

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 842**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06821622 .5**  
96 Fecha de presentación: **06.12.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1968632**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2008**

54 Título: **Vacuna mejorada contra la gripe**

30 Prioridad:  
**06.12.2005 US 742574 P**  
**06.12.2005 US 742530 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.08.2012**

73 Titular/es:  
**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,  
LTD.  
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.  
BOX 95  
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:  
**ARNON, Ruth y  
BEN-YEDIDIA, Tamar**

74 Agente/Representante:  
**Izquierdo Faces, José**

**ES 2 385 842 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

Vacuna mejorada contra la gripe

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere en líneas generales a vacunas contra la gripe para el uso humano y veterinario. En particular, la presente invención proporciona una vacuna que puede suscitar protección intercepas y a largo plazo que comprende una pluralidad de proteínas quiméricas que comprenden los siguientes epítomos peptídicos del virus de la gripe: un epítomo de linfocitos B y CTL (M1 2-12; SEC ID N°: 25 o 26); un epítomo de linfocitos B (HA 91-108; SEC ID N°: 48); y un epítomo de auxiliar T (HA 307-319; SEC ID N°:57); dos epítomos de CTL (NP 335-350; SEC ID N°: 67, y NP 380-393; SEC ID N°: 68); y un epítomo de linfocitos B adicional (HA 354-372; SEC ID N°: 80).

15 **Antecedentes de la invención**La gripe

[0002] La gripe es una enfermedad ocasionada por virus de tres subtipos principales, la gripe A, B y C, que se clasifica de acuerdo con sus determinantes antigénicos. El virión de la gripe consiste en un genoma de ARN monocatenario estrechamente asociado con una nucleoproteína (NP) y envuelto por una envuelta de lipoproteína revestida por proteína de la matriz (M1) y lleva dos antígenos principales de glicoproteína de la superficie, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Las glicoproteínas HA y NA son sumamente susceptibles a cambios; por ejemplo, hay 16 clases inmunitarias de HA y 9 clases de NA diferentes que proporcionan la base para los diferentes subtipos del virus de la gripe como H1N1 o H3N2. El virus de la gripe A tiene una glicoproteína transmembrana adicional, M2, que está muy conservada entre los diferentes subtipos de HN. El gen M2 codifica una proteína que tiene 96 - 97 aminoácidos que se expresa como un tetrámero sobre la superficie celular del virión. Se compone aproximadamente de 24 aminoácidos extracelulares, aproximadamente 19 aminoácidos transmembrana y aproximadamente 54 restos citoplásmicos (Lamb et al, 1985).

[0003] Los virus de la gripe A y B son las causas más comunes de gripe en humanos. La gripe tiene un impacto enorme sobre la salud pública con graves implicaciones económicas además de los problemas de salud devastadores, que incluyen morbilidad e incluso mortalidad. La infección puede ser leve, moderada o grave, variando desde asintomática hasta infección leve de las vías respiratorias superiores y traqueobronquitis a una neumonía viral, grave, ocasionalmente letal.

[0004] Los virus de la gripe tienen dos características inmunológicas importantes que presentan una exposición a preparaciones de vacuna. La primera concierne a cambios genéticos que se producen en las glicoproteínas de la superficie cada pocos años, que se denomina "deriva antigénica". Este cambio antigénico produce virus que eluden la resistencia suscitada por las vacunas existentes. La segunda característica de gran preocupación para la salud pública es que los virus de la gripe, en particular el virus de la gripe A, pueden intercambiar y combinar material genético. Este proceso, conocido como "cambio antigénico", da como resultado nuevas cepas diferentes de los dos virus parentales, que pueden ser cepas pandémicas letales. La gripe aviar es un virus de la gripe A que ha cruzado la barrera de las especies desde aves a mamíferos, incluyendo seres humanos.

Gripe aviar

[0005] Las mayoría de las cepas de la gripe aviar (AI, siglas en inglés) se clasifican como gripe aviar poco patógena (LPAI, siglas en inglés) y ocasionan escasos síntomas clínicos en aves infectadas. En cambio, las cepas de la gripe aviar altamente patógena (HPAI, siglas en inglés) ocasionan una enfermedad grave y extremadamente contagiosa y la muerte entre las aves infectadas.

[0006] Los seres humanos normalmente no están afectados por la gripe aviar, sin embargo, las epidemias de la gripe aviar altamente patógena (HPAI) recientemente observada en aves de corral en Asia aumenta las oportunidades de exposición e infección para el ser humano. Se han descrito casos graves en el pasado y durante las epidemias actuales en Asia. Recientemente brotes altamente patógenos han sido ocasionados por virus de la gripe A de los subtipos H5 y H7. De los 15 subtipos del virus de gripe aviar, el H5N1 es de particular preocupación dado que muta rápidamente y tiene una propensión documentada para adquirir genes de virus que infectan a otras especies de animales. Su capacidad para ocasionar enfermedades en seres humanos está actualmente bien documentada. Las aves que sobreviven a la infección excretan el virus durante al menos 10 años, por vía oral y en las heces, por lo tanto facilitando mayor propagación en los mercados de aves de corral vivas y por aves migratorias.

[0007] La epidemia de la HPAI, ocasionada por el subtipo H5N1, que comenzó a mediados de Diciembre del 2003 en determinados países de Asia se ha propagado y plantea una preocupación para la salud pública. La propagación de la infección en las aves aumenta las oportunidades para la infección directa en seres humanos. Si a lo largo del tiempo más humanos comienzan a infectarse, aumenta también la probabilidad de que los seres humanos, si

actualmente están infectados con cepas de gripe humana y aviar, pudieran servir como hospedadores para la emergencia de un nuevo subtipo con suficientes genes de la gripe humana que se transmitan fácilmente de una persona a otra. Tal evento marcaría el inicio de una pandemia gripal.

5 **[0008]** La propagación de la AI entre aves se produce principalmente por contacto directo entre aves sanas y aves infectadas, y por contacto indirecto con equipo y materiales contaminados. El virus se excreta a través de las heces de las aves infectadas y a través de secreciones desde los orificios nasales, boca y ojos.

10 **[0009]** El contacto con material fecal infectado es el modo de transmisión más habitual de un ave a otra. Los patos salvajes a menudo introducen virus poco patógenos en bandadas domésticas criadas en libertad o en corrales al aire libre a través de contaminación fecal. Dentro de una instalación de aves de corral, la transferencia de virus HPAI entre aves también puede producirse mediante secreciones transmitidas por el aire. La propagación de la gripe aviar entre dependencias de aves de corral casi siempre sigue el movimiento de personal y de equipo contaminado. La transferencia de huevos es también un posible medio de transmisión de AI.

#### 15 Antígenos del virus de la gripe y producción de vacunas

20 **[0010]** La inmunización contra el virus de la gripe está limitada por la variación antigénica del virus y por la restricción de la infección a las membranas mucosas respiratorias. Las vacunas de la gripe actualmente disponibles se basan en virus inactivos completos, o en determinantes antigénicos, de las proteínas de superficie. La HA es un fuerte inmunógeno y es el antígeno más significativo definiendo la especificidad serológica de las diferentes cepas de virus.

25 **[0011]** La molécula de HA (75-80 kD) comprende una pluralidad de determinantes antigénicos, muchos de los cuales se encuentran en regiones que experimentan cambios de secuencia en diferentes cepas (determinantes específicos de cepas) y otros en regiones que están conservadas en muchas moléculas de HA (determinantes comunes). Debido a estos cambios, las vacunas gripales necesitan modificarse al menos cada pocos años.

30 **[0012]** En la técnica se conocen muchos antígenos gripales, y vacunas preparadas a partir de los mismos. La Patente de Estados Unidos 4.474.757 desvela una vacuna contra infecciones del virus de la gripe que consiste en un péptido sintético correspondiente a un fragmento antigénico de HA unido a un transportador macromolecular adecuado, tal como polímeros de aminoácidos o toxoide tetánico.

35 **[0013]** La publicación internacional PCT WO 93/20846 de algunos de los inventores de la presente invención explica una vacuna recombinante sintética contra una pluralidad de diferentes cepas de virus de la gripe que comprende al menos una proteína recombinante que comprende la secuencia de aminoácidos de la flagelina y al menos una secuencia de aminoácidos de un epítipo de HA o NP del virus de la gripe, o un agregado de dicha proteína quimérica. Siguiendo esta estrategia, se descubrió una vacuna antigripal recombinante sintética basada en tres epítopos que era altamente eficaz en ratones. Las vacunas ilustradas con ejemplos incluyen quimeras de flagelina que comprenden el epítipo de HA 91-108, un epítipo de linfocitos B de la HA que se conserva en todas las cepas H3 y suscita anticuerpos neutralizantes antigripales, junto con uno o dos epítopos NP de auxiliares T o CTL (NP 55 - 69 y NP 147 -158, respectivamente) que induce respuestas inmunitarias restringidas al MHC. Se consideró que una vacuna que comprendía una combinación de las tres quimeras mencionadas anteriormente ofrecía la mejor protección contra una infección viral.

45 **[0014]** La publicación de solicitud PCT WO 00/32228 de algunos de los inventores de la presente invención explica una vacuna gripal basada en péptidos sintéticos humanos que comprende al menos cuatro epítopos del virus de la gripe, siendo dichos epítopos del virus de la gripe reactivos con células humanas, comprendiendo dichos epítopos:

50 (i) Un epítipo de hemaglutinina (HA) para linfocitos B; (ii) un epítipo de hemaglutinina (HA) o de nucleoproteína (NP) para auxiliares T que puede unirse a muchas moléculas de HLA; (iii) al menos dos epítopos de proteína de matriz (M) o de nucleoproteína (NP) para linfocitos citotóxicos (CTL) que están restringidos a las moléculas de HLA más prevalentes en diferentes poblaciones humanas, en particular etnias o grupos raciales específicos. Los epítopos peptídicos de la gripe pueden expresarse como flagelina de *Salmonella* recombinante. Esta vacuna requiere la preparación engorrosa de al menos cuatro polipéptidos quiméricos.

60 **[0015]** La publicación de solicitud PCT WO 2004/080403 y la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 2004/0223976 proporcionan una vacuna contra enfermedades ocasionadas por infección con el virus de la gripe y métodos de vacunación. Cada vacuna comprende una pluralidad de péptidos derivados de las proteínas M2 y/o HA de virus de la gripe, conjugados químicamente con una proteína transportadora. La conjugación es entre un extremo del péptido y un sitio reactivo de la proteína transportadora en la que la proteína transportadora se selecciona del complejo de proteína de membrana externa de *Neisseria meningitidis*, toxoide tetánico, antígeno de superficie de hepatitis B o antígeno de núcleo, hemocianina de lapa californiana, proteína capsidial de rotavirus y la proteína L1 de VLP del papilomavirus bovino o humano. Esta descripción requiere una pluralidad de epítopos peptídicos de M2 o de HA unidos de manera covalente a la superficie externa de una proteína transportadora y nunca sugiere ni explica

ninguna vacuna que comprenda un polipéptido quimérico.

5 **[0016]** La publicación de solicitud PCT WO 99/07839 se refiere a antígenos gripales para su uso en vacunas en las que las vacunas comprenden un producto de fusión de al menos la parte extracelular de M2 y un transportador de presentación. El fragmento M2 se fusionó al extremo amino de la proteína transportadora para conservar un extremo N libre del dominio M2 y de esta manera imitar la estructura de tipo silvestre de la proteína M2. Adicionalmente esa invención se ilustra con un ejemplo por medio de una proteína de fusión M2 en la que la parte extracelular intacta del fragmento M2 está fusionada al extremo N de la proteína núcleo del virus de la hepatitis B para imitar la estructura de tipo silvestre de la proteína M2 en partículas virales y en células infectadas, en el que el extremo N libre se extiende en el entorno extracelular. Esta solicitud nunca explica ni sugiere ningún epítipo M2 aislado que esté restringido conformacionalmente.

15 **[0017]** La publicación de solicitud de Patente Internacional N° WO 99/07839 explica una parte extracelular inmunogénica de una proteína de membrana M2 de un virus de la gripe A fusionada a un transportador de presentación, que puede seleccionarse del extremo amino de la proteína núcleo del virus de la Hepatitis B humana, tercer fragmento d de proteínas del complemento (C3d), el fragmento C de la toxina tetánica o partículas Ty de levaduras. Se mencionan otros transportadores de presentación no peptídicos, pero esa invención se ilustra solo con ejemplos por productos de fusión genéticos.

20 **[0018]** Slepushkin et al. (1995) describen protección de ratones contra exposición a la gripe A por vacunación con una proteína M2 recombinante expresada en baculovirus y administrada con adyuvante de Freund.

25 **[0019]** La publicación de solicitud PCT N° WO 98/23735 desvela una vacuna gripal para inducir una respuesta inmunitaria citolítica mediada por células contra un antígeno en un mamífero que comprende un producto de fusión de un antígeno gripal y una proteína de estrés o una proteína de choque térmico como un transportador. El antígeno gripal se selecciona de hemaglutinina, nucleoproteína, neuraminidasa, M1, M2, PB1, PB2, PA y una combinación de los mismos. No existe ninguna explicación ni sugerencia de una vacuna que combine un epítipo de M con un epítipo de HA.

30 **[0020]** Zou, et al. (2005) explican el péptido M2 6-13 extracelular y sugieren que esta secuencia puede ser útil en la preparación de una vacuna contra la gripe. Liu, et al (2005) desvelan epítopos específicos de hospedadores dentro de las secuencias M2 extracelulares, que pueden ser útiles para la preparación de una vacuna gripal bivalente. Los epítopos en cuestión incluyen la secuencia de M2 10-20 común para la gripe humana, aviar y porcina.

35 **[0021]** La publicación de solicitud PCT N° WO 94/26903 se refiere a péptidos de proteína de matriz de la gripe humana que pueden unirse a moléculas humanas del MHC de Clase I. Esta invención proporciona epítopos peptídicos candidatos que pueden unirse al surco de moléculas del MHC de clase I, identificados usando el antígeno que procesa la línea celular defectuosa 174.CEM T2 (T2). No existe ninguna explicación ni sugerencia de una vacuna que comprenda una combinación del epítipo peptídico de M con un epítipo peptídico de HA.

40 **[0022]** Levi R. et al. ("Synthetic recombinant influenza vaccine induces efficient long-term immunity and cross-strainprotection", Vaccine, Butterworth Scientific. Guildford, GB, Vol. 14, No. 1, enero 1996, págs. 85-92) desvelan una vacuna contra la gripe basada en péptidos sintéticos que comprende una mezcla de tres epítopos seleccionados de un epítipo de HA de linfocitos B, un epítipo de NP de auxiliares T y un epítipo de CTL. Levi et al. No mencionan epítopos de matriz ni de gripe B.

50 **[0023]** Chen Z. et al. ("Enhanced protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with both hemagglutinin- and neuraminidase-expressing DNAs", Vaccine Butterworth Scientific. Guildford, GB, Vol. 17, No. 7-8, febrero 1999, págs. 653-659) describen vacunas de ADN que codifican las proteínas de longitud completa de HA, NA, y M1. No se especifican péptidos más cortos.

**[0024]** El documento WO 02/00885 A2 se refiere a partículas similares al virus de la gripe que comprenden las proteínas HA, NA, M1 y M2. Dicha solicitud no desvela ningún péptido corto.

55 **[0025]** Jeon S.H. et al., (" Intranasal immunization with synthetic recombinant vaccine containing multiple epitopes of influenza virus", Vaccine, Butterworth Scientific. Guildford, GB, Vol. 20, No. 21-22, junio 2002, págs. 2772-2780) se refieren a inmunización intranasal con una vacuna gripal recombinante sintética que contiene epítopos múltiples del virus de la gripe. Jeon et al., no describen epítopos de M1 ni epítopos de la gripe de tipo B.

60 **[0026]** El documento de Ben-Yedidia et al. ("Towards an epitope-based human vaccine for influenza", Human Vaccines, Vol. 1, No. 3, mayo 2005, páginas 95-101) es una publicación de revisión sobre vacunas humanas para la gripe basadas péptidos. En su interior no se mencionan epítopos de la proteína de matriz.

65 **[0027]** Sería muy ventajoso tener una vacuna para la gripe que pudiese administrarse una vez y que otorgase protección durante varios años o incluso durante toda la vida proporcionando protección cruzada contra nuevas cepas de virus.

**[0028]** Sigue existiendo una necesidad no satisfecha de una vacuna útil que suscite una respuesta inmunitaria contra una amplia gama de subtipos de la gripe que proporcione protección intercepas y a largo plazo, que sea tanto rentable como fácil de producir, que pueda administrarse de diversas formas y que sea útil para la inmunización en animales y en seres humanos.

5

### Sumario de la invención

**[0029]** La presente invención proporciona una vacuna contra la gripe que suscita protección ínter subtipos y a largo plazo contra infección con virus de la gripe A y gripe B, incluyendo los serotipos de la gripe aviar. Se suscita una fuerte respuesta inmunitaria inesperada contra el virus de la gripe A o B por una vacuna que comprende proteínas quiméricas que comprenden al menos un epítipo peptídico de la proteína de matriz (M) de la gripe A y al menos un epítipo peptídico de hemaglutinina (HA) de la gripe A o B. Una vacuna que comprende una combinación de un epítipo de M y un epítipo de HA supera los inconvenientes de las vacunas conocidas que incluyen la necesidad de incluir epítopos que estén restringidos a moléculas de HLA asociadas con diferentes poblaciones raciales o étnicas. La vacuna de la presente invención suscita eficacia interracial y las poblaciones asiáticas y africanas reaccionan así como las caucásicas.

10

15

**[0030]** Adicionalmente, se suscita una sorprendente respuesta inmunitaria eficaz contra el virus de la gripe A o B mediante una vacuna que comprende una proteína quimérica que comprende un epítipo peptídico de M2 y una secuencia de aminoácidos de flagelina en la que el epítipo peptídico de M2 está incluido dentro de la secuencia polipeptídica de la flagelina. Este descubrimiento es inesperado en vista de que hasta ahora se conocen proteínas de fusión y conjugados de M2 que comprenden al menos la región extracelular completa de M2 e imitan la conformación del dominio extracelular completo de la proteína M2.

20

25

**[0031]** En un aspecto, la presente invención proporciona una vacuna para la inmunización de un sujeto que comprende una pluralidad de proteínas quiméricas que comprenden los epítopos peptídicos del virus de la gripe:

M1 2-12 (SEC ID de N°: 25 o 26);

HA 91-108 (SEC ID N°: 48);

HA 307-319 (SEC ID N°: 57);

NP 335-350 (SEC ID N°: 67);

NP 380-393 (SEC ID N°: 68); y

HA 354-372 (SEC ID N°: 80).

30

35

**[0032]** De acuerdo con una realización la vacuna comprende adicionalmente un adyuvante o un excipiente.

**[0033]** De acuerdo con otra realización, para la administración, la vacuna se fórmula mediante una modalidad seleccionada del grupo que consiste en administración intraperitoneal, subcutánea, intranasal, intramuscular, oral, tópica y transdérmica.

40

**[0034]** De acuerdo con otro aspecto, la vacuna es para usar en un método para suscitar una respuesta inmunitaria y conferir protección contra el virus gripal en un sujeto. Preferentemente, la respuesta inmunitaria se suscita contra la gripe aviar, la gripe de tipo A, la gripe de tipo B o una de sus combinaciones.

45

**[0035]** De acuerdo con otro aspecto de la presente invención la vacuna se usa para la preparación de un agente farmacéutico para suscitar una respuesta inmunitaria y conferir protección contra el virus de la gripe en un sujeto.

**[0036]** En algunas realizaciones la vacuna protege contra la gripe A, incluyendo la gripe aviar. En otras realizaciones la vacuna comprende un epítipo de la gripe B y suscita protección contra la gripe B. En otra realización la vacuna comprende epítopos peptídicos que suscitan protección tanto para el virus de la gripe A como para el de la gripe B.

50

**[0037]** Las vías de administración de la vacuna incluyen, pero sin limitación, la administración intraperitoneal, subcutánea, intranasal, intramuscular, oral, tópica y transdérmica. Las vías de administración preferidas incluyen la administración oral, intranasal (IN) e intramuscular (IM). En una realización, la vacuna se fórmula para administración intranasal. En otra realización la vacuna se fórmula para administración intramuscular.

55

**[0038]** Debe entenderse explícitamente que las composiciones conocidas deben excluirse de la presente invención.

**[0039]** Otras realizaciones y el alcance de aplicabilidad completo de la presente invención resultarán obvios a partir de la descripción detallada proporcionada en lo sucesivo en el presente documento. Sin embargo, debe entenderse que aunque la descripción detallada y los ejemplos específicos indiquen realizaciones preferidas de la presente invención, se ofrecen solo a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones, dentro del espíritu y el alcance de la invención, resultarán obvios para los expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

60

65

**Breve descripción de la Figuras****[0040]**

5 La Figura 1 presenta un gráfico que muestra la secreción de interferón gamma ( $IFN\gamma$ ) de linfocitos incubados con el péptido respectivo después de la segunda y tercera inmunización de ratones transgénicos (TG) HHD/HLA A2.

10 Las Figuras 2A -2C muestran la lisis de células diana por células NK (de las siglas en inglés *Natural Killer*, linfocitos citolíticos naturales) derivadas de ratones inmunizados con epítomos individuales o combinaciones después de la segunda (2A) y tercera inmunización (2B). Incluso después de la segunda inmunización, las células NK de los ratones inmunizados con la combinación de 6 epítomos (hexa-vacuna 1) fueron capaces de realizar la lisis de las células diana más eficazmente que las células de ratones vacunados con los flagelos nativos (2C). La lisis específica se determinó a diferentes proporciones de E:D.

15 Las Figuras 3A y 3B muestran los resultados de la inmunización de ratones C57B1/6 con la Hexa-vacuna 2, que consiste en flagelos recombinantes que comprenden los epítomos peptídicos de HA 91-108, HA 354-372, HA 307-319, NP 335-350, NP 380-393 y M2 1-18. El suero se sometió a ensayo después de tres inmunizaciones y se determinó la especificidad del anticuerpo (Ab o Ig) contra el virus de la gripe H3N2 completo (3A) y contra el péptido M2 1-18 específico (3B).

20 La Figura 4 muestra la unión de epítomos peptídicos a HLA-A2 en linfocitos T2: se observó una unión alta y dependiente de la dosis por el péptido M1 3-11. Otros péptidos sometidos a ensayo, NP 336-344, NP 380-388 y HA 307-319, también mostraron capacidad de unión, que no fue dependiente de la dosis.

25 Las Figuras 5A-5C muestran la protección de anticuerpos suscitada por los epítomos peptídicos recombinantes. Se obtuvo una elevación significativa en el título de anticuerpos (Ab), específica para cada epítomo con los epítomos M1 2-12, NP 335-350 y HA 91-108 en ratones inmunizados solo con el epítomo de interés.

30 La Figura 6 muestra la respuesta inmune humoral a la dosis obtenida después de la vacunación de los ratones con Hexa-vacuna1.

35 La Figura 7 muestra la respuesta inmune humoral contra flagelos después de administración intranasal e intramuscular de la Hexa-vacuna1.

40 La Figura 8 muestra los resultados de titulación de virus. Después de tres vacunaciones con la Hexa-vacuna1, los ratones se infectaron con una dosis sub-letal del virus de la gripe de la cepa H3N2 (A/Texas/1/77). Los pulmones de los ratones se extirparon 5 días después para titulación de la carga viral. La titulación se realizó en huevos fertilizados.

La Figura 9 presenta el título IgE en el experimento de dosificación y en el experimento para evaluar la respuesta celular.

45 La Figura 10 muestra la concentración de IgE (ng/ml) en sueros de ratones transgénicos HHD inmunizados por vía intranasal (IN) con flagelos recombinantes que expresan epítomos gripales.

50 La Figura 11 muestra el factor de aumento del título de IgG contra 3 cepas diferentes de la gripe en sueros de conejos NZW inmunizados por vía intranasal tres veces con flagelos recombinantes que expresan seis epítomos gripales (Hexa-vacuna2).

55 La Figura 12 representa datos farmacocinéticos. Después de 15 minutos, se observó la concentración máxima en suero de la Hexa-vacuna1 ( $T_{max}$ ). Treinta minutos después de la dosificación, se obtuvo la mitad ( $T_{1/2}$ ) de la cantidad de exposición total. Después de 12 horas la proteína no pudo detectarse.

**Descripción detallada de la invención**

60 **[0041]** La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que una vacuna que comprende al menos un epítomo peptídico de M y al menos un epítomo peptídico de HA es capaz suscitar inmunidad protectora intercepas y a largo plazo contra la gripe.

Definiciones

65 **[0042]** Por comodidad, en el presente documento se describen determinados términos empleados en la memoria descriptiva, en los ejemplos y en las reivindicaciones.

**[0043]** La expresión “presentación de antígenos” significa la expresión de antígenos sobre la superficie de una célula en asociación con moléculas de animales del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I o de clase II (MHC-I o MHC-II) o con el HLA-I y HLAII de seres humanos.

5 **[0044]** El término “inmunogenicidad” o “inmunogénico” se refiere a la capacidad de una sustancia para estimular o suscitar una respuesta inmunitaria. La inmunogenicidad se mide, por ejemplo, determinando la presencia de anticuerpos específicos para la sustancia. La presencia de anticuerpos se detecta por métodos conocidos en la técnica, usando, por ejemplo, un ensayo ELISA.

10 **[0045]** Los epítomos de la gripe pueden clasificarse como de tipo linfocito B, de tipo linfocito T o de tipo linfocito B y linfocito T, dependiendo del tipo de respuesta inmunitaria que susciten. La definición de epítomo peptídico de linfocito B o linfocito T no es inequívoco; por ejemplo, un epítomo peptídico puede inducir la producción de anticuerpos pero al mismo tiempo que el epítomo puede poseer una secuencia que permita la unión a la molécula HLA humana, haciéndola accesible a los CTL, por tanto una clasificación doble de linfocito T y linfocito B para ese epítomo particular. Los “CTL”, “linfocitos T citolíticos” o “linfocitos T citotóxicos” son grupo de linfocitos T diferenciados que reconocen y producen la lisis de células diana que llevan un antígeno extraño específico que actúa en defensa contra infección viral y células cancerosas. Los “linfocitos T auxiliares” o “Th” es cualquiera de los linfocitos T que cuando se estimulan por un antígeno específico liberan citocinas que promueven la activación y función de linfocitos B y linfocitos T citolíticos .

20 **[0046]** La expresión “flagelina recombinante” se refiere a un polipéptido de flagelina que comprende un epítomo peptídico incluido dentro de su secuencia. Una flagelina recombinante se diferencia de una proteína de fusión clásica en que el péptido o la proteína se va a expresarse en una proteína de fusión se fusiona a una proteína transportadora en su extremo N o C, dejando el otro extremo libre y conformacionalmente irreprimido.

25 **[0047]** “Secuencia de aminoácidos”, como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de oligopéptidos, péptidos, polipéptidos, o de proteína, y a fragmentos de los mismos y a moléculas sintéticas o de origen natural.

30 **[0048]** “Gripe aviar” o “AI” (de las siglas en inglés Avian Influenza) se refiere al virus de la gripe aviar que infecta aves, incluyendo aves domésticas y salvajes. Los virus de la gripe aviar conocidos pertenecen a los subtipos de virus H5, H7 y H9. El virus de la gripe aviar puede pertenecer al tipo poco patógeno (LPAI) o altamente patógeno (HPAI) y puede o no haber experimentado cambios antigénicos. Se ha demostrado que determinadas cepas de la gripe aviar, incluyendo H5N1, H7N3, H7N7 y H9N2, infectan mamíferos, incluyendo seres humanos.

35 Epítomos peptídico útiles en la preparación de una vacuna

40 **[0049]** Los epítomos peptídicos derivados de proteínas de la gripe son útiles en la preparación de las composiciones de la presente invención. Una de las composiciones descritas incluye al menos un epítomo peptídico derivado de proteínas M1 o M2 de la gripe A en combinación con un epítomo peptídico de HA de la gripe A o gripe B. Debe observarse que los epítomos peptídicos indicados en el presente documento se proporcionan únicamente con propósitos ilustrativos. Las proteínas del virus de la gripe varían entre aislados, proporcionando por lo tanto secuencias variantes múltiples para cada proteína de la gripe.

45 **[0050]** La proteína de matriz M1 es un componente estructural principal de las partículas del virus de la gripe y forma una capa interna de la envuelta derivada de células lipídicas. Dentro del virión y en células infectadas en fases tardías de la replicación del virus, la proteína M1 se asocia con las ribonucleoproteínas virales (vRNP), que están compuestas de moléculas de ARN viral, copias múltiples de la NP y las tres subunidades de la polimerasa viral que contiene los extremos de los ARN virales. El dominio N terminal de M1 se refiere al aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 20 de la proteína M1.

50 **[0051]** La proteína de matriz M2 es un canal iónico de hidrógeno que da como resultado la disociación del complejo matriz y nucleoproteína dentro de las vacuolas. Este canal iónico libera el genoma posibilitando que el ARN viral entre en el núcleo de la célula infectada e inicie la replicación viral. Las sustancias terapéuticas contra la gripe, tales como amantadina y rimantadina actúan bloqueando la actividad de M2. La gripe B tiene una proteína homóloga conocida como NB; aunque no existe similitud de secuencia ambas son proteínas transmembrana y pueden compartir funciones similares. El dominio extracelular de la proteína M2, que es una proteína transmembrana del virus de la gripe A, es casi invariable en todas las cepas de la gripe A. El dominio N terminal de M2 se refiere a la secuencia de aminoácidos N terminal del dominio transmembrana.

60 **[0052]** La Tabla 1 proporciona una lista ejemplar de epítomos peptídicos de M1 y M2 que pueden seleccionarse para la preparación de proteínas quiméricas.

65

Tabla 1. Epítomos peptídicos de M1 y M2

	Tipo de epítopo*	Posición del epítopo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos	Nº de acceso del NCBI
5		M2 6-9	EVET (SEC ID Nº: 1)	GAAGTGGAAACC (SEC ID Nº: 81)	<a href="#">ABJ15715.1</a>
10	auxiliar T	M2 1-15	<b>MSLLTEVETHTRNG W (SEC ID Nº: 2)</b>	<b>ATGAGCCTGCTGACC GAAGTGGAAACCCAC ACCAGGAATGGGTGG (SEC ID Nº: 82)</b>	<a href="#">ABJ15715.1</a>
15		M2 10-18	PIRNEWGCR (SEC ID Nº: 3)	CCGATTCGTAACGAA TGGGGTTGTCGT (SEC ID Nº: 83)	<a href="#">ABD59884</a>
		M2 8-15	ETPIRNEWGC (SEC ID Nº: 4)	GAAACCCCGATTCTGT AACGAATGGGGTTGT CGT (SEC ID Nº: 84)	<a href="#">ABD59884</a>
20		M2 10-20	PIRNEWGCR CN (SEC ID Nº: 5)	GAAACCCCGATTCTGT AACGAATGGGGTTGT CGTGGTTGTCGT (SEC ID Nº: 85)	<a href="#">ABD59884</a>
25	CTL	M2 3-11	LLTEVETPI (SEC ID Nº: 6)	CTGCTGACCGAAGTGG AAACCCCGATT (SEC ID Nº: 86)	<a href="#">ABD59884</a>
	CTL	M2 2-10	SLLTEVETP (SEC ID Nº: 7)	AGCCTGCTGACCGAAG TGGAAACCCCG (SEC ID Nº: 87)	<a href="#">ABD59884</a>
30	CTL	M2 2-11	SLLTEVETPI (SEC ID Nº: 8)	AGCCTGCTGACCGAAG TGGAAACCCCGATT (SEC ID Nº: 88)	<a href="#">ABD59884</a>
	CTL	M2 4-11	LTEVETPLT (SEC ID Nº: 9)	CTGACCGAAGTGGAAA CCCCCTGACC (SEC ID Nº: 89)	<a href="#">ABD59884</a>
35	auxiliar T	M2 1-15	<b>MSLLTEVETPIRNE W (SEC ID Nº: 10)</b>	<b>ATGAGCCTGCTGACCG AAGTGGAAACCCCGAT TCGCAACGAATGG (SEC ID Nº: 90)</b>	<a href="#">ABD59884</a>
40	auxiliar T	M2 1-18	<b>MSLLTEVETPIRNE WGCR (SEQ ID NO:11)</b>	<b>ATGAGCCTGCTGACCG AAGTGGAAACCCCGAT TCGCAACGAATGGGGC TGCCGC (SEC ID Nº: 91)</b>	<a href="#">ABD59884</a>
45	auxiliar T	M2 1-15	<b>MSLLTEVETLTKNG W (SEC ID Nº: 12)</b>	<b>ATGAGCCTGCTGACCG AAGTGGAAACCCCTGAC CAAAACGGCTGG (SEC ID Nº: 92)</b>	<a href="#">AAK49250</a>
50	auxiliar T	M2 1-15	<b>MSLLTEVETLTRNG W (SEC ID Nº: 13)</b>	<b>ATGAGCCTGCTGACCG AAGTGGAAACCCCTGAC CCGCAACGGCTGG (SEC ID Nº: 93)</b>	<a href="#">ABI85097</a>
	CTL	M2 4-12	LTEVETPIR (SEC ID Nº: 14)	CTGACCGAAGTGGAAA CCCCATTGCGC (SEC ID Nº: 94)	<a href="#">ABD59884</a>
55	CTL	M2 4-13	LTEVETPIRN (SEC ID Nº: 15)	CTGACCGAAGTGGAAA CCCCATTGCGAAC (SEC ID Nº: 95)•	<a href="#">ABD59884</a>
	CTL	M2 6-14	EVETPIRNE (SEC ID Nº: 16)	GAAGTGGAAACCCCGA TTCGCAACGAA (SEC ID Nº: 96)	<a href="#">ABD59884</a>
60	CTL	M2 6-15	EVETPIRNEW (SEC ID Nº: 17)	GAAGTGGAAACCCCGA TTCGCAACGAATGG (SEC ID Nº: 97)	<a href="#">ABD59884</a>
65	CTL	M2 4-14	LTEVETPIRNE (SEC ID Nº: 18)	CTGACCGAAGTGGAAA CCCCATTGCGAACGA A (SEC ID Nº: 98)	<a href="#">ABD59884</a>

ES 2 385 842 T3

5	auxiliar T	M2 4-18	<b>LTEVETPIRNEWGC (SEC ID N°: 19)</b>	CTGACCGAAGTGAAAA CCCCGATTGCGAACGA ATGGGGCTGCCGC (SEQ ID NO:99)	<u>ABD59884</u>
	linfocito B	M2 6-13	EVETPIRN (SEC ID N°: 20)	GAAGTGGAACCC CCGATTGCTAAC (SEC ID N°: 100)	<u>ABD59900</u>
10	linfocito B	M2 1-18	<b>MSLLTEVETPTRNE WECR (SEC ID N°: 21)</b>	ATGAGCCTGCTGACCG AAGTGGAACCCCGAC CCGCAACGAATGGGAA TGCCGC (SEQ ID NO:101)	<u>BAD89348</u>
15	linfocito B	M2 2-24	<b>SLLTEVETPTRNEW ECRCSDSSD (SEC ID N°: 22)</b>	AGCCTGCTGACCGAAG TGGAACCCCGACCCG CAACGAATGGGAATGC CGCTGCAGCGATAGCA GCGAT (SEC ID N°: 102)	<u>BAD89348</u>
20	linfocito B	M2 2-24	<b>SLLTEVETPIRNEW GCRCNDSSD (SEC ID N°: 23)</b>	AGCCTGCTGACCGAAG TGGAACCCCGATTGCG CAACGAATGGGGCTGC CGCTGCAACGATAGCA GCGAT (SEC ID N°: 103)	<u>ABD59884</u>
25	linfocito B	M2 7-15	VETPIRNEW (SEC ID N°: 24)	GTGGAACCCCGATT CGTAACGAATGG (SEQ ID NO:104)	<u>ABD59884</u>
	linfocito B	M1 2-12	SLLTEVETYVL (SEC ID N°: 25)	AGCCTGCTGACCGAAG TGGAACCTATGTGCT T(SEQ ID NO:105)	AAO52904
30	CTL	M1 2-12	SLLTEVETYVP (SEC ID N°: 26)	AGCCTGCTGACCGAAG TGGAACCTATGTGCC G(SEC ID N°: 106)	AAO33507
35	CTL	M1 3-11	LLTEVETYV (SEC ID N°: 27)	CTGCTGACCGAAGTGG AAACCTATGTG (SEC ID N°: 107)	AAO33507
	CTL	M1 13-21	SIVPSGPL (SEC ID N°: 28)	AGCATTGTGCCGAGCG GCCCGCTG (SEC ID N°: 108)	<u>ABD59901</u>
40	CTL	M1 17-31	<b>SGPLKAEIAQRLED (SEC ID N°: 29)</b>	AGCGGCCCGCTGAAAG CGGAAATTGCGCAGCG CCTGGAAGATGTG (SEC ID N°: 109)	<u>ABD59901</u>
45	CTL	M1 18-29	GPLKAEIAQRLE (SEC ID N°: 30)	GGCCCGCTGAAAGCGG AAATTGCGCAGCGCCT GGAA (SEC ID N°: 110)	<u>ABD59901</u>
	CTL	M1 27-35	RLEDVFAGK (SEC ID N°: 31)	CGCCTGGAAGATGTGT TTGCGGGCAA (SEC ID N°: 111)	<u>ABD59901</u>
50	CTL	M1 41-51	ALMEWLKTRPI (SEC ID N°: 32)	GCGCTGATGGAATGGC TGAAACCCGCCCG (SEC ID N°: 112)	<u>ABD59901</u>
	CTL	M150-59	PILSPLTKGI (SEC ID N°: 33)	CCGATTCTGAGCCCGC TGACCAAAGGCATT (SEC ID N°: 113)	<u>ABD59901</u>
55	CTL	M1 51-59	ILSPLTKGI (SEC ID N°: 34)	ATTCTGAGCCCGCTGA CCAAAGGCATT (SEC ID N°: 114)	<u>ABD59901</u>
60	CTL	M1 55-73	<b>LTKGILGFVFTLV PSERGL (SEC ID N°: 35)</b>	CTGACCAAAGGCATT TGGGCTTTGTGTTTAC CCTGACCGTGCCGAGC GAACGCGC (SEC ID N°: 115)	<u>ABD59901</u>
65	CTL	M1 56-68	TKGILGFVFTLV (SEC ID N°: 36)	ACCAAAGGCATTCTGG GCTTTGTGTTTACCCT GACCGTG (SEC ID N°: 116)	<u>ABD59901</u>

5	CTL	M1 57-68	KGILGFVFTLV (SEC ID N°: 37)	AAAGGCATTCTGGGCT TTGTGTTTACCCTGAC CGTG (SEQ ID NO:117)	<a href="#">ABD59901</a>
	CTL	M1 58-66	GILGFVFTL (SEC ID N°: 38)	GGCATTCTGGGCTTTG TGTTTACCCTG (SEQ ID NO:118)	<a href="#">ABD59901</a>
10	CTL	M1 60-68	LGFVFTLV (SEC ID N°: 39)	CTGGGCTTTGTGTTTA CCCTGACCGTG (SEQ ID NO:119)	<a href="#">ABD59901</a>
	CTL	M1 59-67	ILGFVFTL (SEC ID N°: 40)	ATTCTGGGCTTTGTGT TTACCCTGACC (SEC ID N°: 120)	<a href="#">ABD59901</a>
15	CTL	M1 128-135	ASCMGLIY (SEC ID N°: 41)	GCGAGCTGCATGGGCC TGATTTAT (SEC ID N°: 121)	<a href="#">ABD59901</a>
	CTL	M1 134-142	RMGAVTTEV (SEC ID N°: 42)	CGCATGGGCGCGGTGA CCACCGAAGTG (SEC ID N°: 122)	<a href="#">ABD59901</a>
20	CTL	M1 145-155	GLVCATCEQIA (SEC ID N°: 43)	GGCCTGGTGTGCGCGA CCTGCGAACAGATTGC G (SEQ ID NO:123)	<a href="#">ABD59901</a>
	CTL	M1 164-172	QMVATTNPL (SEC ID N°: 44)	CAGATGGTGGCGACCA CCAACCCGCTG (SEC ID N°: 124)	<a href="#">ABD59901</a>
25	CTL	M1 164-173	QMVATTNPLI (SEC ID N°: 45)	CAGATGGTGGCGACCA CCAACCCGCTGATT (SEC ID N°: 125)	<a href="#">ABD59901</a>
	CTL	M1 178-187	RMVLASTTAK (SEC ID N°: 46)	CGCATGGTGTGCGCGA GCACCACCGCGAAA (SEC ID N°: 126)	<a href="#">ABD59901</a>
30	CTL	M1 232-240	DLLENLQTY (SEC ID N°: 47)	GATCTGCTGGAAAACC TGCAGACCTAT (SEC ID N°: 127)	<a href="#">ABD59901</a>
35					

40 **[0053]** La nucleoproteína (NP) es uno de los grupos de antígenos específicos, que se distingue entre los virus de la gripe A, B y C. A diferencia de la HA, la NP se conserva altamente, conservándose el 94 % en todos los virus de la gripe A. Los anticuerpos específicos de la NP del virus de la gripe A no tienen actividad neutralizante contra el virus, pero la NP es una diana importante para los linfocitos T citotóxicos (CTL) que reaccionan en cruzado con todos los virus de tipo A (Townsend, 1984). Los CTL reconocen péptidos sintéticos cortos correspondientes a regiones lineales de la molécula de NP de la gripe.

45 **[0054]** La hemaglutinina (HA) es una glicoproteína trimérica incluida en la envuelta del virus de la gripe. Es responsable de la adhesión y penetración del virus en la célula hospedadora. Los anticuerpos contra la HA neutralizan la infectividad viral. Las variaciones antigénicas de esta molécula son las responsables de brotes gripales frecuentes y del escaso control de infección por inmunización (Ada y Jones, 1986).

50 **[0055]** La ARN polimerasa del virus de la gripe es un heterocomplejo compuesto por tres proteínas de polimerasa (P), PB1, PB2 y PA, presentes en una proporción 1:1:1. Su función en la virulencia de la gripe no se ha aclarado por completo. En la siguiente Tabla 2 del presente documento pueden encontrarse ejemplos no limitantes de epítomos peptídicos de HA, NP y PB.

55 Tabla 2: epítomos peptídicos de HA, NP y PB

Tipo de epítomo *	Posición del epítomo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos	N° de acceso del NCBI
60 Linfocito B	HA 91-108	SKAYSNCYPYDVPD YASL (SEC ID N°: 48)	AGCAAAGCTTACAGCAAC TGTTACCCTTAT GATGTGCCGGATTAT GCCTCCCTT (SEC ID N°: 128)	<a href="#">AAM82562</a>
65 Linfocito B	HA 91-108	SKAFSNCYPYDVPD YASL (SEC ID N°: 49)	AGCAAAGCGTTTAGCAAC TGCTATCCGTATGATGTG CCGGATTATGCGAGCCTG (SEC ID N°: 129)	<a href="#">GAC81017</a>

ES 2 385 842 T3

5	Linfocito B	HA 107-124	<b>STAYSNCPYDVPD YASL (SEC ID Nº: 50)</b>	<b>AGCACCGCGTATAGCAAC TGCTATCCGTATGATGTG CCGGATTATGCGAGCCTG (SEC ID Nº: 13 0)</b>	<u>ABD59854 (de A/TS/ 3286/0 3 (H3N2)</u>
10	Linfocito B	HA166-175 (HA 150-159 cepa A/PR/8)	WLTEKEGSYP (SEC ID Nº: 50)	<b>TGGCTGACGGAGAAG GAGGGCTCATACCCA (SEC ID Nº: 131)</b>	<u>ABD77675</u>
15	auxiliar T	HA 306-324	<b>PKYVKQNTLKLATG MRNVP (SEC ID Nº: 52)</b>	<b>CCCAAGTATGTTAAGCAA AACACTCTGAAGTTGGCA ACAGGGATGCGGAATGTA CCAGAGAAACAACTAGA GGC(SEC ID Nº: 132)</b>	<u>AAL62329</u>
20	CTL	HA 521-531	GVKLESMGIYQ (SEC ID Nº: 53)	<b>GGCGTGAAACTGGAAAGC ATGGGCATTTATCAG (SEC ID Nº: 133)</b>	<u>ABJ09518</u>
25	CTL	HA 518-528	EISGVKLESMG (SEC ID Nº: 54)	<b>GAAATTTCCGGCGTGAAA CTGGAAGCATGGGC (SEC ID Nº: 134)</b>	<u>ABJ09518</u>
30	CTL	HA 458-467	NVKNLYEKVK (SEC ID Nº: 55)	<b>AACGTGAAAAACCTGTAT GAAAAAGTGAAA (SEC ID Nº: 135)</b>	<u>ABD77675</u>
35	auxiliar T	HA 128-145	<b>KVKILPKDRWTQHT TTGG (SEC ID Nº: 56)</b>	<b>AAAGTGAAAATTCTGCCG AAAGATCGCTGGACCCAG CATACCACCACCGGCGGC (SEC ID Nº: 136)</b>	<u>AAO46269</u>
40	auxiliar T	HA307-319 (HA 306-318)	PKYVKQNTLKLAT(SEQ ID NO:57)	<b>CCCAAGTATGTTAAGCAA AACACTCTGAAGTTGGCA ACA(SEC ID Nº: 137)</b>	<u>AAL62329</u>
45	auxiliar T	NP 91-99	KTGGPIYRR (SEC ID Nº: 58)	<b>AAAAGTGGAGGACCT ATATACAGGAGAGG (SEQ ID NO:138)</b>	<u>BAA99400</u>
50	CTL	NP 44-52	CTELKLSDY (SEC ID Nº: 59)	<b>TGCACCGAACTGAAACTG AGCGATTAT (SEC ID Nº: 139)</b>	<u>BAA99400</u>
55	CTL	NP 82-95	HPSAGKDPKKTGGP(SEC ID Nº: 60)	<b>CATCCGAGCGCGGGCAAA GATCCGAAAAAAACCGGC GGCCCG (SEC ID Nº: 140)</b>	<u>BAA99400</u>
60	CTL	NP 82-94	HPSAGKDPKKTGG (SEC ID Nº: 61)	<b>CATCCGAGCGCGGGCAAA GATCCGAAAAAAACCGGC GGC(SEC ID Nº: 141)</b>	<u>BAA99400</u>
65	auxiliar T	NP 206-229	<b>FWRGENGRKTRSAY ERMCNILK GK (SEC ID Nº: 62)</b>	<b>TTTTGGCGCGCGAAAAC GGCCGCAAACCCGCAGC GCGTATGAACGCATGTGC AACATTCTGAAAGGCAAA (SEC ID Nº: 142)</b>	<u>ABD59868</u>
	CTL	NP 265-273	ILRGVAHK (SEC ID Nº: 63)	<b>ATTCTGCGCGCAGCGTG GCGCATAAA (SEC ID Nº: 143)</b>	<u>BAA99400</u>
	CTL	NP 305-313	KLLQNSQVY (SEC ID Nº: 64)	<b>AAACTGCTGCAGAACAGC CAGGTGTAT (SEC ID Nº: 144)</b>	<u>ABD59868</u>
	CTL	NP 335-349	<b>SAAFEDLRVLSFIR G (SEC ID Nº: 65)</b>	<b>AGCGCGCGTTTGAAGAT CTGCGCGTGCTGAGCTTT ATTGCGGGC (SEC ID Nº: 145)</b>	<u>ABD35694</u>
	CTL	NP 335-350	<b>SAAFEDLRVSSFIR GT (SEC ID Nº: 66)</b>	<b>AGCGCGCGTTTGAAGAT CTGCGCGTGAGCAGCTTT ATTGCGGGCACC (SEC ID Nº: 146)</b>	<u>ABK34765</u>

5	CTL	NP 335-350	<b>SAAFEDLRVLSFIR GY (SEC ID NO:67)</b>	<b>AGCGCGGCGTTTGAAGAT CTGCGCGTGCTGAGCTTT ATTGCGGCTAT (SEC ID N°: 147)</b>	<u>ABD35694</u>
10	CTL	NP 380-393	ELRSRYWAIRTRSG (SEC ID N°: 68)	<b>GAACTGCGCAGCCGCTAT TGGGCGATTGCGACCCGC AGCGGC (SEC ID N°: 148)</b>	<u>ABK34765</u>
15	CTL	NP 380-388	ELRSRYWAI (SEC ID N°: 69)	<b>GAACTGCGCAGCCGCTAT TGGGCGATT (SEC ID N°:149)</b>	<u>ABK34765</u>
20	CTL	NP 383-391	SRYWAIRTR (SEC ID N°: 70)	<b>AGCCGCTATTGGGCGATT CGACCCGC (SEC ID N°:150)</b>	<u>BAA99400</u>
25	CTL	NP 384-394	YWAIRTRSGG (SEC ID N°: 71)	<b>TATTGGGCGATTGCGACC CGCAGCGGCGGC (SEC ID N°: 151)</b>	<u>BAA99400</u>
30	CTL	NP 382-390	SRYWAIRTR (SEC ID N°: 72)	<b>AGCCGCTATTGGGCGATT CGACCCGC (SEC ID N°:152)</b>	<u>BAA99400</u>
35	CTL	NP 418-426	LFPDKPTIM (SEC ID N°: 73)	<b>CTGCCGTTTGATAAACCG ACCATTATG (SEC ID N°: 153)</b>	<u>BAA99400</u>
	CTL	PB1 591-599	VSDGGPNLY (SEC ID N°: 74)	<b>GTGAGCGATGGCGGCCCG AACCTGTAT (SEC ID N°:154)</b>	<u>ABK34974</u>
	CTL	PB1 571-579	RRSFELKKL (SEC ID N°: 75)	<b>CGCCGCGACTTTGAACTG AAAAAACTG (SEC ID N°:155)</b>	<u>ABK34974</u>
	CTL	PB2 368-376	RRATAILRK (SEC ID N°: 76)	<b>CGCCGCGGACCGCGATT CTGCGCAA (SEC ID N°:156)</b>	<u>ABK34762</u>

40 **[0056]** En algunos ejemplos la vacuna comprende un epítipo peptídico derivado de la gripe B. En la Tabla 3 se muestran ejemplos no limitantes de epítipos peptídicos de la gripe B.

Tabla 3: epítipos peptídicos de la gripe B

Tipo de epítipo *	Posición del epítipo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos	N° de acceso del NCBI
CTL	NP 30-38 (gripe B)	RPIIRPATL (SEC ID N°: 77)	<b>CGCCCGATTATTCGCC GGCGACCCTG (SEC ID N°:157)</b>	ABF21293
CTL	NP 263-271 (gripe B)	ADRGLLRDI (SEC ID N°: 78)	<b>GCAGATAGAGGGCTA TTGAGAGACATC (SEC ID N°:158)</b>	ABF21293
auxiliar T	HA 308-320 (gripe B)	PYYTGEHAKAIGN(SEC ID N°: 79)	<b>CCGTATTATACCGGCGA ACATGCGAAAGCGATTG GCAAC (SEC ID N°:159)</b>	ABI84095
B	HA 354-372 (gripe B)	<b>PAKLLKERGFFGAI AGFLE (SEC ID N°: 80)</b>	<b>CCGGCGAAACTGCTGAA AGAACGCGGCTTTTTTG GCGCGATTGCGGGCTTT CTGGAA (SEC ID N°:160)</b>	ABI83926

\* Cada péptido puede pertenecer a uno o a más tipos de epítipos. Por ejemplo un péptido que suscita una respuesta contra linfocitos B puede también suscitar una respuesta contra linfocitos T (auxiliares T y/o CTL).

Ácidos nucleicos

5 **[0057]** También se describen moléculas de ácido nucleico que codifican un vector, tal como un vector de expresión, que comprende los epítomos de la gripe y una célula hospedadora que comprende un vector que comprende un epítomo de la gripe útil en la preparación de una vacuna sintética de la invención.

10 **[0058]** Una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un péptido puede obtenerse a partir de su fuente natural, por ejemplo, como una parte de un gen. Una molécula de ácido nucleico también producirse usando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación) o síntesis química. Las secuencias de ácido nucleico incluyen secuencias de ácido nucleico natural y sus homólogos, que comprenden, pero sin limitación, variantes alélicas naturales y secuencias de ácido nucleico modificadas en las que los nucleótidos se han insertado, delecionado, sustituido y/o invertido de tal manera que tales modificaciones no interfieren sustancialmente con la capacidad de la molécula de ácido nucleico para codificar una flagelina funcional.

15 **[0059]** Una secuencia de polinucleótidos o de oligonucleótidos puede deducirse a partir del código genético de una proteína, sin embargo, la degeneración del código debe tenerse en cuenta y las secuencias de ácido nucleótido también incluyen secuencias, que son degeneradas como un resultado del código genético, cuyas secuencias puede determinar fácilmente un experto habitual en la materia.

20 **[0060]** Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido", como se usan en el presente documento, se refieren a un oligonucleótido, polinucleótido o nucleótido y a fragmentos o a partes de los mismos, y a ADN o ARN de origen genómico o sintético, que puede ser mono- o bi- catenario y representar la cadena con sentido o antisentido. Debe entenderse que la expresión incluye, como equivalentes, análogos de ARN o de ADN preparados a partir de análogos de nucleótidos, y, según sea aplicable a la realización que se está describiendo.

30 **[0061]** El término "oligonucleótido" se refiere a una secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 6 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, preferentemente aproximadamente de 15 a 30 nucleótidos y más preferentemente aproximadamente de 20 a 25 nucleótidos, que puede usarse en amplificación por PCR o en un ensayo de hibridación o en una micromatriz. Como se usa en el presente documento, oligonucleótido es sustancialmente equivalente a los términos "amplímeros", "cebadores", "oligómeros", y "sondas", como normalmente se define en la técnica. Los oligonucleótidos que codifican los epítomos peptídicos específicos, útiles en la preparación de la vacuna de la presente invención, se proporcionan en las Tablas 1-3 anteriores del presente documento.

35 **[0062]** Como se usa en el presente documento, son condiciones altamente rigurosas aquellas que permiten una divergencia de secuencia de hasta aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 25 %, preferentemente hasta aproximadamente el 5% a aproximadamente el 15 %. Sin limitación, los ejemplos de condiciones altamente rigurosas (-10 °C por debajo de la T<sub>m</sub> del híbrido calculada) usan como la solución de lavado de 0,1 X SSC (citrate en solución salina convencional) y SDS al 0,5 % a la T<sub>i</sub> (temperatura de incubación) apropiada por debajo de la T<sub>m</sub> del híbrido calculada. La máxima rigurosidad de la condiciones se debe principalmente a las condiciones del lavado, particularmente si las condiciones de hibridación usadas son aquellas que permiten que se formen híbridos menos estables junto con híbridos estables. Las condiciones de lavado a mayor rigurosidad eliminan después los híbridos menos estables. Una condición de hibridación común que puede usarse con las condiciones de lavado de altamente a moderadamente rigurosas, descritas anteriormente, es la hibridación en una solución de 6 X SSC (o 6 X SSPE), 5 X reactivo de Denhardt, SDS al 0,5%, ADN de esperma de salmón fragmentado, desnaturalizado, 100 mg/ml a una T<sub>i</sub> apropiada. (Véase, en líneas generales, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> edición, Cold Spring Harbor Press (1989) para condiciones adecuadas de alta rigurosidad).

50 **[0063]** Las condiciones de rigurosidad son una función de la temperatura usada en el experimento y lavados de hibridación, la molaridad de los cationes monovalentes en una solución de hibridación y en la solución (o soluciones) de lavado y el porcentaje de formamida en la solución de hibridación. En general, la sensibilidad mediante hibridación con una sonda se ve afectada por la cantidad y actividad específica de la sonda, la cantidad del ácido nucleico diana, la detectabilidad de la sonda, la tasa de hibridación y la desnaturalización de la hibridación. La tasa de hibridación está maximizada a una T<sub>i</sub> de aproximadamente 20 °C -25 °C por debajo de la T<sub>m</sub> para híbridos de ADN: ADN y aproximadamente 10 °C -15 °C por debajo de la T<sub>m</sub> para híbridos de ADN: ARN. También puede maximizarse mediante una fuerza iónica de aproximadamente 1,5 M de Na<sup>+</sup>. La tasa es directamente proporcional a la longitud del dúplex e inversamente proporcional al grado de desapareamiento.

60 **[0064]** La especificidad en cuanto a la hibridación, sin embargo, es una función de la diferencia en cuanto a la estabilidad entre el híbrido deseado y los híbridos de "fondo". La estabilidad del híbrido es una función de la longitud del dúplex, de la composición de bases, de la fuerza iónica, del desapareamiento y de agentes desestabilizantes (si hubiese alguno). La T<sub>m</sub> de un híbrido perfecto puede calcularse para híbridos de ADN: ADN usando la ecuación de Meinkoth et al (1984).

65

Moléculas quiméricas o recombinantes

**[0065]** Una "proteína quimérica", "polipéptido quimérico" o "proteína recombinante" se usan indistintamente y se refieren a un epítipo peptídico de la gripe unido operativamente a un polipéptido distinto del polipéptido a partir del cual derivó el epítipo peptídico. Los epítopos peptídicos de la presente invención pueden prepararse por expresión en un vector de expresión como una proteína quimérica. Los expertos en la materia conocen métodos para producir una proteína quimérica o recombinante que comprenda un epítipo peptídico de la gripe. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un epítipo peptídico de la gripe puede insertarse en un vector de expresión para la preparación de una construcción de polinucleótidos para la propagación y expresión en células hospedadoras.

**[0066]** En un ejemplo no limitante, el polipéptido quimérico descrito incluye quimeras de un epítipo peptídico de la gripe con uno o más de los siguientes polipéptidos: flagelina, toxina colérica, toxina tetánica, ovo albúmina, proteína de choque térmico de la tuberculosis, toxoide diftérico, proteína G del virus sincitial respiratorio, proteína de membrana externa de *Neisseria meningitidis*, nucleoproteína (N) del virus de la estomatitis vesicular, glicoproteína (G) del virus de la estomatitis vesicular, proteína rica en glutamato del antígeno *Plasmodium falciparum*, proteína 3 de la superficie del merozoíto o proteína de envuelta (E) de virus.

**[0067]** La expresión "vector recombinante" y "vector de expresión recombinante" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ADN, por ejemplo, un plásmido, flagelina o virus, que contiene secuencias de ácido nucleico deseadas y apropiadas necesarias para la expresión de los epítopos peptídicos recombinantes para la expresión en una célula hospedadora particular. Como se usa en el presente documento "unido operativamente" se refiere a una unión funcional de al menos dos secuencias. Unido operativamente incluye la unión entre un promotor y una segunda secuencia, por ejemplo un ácido nucleico de la presente invención, en el que la secuencia promotora inicia y media la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia.

**[0068]** El vector de expresión puede proporcionar las regiones reguladoras necesarias para la transcripción del epítipo peptídico. La naturaleza exacta de las regiones reguladoras necesarias para la expresión de genes puede variar entre vectores y células hospedadoras. Generalmente, se requiere un promotor que sea capaz de unir la RNA polimerasa y promover la transcripción de una secuencia de ácido nucleico asociada operativamente. Las regiones reguladoras pueden incluir las secuencias 5' no-codificantes implicadas con el inicio de la transcripción y traducción, tales como la caja TATA, secuencia de terminación, secuencia CAAT y similares. La región 3' no codificante para la secuencia codificante puede contener secuencias reguladoras de terminación transcripcional, tales como terminadores y sitios de poliadenilación. También puede proporcionarse un codón de inicio de la traducción (ATG).

**[0069]** Para clonar las secuencias de ácido nucleico en el sitio de clonación de un vector, durante la síntesis de los ácidos nucleicos, enlazadores o adaptadores proporcionan sitios de restricción compatibles apropiados. Por ejemplo, un sitio enzimático de restricción deseado puede introducirse en un fragmento de ADN por amplificación del ADN mediante el uso de PCR con cebadores que contienen el sitio de enzimático de restricción deseado.

**[0070]** Una construcción de expresión que comprenda una secuencia epitópica peptídica asociada operativamente con regiones reguladoras puede introducirse directamente en células hospedadoras apropiadas para la expresión y producción de los epítopos peptídicos como tal o como proteínas de fusión recombinantes. Los vectores de expresión que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, plásmidos, cósmidos, fagos, fagémidos, flagelina o virus modificados. Típicamente, tales vectores de expresión comprenden un origen de replicación funcional para la propagación del vector en una célula hospedadora apropiada, uno o más sitios de restricción endonucleasa para la inserción de la secuencia génica deseada, y uno o más marcadores de selección.

**[0071]** Después, la construcción de polinucleótidos recombinante que comprende el vector de expresión y un epítipo peptídico debe transferirse dentro de una célula hospedadora bacteriana en la que pueda replicarse y expresarse. Esto puede conseguirse por métodos conocidos en la técnica. El vector de expresión se usa con una célula hospedadora procarionta o eucariota compatible que puede derivar de bacterias, levaduras, insectos, mamíferos y seres humanos.

**[0072]** Un vector de expresión particularmente preferido es un vector de flagelina. Un ejemplo no limitante de un vector de expresión de flagelina se describe en el documento US 6.130.082, incorporado en el presente documento por referencia. También son adecuados otros vectores de expresión que incluyan un gen de flagelina, por ejemplo un gen *fliC* de *Salmonella*. Las células hospedadoras que expresan la flagelina recombinante pueden formularse como vacunas vivas.

**[0073]** Una alternativa para la producción de epítopos peptídicos por técnicas recombinantes es la síntesis peptídica mediante el uso de un sintetizador peptídico. En la técnica pueden usarse síntesis peptídicas convencionales u otros protocolos sintéticos.

Formulación de la vacuna

5 [0074] La vacuna puede formularse para la administración en uno de muchos modos diferentes. De acuerdo con una realización de la invención, la vacuna se administra por vía intranasal. La composición intranasal puede formularse, por ejemplo, en forma líquida, como gotas nasales, pulverización o ser adecuada para la inhalación, como un polvo, crema o emulsión. La composición puede contener una diversidad de aditivos tales como adyuvantes, excipientes, estabilizantes, tampones o conservantes. Para una aplicación sencilla, la composición de vacuna se suministra preferentemente en un recipiente apropiado para la distribución de la flagelina recombinante en forma de gotas nasales o un aerosol. En determinadas realizaciones preferidas la vacuna se formula para administración mucosa, en particular administración nasal (Arnon, 2001; Ben-Yedidia, 1999).

[0075] En otra realización de la invención, la administración es oral y la vacuna puede presentarse, por ejemplo, en forma de un comprimido o incluirse en una capsula de gelatina o una microcapsula.

15 [0076] En otra realización más, la vacuna se formula para administración parenteral. En algunas realizaciones la vacuna se formula para inoculación masiva, por ejemplo, para usar con un inyector a presión o un cartucho de un solo uso.

20 [0077] La formulación de estas modalidades es en general conocida por los expertos en la materia.

[0078] Los liposomas proporcionan otro sistema de administración para la administración y presentación del antígeno. Los liposomas son vesículas bicapa compuestas de fosfolípidos y otros esteroides que rodean un centro típicamente acuoso en el que los antígenos y otros productos pueden encapsularse. La estructura del liposoma es muy versátil con muchos tipos de tamaño que varían de nanómetros a micrómetros, desde aproximadamente 25 nm a aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ . Se ha observado que los liposomas son eficaces para la administración de agentes terapéuticos a superficies dérmicas y mucosas. Adicionalmente, los liposomas pueden modificarse para una administración diana, por ejemplo, incorporando anticuerpos específicos en la membrana de la superficie, o alterarse para encapsular bacterias, virus o parásitos. El tiempo de supervivencia promedio de la estructura del liposoma intacto puede prolongarse con la inclusión de determinados polímeros, por ejemplo, polietilén glicol, que permite la liberación prolongada *in vivo*.

35 [0079] Las micropartículas y nanopartículas emplean pequeñas esferas biodegradables que actúan como depósitos para la administración de vacunas. La principal ventaja que poseen las microesferas poliméricas sobre otros adyuvantes con efecto de tipo depósito, es que son extremadamente inocuas y han sido autorizadas por la FDA (administración de alimentos y medicamentos) en los Estados Unidos para su uso en medicina humana como suturas adecuadas y para su uso como un sistema de administración de fármacos biodegradable (Langer, 1990). Las tasas de hidrólisis de copolímeros se caracterizan muy bien, lo que a su vez permite la fabricación de micropartículas con liberación antigénica prolongada durante periodos de tiempo prolongados (O'Hagen, et al., 1993).

40 [0080] La administración parenteral de micropartículas suscita inmunidad de larga duración, especialmente si incorporan características de liberación prolongadas. La tasa de liberación puede modularse mediante la mezcla de polímeros y sus pesos moleculares relativos, que se hidrolizarán en diferentes periodos de tiempo. Sin desear ligarse a teoría alguna, la formulación de partículas de diferente tamaño (1  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$ ) también puede contribuir a respuestas inmunológicas de larga duración ya que las partículas grandes deben degradarse en partículas más pequeñas antes de estar disponibles para la captación por los macrófagos. De esta manera, podría desarrollarse una vacuna de una sola inyección integrando diversos tamaños de partículas, prolongando por tanto la presentación del antígeno y beneficiando enormemente a los productores pecuarios.

50 [0081] En algunas aplicaciones, en la formulación de la vacuna puede incluirse un adyuvante o excipiente. La elección del adyuvante se determinará en parte por el modo de administración de la vacuna. Por ejemplo, la vacunación no inyectada conducida a un mejor cumplimiento global y a menores costes globales. Un modo de administración preferido es la administración intranasal. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes intranasales incluyen polvo de quitosán, microesferas de PLA y PLG, QS-21, nanopartículas de fosfato de calcio (CAP) y mCTA/LTB (toxina colérica mutante E112K con la subunidad B pentamérica de la enterotoxina termolábil).

Uso terapéutico de las vacunas

60 [0082] Las vacunas de la presente invención están destinadas para el uso en seres humanos y en animales, incluyendo ganado, aves de corral y animales domésticos, para la prevención o atenuación de la enfermedad de la gripe A y B.

65 [0083] Para ilustrar más completamente algunas realizaciones de la invención se presentan los siguientes ejemplos. Sin embargo, de ningún modo deben considerarse como limitantes del amplio alcance de la presente invención. Un experto en la materia puede diseñar fácilmente muchas variaciones y modificaciones de los principios descritos en el presente documento sin alejarse del alcance de la invención.

## Ejemplos

5 **[0084]** ABREVIATURAS: Ab: anticuerpos; CTL: linfocitos T citotóxicos; EID: dosis infecciosa de huevos; HA: Hemaglutinina; UHA: Unidades de Hemaglutinación; NP: Nucleoproteína; PMBC: células mononucleares de sangre periférica; Th: auxiliar T; IN o i.n.: intranasal; IP: intraperitoneal; IM o i.m.: intramuscular; NK: linfocitos citolíticos naturales; proporción E: D: proporción de efector:diana.

### EJEMPLO 1. Síntesis de péptidos y de flagelina recombinante.

10 **[0085]** Los epítomos pueden expresarse como flagelos recombinantes, en el que cada flagelo comprende uno o más epítomos peptídicos. Como alternativa, los epítomos peptídicos pueden expresarse en un vector de expresión como una proteína de fusión multimérica que comprende dos o más epítomos peptídicos.

15 **[0086]** La flagelina recombinante se sintetiza por métodos de biología molecular conocidos en la técnica. En resumen: se preparó un vector de expresión de flagelos que comprendía un marcador de antibióticos. Los oligonucleótidos sintetizados se insertaron en el sitio EcoRV del plásmido y se transfectaron en células competentes de *E. coli*. Se seleccionaron colonias que contenían el plásmido recombinante por sondeo con un oligonucleótido radiomarcado. Los plásmidos de colonias positivas se purificaron y la orientación del inserto se determinó usando  
20 análisis de restricción. Los plásmidos deseados se usaron para transformar células competentes de *Salmonella typhimurium* LB5000 (una modificación competente, negativa restrictiva no flagelada) y después se transfirieron a una cepa de *Salmonella dublin* SL5928 (un mutante Aro A) para una vacuna viva negativa a flagelina, por transducción usando el fago int. P22HT105/1. La cepa de *S. dublin* transformada se seleccionó por la resistencia a la kanamicina, movilidad al microscopio óptico y crecimiento en placas de agar LB semisólido, complementado con  
25 caldo nutritivo Oxoid nº 2. Los clones seleccionados se cultivaron durante una noche en 2 litros de medio y la flagelina se purificó por escisión ácida. El producto resultante es un agregado de la flagelina y puede usarse como tal para una vacuna.

30 **[0087]** La flagelina recombinante no pretende limitarse por la elección de la secuencia de flagelina. En algunas realizaciones la flagelina tiene el gen H1-d de *Salmonella muenchen* con el número de acceso X03395 para la flagelina de fase 1-d (ATCC 8388).

### EJEMPLO 2: Respuesta de ratones quiméricos contra el virus de la gripe completamente inactivado.

35 **[0088]** Para evaluar la respuesta inmunogénica suscitada por la vacuna de la presente invención se usaron quimeras de ser humano-ratón. Para establecer la idoneidad de la quimera de ser humano/ratón por radiación, para evaluar la vacuna basada en péptidos, se evaluó su respuesta inmunitaria contra el virus de la gripe purificado inactivo. Los ratones se inmunizaron por vía i. p. con 50 µg del virus el día del trasplante de PBMC, seguido de una exposición viral subletal con la cepa A/Texas/ 1/77 de la gripe, 14 días después de la inmunización. La vacunación  
40 de la quimera de ser humano/ratón por radiación con la vacuna del virus completamente inactivado, sin ningún adyuvante, indujo la producción de anticuerpos específicos, el título de los anticuerpos en suero fue significativamente más alto (2,4 veces) en la quimera inmunizada en comparación con el grupo control. Además, esta vacunación redujo notablemente la infección viral posterior. El título del virus en los pulmones después de la exposición fue significativamente más bajo (2,7 órdenes de magnitud) en la quimera inmunizada en comparación  
45 con el grupo control.

**[0089]** Este experimento demuestra la idoneidad de la quimera de ser humano/ratón por radiación, para evaluar la respuesta anti-gripal después de inmunización.

50 EJEMPLO 3. Análisis FACS de ratones inmunizados para evaluar el implante de PBMC humanas en la quimera de ser humano/BALB.

**[0090]** El éxito del implante de las células humanas en quimeras de ser humano/ratón se demostró en un experimento preliminar que demostraba que la mayoría de los linfocitos en el peritoneo (50–80 %) y en los pulmones  
55 de los ratones (30-60 %) eran de origen humano. Para la evaluación del implante de células humanas en la quimera de ser humano/ratón, la presencia de células humanas en los ratones implantados se analizó por FACS.

### EJEMPLO 4. Eliminación del virus de los pulmones después de exposición subletal.

60 **[0091]** La infección de la gripe es una infección respiratoria; por tanto, una respuesta inmunitaria local inducida por una administración intranasal de la vacuna puede ser más eficaz que la administración parenteral. La pauta de inmunización se modificó para adaptarla a la inmunización intranasal.

65 **[0092]** Por vía intranasal (i.n.) se inmunizaron ratones (6-8 por grupo en 7 experimentos repetidos) 10-12 días después del trasplante de PBMC, como se describe en los Métodos. Diez días después, se expusieron por vía i. n. a 10<sup>-4</sup> UHA en 50 µl de líquido alantoico de la cepa viva A/Texas/1/77 u otra cepa del virus de la gripe. Cinco días

después se sacrificaron y sus pulmones se extirparon para determinar la titulación del virus. La producción de anticuerpos humanos en estos ratones se evaluó tanto en el suero (antes de la exposición) como en los pulmones (después de la exposición).

- 5 **[0093]** Además del experimento de exposición a infección subletal, se examinó la capacidad de la vacuna para proteger a la quimera de ser humano/ratón de una dosis letal del virus de la gripe.

EJEMPLO 5. Protección de infección con diferentes cepas de la gripe.

- 10 **[0094]** Uno de los principales problemas con las vacunas de la gripe actualmente disponibles es que solo son eficaces contra las cepas incluidas en la vacuna. Por lo tanto, es de interés examinar la capacidad de la flagelina recombinante que comprende epítomos de la gripe para proteger a ratones de diferentes subtipos de la gripe. El epítomo peptídico de M, que se expresa en la flagelina, puede conservarse en todos los subtipos H3 de la gripe, mientras que los epítomos de linfocitos T son de regiones de la hemaglutinina y nucleoproteína altamente  
15 conservadas en otros subtipos también. En otros ejemplos el epítomo peptídico de M se conserva en todas las cepas H9 o H5. En la primera etapa, se demuestra que los anticuerpos de conejo contra estos epítomos pueden de hecho reconocerse y reaccionar en ELISA con diferentes cepas de la gripe incluyendo A/Texas/1/77, A/Aichi/68, A/PR/8/34 y A/Japonesa/57. Para someter a ensayo adicionalmente el potencial de esos epítomos para conferir protección cruzada en seres humanos, se inmunizaron quimeras de ser humano/ratón por radiación (8 ratones por grupo) por  
20 vía i. n. con la flagelina recombinante. Su resistencia a diferentes exposiciones de cepas de la gripe se detectó 7 días después y se comparó con la de los ratones no trasplantados que se inmunizaron con la misma mezcla de flagelos. Las cepas de la gripe usadas para infección fueron: A/Texas/1/77 (H3N2), A/Japonesa/57 (H2N2) y A/PR/8/34 (H1N1). También se sometieron a ensayo otras cepas.

25 EJEMPLO 6: Ensayo de respuesta de CTL.

- [0095]** Después de la inmunización con la vacuna de la presente invención, los bazo de los animales se extirparon y se incubaron, durante 5 días más, con el péptido que representaba el epítomo en cuestión (por ejemplo NP 335-350 o M2 1-18). En una placa distinta se incubaron células diana singénicas carentes de TAP (con la misma tipificación que HLA A2.1, por ejemplo: células RMA) con el mismo péptido y con S<sup>35</sup>-Metionina. Los esplenocitos  
30 activados se incubaron con las células diana y después del reconocimiento del péptido, los atacarán y liberarán metionina. Recuentos de alta radiactividad indican un nivel alto de linfocitos CTL activos.

EJEMPLO 7: Ensayos de anticuerpos en suero y de neutralización de anticuerpos.

- 35 **[0096]** Se inmunizaron ratones, cobayas o conejos con la mezcla de la flagelina recombinante, 14 días después de la inmunización, se extrajeron muestras de sangre y se separó el suero. Estos sueros se emplearon para detectar la especificidad de los anticuerpos, por ejemplo por ELISA o transferencia de western, además, es posible determinar su tipo, es decir, IgG1, o IgG2a o IgG2c etc. En homogeneizados de pulmón pudo detectarse IgA, lo que indica una  
40 respuesta inmunitaria en la mucosa.

- [0097]** Ensayo de neutralización: células MDCK (riñón canino Madin-Darby) se infectaron con el virus de la gripe, como se determina por recuentos en placa o por MTT (un tipo de tinción para determinar la viabilidad), seguido de incubación del virus con suero de animales inmunizados; los anticuerpos se unen al virus e impiden la infección de  
45 las células MDCK. Un número de placas reducido o una viabilidad aumentada de las células indican la especificidad de los anticuerpos y su capacidad para impedir/reducir la infección.

EJEMPLO 8: Inmunogenicidad de epítomos individuales.

- 50 **[0098]** Se inmunizaron ratones transgénicos HHD/HLA A2 con flagelos que expresaban cada epítomo (Fla-91, Fla-335, Fla-380, Fla-M1 2-12) o con una mezcla de 6 epítomos (Hexa-vacuna 1: Fla-91, Fla-335, Fla-380, Fla-M1 2-12, Fla-354 y Fla-307). Fla-91 se refiere a flagelos que comprenden el epítomo de HA 91-108; Fla-335 se refiere a flagelos que comprenden el epítomo de NP 335-350; Fla-380 se refiere a flagelos que comprenden el epítomo de NP 380-393; Fla-M1 2-12 se refiere a flagelos que expresan el epítomo de M1 2-12; Fla-354 se refiere a flagelos que  
55 expresan el epítomo de HA 354-372 (gripe B); Fla-307 se refiere a flagelos que expresan el epítomo de HA 307-319.

- [0099]** Las células se incubaron con el péptido respectivo y las células de los ratones inmunizados con la Hexa-vacuna se incubaron con los 4 péptidos HA91, NP335, NP380, M1 2-12. En la siguiente Tabla 4 del presente documento pueden encontrarse los datos de las secuencias epitópicas peptídicas, identificadores de secuencia y de  
60 homología de cepas.

5

Tabla 4: Listado de epítomos peptídicos de la Hexa-vacuna1

Tipo de epítomo	Secuencia epitópica	Homología en cepas de la gripe
auxiliares T	HA307-319 PKYVKQNTLKLAT (SEC ID N°: 57)	H3N2
CTL	NP335-350 SAAFEDLRVLSFIRGY (SEC ID N°:67)	H1N2, H2N2, H3N2, H9N2.
CTL	NP 380-393 ELRSRYWAIRTRSG (SEC ID N°:68)	H1N1, H1N2, H2N2, H3N8, H5N1, H5N2, H5N9, H6N1, H6N2, H6N9, H7N7, H9N2, H9N2, H11N1, H11N8, H11N9, H14N5.
Linfocito B	HA91-108 SKAYSNCYPYDVPDYASL (SEC ID N°: 48)	H3N2
Linfocito B y CTL	M1 2-12 SLLTEVETYVP (SEC ID N°: 26)	H1N1, H3N2, H4N6, H5N1, H5N2, H5N3, H6N1, H7N3, H9N2,
Célula B (gripe B)	HA 354-372 PAKLLKERGFFGAIAGFLE (SEC ID N°: 80)	B/Hong Kong/330/2001; B/Beijing/1/87; B/Singapur/222/79; B/Oregón/5/80; B/Shandong/7/97; B/Memphis/13/03; B/Los Ángeles/1/02; B/Nebraska/1/01; B/Hong Kong/548/2000; B/Hong Kong/156/99; B/Viena/1/99; B/Lee/40 y otras.

30 Inmunogeneicidad en modelo de "ratón transgénico HHD".

**[0100]** Se seleccionaron epítomos CTL para determinar su unión a moléculas HLA-A2. Para estudiar respuestas restringidas a HLA, se emplearon ratones D b-/-  $\beta 2$  microglobulina ( $\beta 2m$ ) anulados, transgénicos para una HLA - A2.1/D b-/- recombinante. Se empleó la cadena sencilla de  $\beta 2$  microglobulina (ratones HHD). Estos ratones combinan transgénesis de HLA clásica con destrucción selectiva de H-2 murina y muestran solo respuestas restringidas para HLA-A2.1. Estos ratones sirven como un modelo animal para la búsqueda de sistemas que implican inmunidad celular tales como cáncer, autoinmunidad y temas de vacunación.

**[0101]** La respuesta celular que contribuye a la eliminación de los virus implica mecanismos mediados por citocinas. La implicación de citocinas en la respuesta inmunitaria creada por la vacuna recombinante se estudió en el modelo de ratones transgénicos HHD.

**[0102]** En este estudio, se administraron tres veces, por vía subcutánea, flagelos que expresaban diversos epítomos peptídicos en PBS, emulsionados en adyuvante de Freund. Al grupo control se le administró PBS emulsionado en adyuvante de Freund.

**[0103]** Ensayos celulares: los esplenocitos de estos ratones se incubaron en presencia de los péptidos sintéticos correspondientes al epítomo anterior. La secreción de IFN- $\gamma$  por las células en respuesta a la estimulación con los péptidos se controló por ELISA.

**[0104]** La Figura 1 muestra la secreción de IFN gamma medida a partir de linfocitos incubados con el péptido respectivo después de la segunda y tercera inmunización.

**[0105]** Los linfocitos activados secretaron IFN- $\gamma$  en respuesta a la incubación con los péptidos correspondientes. El grupo inmunizado con la Hexa-vacuna 1, que contenía la mezcla de 6 flagelos recombinantes, se incubó por separado con una mezcla de los 4 epítomos celulares sometidos a ensayo. Después de la tercera inmunización, la secreción de IFN- $\gamma$  de estas células era significativamente elevada (los niveles de IFN secretados por las células incubadas con medio, estaban por debajo del nivel de detección del ensayo de 2pg/ml). El IFN gamma secretado de linfocitos no activados (controles negativos- cultivados en medio sin péptido) fue <0,004 ng/ml.

**[0106]** La lisis de NK (linfocitos citolíticos naturales) contribuye a la respuesta antiviral. Se sabe que las células virales infectadas son más sensibles a la lisis que las células no infectadas. Se especula que el reconocimiento de células diana por linfocitos citolíticos naturales es más 'específico' que lo que se pensaba anteriormente. Se ha demostrado una similitud en el motivo del péptido entre aglutinantes HLA A2 y aglutinantes HLA-G (expresado linfocitos citolíticos naturales).

**[0107]** Por lo tanto, además del mecanismo no específico de la activación de NK, los péptidos específicos para HLA-A2 pueden suscitar una elevación específica adicional de la actividad de NK (lisis).

5 **[0108]** Ensayos con linfocitos T citotóxicos (CTL): se inmunizaron ratones HHD/HLA A2.1 con la Hexa-vacuna 1 en PBS. No se demostró la lisis directa de células diana por linfocitos CD8+, sin embargo, se obtuvo una lisis marcada de células Yac-1 que son sensibles a lisis por NK. La lisis por NK se encontró después de la segunda inmunización y también fue elevada después de la tercera inmunización. Debe observarse que los niveles de línea basal de la activación NK en ratones sin tratar son aproximadamente nulos.

10 **[0109]** Las Figuras 2A - 2C muestran la lisis de células diana por NK derivados de ratones vacunados después de la segunda y tercera inmunización. Se presenta el porcentaje de lisis de las dianas YAC-1 por linfocitos NK después de la segunda y tercera inmunización. Linfocitos de bazo de ratones inmunizados se sensibilizaron con los péptidos incluidos en los flagelos recombinantes durante 5 días y después se incubaron con células YAC-1 marcadas con <sup>35</sup>S-Met. La lisis específica se determinó a proporciones E: D diferentes. Los datos (% de lisis por linfocitos NK de cada grupo) se presentan como veces de activación en comparación con la lisis de grupo inmunizado con flagelos nativos. Después de la segunda inmunización, los linfocitos NK de los ratones inmunizados con la combinación de 6 epítomos (Hexa-vacuna 1) fueron capaces de realizar la lisis de las células diana más eficazmente que las células de los ratones vacunados con los flagelos nativos. Las Figuras 2A y 2B muestran la lisis por linfocitos NK de epítomos peptídicos recombinantes individuales o una combinación de tres epítomos recombinantes (Fla-NP335, Fla-NP380, Fla-MI 2-12).

15 **[0110]** Después de tres inmunizaciones, las células de los ratones inmunizados con M1 2-12 mostraron una elevación significativa en su capacidad para destruir células diana. El epítomo peptídico M1 2-12 es por lo tanto un epítomo peptídico útil en la preparación de la vacuna de la presente invención.

20 **[0111]** Las Figuras 3A y 3B muestran los resultados de inmunización de ratones C57B1/6 con la Hexa-vacuna 1, que consiste en flagelos con 6 epítomos de la gripe (HA 91-108, HA 354-372, HA 307-319, NP 335-350, NP 380-393 y M2 1-18).

25 **[0112]** El suero se retiró después de una pauta de 3 inmunizaciones y se determinó la especificidad de Ab contra el virus de la gripe H3N2 completo (Figura 3A) y contra el péptido M2 1-18 específico (Figura 3B).

30 **[0113]** La unión de epítomos y estabilización de HLA-A2 en T2 humano (deficiente para transportadores TAP y por lo tanto expresan cantidades bajas o inestables de moléculas HLA-A2.1, Después de la unión de péptidos, se expresaron niveles estables y altos de HLA-A2 en la superficie celular). Se incubaron linfocitos T2 con diversas concentraciones de péptidos en medio aséptico durante una noche y se tiñeron con anticuerpos monoclonales específicos. La estabilización de las moléculas HLA-A2 se detectó por citometría de flujo.

35 **[0114]** La Figura 4 muestra la unión de péptidos a HLA-A2 en linfocitos T2: se observó unión alta y dependiente de la dosis por el péptido M1 3-11. Otros péptidos sometidos a ensayo, NP 336-344, NP 380-388 y HA 307-319, mostraron alguna capacidad de unión baja que no era dependiente de la dosis. NP 380-393 se conoce como específico para la molécula HLA B8 y no se esperaba que se uniese a HLA A2. El péptido HA 91-108 que es más largo que el surco de HLA, mostró capacidad de unión solo a la mayor concentración (100 μM), debido probablemente al motivo de HLA en el lado N-terminal. La unión mínima y no dependiente de la dosis se demostró a 40 concentraciones más bajas.

45 **[0115]** Además de las respuestas celulares, los sueros de ratones después de la tercera inmunización se compararon con los sueros pre-inmunes para anticuerpos específicos contra los epítomos:

50 **[0116]** Las Figuras 5A-5C muestran que los epítomos peptídicos recombinantes suscitan protección contra anticuerpos. Una elevación significativa en el título de Ab, específica para el epítomo se obtuvo con los epítomos NP 335-350 (5A), M1 2-12 (5B) y HA 91-108 (5C) en ratones inmunizados con el único epítomo de interés (200mg/ratón, IM).

## 55 Conclusiones

60 **[0117]** Los resultados de este estudio indican que la inmunización con la flagelina recombinante que contiene epítomos de linfocitos T específicos da como resultado el reconocimiento específico y respuestas celulares de tipo TH1, como se muestra por secreción de IFN-γ por linfocitos de los ratones vacunados en respuesta a estimulación *in-vitro* con los péptidos sintéticos respectivos. Adicionalmente, la unión específica de los epítomos investigados a células diana que expresan HLA A2 así como la lisis específica de estas células, cargadas con el epítomo, por linfocitos NK indican respuesta celular a la Hexa-vacuna 1 en ratones transgénicos HHD.

## 65 EJEMPLO 9: estudio de optimización de la dosis.

**[0118]** Este estudio se diseñó para seleccionar la dosis óptima del epítomo basado en la Hexa-vacuna, vacuna,

antigripal, que es la dosis más eficaz que confiere una respuesta inmunitaria suficiente medida por diversos ensayos inmunológicos. La realización de este estudio con la Hexa-vacuna evaluó la eficacia de la vacuna evaluando la respuesta humoral y titulación del virus en los pulmones después de una pauta de tres inmunizaciones e infección.

#### 5 Diseño del estudio

[0119] Ratonos HHD/HLA A2.1 se inmunizaron 3 veces por vía IN e IM con 240, 80, 24 o 8 µg de Hexa-vacuna 1, que consistía en epítomos de la gripe dentro de flagelos bacterianos en PBS (véase la Tabla 5 para grupos e identificación). Se extrajo sangre para la evaluación de la respuesta humoral suscitada en los ratones vacunados. Los ratones se infectaron con el virus de la gripe H3N2 y la titulación viral en sus pulmones sirvió como una correlación para determinar la eficacia.

Tabla 5: grupos de estudio e identificaciones

Grupo N°.	Tratamiento	Vía
A	8 µg	IN
B	24 µg	IN
C	80 µg	IN
D	240 µg	IN
E	flagelos (Control) 240 µg	IN
F	8 µg	IM
G	24 µg	IM
H	80 µg	IM
I	240 µg	IM
J	Flagelos (Control)240 µg	IM

#### 30 Respuesta inmunitaria humoral

[0120] Los aumentos de dosis de la Hexa-vacuna 1 que contenían 8-240 µg de todos epítomos combinados indujeron una respuesta humoral específica contra el virus H3N2. La respuesta en los grupos inmunizados con la dosis más alta fue significativamente superior que la de la línea basal. El cambio de título entre sueros preinmunizados e inmunizados se muestra en la Figura 6, que corresponde a los grupos en la Tabla 5. Una elevación significativa sobre el nivel pre-inmune ( $p < 0,05$ ) y sobre los grupos de control E y J que se inmunizaron con los flagelos nativos (IN o IM respectivamente) en cuanto a reconocimiento específico del virus de la gripe H3N2 se observó en los grupos D e I que se inmunizaron con 240 µg de la Hexa-vacuna 1 IN o IM, respectivamente.

#### 40 Respuesta humoral: Reconocimiento específico de flagelos

[0121] La respuesta humoral también se dirige hacia el transportador de flagelos. En la figura 7 se muestra se muestra el título en suero de los anticuerpos.

[0122] La Figura 7 muestra la respuesta humoral contra flagelos después de administración IN o IM de la Hexa-vacuna 1. En los grupos inmunizados por vía IN (barras en el lado izquierdo); hubo una respuesta de aumento de dosis en la que se encontró mayor producción de Ab cuando se proporcionó la dosis más alta (IN 240 µg). En los grupos administrados por vía IM (barras en el lado derecho) se observó de manera similar una respuesta alta en todas las dosis que variaban de 8 µg -240 µg /ratón. En ambas vías, las respuestas de los flagelos nativos es mucho más alta; esto puede deberse a cambios estructurales causados por la adición de epítomos extraños que pueden influenciar su inmunogenicidad.

#### Titulación de virus

[0123] Después de una pauta de 3 vacunaciones, los ratones se infectaron con una dosis subletal de la cepa H3N2 del virus de la gripe (A/Texas/1/77). Los pulmones de los ratones se extrajeron 5 días después para determinar la titulación de la carga viral en ellos. La titulación se realizó en huevos fertilizados (Figura 8). La carga viral en los grupos inmunizados con la Hexa-vacuna 1 (240 µg) es comparable en ambas vías IM e IN y es significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) que el título en los grupos control. Esto demuestra que la Hexa-vacuna 1 es eficaz y proporciona protección contra la infección viral.

#### Conclusiones

[0124] Anticuerpos contra virus (H3N2); fueron significativamente superiores en el grupo inmunizado con las dosis más altas tanto IM como IN, pero no en los grupos inmunizados con dosis inferiores, demostrando una respuesta de

aumento de la dosis.

**[0125]** Eliminación del virus: en los grupos inmunizados IN e IM se encontró un título de virus más bajo, mientras que en animales inmunizados con dosis más bajas se detectaron títulos virales más altos.

**[0126]** Estos datos indican que existe una correlación entre la dosis y respuesta, en la que solo las dosis más altas conducen a una protección significativa.

**[0127]** Como se describe a continuación, no se advirtió pérdida de peso significativa, anomalías conductuales ni síntomas de alergia (elevación de IgE);

#### EJEMPLO 10: Respuesta de IgE después de inmunización

**[0128]** Para la evaluación de la posible respuesta alérgica al producto de la presente invención, los niveles de IgE se midieron en todos los experimentos principales realizados en ratones después de inmunización con diferentes combinaciones de epítomos o con flagelos nativos. En los diversos estudios, los ratones se inmunizaron IN o IM con los flagelos recombinantes, la IgE total en el suero se midió mediante un kit comercial de detección de IgE murina.

**[0129]** Los títulos más bajos de < 20 ng/ml se encontraron en los animales inmunizados similares al nivel normal en los ratones no inmunizados.

**[0130]** La Figura 9 presenta la concentración de IgE (ng/ml) en el experimento de dosificación y en el experimento para evaluar la respuesta celular. En ambas, los títulos de IgE el día 0 y después de la tercera inmunización fueron similares.

**[0131]** Los ratones se inmunizaron por vía IN o IM con la Hexa-vacuna 1 a dosis en aumento, desde 8 µg-240 µg /ratón. Los sueros de estos ratones se sometieron a ensayo para determinar la IgE total.

**[0132]** La Figura 10 representa la concentración de IgE en sueros de ratones transgénicos (TG) HHD inmunizados por vía IN con flagelos recombinantes que expresaban epítomos de la gripe.

#### Conclusiones

**[0133]** En las muestras de sueros de ratones inmunizados con flagelos recombinantes, se detectaron niveles bajos de IgE. El intervalo normal para IgE en plasma se estableció entre 19 y 200 ng/ml usando animales de tipo silvestre. Los títulos obtenidos en los animales inmunizados no superaron 20 ng/ml y por lo tanto, la Hexa-vacuna no induce respuestas alérgicas.

#### EJEMPLO 11: evaluación de la Hexa-vacuna 2 en conejos.

**[0134]** En este estudio, a los conejos se les administró por vía IN e IM el producto de vacuna en un entorno controlado en una instalación para animales certificada libre de patógenos específicos (SPF). Después de una pauta de 3 vacunaciones, se extrajeron muestras de sangre y especímenes del sitio de administración y se extrajeron órganos principales y se sometieron a análisis histopatológico.

**[0135]** Los grupos del estudio consistían en tres inmunizaciones que comparaban la Hexa-vacuna 2 (6 epítomos: HA91-108, HA307-319, HA 354-372, NP 335-350, NP 380-393, M1 2-12) con PBS:

Vía IN: Hexa-vacuna2 100 µg y 50 µg /50 µl /conejo

Vía IM: Hexa-vacuna2 600 µg y 300 µg /500 µl /conejo

**[0136]** No se observó mortalidad ni morbilidad en ninguno de los grupos. Los resultados Histopatológicos (2 semanas después de la inmunización) mostraron:

Intranasal: Sin toxicidad en los órganos examinados.

Intramuscular: Sin toxicidad en los órganos examinados. Un animal presentó infiltrado histolítico mínimo focal en el sitio de inyección.

#### Conclusiones

**[0137]** Seguridad: Se encontró que la Hexa-vacuna 2 era inocua y tolerable en conejos. Respuesta humoral: El título de Ab específico para diferentes cepas de la gripe se registró en algunos de los conejos. Debe observarse que se encontraron distintas respuestas entre conejos individuales. La Figura 10 describe el factor de aumento en el título de anticuerpos en comparación con el título pre inmune en los conejos respondedores. No se excluyó a los conejos no respondedores.

**[0138]** Figura 11: Factor de aumento del título de IgG para 3 cepas diferentes de la gripe en suero de conejos NZW inmunizados 3 veces por vía IN con flagelos recombinantes que expresaban 6 epítomos de la gripe.

## 5 EJEMPLO 12: Farmacocinética

**[0139]** Los estudios farmacocinéticos revelaron que el punto máximo de la vacuna en suero se obtuvo a los 15 minutos y se eliminó a las 12 horas. En un estudio paralelo con la vacuna formulada con adyuvante (Alum), la concentración máxima en suero se alcanzó después de 30 minutos y la vacuna se eliminó del suero después de 24 horas (datos no mostrados). Además se calcularon los valores  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  y ABC como se describe a continuación.

### Diseño del estudio

**[0140]** El estudio consistió en 10 grupos de 3 machos y 3 hembras por grupo a los que se les administró una sola dosis de de 50  $\mu$ g de flagelo recombinante/animal. A los animales se les extrajo la sangre a 10 puntos de tiempo predeterminados de 5, 10, 30 minutos y 1, 2, 4, 8, 12, 24 horas.

### Análisis farmacocinético

**[0141]** El cálculo de las características farmacocinéticas se basó en el tiempo de muestreo de sangre real [h] (relativo al tiempo de administración del tratamiento correspondiente) redondeado a dos dígitos decimales y los tiempos previos a la dosis negativos se establecieron a cero. Se usó la muestra antes de la administración para el cálculo de las características.

**[0142]** Para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos se aplicaron las siguientes reglas:

**[0143]** Los valores de concentración de flagelina en suero en los puntos de tiempo en el tiempo de retraso entre el tiempo cero y la primera concentración cuantificable se consideraron como cero. La evaluación de la biodisponibilidad relativa se realizó para los parámetros diana primarios ABC y  $C_{max}$ .

**[0144]** Los valores logarítmicos transformados de los parámetros diana primarios se sometieron a un análisis de modelo de varianza (ANOVA) con los efectos: secuencia, sujetos dentro de la secuencia, periodo y tratamiento. El efecto de secuencia se sometió a ensayo usando la media cuadrática de sujetos dentro de la secuencia del ANOVA como un término de error. Los otros efectos se sometieron a ensayo contra el error residual (error cuadrático medio) del ANOVA. Basándose en el ANOVA se calcularon los intervalos de confianza del 90 % para el ensayo de proporciones de tratamiento \*100/referencia [%].

**[0145]** Para los parámetros diana primarios se proporcionó el ensayo de proporciones de tratamiento individual\* 100/referencia [%] Para la frecuencia de  $T_{max}$  se dibujaron tablas por tratamiento basándose en el tiempo nominal de los valores  $T_{max}$ .

**[0146]** La Figura 12 representa la concentración en suero de proteína. La concentración en suero máxima 3,925 ng/ml ( $C_{max}$ ) de la Hexa-vacuna se observó después de 15 minutos ( $T_{max}$ ). La mitad ( $T_{1/2}$ ) de la cantidad de exposición total se obtuvo 30 minutos después de la dosis. El área bajo la curva del tiempo con respecto a la concentración de suero de 15,027 ng/ml indica la exposición total corporal a lo largo del tiempo a la Hexa-vacuna. No se detectaron rastros de proteína después de 12 h.

### Conclusiones

**[0147]** Al final del estudio farmacocinético se obtuvo una curva de concentración típica con un aumento pronunciado de la curva entre los 5 y 15 minutos y una pendiente moderada hasta las 12 horas. El nivel de concentración máximo ( $C_{max} = 3,925$  ng/ml) se observó después de 15 minutos. No pudieron detectarse trazas de proteína en el suero 12 horas después de la post-dosificación. La vacuna basada en flagelina se eliminará totalmente del suero a las 12 horas.

### Seguridad del epítomo.

**[0148]** Los epítomos conservados seleccionados utilizados en la Hexa-vacuna comprenden epítomos que son restrictivos para la mayoría de las moléculas HLA prevalentes en seres humanos. Los epítomos seleccionados son restrictivos para la estructura viral y no son compartidos por ninguna proteína humana por lo tanto no es probable que induzcan una reacción autoinmunitaria.

### Referencias

**[0149]** Ada GL y Jones PD, "The immune response to influenza infection", Curr. Topics Microbio. Immunol.1986;

128:1.

- Arnon R, Tarrab-Hazdai R, Ben-Yedidia T. Peptide-based synthetic recombinant vaccines with anti-viral efficacy. *Biologicals*. 2001; 29(3-4):237-42.
- 5 Ben-Yedidia T, Marcus H, Reisner Y, Arnon R. Intranasal administration of peptide vaccine protects human/mouse radiation chimera from influenza infection. *Int Immunol*. 1999; 11(7):1043-51.
- 10 Gianfrani C, Oseroff C, Sidney J, Chesnut R, Sette A. Human memory CTL response specific for influenza A virus is broad and multispecific. *Hum Immunol*. 2000; 61:438-452.
- 15 Ibrahim GF, Fleet GH, Lyons MJ, Walker RA. Method for the isolation of highly purified Salmonella flagellins. *J Clin Microbiol*. 1985; (6):1040-4.
- 20 Jeon SH, Ben-Yedidia T, Arnon R. Intranasal immunization with synthetic recombinant vaccine containing multiple epitopes of influenza virus. *Vaccine*. 2002; 20(21-22):2772-80.
- Lamb R A, Zebedee S L, Richardson C D. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell*. 1985; 40:627-633.
- 25 Langer R. New methods of drug delivery. *Science*. 1990; 249(4976):1527-33.
- Liu W, Zou P, Ding J, Lu Y, Chen YH. Sequence comparison between the extracellular domain of M2 protein human and avian influenza A virus provides new information for bivalent influenza vaccine design. *Microbes Infect*. 2005; 7(2):171-7.
- 30
- Meinkoth J, Wahl G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem*. 1984; 138(2):267-84.
- 35
- O'Hagan DT, Jeffery H, Davis SS. Long-term antibody responses in mice following subcutaneous immunization with ovalbumin entrapped in biodegradable microparticles. *Vaccine*. 1993; 11(9):965-9.
- 40
- Shapira M, Jolivet M, Arnon R. A synthetic vaccine against influenza with built-in adjuvanticity. *Int J Immunopharmacol*. 1985; 7:719-723.
- Slepishkin VA, Katz JM, Black RA, Gamble WC, Rota PA, Cox NJ. Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. *Vaccine*. 1995; 13(15):1399-402.
- 45
- Townsend AR, Skehel JJ. The influenza A virus nucleoprotein gene controls the induction of both subtype specific and cross-reactive cytotoxic T cells. *J Exp Med*. 1984; 160(2):552-63.
- Zou P, Liu W, Chen YH: The epitope recognized by a monoclonal antibody in influenza A virus M2 protein is immunogenic and confers immune protection. *Int Immunopharmacol*. 2005; 5(4):631-5.
- 50

**Listado de secuencias**

**[0150]**

- 55 <110>Yeda Research and Development Co. Ltd. at the Weizmann Institute of Science BEN-YEDIDIA, Tamar ARNON, Ruth
- <120> VACUNA MEJORA CONTRA LA GRIPE
- 60 <130> BNDVX/001 PCT
- <140> PCT/IL2006/  
<141> 06-12-2006
- 65 <150> 60/742.574  
<151> 06-12-2005

<150> 60/742.530  
<151> 06-12-2005

5 <160> 162  
<170> PatentIn versión 3.3  
<210> 1  
<211> 4  
<212> PRT  
10 <213> GRIPE  
  
<400> 1

15                           Glu val Glu Thr  
                                  1

20 <210> 2  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> GRIPE

25 <400> 2

Met Ser Leu Leu Thr Glu val Glu Thr His Thr Arg Asn Gly Trp  
  1          5                  10                  15

30  
  
<210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
35 <213> GRIPE  
  
<400> 3

40                           Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg  
                                  1                  5

45 <210> 4  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> GRIPE  
  
<400> 4

50  
  
                          Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys  
                                  1                  5                  10

55  
  
<210> 5  
<211> 11  
<212> PRT  
60 <213> GRIPE  
  
<400> 5

65                           Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn  
                                  1                  5                  10

5 <210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE

10 <400> 6

Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile  
1 5

15

<210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE

20

<400> 7

25

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro  
1 5

30

<210> 8  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> GRIPE

35

<400> 8

40

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile  
1 5 10

45

<210> 9  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE

50

<400> 9

Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Leu Thr  
1 5

55

<210> 10  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> GRIPE

60

<400> 10

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp  
1 5 10 15

ES 2 385 842 T3

<210> 11  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> GRIPE

5  
<400> 11

10 Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly  
1 5 10 15

Cys Arg

15  
<210> 12  
<211> 15  
<212> PRT  
20 <213> GRIPE

<400> 12

25 Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Lys Asn Gly Trp  
1 5 10 15

30 <210> 13  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> GRIPE

35 <400> 13

40 Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Arg Asn Gly Trp  
1 5 10 15

45 <210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE  
<400> 14

50 Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg  
1 5

55 <210> 15  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> GRIPE

<400> 15

60 Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn  
1 5 10

65

<210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE

5  
<400> 16

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu  
1 5

10 <210> 17  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> GRIPE

15 <400> 17

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp  
1 5 10

20 <210> 18  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> GRIPE

25 <400> 18

Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu  
1 5 10

30 <210> 19  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> GRIPE

<400> 19

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

35 <210> 20  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> GRIPE

<400> 20

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn  
1 5

45 <210> 21  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> GRIPE

50 <400> 21

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Glu Trp Glu  
1 5 10 15

Cys Arg

<210> 22  
<211> 23  
5 <212> PRT  
<213> GRIPE  
  
<400> 22

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Glu Trp Glu Cys  
1 5 10 15

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp  
20

10  
  
<210> 23  
<211> 23  
<212> PRT  
15 <213> GRIPE  
  
<400> 23

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys  
1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp  
20

20  
  
<210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE  
25  
  
<400> 24

Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp  
1 5

30 <210> 25  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> GRIPE  
  
35 <400> 25

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu  
1 5 10

<210> 26  
40 <211> 11  
<212> PRT  
<213> GRIPE  
  
<400> 26  
  
45

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Pro  
1 5 10

5 <210> 27  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE  
  
<400> 27

Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val  
1 5

10 <210> 28  
<211> 8  
<212> PRT  
15 <213> GRIPE  
  
<400> 28

Ser Ile Val Pro Ser Gly Pro Leu  
1 5

20 <210> 29  
<211> 15  
<212> PRT  
25 <213> GRIPE  
  
<400> 29

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val  
1 5 10 15

30 <210> 30  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> GRIPE  
  
35 <400> 30

Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu  
1 5 10

40 <210> 31  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE  
  
45 <400> 31

Arg Leu Glu Asp Val Phe Ala Gly Lys  
1 5

50 <210> 32  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> GRIPE  
  
<400> 32

Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile  
 1 5 10

<210> 33  
 <211> 10  
 5 <212> PRT  
 <213> GRIPE  
 <400> 33

Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile  
 1 5 10

<210> 34  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 15 <213> GRIPE  
 <400> 34

Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile  
 1 5

<210> 35  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> GRIPE  
 25 <400> 35

Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser  
 1 5 10 15

Glu Arg Gly

<210> 36  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> GRIPE  
 35 <400> 36

Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val  
 1 5 10

<210> 37  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> GRIPE  
 <400> 37

Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val  
 1 5 10

<210> 38  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 50 <213> GRIPE  
 <400> 38

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu  
1 5

5 <210> 39  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE

10 <400> 39

Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val  
1 5

15 <210> 40  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE

<400> 40

Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr  
1 5

20 <210> 41  
<211> 8  
<212> PRT  
25 <213> GRIPE

<400> 41

Ala Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr  
1 5

30 <210> 42  
<211> 9  
<212> PRT  
35 <213> GRIPE

<400> 42

Arg Met Gly Ala Val Thr Thr Glu Val  
1 5

40 <210> 43  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> GRIPE

45 <400> 43

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala  
1 5 10

50 <210> 44  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE

55 <400> 44

Gln Met Val Ala Thr Thr Asn Pro Leu  
 1 5

5 <210> 45  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> GRIPE

<400> 45

Gln Met Val Ala Thr Thr Asn Pro Leu Ile  
 1 5 10

10 <210> 46  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> GRIPE

15 <400> 46

Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys  
 1 5 10

20 <210> 47  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> GRIPE

25 <400> 47

Asp Leu Leu Gln Asn Leu Gln Thr Tyr  
 1 5

30 <210> 48  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> GRIPE

35 <400> 48

Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala  
 1 5 10 15

Ser Leu

40 <210> 49  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> GRIPE

<400> 49

Ser Lys Ala Phe Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala  
 1 5 10 15

Ser Leu

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

<400> 50

Ser Thr Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala  
1 5 10 15

Ser Leu

5  
<210> 51  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> GRIPE

10  
<400> 51

Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser Tyr Pro  
1 5 10

15  
<210> 52  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> GRIPE

20  
<400> 52

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg  
1 5 10 15

Asn Val Pro

25  
<210> 53  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> GRIPE

30  
<400> 53

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

35  
<210> 54  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> GRIPE

<400> 54

Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly  
1 5 10

40  
<210> 55  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> GRIPE

45  
<400> 55

Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys  
1 5 10

<210> 56  
<211> 18  
<212> PRT  
5 <213> GRIPE  
  
<400> 56

10

Lys Val Lys Ile Leu Pro Lys Asp Arg Trp Thr Gln His Thr Thr Thr  
1 5 10 15  
  
Gly Gly

15 <210> 57  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> GRIPE

20 <400> 57

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr  
1 5 10

25 <210> 58  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> GRIPE

30 <400> 58

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr  
1 5 10

35 <210> 59  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE

<400> 59

40 Cys Thr Gln Leu Lys Leu Ser Asp Tyr  
1 5

<210> 60  
<211> 14  
<212> PRT  
45 <213> GRIPE

<400> 60

50 His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro  
1 5 10

<210> 61  
<211> 13  
<212> PRT

<213> GRIPE

<400> 61

5 His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly  
1 5 10

<210> 62

<211> 24

<212> PRT

10 <213> GRIPE

<400> 62

Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg  
1 5 10 15

Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly Lys  
20

15

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> GRIPE

20

<400> 63

Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys  
1 5

25

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> GRIPE

30

<400> 64

Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Tyr  
1 5

35

<210> 65

<211> 15

<212> PRT

<213> GRIPE

40

<400> 65

Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly  
1 5 10 15

45

<210> 66

<211> 16

<212> PRT

<213> GRIPE

<400> 66

50

Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Ser Ser Phe Ile Arg Gly Thr  
1 5 10 15

<210> 67

ES 2 385 842 T3

<211> 16  
<212> PRT  
<213> GRIPE

5 <400> 67

Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly Tyr  
1 5 10 15

<210> 68  
10 <211> 14  
<212> PRT  
<213> GRIPE

<400> 68  
15

Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly  
1 5 10

<210> 69  
20 <211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE

<400> 69

Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile  
1 5

<210> 70  
30 <211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE

<400> 70

Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg  
1 5

<210> 71  
40 <211> 10  
<212> PRT  
<213> GRIPE

<400> 71

Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly  
1 5 10

<210> 72  
50 <211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE

<400> 72

Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg  
1 5

<210> 73  
55 <211> 9

<212> PRT  
<213> GRIPE

<400> 73

5

Leu Pro Phe Asp Lys Pro Thr Ile Met  
1 5

<210> 74  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE

10

<400> 74

Val Ser Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr  
1 5

15

<210> 75  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE

20

<400> 75

Arg Arg Ser Phe Glu Leu Lys Lys Leu  
1 5

25

<210> 76  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE

30

<400> 76

Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys  
1 5

35

<210> 77  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> GRIPE

40

<400> 77

Arg Pro Ile Ile Arg Pro Ala Thr Leu  
1 5

45

<210> 78  
<211> 9  
<212> PRT  
  
<213> GRIPE

50

<400> 78

Ala Asp Arg Gly Leu Leu Arg Asp Ile  
1 5

55

<210> 79  
<211> 13  
<212> PRT

<213> GRIPE

<400> 79

Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala Ile Gly Asn  
 1 5 10

5  
 <210> 80  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> GRIPE

10  
 <400> 80

Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile Ala Gly  
 1 5 10 15

Phe Leu Glu

15  
 <210> 81  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

20  
 <400> 81  
 gaagtggaaa cc 12

<210> 82  
 <211> 45  
 25  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

<400> 82  
 atgagcctgc tgaccgaagt ggaaaccac accaggaatg ggtgg 45

30  
 <210> 83  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

35  
 <400> 83  
 ccgattcgta acgaatgggg ttgtcgt 27

<210> 84  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

<400> 84  
 45 gaaacccga ttcgtaacga atggggtgt cgt 33

<210> 85  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 50 <213> GRIPE

<400> 85  
 gaaacccga ttcgtaacga atggggtgt cgtggtgtc gt 42

55  
 <210> 86  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

ES 2 385 842 T3

<400> 86  
 ctgctgaccg aagtggaaac cccgatt 27

5 <210> 87  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

10 <400> 87  
 agcctgctga ccgaagtga aaccccg 27

15 <210> 88  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

<400> 88  
 agcctgctga ccgaagtga aaccccgatt 30

20 <210> 89  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

25 <400> 89  
 ctgaccgaag tggaaacccc gctgacc 27

30 <210> 90  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

35 <400> 90  
 tgagcctgct gaccgaagt gaaaccccga ttcgcaacga atgg 44

40 <210> 91  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

<400> 91  
 atgagcctgc tgaccgaagt ggaaaccccg attcgcaacg aatggggctg ccgc 54

45 <210> 92  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

50 <400> 92  
 atgagcctgc tgaccgaagt ggaaaccctg accaaaaacg gctgg 45

55 <210> 93  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

<400> 93  
 atgagcctgc tgaccgaagt ggaaaccctg acccgcaacg gctgg 45

60 <210> 94  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

65 <400> 94  
 ctgaccgaag tggaaacccc gattcgc 27

ES 2 385 842 T3

<210> 95  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
 5  
 <400> 95  
 ctgaccgaag tggaaacccc gattcgcaac 30  
 <210> 96  
 10 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
 <400> 96  
 15 gaagtggaag ccccgattcg caacgaa 27  
 <210> 97  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 20 <213> GRIPE  
 <400> 97  
 gaagtggaag ccccgattcg caacgaatgg 30  
 25 <210> 98  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
 30 <400> 98  
 ctgaccgaag tggaaacccc gattcgcaac gaa 33  
 <210> 99  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 35 <213> GRIPE  
 <400> 99  
 ctgaccgaag tggaaacccc gattcgcaac gaatggggct gccgc 45  
 40  
 <210> 100  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
 45  
 <400> 100  
 gaagtggaag ccccgattcg taac 24  
 50 <210> 101  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
 55 <400> 101  
 atgagcctgc tgaccgaagt ggaaaccccg acccgcaacg aatgggaatg ccgc 54  
 <210> 102  
 <211> 69  
 60 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
 <400> 102

	<b>agcctgctga ccgaagtgga aacccccgacc cgcaacgaat gggaatgccg ctgcagcgat</b>	<b>60</b>
	<b>agcagcgat</b>	<b>69</b>
	<210> 103	
	<211> 69	
5	<212> ADN	
	<213> GRIPE	
	<400> 103	
10	<b>agcctgctga ccgaagtgga aacccccgatt cgcaacgaat ggggctgccg ctgcaacgat</b>	<b>60</b>
	<b>agcagcgat</b>	<b>69</b>
	<210> 104	
	<211> 27	
15	<212> ADN	
	<213> GRIPE	
	<400> 104	
20	gtggaaacct cgattcgtaa cgaatgg 27	
	<210> 105	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> GRIPE	
25	<400> 105	
	agcctgctga ccgaagtgga aacctatgtg ctt 33	
	<210> 106	
30	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> GRIPE	
	<400> 106	
35	agcctgctga ccgaagtgga aacctatgtg ccg 33	
	<210> 107	
	<211> 27	
	<212> ADN	
40	<213> GRIPE	
	<400> 107	
	ctgctgaccg aagtggaaac ctatgtg 27	
45	<210> 108	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> GRIPE	
50	<400> 108	
	agcattgtgc cgagcggccc gctg 24	
	<210> 109	
	<211> 45	
55	<212> ADN	
	<213> GRIPE	
	<400> 109	
60	agcggcccgc tgaagcgga aattgcgag cgcctggaag atgtg 45	

ES 2 385 842 T3

<210> 110  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
 5  
 <400> 110  
 ggcccgtga aagcggaaat tgcgcagcgc ctggaa 36  
 <210> 111  
 10 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
 <400> 111  
 15 cgcctggaag atgtgttgc gggcaaa 27  
 <210> 112  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 20 <213> GRIPE  
 <400> 112  
 gcgctgatgg aatggctgaa aacccgcccg 30  
 25 <210> 113  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
 30 <400> 113  
 ccgattctga gcccgctgac caaaggcatt 30  
 <210> 114  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 35 <213> GRIPE  
 <400> 114  
 attctgagcc cgctgaccaa aggcatt 27  
 40  
 <210> 115  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
 45  
 <400> 115  
 ctgaccaaag gcattctggg cttgtgttt accctgaccg tgccgagcga acgcggc 57  
 <210> 116  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
 50  
 <400> 116  
 55 accaaaggca ttctgggctt tgtgtttacc ctgaccgtg 39  
 <210> 117  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 60 <213> GRIPE  
 <400> 117  
 aaaggcattc tgggctttgt gttaccctg accgtg 36  
 65 <210> 118  
 <211> 27

<212> ADN  
 <213> GRIPE  
  
 <400> 118  
 5 ggcattctgg gctttgtgtt tacccctg 27  
  
 <210> 119  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 10 <213> GRIPE  
  
 <400> 119  
 ctgggctttg tgttaccct gaccgtg 27  
  
 15 <210> 120  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
  
 20 <400> 120  
 attctgggct ttgtgtttac cctgacc 27  
  
 <210> 121  
 <211> 24  
 25 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
  
 <400> 121  
 30 gcgagctgca tgggcctgat ttat 24  
  
 <210> 122  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
 35  
 <400> 122  
 cgcatgggcg cggtgaccac cgaagtg 27  
  
 <210> 123  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
  
 <400> 123  
 45 ggcctggtgt gcgcgacctg cgaacagatt gcg 33  
  
 <210> 124  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 50 <213> GRIPE  
  
 <400> 124  
 cagatggtgg cgaccaccaa cccgctg 27  
  
 55 <210> 125  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
  
 60 <400> 125  
 cagatggtgg cgaccaccaa cccgctgatt 30  
  
 <210> 126  
 <211> 30  
 65 <212> ADN  
 <213> GRIPE

ES 2 385 842 T3

<400> 126  
 cgcatggtgc tggcgagcac caccgcgaaa 30

5 <210> 127  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

10 <400> 127  
 gatctgctgg aaaacctgca gacctat 27

<210> 128  
 <211> 54

15 <212> ADN  
 <213> GRIPE

<400> 128  
 agcaaagctt acagcaactg ttacccttat gatgtgccgg attatgcctc cctt 54

20 <210> 129  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

25 <400> 129  
 agcaaagcgt ttagcaactg ctatccgtat gatgtgccgg attatgcgag cctg 54

<210> 130  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

30 <400> 130  
 agcaccgcgt atagcaactg ctatccgtat gatgtgccgg attatgcgag cctg 54

<210> 131  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

40 <400> 131  
 tggctgacgg agaaggaggg ctcatacca 30

45 <210> 132  
 <211> 75  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

50 <400> 132

**cccaagtatg ttaagcaaaa cactctgaag ttggcaacag ggatgcggaa tgtaccagag 60**

**aaacaaacta gaggc 75**

<210> 133  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

55 <400> 133  
 ggcgtgaaac tggaaagcat ggcattat cag 33

60 <210> 134  
 <211> 33

ES 2 385 842 T3

<212> ADN  
 <213> GRIPE  
  
 <400> 134  
 5 gaaattccg gcgtgaaact ggaaagcatg ggc 33  
  
 <210> 135  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 10 <213> GRIPE  
  
 <400> 135  
 aacgtgaaaa acctgtatga aaaagtgaaa 30  
  
 15 <210> 136  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
  
 20 <400> 136  
 aaagtgaaaa ttctgccgaa agatcgctgg acccagcata ccaccaccgg cggc 54  
  
 <210> 137  
 <211> 39  
 25 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
  
 <400> 137  
 30 ccgaaatatg tgaacagaa caccctgaaa ctggcgacc 39  
  
 <210> 138  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
 35  
 <400> 138  
 ccgaaatatg tgaacagaa caccctgaaa ctggcgacc 39  
  
 <210> 139  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
 40  
  
 <400> 139  
 45 tgcaccgaac tgaactgag cgattat 27  
  
 <210> 140  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 50 <213> GRIPE  
  
 <400> 140  
 catccgagcg cgggcaaaga tccgaaaaaa accggcggcc cg 42  
  
 55 <210> 141  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
  
 60 <400> 141  
 catccgagcg cgggcaaaga tccgaaaaaa accggcggcc 39  
  
 <210> 142  
 <211> 72  
 65 <212> ADN  
 <213> GRIPE

ES 2 385 842 T3

<400> 142

**ttttggcgcg gcgaaaacgg ccgcaaaacc cgcagcgcgt atgaacgcat gtgcaacatt 60**

**ctgaaaggca aa 72**

5

<210> 143  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

10

<400> 143  
 attctgcgcg gcagcgtggc gcataaa 27

15

<210> 144  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

20

<400> 144  
 aaactgctgc agaacagcca ggtgat 27

25

<210> 145  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

<400> 145  
 agcgcggcgt ttgaagatct gcgcgtgctg agctttattc gcggc 45

30

<210> 146  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

35

<400> 146  
 agcgcggcgt ttgaagatct gcgcgtgagc agctttattc gcggcacc 48

40

<210> 147  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

45

<400> 147  
 agcgcggcgt ttgaagatct gcgcgtgctg agctttattc gcggctat 48

50

<210> 148  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

<400> 148  
 gaactgcgca gccgctattg ggcgattcgc acccgcagcg gc 42

55

<210> 149  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE

60

<400> 149  
 gaactgcgca gccgctattg ggcgatt 27

<210> 150  
 <211> 27

<212> ADN  
 <213> GRIPE  
  
 <400> 150  
 5 agccgctatt gggcgattcg cacccgc 27  
  
 <210> 151  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 10 <213> GRIPE  
  
 <400> 151  
 tattggcgca ttcgcacccg cagcggcggc 30  
  
 15 <210> 152  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
  
 20 <400> 152  
 agccgctatt gggcgattcg cacccgc 27  
  
 <210> 153  
 <211> 27  
 25 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
  
 <400> 153  
 ctgccgttg ataaaccgac cattatg 27  
 30  
 <210> 154  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
 35  
 <400> 154  
 gtgagcgatg gcggcccga cctgtat 27  
  
 40 <210> 155  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
  
 45 <400> 155  
 cgccgcagct ttgaactgaa aaaactg 27  
  
 <210> 156  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 50 <213> GRIPE  
  
 <400> 156  
 cgccgcgca cgcgattct gcgcaaa 27  
  
 55 <210> 157  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> GRIPE  
  
 60 <400> 157  
 cgcccgatta ttcgcccggc gaccctg 27  
  
 <210> 158  
 <211> 27  
 65 <212> ADN  
 <213> GRIPE

ES 2 385 842 T3

<400> 158  
gcagatagag ggctattgag agacatc 27

5 <210> 159  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> GRIPE

10 <400> 159  
ccgtattata ccggcgaaca tgcgaaagcg attggcaac 39

<210> 160  
<211> 57

15 <212> ADN  
<213> GRIPE

<400> 160  
ccggcgaaac tgctgaaaga acgcggcttt ttggcgcgga ttgcgggctt tctggaa 57

20 <210> 161  
<211> 509  
<212> PRT  
<213> salmonella muenchen

25 <400> 161

30 Lys Glu Lys Ile Met Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu  
1 5 10 15

35 Leu Thr Gln Asn Asn Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala  
20 25 30

40 Ile Glu Arg Leu Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp  
35 40 45

Ala Ala Gly Gln Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly

45

50

55

60

65

ES 2 385 842 T3

	50					55					60					
5	Leu 65	Thr	Gln	Ala	Ser	Arg 70	Asn	Ala	Asn	Asp	Gly 75	Ile	Ser	Ile	Ala	Gln 80
10	Thr	Thr	Glu	Gly	Ala 85	Leu	Asn	Glu	Ile	Asn 90	Asn	Asn	Leu	Gln	Arg 95	Val
15	Arg	Glu	Leu	Ala 100	Val	Gln	Ser	Ala	Asn 105	Gly	Thr	Asn	Ser	Gln 110	Ser	Asp
20	Leu	Asp	Ser 115	Ile	Gln	Ala	Glu	Ile 120	Thr	Gln	Arg	Leu	Asn 125	Glu	Ile	Asp
25	Arg	Val 130	Ser	Gly	Gln	Thr	Gln 135	Phe	Asn	Gly	Val	Lys 140	Val	Leu	Ala	Gln
30	Asp 145	Asn	Thr	Leu	Thr	Ile 150	Gln	Val	Gly	Ala	Asn 155	Asp	Gly	Glu	Thr	Ile 160
35	Asp	Ile	Asp	Leu	Lys 165	Glu	Ile	Ser	Ser	Lys 170	Thr	Leu	Gly	Leu	Asp 175	Lys
40	Leu	Asn	Val	Gln 180	Asp	Ala	Tyr	Thr	Pro 185	Lys	Glu	Thr	Ala	Val 190	Thr	Val
45	Asp	Lys	Thr 195	Thr	Tyr	Lys	Asn	Gly 200	Thr	Asp	Thr	Ile	Thr 205	Ala	Gln	Ser
50	Asn	Thr 210	Asp	Ile	Gln	Thr	Ala 215	Ile	Gly	Gly	Gly	Ala 220	Thr	Gly	Val	Thr
55	Gly 225	Ala	Asp	Ile	Lys	Phe 230	Lys	Asp	Gly	Gln	Tyr 235	Tyr	Leu	Asp	Val	Lys 240
60	Gly	Gly	Ala	Ser	Ala 245	Gly	Val	Tyr	Lys	Ala 250	Thr	Tyr	Asp	Glu	Thr 255	Thr
65	Lys	Lys	Val	Asn 260	Ile	Asp	Thr	Thr	Asp 265	Lys	Thr	Pro	Leu	Ala 270	Thr	Ala
70	Glu	Ala	Thr 275	Ala	Ile	Arg	Gly	Thr 280	Ala	Thr	Ile	Thr	His 285	Asn	Gln	Ile
75	Ala	Glu 290	Val	Thr	Lys	Glu	Gly 295	Val	Asp	Thr	Thr	Thr 300	Val	Ala	Ala	Gln
80	Leu 305	Ala	Ala	Ala	Gly	Val 310	Thr	Gly	Ala	Asp	Lys 315	Asp	Asn	Thr	Ser	Leu 320
85	Val	Lys	Leu	Ser	Phe	Glu	Asp	Lys	Asn	Gly	Lys	Val	Ile	Asp	Gly	Gly

				325					330					335			
5	Tyr	Ala	Val	Lys 340	Met	Gly	Asp	Asp	Phe 345	Tyr	Ala	Ala	Thr	Tyr 350	Asp	Glu	
10	Lys	Gln	Val 355	Gln	Leu	Leu	Leu	Asn 360	Asn	His	Tyr	Thr	Asp 365	Gly	Ala	Gly	
15	Val	Leu	Gln	Thr	Gly	Ala	Val 375	Lys	Phe	Gly	Gly	Ala 380	Asn	Gly	Lys	Ser	
20	Glu 385	Val	Val	Thr	Ala	Thr 390	Val	Gly	Lys	Thr	Tyr 395	Leu	Ala	Ser	Asp	Leu 400	
25	Asp	Lys	His	Asn	Phe 405	Arg	Thr	Gly	Gly	Glu 410	Leu	Lys	Glu	Val	Asn 415	Thr	
30	Asp	Lys	Thr	Glu 420	Asn	Pro	Leu	Gln	Lys 425	Ile	Asp	Ala	Ala	Leu 430	Ala	Gln	
35	Val	Asp	Thr 435	Leu	Arg	Ser	Asp	Leu 440	Gly	Ala	Val	Gln	Asn 445	Arg	Phe	Asn	
40	Ser	Ala 450	Ile	Thr	Asn	Leu	Gly 455	Asn	Thr	Val	Asn	Asn 460	Leu	Ser	Ser	Ala	
45	Arg 465	Ser	Arg	Ile	Glu	Asp 470	Ser	Asp	Tyr	Ala	Thr 475	Glu	Val	Ser	Asn	Met 480	
50	Ser	Arg	Ala	Gln	Ile 485	Leu	Gln	Gln	Ala	Gly 490	Thr	Ser	Val	Leu	Ala 495	Gln	
55	Ala	Asn	Gln	Val 500	Pro	Gln	Asn	Val 505	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg				

<210> 162  
 <211> 1530  
 <212> ADN  
 <213> salmonella muenchen

<400> 162

55

60

65

ES 2 385 842 T3

	aaggaaaaga tcatggcaca agtcattaat acaaacagcc tgctcgtggt gaccagaat	60
	aacctgaaca aatcccagtc cgctctgggc accgctatcg agcgtctgtc ttccggtctg	120
5	cgatcaaca gcgcgaaaga cgatgcggca ggtcaggcga ttgctaaccg tttcaccgcg	180
	aacatcaaag gtctgactca ggcttcccgt aacgctaacg acggtatctc cattgcgcag	240
	accactgaag gcgcgctgaa cgaaatcaac aacaacctgc agcgtgtgcg tgaactggcg	300
10	gttcagtctg ctaacggtac taactcccag tctgacctg actctatcca ggctgaaatc	360
	accagcgtc tgaacgaaat cgaccgtgta tccggtcaga ctcagttcaa cggcgtgaaa	420
15	gtcctggcgc aggacaacac cctgaccatc caggttggtg ccaacgacgg tgaactatt	480
	gatattgatt taaaagaaat tagctctaaa aactggggac ttgataagct taatgtccag	540
	gatgcctaca ccccgaaaga aactgctgta accgttgata aaactaccta taaaatggt	600
20	acagatacta ttacagccca gagcaatact gatatccaaa ctgcaattgg cggtggtgca	660
	acggggggtta ctggggctga tatcaaatth aaagatggtc aatactatth agatgttaaa	720
25	ggcgggtgctt ctgctggtgt ttataaagcc acttatgatg aaactacaaa gaaagttaat	780
	attgatacga ctgataaaac tccgtagca actgcggaag ctacagctat tcggggaacg	840
	gccactataa cccacaacca aattgctgaa gtaacaaaag aggggtgtga tacgaccaca	900
30	gttgcggctc aacttgctgc tgcaggggtt actggtgctg ataaggacaa tactagcctt	960
	gtaaaactat cgtttgagga taaaacggt aaggttattg atggtggcta tgcagtgaaa	1020
	atgggcgacg atttctatgc cgctacatat gatgagaaac aggtacaatt actgctaaac	1080
35	aaccactata cagatggtgc tggcgtgctc caaactggag ctgtgaaatt tgggtggcga	1140
	aatggtaaat ctgaagttgt tactgctacc gtaggtaaaa cttacttagc aagcgacctt	1200
	gacaaacata acttcagaac aggcggtgag cttaaagagg ttaatacaga taagactgaa	1260
40	aaccactgc agaaaattga tgctgccttg gcacaggtg atacacttcg ttctgacctg	1320
	ggtgcggtac agaaccgttt caactccgct atcaccaacc tgggcaatac cgtaaataac	1380
	ctgtcttctg cccgtagccg tatcgaagat tccgactacg cgaccgaagt ctccaacatg	1440
45	tctcgcgcgc agattctgca gcaggccggt acctccgttc tggcgcaggc taaccaggtt	1500
	ccgcaaaacg tctctctttt actgcgttaa	1530

50

55

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una vacuna que comprende los epítomos peptídicos del virus de la gripe: M1 2-12 (SEC ID N°: 25 o 26); HA 91-108 (SEC ID N°: 48); HA 307-319 (SEC ID N°: 57); NP 335-350 (SEC ID N°: 67); NP 380-393 (SEC ID N°: 68); y HA 354-372 (SEC ID N°: 80).
2. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, que adicionalmente comprende un adyuvante o un excipiente.
- 10 3. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, formulada para la administración por una modalidad selecciona del grupo que consiste en administración intraperitoneal, subcutánea, intranasal, intramuscular, oral, tópica y transdérmica.
- 15 4. Una vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un método para suscitar una respuesta inmunitaria y conferir protección contra el virus de la gripe en un sujeto.
5. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la respuesta inmunitaria se suscita contra la gripe aviar, la gripe de tipo A, la gripe de tipo B o una de sus combinaciones.
- 20 6. El uso de la vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para la preparación de un agente farmacéutico para suscitar una respuesta inmunitaria y conferir protección contra el virus de la gripe en un sujeto.

FIGURA 1

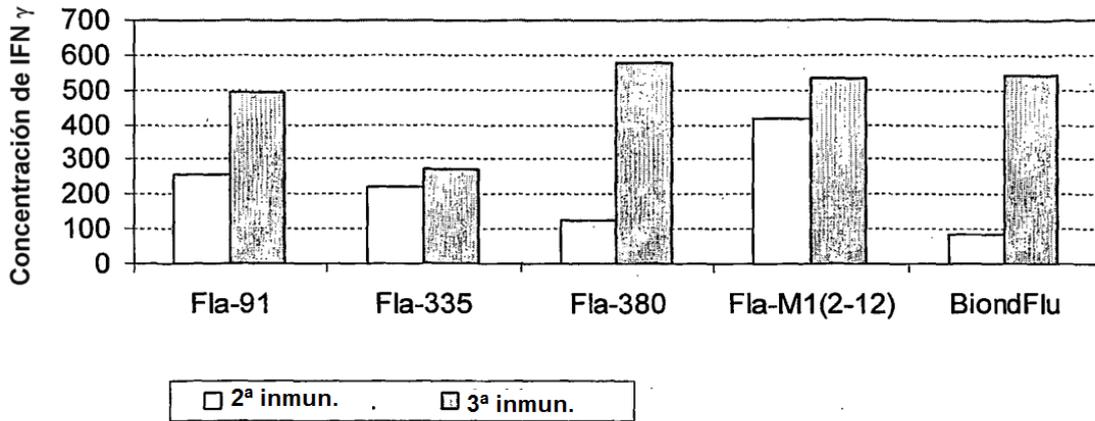


FIGURA 2A

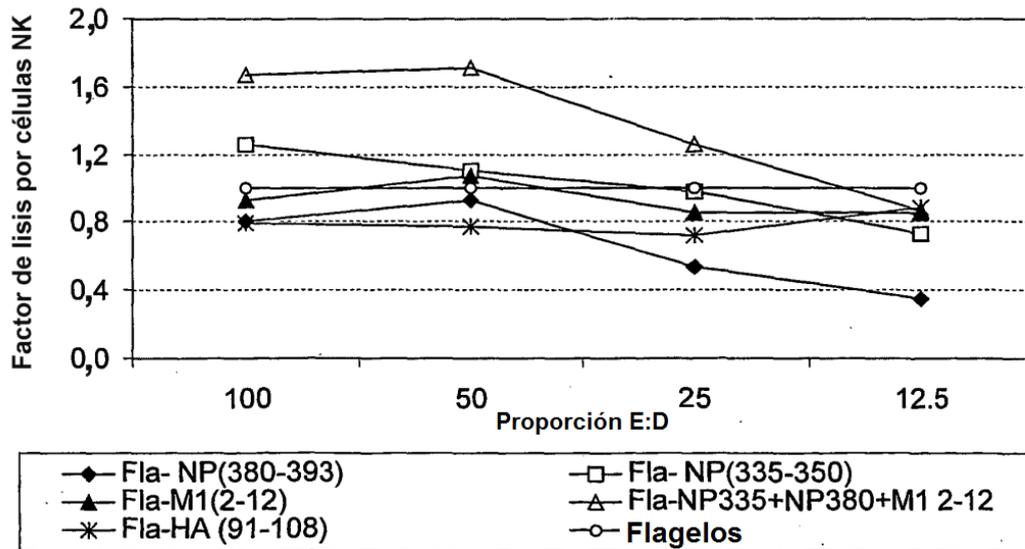


FIGURA 2B

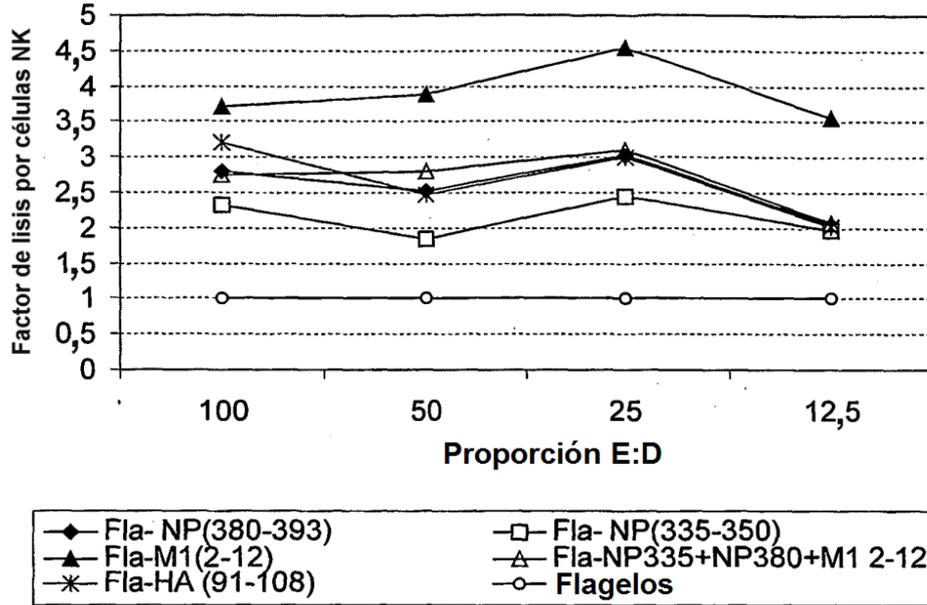


FIGURA 2C

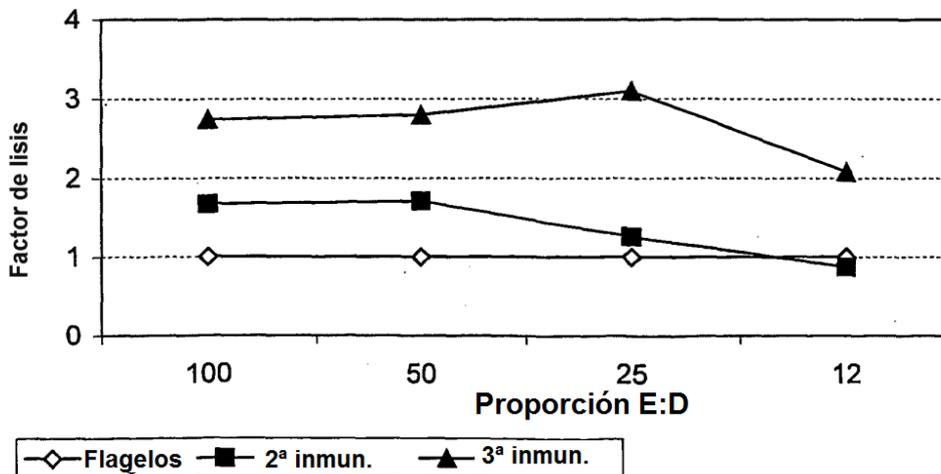


FIGURA 3A

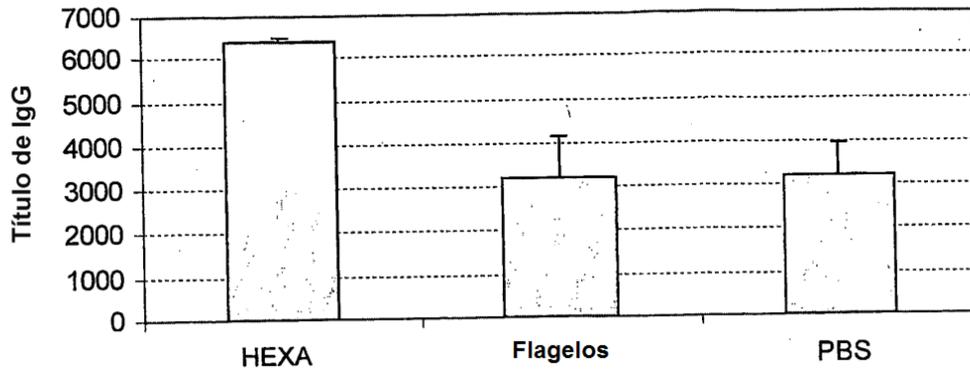


FIGURA 3B

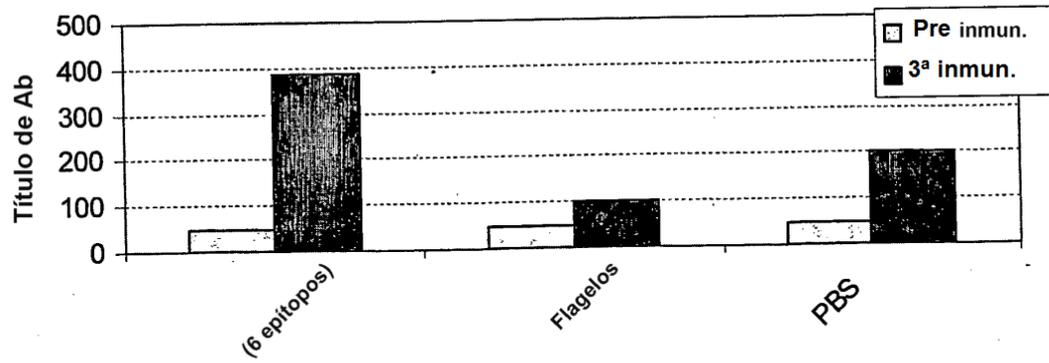


FIGURA 4

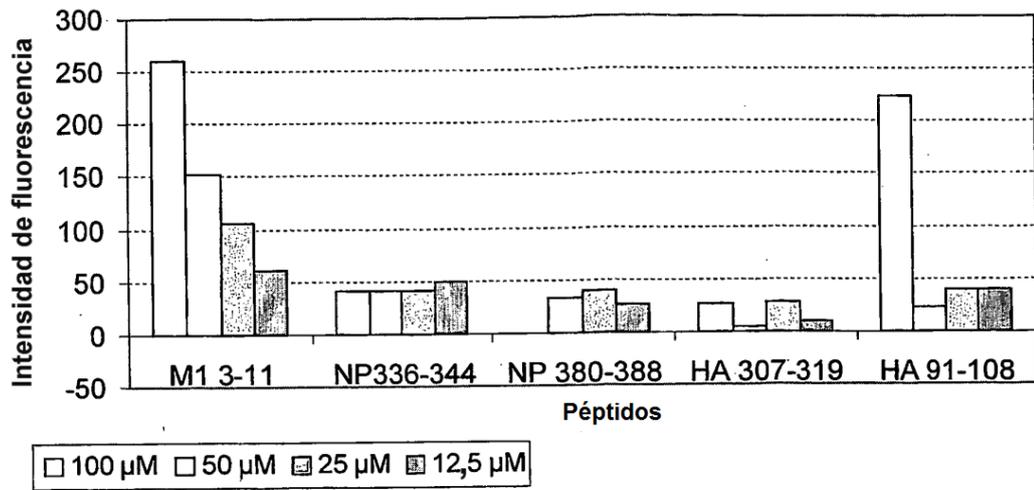


FIGURA 5A

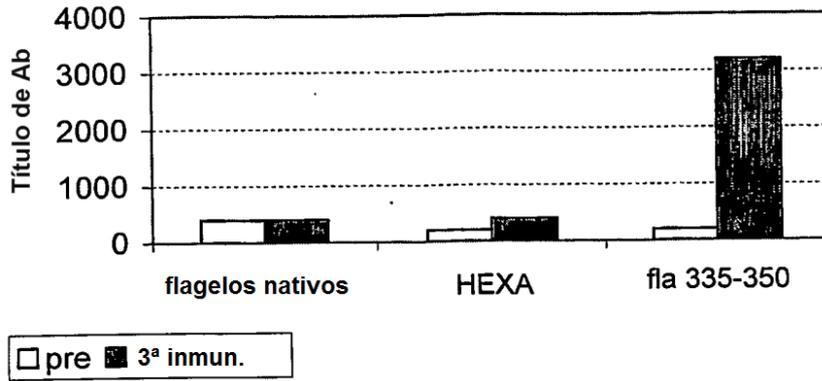


FIGURA 5B

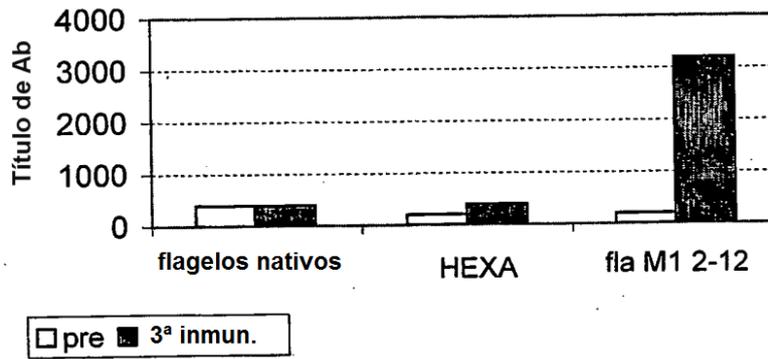


FIGURA 5C

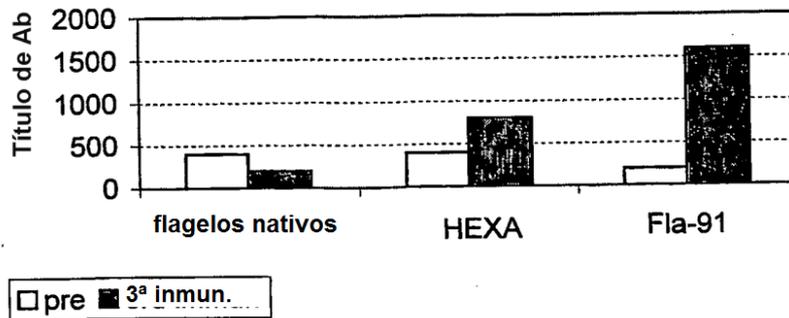


FIGURA 6

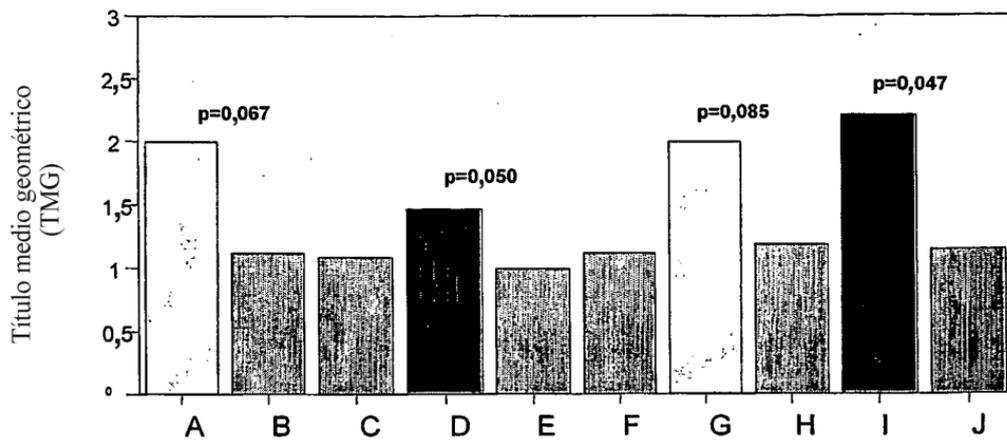


FIGURA 7

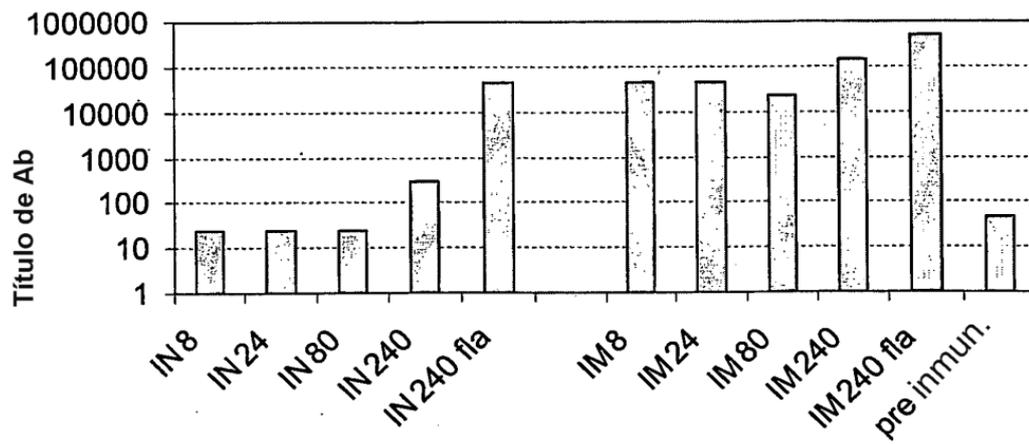


FIGURA 8

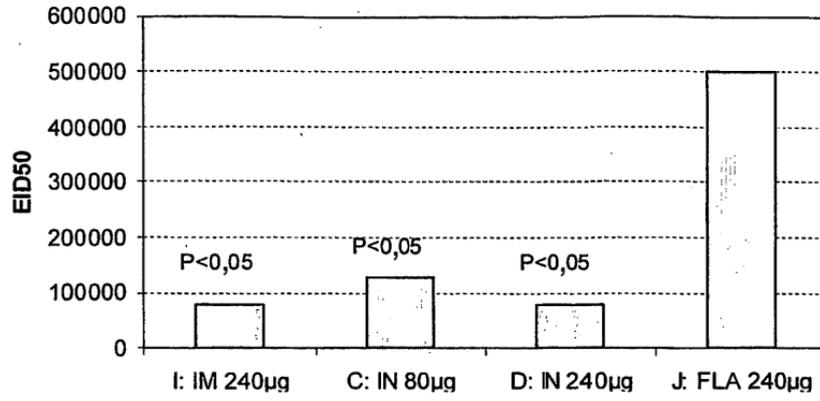


FIGURA 9

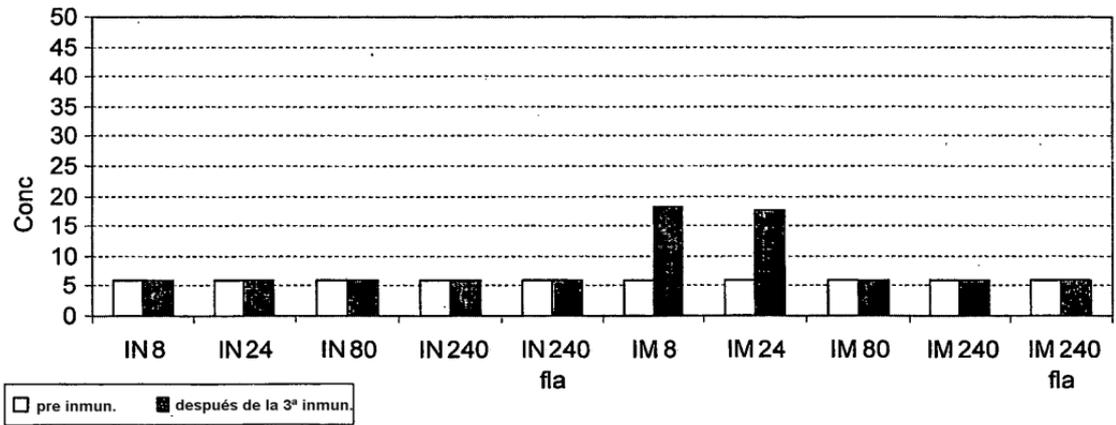


FIGURA 10

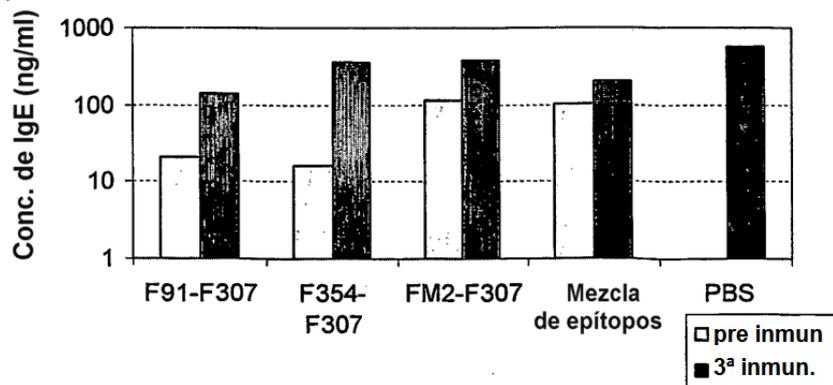


FIGURA 11

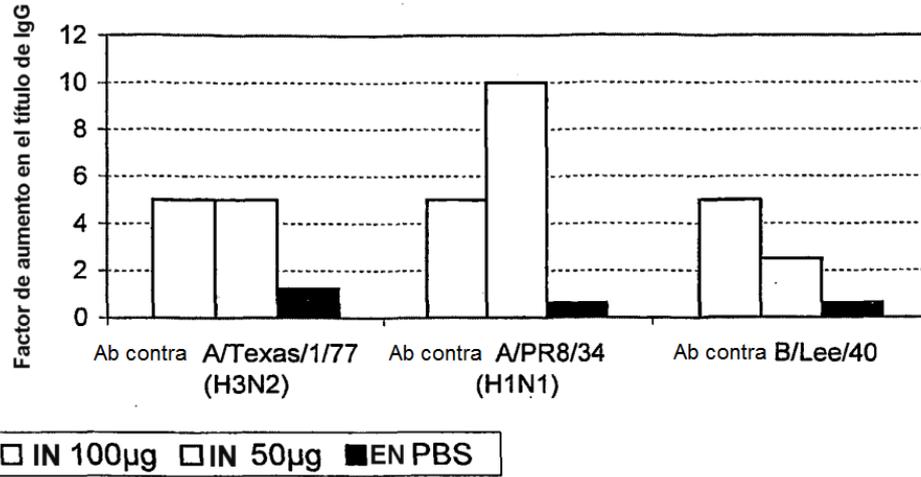


FIGURA 12

