

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 611**

51 Int. Cl.:
A61K 39/145 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10003160 .8**
96 Fecha de presentación: **28.11.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **2204187**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.07.2010**

54 Título: **Vacuna contra la gripe humana que contiene cuatro péptidos de influenza**

30 Prioridad:
30.11.1998 IL 12733198

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.10.2012

73 Titular/es:
**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT
COMPANY LIMITED (100.0%)
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:
**ARNON, RUTH;
BEN-YEDIDIA, TAMAR y
LEVI, RAPHAEL**

74 Agente/Representante:
IZQUIERDO FACES, José

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).

ES 2 389 611 T3

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra la gripe humana que contiene cuatro peptidos de influenza

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a vacunas de gripe, y particularmente a vacunas basadas en péptidos que comprenden epítomos conservados de tanto los linfocitos C como los T reconocidos por los HLAs predominantes en humanos.

[0002] **ABREVIACIONES:** **Ab:** Anticuerpos; **CTL:** linfocitos T citotóxicos; **EID:** Dosis infecciosa en huevo; **HA:** Hemaglutinina; **HAU:** Unidad de hemaglutinina; **i. n.:** Intranasal; **i. p.:** Intraperitoneal; **NP:** Nucleoproteína; **PMBC:** Células mononucleares de sangre periférica; **TT:** Toxoide tetánico.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0003] La gripe es una preocupación de la salud pública, resulta en carga económica, morbilidad e incluso en mortalidad. La infección de gripe puede resultar en una variedad de estados de enfermedad, variando desde infección sub-clínica a través de una infección respiratoria superior leve y traqueobronquitis a una neumonía viral severa ocasionalmente letal. Las razones de este amplio espectro de severidad se explican por el lugar de la infección y el estado inmune del huésped. La característica más importante de la gripe, desde el punto de vista inmunológico, son los cambios rápidos, impredecibles de las glicoproteínas de superficie, la hemaglutinina y la neuraminidasa, referidos como cambios y derivas antigénicas. Estos cambios llevan eventualmente a la aparición de nuevas cepas de gripe, que permiten al virus escapar del sistema inmune y son la causa de casi todas las epidemias anuales (Laver y otros, 1980 y 1980a; Webster, 1982).

[0004] La inmunización al virus de la gripe está limitada por esta variación antigénica marcada del virus y por la restricción de la infección a las membranas mucosas respiratorias. Las vacunas de la gripe actualmente disponibles y autorizadas están basadas o en virus inactivo completo, o en glicoproteínas de superficie virales. Estas vacunas de la gripe fallan al inducir una inmunidad completa, a largo plazo y de cepas cruzadas.

[0005] El virus de la gripe comprende dos antígenos de superficie: la neuraminidasa (NA) y la hemaglutinina (HA), que experimentan cambios graduales (cambios y derivas), llevando a las altas variaciones antigénicas en la gripe. La HA es un inmunógeno fuerte y es el antígeno más significativo al definir la especificidad serológica de las diferentes cepas de virus. La molécula de HA (75-80 kD) comprende una pluralidad de determinantes antigénicos, varios de los cuales están en regiones que experimentan cambios de secuencia en diferentes cepas (determinantes específicos de la cepa) y otros en regiones que son comunes a muchas moléculas de HA (determinantes comunes).

[0006] La US 4.474.757 describe una vacuna sintética contra una pluralidad de virus de gripe diferentes que comprende un portador macromolecular adecuado que tiene unido al mismo un péptido que es un fragmento antigénico de HA que es común a una pluralidad de diferentes cepas del virus de la gripe. Uno de los determinantes comunes descritos es el epítipo de HA 91-108 que está conservado en todas las cepas del subtipo de gripe H3.

[0007] La nucleoproteína (NP) está localizada en el núcleo viral y es una del grupo de antígenos específicos que distingue entre los virus de la gripe A, B y C. Al contrario que la HA, la NP es una de las proteínas virales más conservadas, estando conservada en un 94% en todos los virus de la gripe A. El anticuerpo específico de la NP del virus de la gripe A no tiene actividad neutralizadora de virus, pero la NP es un objetivo importante para los linfocitos T citotóxicos (CTL) que son de reacción cruzada con todos los virus del tipo A (Townsend y Skehel, 1984). Los CTL reconocen péptidos sintéticos cortos que corresponden con regiones lineares de la molécula de la NP de la gripe (Townsend y otros, 1985 y 1986).

[0008] La publicación Internacional de PCT WO 93/20846 describe una vacuna recombinante sintética contra una pluralidad de cepas de virus de gripe diferentes que comprende al menos una proteína quimérica que comprende la secuencia de aminoácido de la flagelina y al menos una secuencia de aminoácido de un epítipo de la HA o la NP del virus de gripe, o un agregado de la mencionada proteína quimérica. Siguiendo este enfoque, se descubrió que una vacuna anti-gripe recombinante sintética basada en tres epítomos es altamente eficiente en ratones. Esta vacuna incluía la HA 91-108, un epítipo de célula B de la HA que se conserva en todas las cepas H3 y produce anticuerpos neutralizantes anti-gripe, junto con una T colaboradora y epítomos CTL de la NP (NP 55-69 y NP 147-158, respectivamente), que inducen las respuestas inmunes MHC-restringidas. Cada uno de estos epítomos se expresó en la flagelina de la cepa de la vacuna de la Salmonella. Los flagelos aislados fueron administrados por vía intranasal a ratones, resultando en protección contra la infección viral (Levi y Arnon, 1996).

[0009] Ben-Yedidia y otros (Mechanism in Ageing and Development 104 (1998), pp. 11-23) investigan a eficiencia de la vacuna de la gripe de tres epítomos en diferentes grupos de edades de ratones.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0010] De acuerdo con la presente invención, los epítomos de péptido de la gripe reactivos con células humanas fueron expresados en flagelina de Salmonella y probados para la eficacia en una quimera por radiación humana/ratón en los que las PBMC humanas fueron injertadas funcionalmente. La depuración del virus después de la exposición y la resistencia a la infección letal se encontró sólo en los ratones vacunados y la producción de anticuerpos humanos específicos del virus fue también más alta en este grupo. El análisis FACS mostró que la mayoría de las células humanas en los ratones trasplantados fueron CD8+ y CD4+, indicando que la protección fue mediada principalmente por la respuesta inmune celular.

[0011] La presente invención en consecuencia se refiere a una vacuna contra la gripe basada en péptidos sintética humana para la administración intranasal que comprende una mezcla de flagelos que contienen al menos cuatro epítomos del virus de la gripe cada uno expresado individualmente en flagelina de Salmonella, los mencionados epítomos del virus siendo reactivos con las células humanas y siendo seleccionados del grupo consistente de: (i) un epítomo de hemaglutinina (HA) de células B; (ii) un epítomo de hemaglutinina (HA) o nucleoproteína (NP) de T colaboradora que puede enlazar con muchas moléculas HLA; y (iii) al menos dos epítomos de proteína de matriz (M) o nucleoproteína (NP) de linfocito citotóxico (CTL) que están restringidos a las moléculas HLA más predominantes en diferentes poblaciones humanas.

[0012] El epítomo HA de células B es el epítomo 91-108 de hemaglutinina del virus de la gripe [HA 91-108] de la secuencia:

Ser-Lys-Ala-Phe-Ser-Asr

Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr

[0013] Los epítomos de T colaboradoras son el epítomo 307-319 de la hemaglutinina del virus de la gripe [HA 307-319] de la secuencia:

Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-Leu-Ala-Thr

y el epítomo 306-324 de la HA [HA 306-324] de la secuencia:

Cys-Pro-Lys-Tyr-Val-Ly

Lys-Leu-Ala-Thr-Gly-Me

[0014] Los epítomos de los linfocitos T citotóxicos (CTL) usados en la vacuna de la invención cambiarán de acuerdo al tipo de población, concretamente Caucásico o no Caucásico (de origen Asiático o Africano). Para las poblaciones Caucásicas, los epítomos de los CTL son el epítomo 335-350 de la nucleoproteína (NP) del virus de la gripe [NP 335-350] de la secuencia:

Ser-Ala-Ala-Phe-Glu-A

Val-Leu-Ser-Phe-Ile-A

y el epítomo 380-393 de la NP [NP 380-393] de la secuencia:

Glu-Leu-Arg-Ser-Arg-T

Ala-Ile-Arg-Thr-Arg-S

[0015] En una realización preferida de la invención, la vacuna contra la gripe intranasal consiste de una mezcla de los cuatro epítomos del virus de la gripe: epítomos de hemaglutinina HA91-108 y HA307-319, y los epítomos de la nucleoproteína NP335-350 y NP390-393, expresados individualmente en flagelina de Salmonella. Para las poblaciones no Caucásicas, se pueden usar otros epítomos de CTL.

[0016] La presente invención también se refiere al uso de una mezcla de flagelos que contienen al menos cuatro epítomos de virus de gripe cada uno expresado individualmente en flagelina de *Salmonella*, como se ha descrito anteriormente, para la preparación de una vacuna contra la gripe sintética humana para la administración intranasal.

5 **[0017]** La presente invención además se refiere a un método para inducir una respuesta inmune humana y conferir protección contra el virus de la gripe en humanos, que comprenden administrar intranasalmente a individuos humanos una vacuna contra la gripe basada en péptidos sintética que comprende una mezcla de flagelos, como se ha descrito anteriormente.

10 **BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS**

[0018] En las siguientes leyendas, "tetra constructo" significa una mezcla de flagelos expresando los cuatro epítomos de gripe HA91-108, HA307-319, NP335-350 y NP380-393, respectivamente.

15 **Las Figuras 1A-1B** recogen histogramas FACS típicos de linfocitos de pulmón humanos en quimera por radiación humano/ratón, inmunizados con los tetra constructos. Las muestras fueron tomadas 7 días tras la inmunización. Las células fueron separadas en gradiente de ficoll y teñidas con anti-CD45 junto con anti-CD-3 (**Fig. 1A**) o junto con anti-CD19 (**Fig. 1B**), conjugadas con el tinte fluorescente respectivo. Los histogramas muestran que tras la inmunización la mayoría de las células humanas son células T y casi no se pueden detectar células B.

20 **Figura 2:** se analizaron homogeneizados de pulmón de los ratones inmunizados y no inmunizados así como un grupo de ratones no trasplantados para el título de virus 5 días después de la exposición viral. Los ratones fueron inmunizados con el tetra constructo (bloque izquierdo) o flagelina nativa que no expresa los epítomos de gripe (bloque medio). Otro grupo de control no recibió PBMC pero fueron inmunizados con el tetra constructo (bloque derecho). La figura presenta datos medios de 7 experimentos repetidos, en los que cada grupo consistía de 6-8 animales. En cada experimento se empleó un donante diferente.

25 **Figura 3:** Producción de anticuerpos humanos (cantidad total de IgG, IgM y IgA), en quimera por radiación humano/ratón (6-8) animales por grupo en 7 experimentos repetidos, donante diferente empleado en cada experimento) inmunizados con el tetra constructo (columna izquierda) o flagelina nativa que no expresa los epítomos de la gripe (columna media). Otro grupo de control no recibió PBMC pero fueron inmunizados con el tetra constructo (columna derecha). Las muestras de suero fueron diluidas 1:10, las muestras de pulmón fueron diluidas 1:60. La producción de anticuerpos en el grupo que fue trasplantado y vacunado con el tetra constructo (columna izquierda) fue significativamente mayor que en los otros grupos de control.

30 **Figura 4:** Porcentaje de supervivencia de quimera por radiación humano/ratón de exposición letal tras la vacunación intranasal con el tetra constructo. Los ratones (5-10 animales por grupo en 2 experimentos repetidos, donante diferente empleado en cada experimento) fueron trasplantados con PBMC en el día 0, vacunados en el día 9 y expuestos 7 días después. La vacunación con el tetra constructo (círculos negros), flagelina nativa (círculos huecos), o ratones no trasplantados que fueron vacunados con el tetra constructo (cuadrados). Después del día 40, la tasa de supervivencia permaneció la misma y todos los ratones supervivientes eventualmente se recuperaron.

35 **Figura 5:** Peso corporal de los ratones supervivientes, que es indicativo de la severidad de la enfermedad y el potencial para un proceso de recuperación. Quimeras por radiación humano/ratón (5-10 animales por grupo en 2 experimentos repetidos, donante diferente empleado en cada experimento) fueron trasplantadas con PBMC en el día 0, vacunados intranasalmente en el día 9 y expuestos intranasalmente 7 días más tarde con una dosis letal del virus. Los ratones vacunados con el tetra constructo (círculos negros) perdieron menos peso y se recuperaron más rápidamente que los otros grupos. Los grupos de control consistieron de ratones trasplantados a los que se les administró flagelina nativa (círculos huecos) o ratones no trasplantados que fueron vacunados con el tetra constructo (cuadrados). Después del día 40, todos los ratones supervivientes se recuperaron y ganaron peso.

40 **Figura 6:** Vacunación protectora de quimera por radiación humano/ratón trasplantada con PBMC e inmunizada intranasalmente con el tetra constructo. Cada grupo de quimera humano/ratón (5-10 animales por grupo en 2 experimentos repetidos, donante diferente empleado en cada experimento) trasplantado con PBMC obtenidas por leucoféresis de un donante fue infectado 7 días después de la inmunización con una de las tres cepas de gripe diferentes: A/PR/8/34 (H1N1), A/Japonesa/57 (H2N2) o A/Texas/1/77 (H3N2). Tanto los ratones trasplantados (columna izquierda) y no trasplantados (columna derecha) fueron vacunados con el tetra constructo. Sin embargo, sólo los ratones trasplantados fueron capaces de resistir la infección y el título del virus en sus pulmones se reduce significativamente.

45 **Figura 7:** Anticuerpos humanos séricos hacia el virus de gripe después de la inmunización de quimeras por radiación humano/ratón irradiadas letalmente (5-10 por grupo) radio protegidas con 3×10^6 de médula ósea (BM) y trasplantadas con 70×10^6 PBMC humanas. Todos los grupos fueron inmunizados con el tetra

constructo y después expuestos con dosis sub-letales de la cepa H1N1 (rombos negros) o H2N2 (círculos negros) o H3N2 (cuadros negros). El grupo de control consistió de ratones repuestos DE SCID irradiados que no recibieron PBMC y fueron inmunizados con la misma vacuna antes de la exposición con HAN1 (rombos huecos) o H2N2 (círculos huecos) o H-n2 (cuadros huecos).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0019] El concepto de vacuna basada en péptidos tiene varias ventajas sobre las vacunas tradicionales, incluyendo consideraciones de seguridad, la vida útil relativamente larga, la capacidad de dirigir la respuesta inmune contra los epítomos específicos que son supresores ni peligrosos para el huésped y la posibilidad de preparar vacunas multi-patógenas. La eficacia de una vacuna péptida es altamente dependiente de la identificación exacta de los epítomos inmunogénicos que confieren protección así como de la presentación eficiente de estos epítomos al sistema inmune.

[0020] La idea de una vacuna péptida contra la gripe que incluye tanto células B como T fue probada anteriormente en un modelo de ratón, y se ha demostrado que dicha "vacuna" podría inducir respuestas locales específicas en los pulmones que llevan a la protección de los ratones inmunizados de la exposición viral (Arnon y Levi, 1996). En el modelo de ratones usado aquí, se demostró que el epítomo de células B de hecho indujo una producción de Ab alta, mientras que el epítomo de T colaboradoras provocó la proliferación de linfocitos específicos y el epítomo de los CTL fue importante para la actividad citotóxica contra las células infectadas. Sin embargo, la protección eficiente sólo se consiguió cuando los ratones fueron inmunizados con una mezcla de los tres epítomos (Levi y Arnon, 1996).

[0021] De acuerdo a la presente invención, para el propósito del uso humano, los epítomos adecuados tenían que ser seleccionados porque los epítomos de las células T están MHC restringidos. Primero, hemos identificado que al menos cuatro epítomos de la gripe son necesarios para el uso humano: un epítomo de la HA de células B, un epítomo de HA o NP de T colaboradoras que pueden enlazar con muchas moléculas de HLA, y al menos 2 epítomos de NP o matriz de CTL que están restringidos a las moléculas de HLA más predominantes en las diferentes poblaciones.

[0022] De acuerdo a la invención, el epítomo de la gripe de las células B es el Ha 91-108. El epítomo de la gripe de las T colaboradoras es el HA 307-319. También se pueden usar el HA 306-324 (Rothbard, 1988), o el NP 206-229 (Brett, 1991).

[0023] Los epítomos de gripe de los CTL son diferentes en la población Caucásica, la originaria de Asia o la de África. Para la población Caucásica, los epítomos de los CTL de la gripe son el NP335-350 y NP380-393 (Dyer y Middleton, 1993; Gulukota y DeLisi, 1996), que están restringidos a las moléculas de HLA más predominantes en la población Caucásica. Otros epítomos de la gripe que pueden ser usados para la población Caucásica son los epítomos de nucleoproteínas: NP305-313 (DiBrino, 1993); NP384-394 (Kvist, 1991); NP89-101 (Cerundolo, 1991); NP91-99 (Silver y otros, 1993); NP380-388 (Suhrieb, 1993); NP44-52 y NP265-273 (DiBrino, 1994); y NP365-380 (Townsend, 1986); y los epítomos de la proteína de matriz (M) M2-22, M2-12, M3-11, M3-12, M41-51, M50-59, M51-59, M134-142, M145-155, M164-172, M164-173 (todos descritos por Nijman, 1993); M17-31, M55-73, M57-68 (Carreno, 1992); M27-35, M232-240 (DiBrino, 1993).

[0024] Para las poblaciones no Caucásicas, los epítomos de los CTL de la gripe que pueden ser usados son el HA458-467 de la secuencia Asn-Val-Lys-Asn-Leu-Tyr-Glu-Lys-Val-Lys (NVKNLYEKVK), un epítomo de los CTL para el alelo A11 con alta frecuencia en poblaciones Japonesas, Chinas, Tailandesas e Indias (J. Immunol. 1997, 159(10): 4753-61); M-59-68 y M60-67 de las secuencias Ile-Leu-Gly-Phe-Val-Phe-Leu-Thr-Val (ILGFVFTLTV) y Leu-Gly-Phe-Val-Phe-Leu-Thr-Val (LGFVFTLTV), respectivamente, dos epítomos de los CTL para la HLA-B51 con alta frecuencia en población Tailandesa (Eur. J. Immunol. 1994, 24(3): 777-80); y M-128-138 de la secuencia Ala-Cys-Ser-Met-Gly-Leu-Ile-Tyr (ACSMGLIY), un epítomo de los CTL para el alelo B35 con alta frecuencia en población Africana Occidental negroide (Eur. J. Immunol. 1996, 26(2): 335-39).

[0025] Como los péptidos son habitualmente pobres inmunógenos, la eficacia de la vacuna basada en péptidos depende de la presentación adecuada de los epítomos al sistema inmune. Los epítomos de gripe fueron expresados en el gen de la flagelina de la cepa de la vacuna de la *Salmonella*, lo que proporciona tanto función portadora como adyuvante. Después de la segmentación de los flagelos de las bacterias y los pasos de purificación, la suspensión fina de los flagelos se usó para la vacunación. Todas las inmunizaciones fueron realizadas con una mezcla de cuatro epítomos: HA91-108, HA307-319, NP335-350 y NP380-393, expresados en flagelina de *Salmonella*, en ausencia de cualquier adyuvante. La mezcla de los mencionados cuatro epítomos se refiere como "tetra constructo" a través de la especificación.

[0026] Los tres epítomos de células T usados en la vacuna de la presente invención fueron seleccionados debido a su reconocimiento específico por los HLAs predominantes en la población Caucásica, y fueron incluidos en la vacuna junto con el epítomo de células B HA 91-108. Para superar el problema de la variación antigénica del virus, todos estos epítomos están derivados de regiones conservadas en las proteínas del virus y por lo tanto, pueden inducir protección de cepas cruzadas. Los dos epítomos de los CTL de la nucleoproteína interior son reconocidos por

los HLAs predominantes de la población Caucásica: el epítipo NP 335-350 está restringido a haplotipos de HLA A2, A3, Aw68.1 y B37, y el epítipo NP 380-393 está restringido a haplotipos de HLA B8 y B27. El epítipo de las T colaboradoras de la hemaglutinina, HA 307-319, es un epítipo "universal" restringido a la mayoría de las moléculas MHC de clase II, incluyendo DR1, DR2, DR4, DR5, DR7, DR9, DR52A, y otras. Estos epítipos de células T, junto con el epítipo de células B HA 91-108, fueron expresados individualmente en flagelina, y la mezcla de los flagelos resultantes fue usada sin ningún adyuvante para la vacunación intranasal de la quimera por radiación humano/ratón, induciendo en consecuencia una respuesta inmune humana y confiriendo protección. Los ratones vacunados fueron también protegidos de una infección letal y su recuperación fue más rápida.

[0027] Para evaluar la capacidad del mencionado tetra constructo para actuar como una vacuna y estimular una respuesta del sistema inmune humano, se empleo un modelo de ratón humanizado. La observación de que las PBMC humanas pueden ser transferidas adoptivamente i.p. en el ratón SCID y que las células injertadas sobreviven durante un periodo de tiempo prolongado produciendo altos niveles de Ig humana, ha ofrecido muchas nuevas posibilidades en la investigación de inmunología clínica (evaluado en Mosier, 1991). En particular, muchos investigadores han estado utilizando este modelo para estudiar la capacidad de los linfocitos injertados para generar respuestas humorales humanas primarias y secundarias, y para estudios de investigación viral.

[0028] Recientemente, Lubin y otros, 1994, describieron un nuevo enfoque permitiendo el injerto de PBMC humanas en cepas normales de ratones después de irradiación letal de dosis dividida que permite una injerto efectivo y rápido de células humanas. Como se ha informado anteriormente, en tales quimeras por radiación humano/ratón, se podrían generar un humoral humano marcado así como respuestas (CTL) celulares por inmunización con o antígenos extraños o con células alogénicas (Marcus y otros, 1995; Segal y otros, 1996), prestando ventajas a este modelo en comparación con el modelo de ratón SCID de Mosier anteriormente usado. Ventajas adicionales de este modelo es que la diseminación de los linfocitos injertados es muy rápida y tanto los linfocitos B y T se encontraron por análisis FACS en números significativos en los tejidos linfoides dentro de unos pocos días tras el trasplante (Burakova y otros, 1997).

[0029] Para evaluar la eficacia de una vacuna contra la gripe humana de acuerdo a la invención, usamos este modelo de quimera por radiación humano/ratón. A pesar de que el número de células B humanas después del trasplante fue bajo (**Figura 1**) los ratones quiméricos fueron capaces de producir anticuerpos específicos en respuesta a la administración i.p. de antígenos. Esto está de acuerdo con los descubrimientos anteriores, mostrando que hacia la segunda semana después del trasplante, las células B y T humanas injertadas forman folículos en los ganglios del bazo y linfáticos. Además, su fenotipo fue el de las células de memoria, concretamente mayoritariamente CD45RP positivo y CD45RA negativo (Burakova y otros, 1997).

[0030] De acuerdo a la presente invención, las quimeras por radiación humano/ratón fueron inmunizadas con el tetra constructo administrada por la vía intranasal. Este es el primer informe de inducción de respuesta inmune local en la cavidad nasal y pulmones después de la inmunización intranasal en las quimeras por radiación humano/ratón.

[0031] La inducción de la respuesta local inmune en los pulmones se demostró por la presencia de anticuerpos anti gripe específicos en los homogeneizados de los pulmones (**Figura 3**), por la elevación de la proporción de linfocitos CD8⁺ y por la depuración viral como resultado de la inmunización con el tetra constructo (**Figura 2**). El tetra constructo de flagelina puede también proteger los ratones de una exposición a dosis letal del virus, que es la última demostración del efecto protector. Bajo estas condiciones, en las que la dosis de exposición es en órdenes de magnitud más alta que la perteneciente en la infección natural, todas las quimeras fueron infectadas sin tener en cuenta su estado inmune. Sin embargo, mientras ninguno de los ratones inmunizados que no habían sido trasplantados con los linfocitos humanos sobrevivieron a la infección, y sólo el 50% de los ratones trasplantados pero no inmunizados sobrevivieron, el grupo trasplantado e inmunizado fue completamente protegido y mostró una supervivencia del 100% (**Figura 4**).

[0032] La protección parcial en ratones no vacunados se debe probablemente a la estimulación policlonal y a la expansión de las células de la memoria originarias del donante. Esto puede ser debido o a una exposición anterior del donante al antígeno o porque es de reacción cruzada hasta cierto punto con otros antígenos de memoria inmunológica, un fenómeno que ha sido informado anteriormente para otros antígenos (Marcus y otros, 1995).

[0033] Sin embargo, aunque dicha protección parcial fue de hecho observada, se observó una diferencia significativa en la eficacia del proceso de recuperación entre los grupos inmunizados y los no inmunizados como evidente tanto por la tasa de supervivencia como por su patrón de pérdida de peso (**Figuras 4, 5**). A pesar de que los fenotipos HLA de los donantes de PMBC no fueron determinados, todos los ratones trasplantados fueron protegidos como resultado de la vacunación, indicando que los epítipos usados en la presente invención son de hecho reconocidos por una amplia variedad de moléculas HLA.

[0034] Uno de los problemas más agudos relacionados con las vacunas contra la gripe actualmente existentes es el estrecho rango de su especificidad y su actividad específica de la cepa restringida. La variación rápida en las glicoproteínas de la superficie viral lleva a la aparición de nuevas cepas con alta variabilidad en su seroespecificidad, y por lo tanto las vacunas que contienen las glicoproteínas exteriores de algunas cepas específicas están limitadas

en su eficacia a estas cepas. De acuerdo a la presente invención, también establecimos la capacidad de protección cruzada de la vacuna de tetra constructo. Todos los epítomos que fueron incluidos en el tetra constructo son regiones conservadas en las proteínas respectivas, y consecuentemente, los anticuerpos contra los flagelos recombinantes pueden reconocer varias cepas de gripe (**tabla 1**). Consecuentemente, la inmunización de los ratones quiméricos con los epítomos llevó a la producción de anticuerpos específicos y a su protección de infección por dosis sub-lethal por tres cepas diferentes de gripe, de la especificidad H1, H2 o H3 (**Figura 6**).

[0035] En consecuencia, los resultados con el tetra constructo de acuerdo a la invención demuestran la capacidad de una vacuna basada en péptidos sintética de conferir protección contra la exposición viral a la gripe. El constructo de flagelina recombinante de hecho presenta los epítomos de las células B y T de la gripe a las células inmunes humanas de una manera eficiente e induce tanto las respuestas humorales como las celulares. Como los epítomos de células T empleados son reconocidos por una variedad de moléculas HLA, la vacuna fue efectiva en todos los experimentos en los que se utilizaron diferentes donantes con muestras de HLA desconocidas, indicando la aplicabilidad de este enfoque para una vacuna humana en una población heteróloga.

EJEMPLOS

[0036]

Materiales y Métodos

1 Ratones. Se obtuvieron ratones BALB/c (4-8 semanas de edad) de Olac Farms (Bicester, U.K.), ratones NOD/SCID (4-6 semanas de edad del Weizmann Institute Animal Breeding Center (Rehovot, Israel. Todos los ratones fueron alimentados con comida estéril y agua ácida que contenía ciprofloxacina (20 µg/ml).

2 Régimen de acondicionamiento. Los ratones BALB/c fueron expuestos a una irradiación de cuerpo total letal dividida (TBI) de 4 Gy seguido tres días después por 10 Gy. La fuente de radiación es un rayo gamma 150-A ⁶⁰Co (producido por Atomic Energy of Canada, Kanata, Ontario). Se obtuvieron células de médula ósea de los ratones NOD/SCID (4-6 semanas de edad) de acuerdo a Levite y otros, 1991. Los ratones irradiados recibieron fueron inyectados con 2-3x10⁶ de células de médula ósea SCID (i.v. en 0,2 ml de salino regulado con fosfato (PBS)) un día después de la irradiación.

3 Preparación y trasplante de los linfocitos de sangre periférica humanos. Las capas leucocitarias de voluntarios normales fueron puestas en capas en solución Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Noruega) y giradas a 2000 rpm durante 20 minutos. La capa intermedia fue recogida, lavada dos veces, contada y resuspendida en PBS pH 7,4, a la concentración de células deseada. Se inyectaron PBC humanas (70x10⁶ células en 0,5 ml de PBS) i.p. en los ratones recipientes, acondicionados como se ha descrito anteriormente. Los ratones de control no recibieron PBMC humanas.

4 Procedimiento de leucoféresis. La leucoféresis fue realizada en voluntarios normales. Las células fueron recogidas procesando 3-4 litros de sangre a través de Haemonetics V50 (USA) durante 3-3,5 horas. El producto de la leucoféresis fue centrifugado a 1200 rpm durante 10 minutos y se retiró el plasma.

5 Flagelina quimérica. Los oligonucleótidos correspondientes a los epítomos de gripe designados, concretamente NP335-350 (SAAFEDLRVLSFIRGY), NP380-393 (ELRSRYWAIRTRSG) y dos péptido de la hemaglutinina del subtipo H3: HA91-108 (SKAFSNCYPYDVPDYASL) y HA307-319 (PKYVKQNTLKLAT) fueron sintetizados en un Sintetizador de ADN 380B Applied Biosystems, con secuencia GAT adicional en el 3' de cada oligonucleótido para conservar el sitio de restricción EcoRV, como se ha descrito (Levi y Arnon, 1996). Los oligonucleótidos sintéticos fueron insertados en el sitio EcoRV del plásmido pLS408 y eventualmente transformados en una cepa de vacuna viva negativa de flagelina (un mutante Aro A) de *Salmonella dublin* SL5928 por transducción, usando el fago P22HT105/1 int. Finalmente los flagelos fueron purificados después de la segmentación ácida y se usó una suspensión fina para la inmunización (Levi y Arnon, 1996).

6 Preparación de las bacterias recombinantes. La construcción del vector de expresión pLS408 se describe por Newton y otros, 1989. Los oligonucleótidos sintetizados fueron insertados en el sitio EcoRV del plásmido pLS408, y transformados en células competentes de *E. coli* JM101. Las colonias que contenían el plásmido recombinante fueron seleccionadas sondeándolas con uno de los oligonucleótidos etiquetados con ³²p-ATP. Los plásmidos de las colonias positivas fueron purificados y la orientación del inserto fue determinada usando análisis de restricción. Los plásmidos deseados fueron usados para transformar células competentes de *Salmonella typhimurium* LB 500 (un negativo restrictivo, capaz de modificación no flagelado) (Bullas y Ryu, 1983,) y fueron después transferidas a una cepa de vacuna viva negativa de flagelina (un mutante Aro A) de *Salmonella dublin* SL5928 por transducción usando el fago P22HT105/1 int (Orbach y Jackson, 1982, y Schmieger, 1972). LAS *S. dublin* transformadas fueron seleccionadas para la resistencia a la ampicilina, motilidad bajo microscopio de luz y crecimiento en placas de agar LB semisólidas, suplementadas con caldo nutriente Oxoid #2. Los clones seleccionados fueron cultivados durante la noche en 2 litros de Medio amp. LBy la flagelina fue purificada por segmentación ácida, e acuerdo a la técnica descrita por Ibrahim y otros, 1985.

7 Aislamiento de los flagelos. Los flagelos fueron aislados de acuerdo con Ibrahim y otros, 1985. Las células bacterianas de un cultivo nocturno cultivadas en medio LB/ampicilina fueron peletizadas y suspendidas en un pequeño volumen de PBS. el pH fue reducido con 1M HCl a 2,0 y la suspensión fue

incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación suave. Las células despojadas fueron retiradas por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos y el pH fue reajustado a 7,4. Los flagelos fueron entonces precipitados por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (35% w/v) y mantenidos durante la noche a 4° C. El pellet obtenido después de la centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4° C fue disuelto en PBS, dializado contra un gran volumen de PBS a 4° C y se descartó cualquier precipitado formado. La proteína resultante fue almacenada a -20° C. Este flagelo resultante es un agregado de la proteína de la flagelina y puede ser usado como tal para una vacuna. La presencia de la proteína del epítipo NP y HA de la flagelina de la invención se muestra en la Figura 2 después de la SDS-PAGE de los flagelos.

8 Inmunización e infección de animales quiméricos. En el noveno día después del trasplante de las PBMC, las quimeras humano/ratón fueron inmunizadas una vez, intranasalmente con una mezcla de 25 µg de cada constructo de flagelina híbrido en un volumen total de 50 µl de PBS o, en el grupo de control, con 75 µg de los flagelos nativos. Esta cantidad fue predeterminada como la dosis óptima en un experimento preliminar en ratones BALB/c. La infección de los ratones fue realizada 7 días después inoculando intranasalmente el fluido alantoideo infeccioso, 50 µl 10^{-4} de virus HAU por ratón. En tanto la inmunización como la infección, los ratones estaban bajo una ligera anestesia de éter. Las quimeras fueron sacrificadas en el 5° día después de la infección. Sus pulmones fueron retirados para la titulación viral.

9 Análisis FACS de las PBMC donantes y el injerto celular humano en ratones quiméricos. Para la evaluación del injerto celular humano en las quimeras humano/ratón, los ratones injertados con linfocitos humanos fueron sacrificados 27-29 días tras el trasplante PBMC. Los linfocitos de los homogeneizados del pulmón así como los lavados peritoneales fueron separados en gradiente de placa de ficoll (Pharmacia Biotech AB, Upsala, Suecia) y después incubados durante 30 minutos en hielo con una mezcla de los anticuerpos monoclonales etiquetados fluorescentemente apropiados. Después del lavado, se realizó un análisis fluorescente doble de antígenos humanos en un analizador FACScan (Beckton-Dickinson, CA). Se usaron los siguientes anticuerpos que reconocen moléculas de superficie humanas específicas: anti-CD45-ficoeritrina (PE)(clon HI30) de Pharmigen; proteína de clorofila anti-CD3-peridina (PerCP) (clon SK7); y anti-CD19-FITC (clon 4G7) (Beckton-Dickinson, CA).

10 Determinación de inmunoglobulina humana. La Ig humana total fue cuantificada en muestras de suero por ELISA sándwich usando Ig anti-humana purificada F(ab)₂ de cabra (G+M+A) sigma como el agente de captura y Ig anti-humana de cabra purificada conjugada por peroxidasa (G+M+A) (sigma) como el reactivo de detección. El suero humano de concentración de inmunoglobulina conocida se usó como el estándar. El ELISA se realizó como se describe por Marcus y otros, 1995.

11 Determinación de inmunoglobulinas humanas específicas para la gripe. Los homogeneizados de pulmón y el suero fueron probados para anticuerpos humanos anti-gripe específicos. El virus (1100 HAU/ml) fue adsorbido a placas ELISA y el bloqueo fue realizado con un 1% de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS. Se usaron IG. anti humano de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (sigma como anticuerpos secundarios. Después de la adición del sustrato (ABTS) se leyeron las placas a 414 nm.

12 Virus de gripe. Se usaron las cepas de gripe A/PR/8/34 (H1N1), A/Japonesa/57 (H2N2) y A/Texas/1/77 (H3N2). Las cantidades de virus fueron medidas en unidades de hemaglutinina (HAU). Para la inmunización, se usó el virus inactivo (A/Texas/1/77), purificado con gradiente de sacarosa. El crecimiento y purificación del virus fueron de acuerdo a los métodos estándares (Barret e Inglis, 1985). Para la titulación del virus, se homogeneizaron las muestras de pulmón en PBS que contenía un 0,1% de BSA y se centrifugaron para retirar los desechos. Los títulos del virus fueron determinados por el método de titulación del huevo completo (Barret e Inglis, 1985). El título fue calculado por hemaglutinación y presentado como Log EID₅₀ (Thompson, 1947).

13 Análisis estadístico. El análisis estadístico fue realizado usando el programa Stat View II (Abacus Concepts Inc., Berkley, CA, USA) en una Macintosh IICi. Se utilizó el test F para calcular los valores de probabilidad (p). Los resultados están presentados como medio y error estándar de al menos dos experimentos independientes repetidos, incluyendo 5-10 animales por grupo.

EJEMPLO 1. Respuesta de los ratones quiméricos al virus de gripe completamente inactivado

[0037] Para establecer la idoneidad de la quimera por radiación humano/ratón para evaluar la vacuna basada en péptidos sintética, hemos evaluado primero su respuesta inmune contra virus de gripe purificado activo que se sabe es protector. Los ratones fueron inmunizados i.p. con 50 µg del virus en el día del trasplante de las PBMC, seguido por una exposición viral sub-lethal con la cepa A/Texas/a/77 de gripe 14 días después de la inmunización. La vacunación de quimeras por radiación humano/ratón con la vacuna del virus completamente muerto, sin ningún adyuvante, indujo la producción de anticuerpos específicos - el título de los anticuerpos del suero fue significativamente más alto (2,4 veces) en las quimeras inmunizadas en comparación con el grupo de control. Además, esta vacunación redujo marcadamente la posterior infección del virus. El título del virus del pulmón después de la exposición fue significativamente inferior (por 2,7 órdenes de magnitud) en las quimeras inmunizadas en comparación con el grupo de control.

[0038] Después de demostrar así la idoneidad de las quimeras por radiación humano/ratón para evaluar la respuesta anti gripe después de la inmunización con virus de gripe inactivo, procedimos con la evaluación de la vacuna recombinante basada en péptidos sintética diseñada para humanos en este modelo de ratón humanizado.

EJEMPLO 2. Análisis FACS de ratones inmunizados para evaluar el injerto de PBMC humanas en quimera humano/BALB

[0039] El injerto exitoso de las células humanas en la quimera humano/ratón se demostró en un experimento preliminar mostrando que la mayoría de los linfocitos en el peritoneo (50-80%) y en los pulmones de los ratones (30-60%) eran de origen humano. Para la evaluación del injerto de las células humanas en la quimera humano/ratón, se analizó la presencia de células humanas en los ratones injertados por FACS.

[0040] La **Figura 1** es un histograma FACS que recoge el patrón de los linfocitos del pulmón humanos después de la inmunización con el tetra constructo sin infección por exposición adicional. Las células fueron teñidas con anticuerpos anti-CD45 junto con anti-CD3 o junto con anti-CD19. Como se muestra, la mayoría de las células humanas (teñidas con anti-CD45) son CD3⁺, concretamente células T (80%-90%) y sólo una población menor es CD19⁺ (3%-10%). Se obtuvieron datos similares de linfocitos humanos en el peritoneo. Es de interés que la proporción CD8⁺/CD4⁺ en los ratones inmunizados varió entre 1 y 2 en comparación con la proporción de 0,3-0,5 en las quimeras no tratadas. Esta expresión desproporcionada de células CD8 puede sugerir que juegan un papel en la protección observada.

EJEMPLO 3. Depuración de virus de los pulmones después de la exposición sub-letal

[0041] La infección de gripe es una enfermedad respiratoria, por lo tanto, una respuesta inmune local inducida por una administración intranasal de la vacuna podría ser más eficiente que la administración parenteral. El programa de inmunización fue modificado para adaptarlo para la inmunización intranasal.

[0042] Los ratones (6-8 por grupo en 7 experimentos repetidos) fueron inmunizados intranasalmente (i.n.) 10-12 días después del trasplante PBMC, como se ha descrito en los Métodos. Diez días después, fueron expuestos i.n. con 10⁻⁴ de HAU en 50 µl de fluido alantoideo de la cepa A/Texas/1/77 viva del virus de la gripe. Cinco días después fueron sacrificados y se retiraron sus pulmones para la titulación del virus. Como se muestra en la **Figura 2** que recoge los resultados acumulativos, la vacunación con el tetra constructo permitió a las quimeras depurar el virus de sus pulmones significativamente más eficientemente que el grupo vacunado con los flagelos nativos, o el grupo que no fue trasplantado con las PMBC pero fueron inmunizados con el tetra constructo. A pesar de que el mismo porcentaje de linfocitos T humano fue detectado en ambos grupos trasplantados (**Figura 1**), sólo los ratones vacunados con la flagelina híbrida mostraron la capacidad de reducir la dimensión del virus, indicando respuesta local específica y eficiente en los pulmones.

[0043] 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). La inmunización con el tetra constructo resultó en un título significativamente más alto de anticuerpos humanos específicos para el virus en tanto las muestras de suero como las del pulmón (**Figura 3**). Por lo tanto parece que aunque la proporción de linfocitos CD19⁺ como se detectó en el análisis FACS fue igualmente baja en los ratones trasplantados inmunizados y de control, la producción de respuesta de anticuerpos anti-gripe específica difiere significativamente entre los dos grupos.

EJEMPLO 4. Supervivencia y patrón de pérdida de peso después de dosis letal de infección viral

[0044] Además del experimento de exposición a infección sub-letal, se examinó la capacidad del preparado de tetra constructo para proteger a las quimeras humano/ratón de una dosis letal de virus de gripe. LA **Figura 4** describe los resultados de dos experimentos repetidos y demuestra la supervivencia de ratones vacunados y no vacunados (ambos trasplantados con PBMC humanas), así como de otro grupo de control que no fue trasplantado pero fue vacunado con el tetra constructo. Como se puede ver, mientras que todos los ratones de control que fueron inmunizados con el tetra constructo pero no fueron trasplantados con linfocitos humanos murieron en el plazo de 19 días después de la infección, se observó un 100% de supervivencia en los ratones que recibieron las PBMC antes de la inmunización. Esto indica que la supervivencia se debe a la respuesta de las células inmunocompetentes humanas trasplantadas. Las PBMC por ellas mismas proporcionaron un efecto beneficioso limitado, como se observó un 50% de supervivencia en el grupo de control que fue vacunado con la flagelina nativa, que por sí misma no induce ninguna respuesta protectora anti-gripe.

[0045] En la **Figura 5** se recoge el patrón de pérdida de peso corporal de los ratones expuestos: el grupo trasplantado que fue inmunizado con el tetra constructo de flagelina, muestra sólo un aligera reducción en su peso corporal después de la infección con dosis letal y una rápida vuelta a la normalidad, mientras el grupo de control que fue trasplantado con PBMC humanas pero inmunizado con la flagelina nativa, perdió más peso (el peso corporal es significativamente diferente entre el grupo experimental y los grupos de control en los días 22-33 después del trasplante) y los ratones supervivientes empezaron a recuperar peso sólo en los últimos días del experimento. El grupo de control vacunado, no trasplantado perdió peso rápidamente y no se recuperó. La supervivencia del grupo trasplantado que fue inmunizado con los flagelos nativos es mejor que la del grupo no trasplantado probablemente debido a alguna respuesta anti-influencia de memoria de las células del donante.

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

[0046] Uno de los mayores problemas con las vacunas contra la gripe actualmente disponibles es que son efectivas sólo contra las cepas incluidas en la vacuna. Por lo tanto era de interés el examinar la capacidad de los híbridos de la flagelina que expresan epítomos de gripe para proteger ratones de diferentes cepas de gripe que llevan varias glicoproteínas de hemaglutinina y neuraminidasa. El epítomo de células B que se expresa en la flagelina se conserva en todos los subtipos H3 de gripe, mientras que los epítomos de células T son de regiones de la hemaglutinina y nucleoproteína altamente conservadas en otros subtipos también. En el primer paso, se ha mostrado que los anticuerpos de conejo hacia estos epítomos pueden de hecho reconocer y reaccionar en el ELISA con diferentes cepas de gripe incluyendo A/Texas/1/77, A/Aichi/68, A/PR/8/34 y A/Japonesa/57 (Tabla 1). Para probar adicionalmente el potencial de estos epítomos de conferir protección cruzada en humanos, las quimeras por radiación humano/ratón (8 ratones por grupo) fueron inmunizadas i.n. con el tetra constructo. Se detectó su resistencia a diferentes exposiciones de cepas de gripe 7 días después y se comparó con los ratones no trasplantados que fueron inmunizados con la misma mezcla de flagelos. Las cepas de gripe que fueron usadas para la infección fueron: A/Texas/1/77 (H3N2), A/Japonesa/57 (H2N2) y A/PR/8/34 (H1N1). Se observó la inmunidad protectora contra las tres cepas, como se presenta en la **Figura 6**. Se detectó Ig humana específica para cada cepa de gripe en el suero de todos los ratones vacunados y trasplantados, pero no en el grupo de control, como se muestra en la **Figura 7**.

Tabla 1

Cepa de virus de gripe	Ab Anti NP 335-350	Ab anti NP 380-393	Ab anti HA 91-108	Ab anti HA 307-319	Ab anti Virus (Texas)
A/Texas/1/77	++	+	+++	+-	+++
A/Aichi/68	+++	++	+++	++	+++
A/P.C./73	+++	+	++	+-	+++
A/Inglaterra/42/72	+++	+	+++	+	+++
A/PR/8/34	+++	++	+++	++	+++
A/Japonesa/57	+++	+-	+++	+-	+++
A/X/31	+++	+	+++	+++	+++
B/Victoria/2/87	+++	+	++	+++	+++

[0047] Los conejos inmunizados con cuatro epítomos de gripe (NP 335-350, NP 380-393, HA 91-108 y HA 307-319) conjugados con BSA, produjeron anticuerpos la especificidad de los cuales fue determinada por ELISA. Estos anticuerpos reconocieron diferentes cepas de virus de gripe que estaban recubriendo las microplacas ELISA. El reconocimiento entre los anticuerpos elevado contra el virus completo (A/Texas/1/77) sirve como un control positivo. Las muestras de suero fueron probadas en 1:150 de dilución, y el reconocimiento de anticuerpos fue clasificado de acuerdo al O.D. máximo: ++ = O.D > 2; ++ = O.D 1-2; + = O.D 0.5-1; +- = O.D < 0.5;

Referencias**[0048]**

1. Arnon, R. y Levi, R. Synthetic recombinant vaccine induces anti-gripe long-term immunity and cross strain protection, In: Novel Strategies in Design and Production of Vaccines (Ed.: Cohen, S. and Shafferman, A.) Plenum Press, N.Y., 1996, p. 23.
2. Barrett, T. e Inglis, S.C. Growth purification and titration gripe viruses, In: Virology: A practical approach (Ed. Mahy, W.J.) IRL Press, Wash. D.C., 1985, pp. 119-151
3. Brett y otros J. Immunol. 1991. 147:984-991.
4. Bullas, L.R. y Ryu, J. J. of Bacteriol. 1983. 156:471-74.
5. Burakova, T., Marcus, H., Canaan, A., Dekel, B., Shezen, E., David, M., Lubin, I., Segal, H. y Reisner, Y. Engrafted human T and B lymphocytes form mixed follicles in lymphoid organs of human/mouse and human/rat radiation chimera. Transplantation 1997. 63:1166-1171
6. Carreno, B.M., Koenig, S., Coligan, J.E. y Biddison, W.E. The peptide binding specificity of HLA class I molecules is largely allele- specific and non-overlapping. Mol Immunol 1992. 29:1131-1140
7. Cerundolo y otros Proc. R. Soc. Lon. 1991. 244:169-7
8. DiBrino y otros PNAS 90. 1993. (4):1508-12
9. Dyer, P. y Middleton, D. In: Histocompatibility testing, a practical approach (Ed.: Rickwood, D. and Hames, B.D.) IRL Press, Oxford, 1993, p. 292.

10. Gulukota, K. y DeLisi, C. HLA allele selection for designing peptide vaccines. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 1996. 13:81.
11. Ibrahim, G.F. y otros *J. Clin. Microbiol.* 1985. 22:1040-1044
12. Kvist y otros. *Nature.* 1991. 348:446-448
- 5 13. Laver, W.G., Air, G.M., Dopheide, T.A. y Ward, C.W. Amino acids sequence changes in the Hemagglutinin of A/Hong kong (H3N2) gripe virus during the period 1968-77. *Nature* 1980. 283:454-457
14. Laver, W., Air, G., Webster, R., Gerhard, W., Ward, C. y Dopheid, T. Antigenic drift in type A gripe virus: sequence differences in the Hemagglutinin of Hong-Kong (H3N2) variants selected with monoclonal hybridoma antibody. *Virology* 1980a. 98:226-237
- 10 15. Levi, R. y Arnon, R. Synthetic recombinant gripe vaccine induces efficient long-term immunity and crossstrain protection. *Vaccine* 1996. 14:85-92
16. Levite, M., Meshorer, A. y Reisner, Y. A rapid method for obtaining murine bone marrow cells in high yield. *Bone Marrow Transpl.* 1991. 8:1-3
- 15 17. Lubin, I., Segall, H., Marcus, H., David, M., Kulova, L., Steinitz, M., Erlich, P., Gan, J. y Reisner, Y. Engraftment of human peripheral blood lymphocytes in normal strains of mice. *Blood* 1994. 83:2368-2381
18. Marcus, H., David, M., Cnaan, A., Kulova, L., Lubin, I., Segal, H., Denis, L., Erlich, P., Galun, E., Gan, J., Laster, M. y Reisner, Y. Human/mouse radiation chimera are capable of mounting a human primary humoral response. *Blood* 1995. 86:398-406
- 20 19. Mosier, D.E. Adoptive transfer of human lymphoid cells to severely immunodeficient mice: models for normal human immune function, autoimmunity, lymphomagenesis, and AIDS. *Adv. Immunol.* 1991. 50:303-325
20. Newton, S.M.C. y otros. *Science.* 1989. 244:70-72
21. Nijman y otros *Eur. J. Immunol.* 1993. 23:1215-1219
22. Orbach, M.J. y Jackson, E.N. *J. Bacteriol.* 1982. 149: 985-994
- 25 23. Rothbard, J.B., y otros *Cell.* 1988. 52(4):515-523
24. Schmieger, H. *Mol. Gen. Genet.* 1972. 119: 75-88
25. Segal, H., Lubin, I., Marcus, H., Canaan, A. y Reisner, Y. Generation of primary antigen-specific human cytotoxic T lymphocytes in human/mouse radiation cimera. *Blood* 1996. 88:721-730
26. Silver y otros. *Nature.* 1993. 360: 367-369
- 30 27. Suhrbier, A., Schmidt, C. and Fernan, A. Prediction of an HLA B8-restricted gripe epitope by motif. *J. Immunology* 1993. 79:171-173
28. Thompson, W.R. Use of moving averages and interpolation to estimate median-effective dose. *Bacteriol. Rev.* 1947. 11:115-145
29. Townsend, A.R.M. y Skehel, J.J. *J. Exp. Med.* 1984. 160:552-563
- 35 30. Townsend, A.R.M. y otros *Cell.* 1985. 42:457-467
31. Townsend, A.R.M. y otros. *Cell.* 1986. 44:959-968
32. Webster, R.G., Laver, W.G., Air, G.M. y Schild, G.C. Molecular mechanism of variation in gripe viruses. *Nature* 1982. 296:115-121

LISTA DE SECUENCIAS

[0049]

5 <110> Yeda Research and Development Co., Ltd.
 <120> Vacuna basada en péptidos para la Gripe
 <130> EP21464IHV163pau

10 <140> todavía no asignada
 <141> adjunta
 <150> 99 972 929.6
 <151> 1999-11-28

15 <150> PCT/IL99/00640
 <151> 1999-11-28

20 <150> IL 127331
 <151> 1998-11-30
 <160> 9

25 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Virus de gripe

30 <400> 1

35 Ser Lys Ala Phe Ser Asn Cys Tyr Pro
 1 5
 Ser Leu

40 <210> 2
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Virus de gripe

45 <400> 2

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

50 <210> 3
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus de gripe

55 <400> 3

60 Cys Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr L
 1 5
 Arg Asn Val

65 <210> 4
 <211> 16
 <212> PRT

ES 2 389 611 T3

	<213> Virus de gripe	
	<400> 4	
5		Ser ₁ Ala Ala Phe Glu ₅ Asp Leu
10	<210> 5 <211> 14 <212> PRT <213> Virus de gripe	
15	<400> 5	
		Glu ₁ Leu Arg Ser Arg Tyr Ti ₅
20	<210> 6 <211> 10 <212> PRT <213> Virus de gripe	
25	<400> 6	
		Asn ₁ Val Lys Asn Leu ₅ Tyr Glu Lys Val Lys ₁₀
30		
	<210> 7 <211> 9 <212> PRT <213> Virus de gripe	
35	<400> 7	
		Ile ₁ Leu Gly Phe Val ₅ Phe Le
40		
	<210> 8 <211> 9 <212> PRT <213> Virus de gripe	
45	<400> 8	
50		
		Ile ₁ Leu Gly Phe Val ₅ Phe Lei
55		
	<210> 9 <211> 8 <212> PRT <213> Virus de gripe	
60	<400> 9	
		Ala ₁ Cys Ser Met Gly ₅ Leu Ile Ty

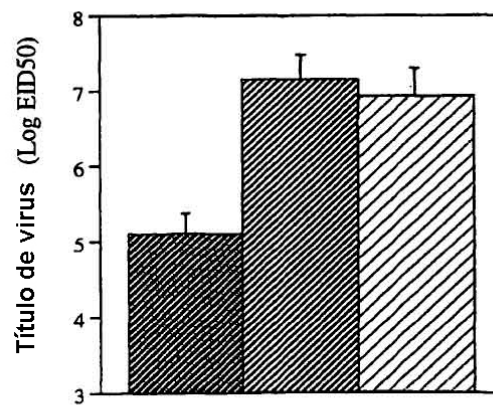
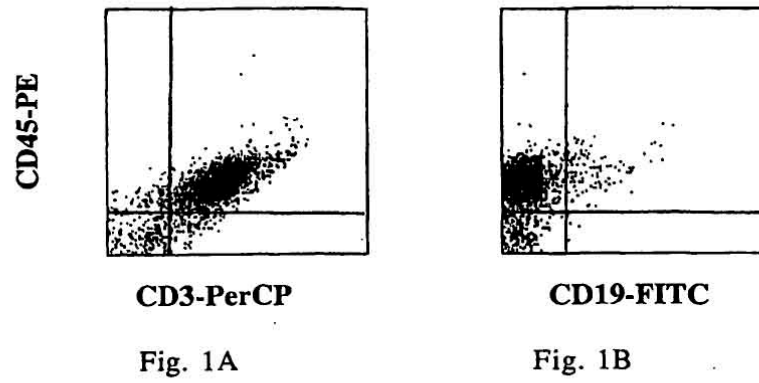
REIVINDICACIONES

1. Una vacuna contra la gripe basada en péptidos sintética humana que comprende cuatro epítomos de virus de gripe:

- 5 (i) un epítomo de hemaglutinina de células B que es el epítomo de hemaglutinina HA91-108 de la secuencia: Ser-Lys-Ala-Phe-Ser-Asn-Cys-Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala-Ser-Leu;
- (ii) un epítomo de la T colaboradora que es el epítomo de hemaglutinina HA307-319 de la secuencia: Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-Leu-Ala-Thr;
- 10 (iii) un epítomo de linfocitos citotóxicos (CTL) que es el epítomo de nucleoproteína NP335-350 de la secuencia: Ser-Ala-Ala-Phe-Glu-Asp-Leu-Arg-Val-Leu-Ser-Phe-Ile-Arg-Gly-Tyr; y
- (iv) un epítomo de los CTL que es el epítomo de nucleoproteína NP380-393 de la secuencia: Glu-Leu-Arg-Ser-Arg-Tyr-Trp-Ala-Ile-Arg-Thr-Arg-Ser-Gly,

15 los mencionados epítomos del virus de gripe siendo reactivos con células humanas.

2. La vacuna contra la gripe basada en péptidos sintética humana de acuerdo a la reivindicación 1 para inducir una respuesta inmune humana y conferir protección contra el virus de la gripe.



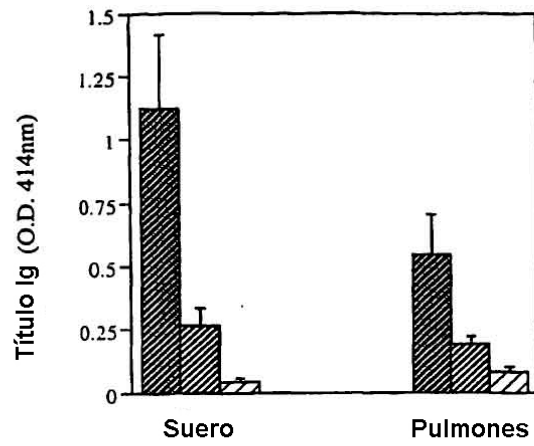


Fig. 3

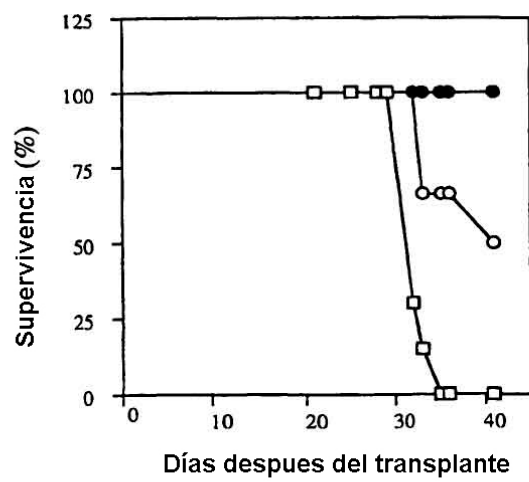


Fig. 4

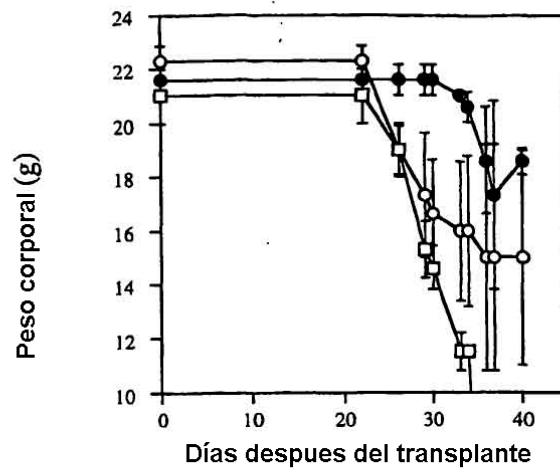


Fig. 5

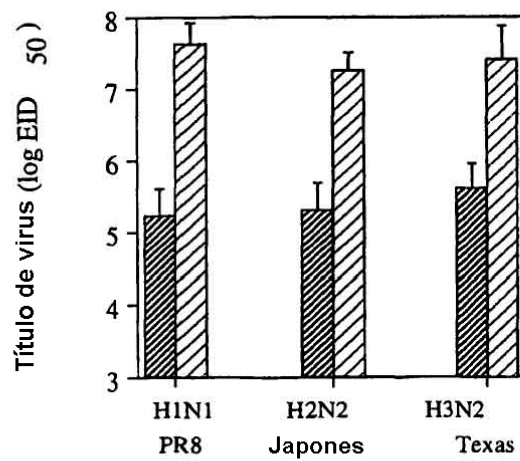


Fig. 6

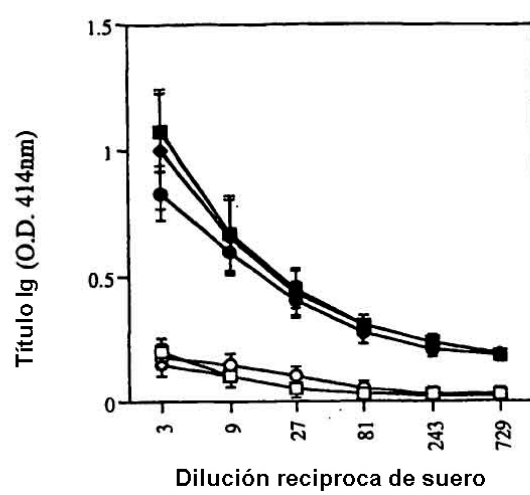


Fig. 7