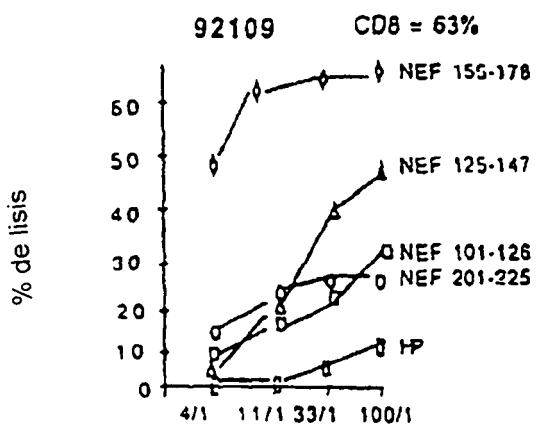


FIGURA 5E

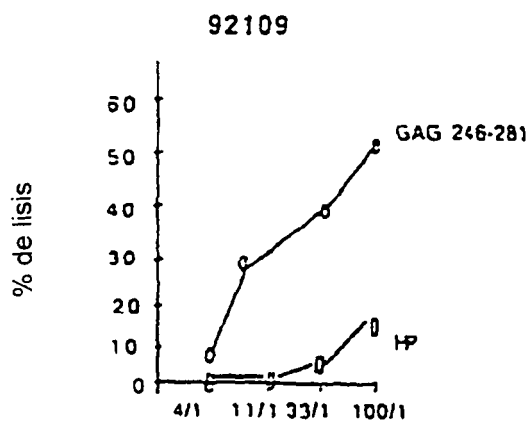


FIGURA 5F

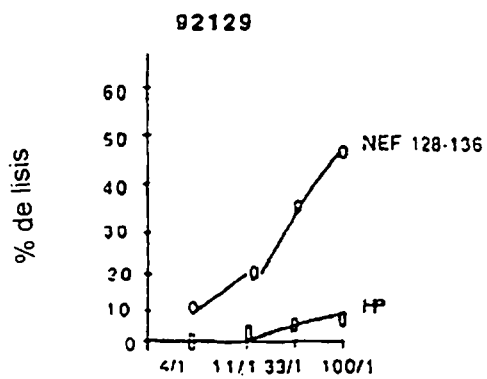


FIGURA 6A

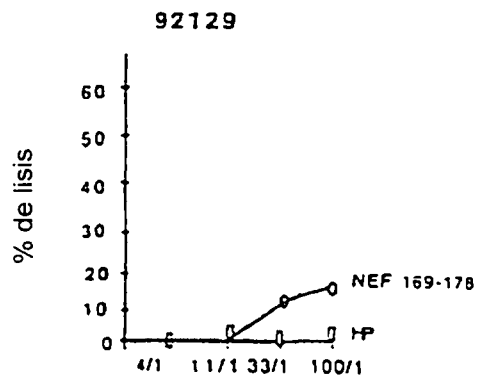


FIGURA 6B

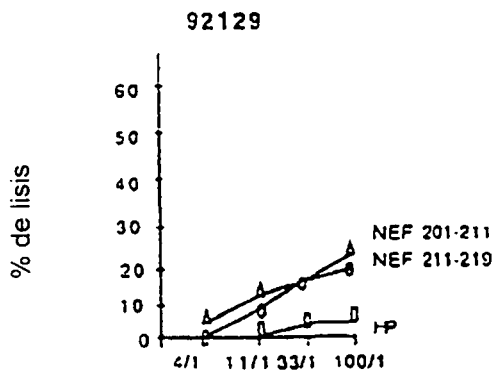


FIGURA 6C

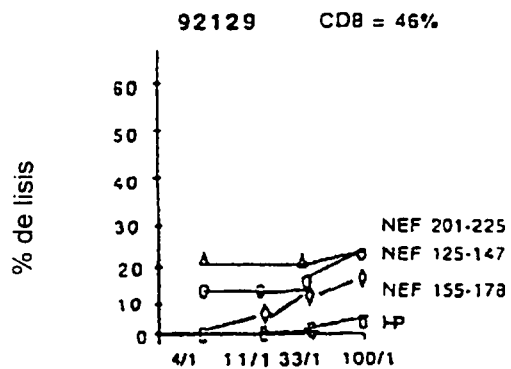


FIGURA 6D

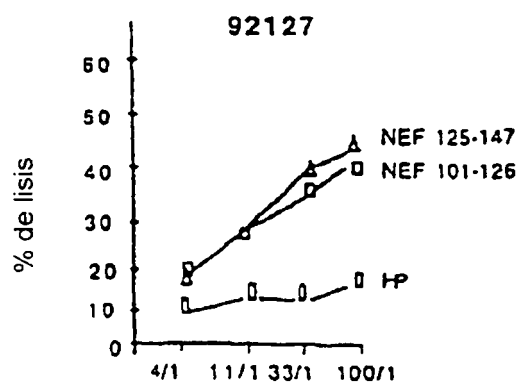


FIGURA 7A

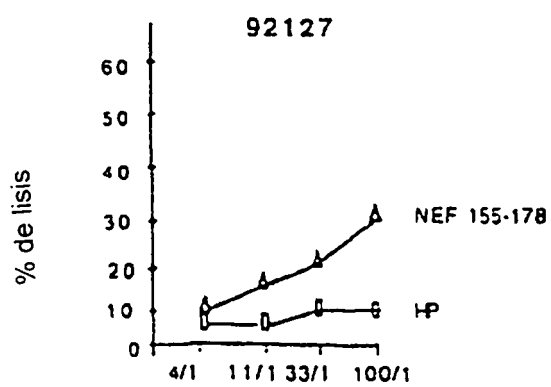


FIGURA 7B

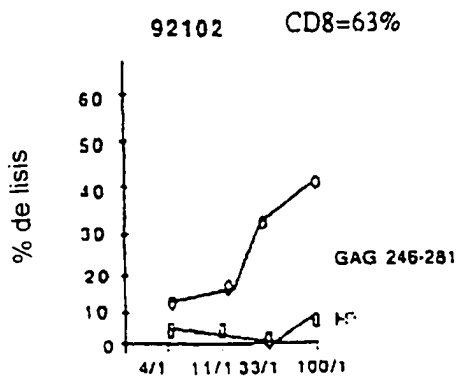


FIGURA 8

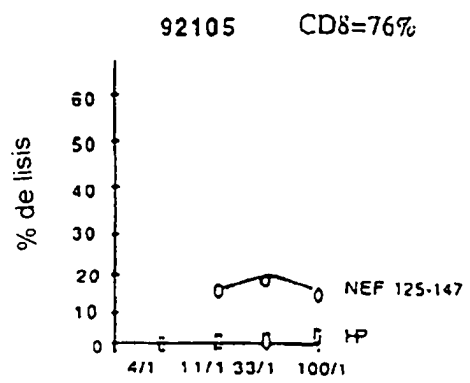


FIGURA 9

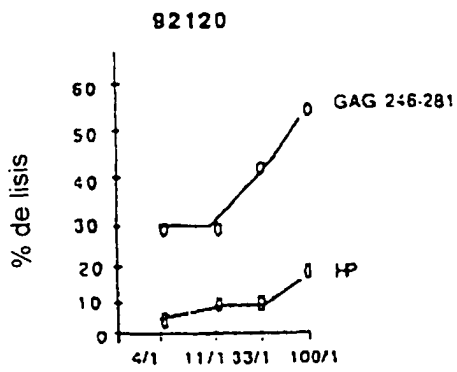


FIGURA 10

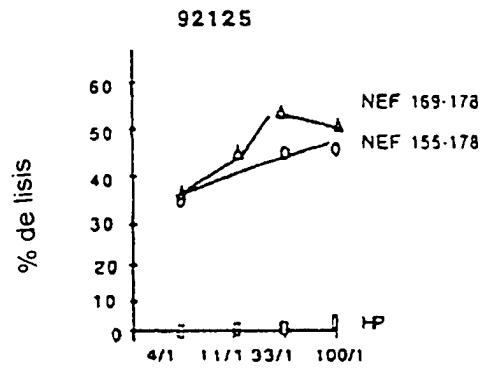


FIGURA 11

FIGURA 12C

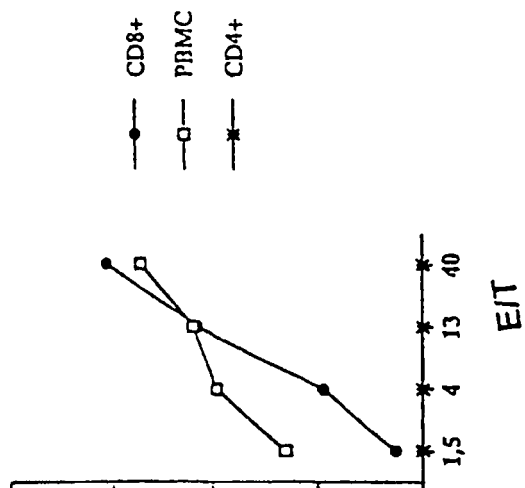


FIGURA 12B

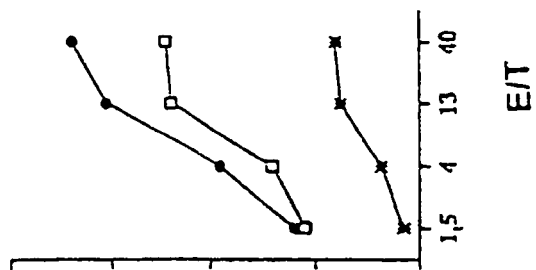


FIGURA 12A

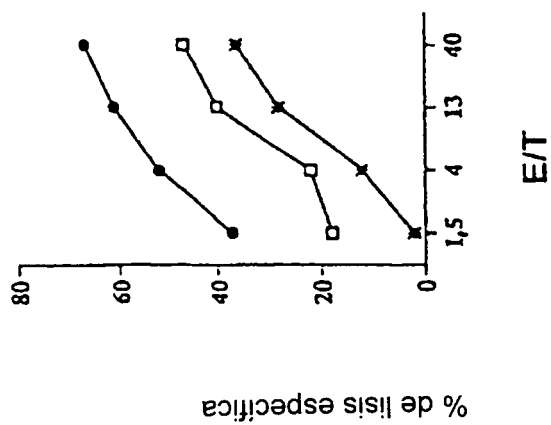
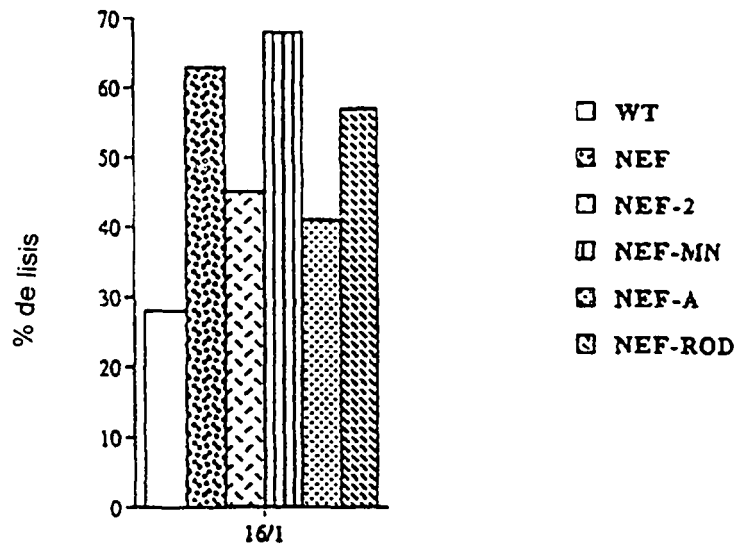


FIGURA 13



Relación células efectoras/diana