

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 798**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C07K 14/255 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2009 E 09769254 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2300609**

54 Título: **Novedosos compuestos inmunoadyuvantes basados en flagelina y uso de los mismos**

30 Prioridad:

25.06.2008 EP 08305327

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

05.03.2014

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
INSTITUT PASTEUR DE LILLE (50.0%)**

72 Inventor/es:

SIRARD, JEAN-CLAUDE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 445 798 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

Novedosos compuestos inmunoadyuvantes basados en flagelina y uso de los mismos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la inducción y/o estimulación de la respuesta inmunitaria en un individuo o un animal.

- 5 Se refiere en particular a nuevos compuestos inmunoadyuvantes útiles para composiciones inmunogénicas y de vacuna.

Antecedentes de la invención

El desarrollo de vacunas seguras y eficaces sigue siendo un objetivo importante en la salud pública mundial.

- 10 En particular, las vacunas llamadas "mucosas" han emergido como una posible y atractiva alternativa a vacunas inyectables.

La administración por la mucosa tiene muchos atributos potencialmente deseables. Quizás el motivo más persuasivo para desarrollar técnicas de administración de vacunas por la mucosa sea el desarrollo de una defensa de inmunidad de primera línea, generando inmunidad local en el sitio mucoso de entrada para muchos patógenos invasores.

- 15 Además, algunos investigadores han informado que existe un sistema inmunitario mucoso común, por lo que la inmunidad mucosa inducida en un sitio puede conducir a inmunidad en un sitio mucoso distal (McGhee, J. R. y col. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. Vaccine 1992, 10:75-88).

Además, la administración de un antígeno mediante un sitio mucoso tiene la posibilidad de generar también una respuesta inmunitaria sistémica.

- 20 Esto sugiere que pueden lograrse beneficios significativos por la administración de vacunas de una forma no invasiva, por ejemplo, intranasalmente u otra vía mucosa, para provocar inmunidad a una amplia gama de patógenos que pueden entrar en diferentes sitios mucosos.

La mayoría de las vacunas de nuestros días (vacunas mucosas u otras) están compuestas de dos componentes principales: (i) el antígeno diana de interés terapéutico y (ii) compuesto(s) inmunoadyuvante(s) que estimulan y/o inducen inmunogenicidad contra dicho antígeno.

- 25 La naturaleza de los inmunoadyuvantes conocidos varía enormemente, pero incluye en particular aceites minerales, extractos bacterianos, organismos vivos y atenuados, y suspensiones de metales de hidróxido de aluminio.

Aunque los adyuvantes proporcionan respuestas inmunitarias potenciadas, su uso también puede provocar efectos secundarios adversos, en función en particular de su vía administrada. Por tanto, los números de adyuvantes que están aprobados y son eficaces en seres humanos siguen siendo relativamente limitados.

- 30 Los avances en el campo de la inmunidad innata han proporcionado un mejor entendimiento de tanto los mecanismos celulares como moleculares que gobiernan la regulación de la respuesta inmunitaria del huésped.

Este mejor conocimiento del sistema inmunitario ha permitido la investigación y desarrollo de nuevos posibles inmunoadyuvantes útiles.

- 35 En particular, los receptores similares a toll (TLR) son fundamentales en la inducción coordinada de inmunidad innata y adaptativa en mamíferos. Como los TLR son expresados por una amplia variedad de tipos de células, pueden estimular la inmunidad por todo el organismo.

- 40 Tras la infección por microorganismos patógenos, los TLR reconocen motivos conservados denominados patrones moleculares asociados a microbios (MAMP). La interacción de TLR induce un programa de expresión génica dedicado a tanto la eliminación innata de como la inmunidad adquirida a microorganismos patógenos. Por ejemplo, los TLR inducen la producción de quimiocinas que, a su vez, atraen específicamente los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) directamente implicados en la eliminación microbiana innata. Además, los TLR promueven la secreción de mediadores inmunes pleiotrópicos (tales como $TNF\alpha$) y la maduración funcional de células dendríticas (CD) que se especializan en presentación de antígeno a linfocitos.

- 45 Por consiguiente, los agonistas de TLR no solo estimulan respuestas inmunitarias pro-inflamatorias "ampliamente específicas", sino que también potencian la respuesta inmunitaria adaptativa a antígenos, y así se considera que son inmunoadyuvantes.

A pesar de estos efectos posiblemente beneficiosos, la toxicidad sistémica de MAMP ha dado lugar a esfuerzos para desarrollar derivados que inclinen la actividad de MAMP hacia la adyuvancia. De hecho, moléculas manipuladas con propiedades únicas es un reto importante en la manipulación de respuestas inmunitarias.

5 Las flagelinas bacterianas (los principales componentes del flagelo en muchos patógenos bacterianos) son agonistas únicos específicos para la activación de TLR5.

La flagelina FliC de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) es el paradigma de estudios sobre la estructura-función de flagelo, inmunidad y señalización de TLR5.

Es una proteína de 494 aminoácidos con dos dominios distintos. Las regiones “conservadas” en el extremo amino y carboxi forman un dominio que es esencial para la activación de TLR5.

10 El dominio central de la flagelina FliC comprende aminoácidos no obligatorios para la señalización de TLR5. Se designa una región “hipervariable”, ya que las secuencias primarias varían enormemente en composición y tamaño de una especie bacteriana a otra. A diferencia, se sabe que la región hipervariable es esencial para la antigenicidad de la flagelina.

15 Se ha mostrado que la inyección intravenosa (i.v.) de flagelinas promueve una respuesta sistémica, caracterizada por la producción de mediadores pro-inflamatorios (tales como TNF α o IL-6) y activación de CD.

Además, las flagelinas desencadenan mecanismos de defensa innatos y adaptativos específicos de mucosa. Por ejemplo, líneas celulares epiteliales y mucosa de pulmón regulan por incremento la producción de quimiocinas como CXCL8 (IL-8) y CCL20 que, a su vez, reclutan PMN y CD mucosos, respectivamente.

20 Diversos autores también han informado de que las flagelinas son potentes inmunoadyuvantes sistémicos y mucosos que provocan (i) respuestas de anticuerpos en suero y/o secretoras y (ii) respuestas de células Th1 y Th2 a tanto las propias flagelinas como a antígenos co-administrados.

Debido a sus potentes actividades de inmunoadyuvante sistémico y mucoso, las flagelinas pueden ser particularmente interesantes para el desarrollo de vacuna, y en particular de tipo de vacuna mucosa. Tal uso se ha propuesto en el documento WO-A-2004 022092.

25 Sin embargo, la mayoría de dichos adyuvantes tipo flagelina no son completamente adecuados para tal aplicación de vacuna, y en particular para dicha estrategia de vacuna mucosa.

De hecho, los adyuvantes de flagelina conocidos muestran efectos secundarios importantes, y en particular actividad antigénica intrínseca y propiedades pro-inflamatorias sistémicas cuando se administran *in vivo*.

30 Además, la mayoría de los inmunoadyuvantes tipo flagelina conocidos necesitan estar físicamente ligados al antígeno diana, con el fin de provocar una potente respuesta inmunitaria cuando se administran *in vivo*. Este requisito obliga a complejas manipulaciones adicionales para obtener un enlace flagelina-antígeno adecuado, y la sustancia inmunogénica útil final.

35 Por tanto, existe la necesidad de nuevos compuestos que puedan usarse como adyuvantes inmunológicos, en particular para inducir y/o para potenciar la respuesta inmunitaria mucosa contra un antígeno, en particular sin desencadenar ningún efecto secundario de inflamación sistémica significativo.

Estos nuevos compuestos deben también ser capaces de desencadenar ventajosamente una respuesta inmunitaria por una simple mezcla con el antígeno diana.

40 La presente invención propone entonces nuevos compuestos inmunoadyuvantes que satisfacen esta necesidad, y que pueden ser particularmente útiles para la producción de composiciones inmunogénicas y de vacuna (en particular de tipo mucoso).

Sumario de la invención

Se ha encontrado, según la invención, novedosos compuestos de péptido derivados de flagelina que se originan a partir de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium de tipo SEC ID N^o 1, que presentan una actividad adyuvante *in vivo* como se ilustra en los ejemplos en la presente memoria.

45 También se ha mostrado según la presente invención que estos novedosos compuestos adyuvantes presentan en particular propiedades de adyuvante mucoso, sin ejercer efectos pro-inflamatorios sistémicos significativos.

Dichos nuevos compuestos derivados de flagelina de la invención son así particularmente útiles como sustancias inmunoadyuvantes, ventajosamente para inducir y/o para potenciar una respuesta inmunitaria mucosa.

Así, la presente invención se refiere a un compuesto inmunoadyuvante según la reivindicación 1:

Realizaciones preferidas del compuesto inmunoadyuvante de la invención se definen más adelante en la descripción.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto inmunoadyuvante como se ha definido anteriormente (o en la siguiente descripción), junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

La composición farmacéutica según la invención comprende un compuesto inmunoadyuvante como se ha definido anteriormente, junto con uno o más antígenos.

Dicha composición farmacéutica es así ventajosamente una composición inmunogénica (es decir, una composición que tiene como objetivo inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno, por ejemplo, para producir anticuerpos) o una composición de vacuna (es decir, una composición que tiene como objetivo inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto o un animal con el fin de tratar o prevenir una enfermedad).

Según una realización preferida, dicha composición inmunogénica o dicha vacuna comprenden ventajosamente dicho compuesto inmunoadyuvante de la invención que no está ligado covalentemente a dicho uno o más antígenos.

La presente invención también se refiere al compuesto inmunoadyuvante como se ha definido anteriormente, para su uso como un medicamento (en particular para inducir y/o para potenciar actividad adyuvante mucosa).

La presente invención también se refiere al uso de un compuesto inmunoadyuvante según la invención para fabricar una composición farmacéutica, en particular para inducir y/o para potenciar una respuesta inmunitaria contra uno o más antígenos distintos de una proteína flagelina (en particular en el compartimento mucoso después de la administración por vía mucosa).

La presente invención también se refiere a (i) un ácido nucleico que codifica el compuesto de péptido inmunoadyuvante como se ha desvelado anteriormente, (ii) un vector recombinante que comprende, insertado en su interior, dicho ácido nucleico, (iii) una célula huésped transfectada o transformada con dicho ácido nucleico o con dicho vector recombinante.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Características y reactividad cruzada de flagelinas suprimidas en la región hipervariable.

(A) Una vista en 3D esquemática de las flagelinas recombinantes.

La estructura de la flagelina FliC natural se presenta en el panel izquierdo usando Pymol (<http://www.pymol.org>). En el monómero, regiones terminales (1-170 y 400-494) están estrechamente plegadas en hélices α y forman un dominio estructural que participa en la función del flagelo. El motivo 89-96 (negro) es esencial para la señalización de TLR5. El dominio "hipervariable" de FliC está principalmente constituido de estructuras β y giros β .

Usando el modelo de Swiss (<http://www.expasy.org/spdbv/>) se predijo una estructura global para FliC $_{\Delta 204-292}$ y FliC $_{\Delta 174-400}$, que muestran supresión parcial y total de la región hipervariable, respectivamente.

Para FliC $_{\Delta 191-352}$, las posiciones de aminoácidos que delinear la supresión se muestran en el panel izquierdo. FliC $_{\Delta 174-400}$ y FliC $_{\Delta 191-352}$ contienen ligadores GAAG y LELE en la unión de supresión, respectivamente.

(B, C) Reactividad cruzada de sueros específicos para FliC.

Se obtuvieron sueros hiperinmunes después de la administración s.c. de flagelina formulada con CFA para la sensibilización, seguido de refuerzos de IFA. El suero se valoró en ELISA para FliC, FliC $_{\Delta 204-292}$, FliC $_{\Delta 191-352}$ y FliC $_{\Delta 174-400}$. Los resultados son representativos de 2 experimentos. (B) Reactividad cruzada de suero anti-FliC. (C) Reactividad cruzada de suero anti-FliC $_{\Delta 174-400}$.

La significancia estadística ($p > 0,05$ en una prueba de Mann-Whitney) se indica por un asterisco.

Figura 2. Actividad pro-inflamatoria epitelial y mucosa de flagelinas suprimidas de la región hipervariable.

(A, B) Activación de células epiteliales por flagelinas recombinantes.

Se activaron células epiteliales humanas con flagelinas FliC, FliC $_{\Delta 204-292}$, FliC $_{\Delta 191-352}$, FliC $_{\Delta 174400}$ o FliC $_{\Delta 174-400/89-96^*}$ a las concentraciones indicadas. Células Caco-Rumbo que alojaban la fusión indicadora *CCL20-luc* se activaron durante 6 h y la actividad de luciferasa se normalizó a la máxima actividad medida con niveles de FliC saturantes (A). Células epiteliales bronquiales BEAS-2B se estimularon durante 16 h antes de medir los niveles de IL-8 en el sobrenadante.

Los resultados son representativos de 1 de 2 experimentos independientes (B).

(C-D) Estimulación de la respuesta innata mucosa por flagelinas suprimidas

- 5 Flagelinas recombinantes o preparaciones tratadas con tripsina (1 µg de equivalente) se administraron i.n. a ratones anestesiados (n=3-5). Se determinaron niveles de ARNm específicos de *CCL20* en los pulmones completos 2 h después usando qRT-PCR en tiempo real (C). Seis horas después de la instilación se muestrearon LBA (barras negras) y pulmones (barras blancas) para medir la concentración de *CCL20* (D).

La significancia estadística ($p > 0,05$) se determinó en una prueba de Mann-Whitney.

Figura 3. Efecto adyuvante de flagelinas con supresión de la región hipervariable.

Ratones (n=8) se inmunizaron i.n. con ovoalbúmina (OVA) ± flagelinas o toxina del cólera (TC) en los días 1 y 21.

- 10 En el día 35, títulos de IgG específica para OVA se midieron en suero (A) y LBA (B).

Se determinó la concentración de IgA específica para OVA en LBA (C).

Los resultados son representativos de 1 de 2 experimentos independientes. La significancia estadística ($p > 0,05$) se determinó en una prueba de Mann-Whitney.

Figura 4. Propiedades antigénicas intrínsecas de flagelinas que carecen de una región hipervariable.

- 15 Se inmunizaron i.n. ratones (n=8) con ovoalbúmina (OVA) ± flagelinas o toxina del cólera (TC) o LPS en los días 1 y 21.

En el día 35, títulos de IgG específica para FliC se midieron en suero (A) y LBA (B). Los resultados son representativos de 1 de 2 experimentos independientes.

La significancia estadística ($p > 0,05$) se determinó en una prueba de Mann-Whitney.

Figura 5. Neutralización de la señalización de TLR5 por anticuerpos específicos para flagelina.

- 20 Se inmunizaron s.c. ratones NMRI en la semana 1 con 1 µg de flagelina FliC y CFA, seguido de refuerzos en las semanas 3, 5, 7 con FliC e IFA. En condiciones simuladas, los animales se trataron similarmente con ovoalbúmina y adyuvantes o adyuvantes solos. Los experimentos se llevaron a cabo en la semana 9.

(A) Actividad neutralizante de TLR5 *in vitro* de suero inmune específico para flagelina.

- 25 Células epiteliales Caco-Rumbo que alojan la construcción indicadora *CCL20-luc* se activaron durante 6 h con la flagelina FliC incubada con 50 % en v/v de sueros hiperinmunes para FliC (círculos blancos) o simulados (círculos negros). Se determinó la actividad de luciferasa y se normalizó a la actividad obtenida con 100 ng/ml de FliC. Los resultados son representativos de 1 de 3 experimentos independientes.

(B, C) Actividad neutralizante de TLR5 *in vivo* de suero inmune específico para flagelina.

- 30 Se inyectaron i.v. animales inmunizados (n=3) con SBF (barras negras) o 0,1 µg (barras grises) o 1 µg de flagelina FliC (barras blancas). Los sueros se recogieron 2 h después y las concentraciones de *CCL20* (B) y *CXCL2* (C) se determinaron por ELISA.

(D) Actividad neutralizante de suero inmune.

- 35 Se transfirieron i.v. pasivamente animales (n=3 por dosis) con diversas cantidades de suero específico para flagelina o simulado, y se trataron 1 h después i.v. con flagelinas recombinantes, como se indica. La producción de quimiocinas en suero 2 h después de la exposición se midió por ELISA.

La significancia estadística ($p > 0,05$) se determinó usando una prueba de Mann-Whitney.

Figura 6. Actividad de respuesta a dosis intranasal de flagelinas FliC y FliC_{Δ174-400}.

- 40 Se instilaron i.n. ratones (n=3-5) con diversas cantidades de flagelinas FliC (cuadrados negros) o FliC_{Δ174-400} (cuadrados abiertos). Las concentraciones de *CCL20* (A) y *CXCL2* (B) se determinaron 6 h después en LBA usando un ELISA.

La significancia estadística ($p > 0,05$) se determinó en una prueba de la U de Mann-Whitney.

Figura 7. Alteración de la capacidad de activación sistémica de flagelina suprimida de la región hipervariable

FliC_{Δ174-400}.

Se administraron i.v. diversas cantidades de flagelina FliC (cuadrados negros) o FliC_{Δ174-400} (cuadrados blancos). Las concentraciones de CCL20 (A) y CXCL2 (B) se determinaron 2 h después en el suero usando un ELISA.

La significancia estadística ($p > 0,05$) se determinó en una prueba de Mann-Whitney.

5 Figura 8: Análisis de SDS-PAGE de diversas flagelinas suprimidas de la región hipervariable recombinantes

La Figura 8 consiste en una fotografía de una electroforesis en SDS-PAGE de FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405}, FliC_{Δ138-405} y FliC_{Δ100-405} recombinantemente producidas después de tinción con azul de Coomassie.

Figura 9: Análisis de inmunotransferencia de diversas flagelinas suprimidas de la región hipervariable recombinantes

10 La Figura 9 consiste en una fotografía de una electroforesis por transferencia Western de FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405}, y FliC_{Δ138-405} y FliC_{Δ100-405} recombinantemente producidas después de tinción con anticuerpos anti-FliC.

Figura 10: Inducción de la producción de quimiocinas CCL20 por diversas flagelinas suprimidas de la región hipervariable recombinantes

Estimulación de la respuesta innata sistémica por flagelinas suprimidas.

15 Flagelinas recombinantes o preparaciones tratadas con tripsina (10 µg de equivalente) se administraron i.p. a ratones (n=2). Dos horas después de la inyección el suero se muestreó para medir la concentración de CCL20.

Figura 11: Inducción de la producción de quimiocinas CXCL2 por diversas flagelinas suprimidas de la región hipervariable recombinantes

Estimulación de la respuesta innata sistémica por flagelinas suprimidas.

20 Flagelinas recombinantes o preparaciones tratadas con tripsina (10 µg de equivalente) se administraron i.p. a ratones (n=2). Dos horas después de la inyección el suero se muestreó para medir la concentración de CXCL2.

Figura 12: Efecto adyuvante de FliC_{Δ174-400} recombinante para inmunización contra el antígeno gp140 del virus del VIH.

Se inmunizaron i.n. ratones (n=6) con gp140 (5 µg) ± flagelinas (1 µg) en los días 1 y 21.

25 En el día 35, los títulos de IgG específica para gpP140 se midieron en suero (símbolos cerrados) y LBA (símbolos abiertos). Los resultados son representativos de 1 de 2 experimentos independientes.

Figura 13: Perfil de cromatografía a 280 nm de un ciclo de purificación de FliC sobre un sustrato de inmunoafinidad sobre el que se han inmovilizado anticuerpos monoclonales de ratón anti-FliC_{Δ174-400}.

30 **Figura 14: Análisis de electroforesis de diversas fracciones de cromatografía recogidas durante un ciclo de purificación de FliC sobre un sustrato de inmunoafinidad sobre el que se han inmovilizado anticuerpos monoclonales de ratón anti-FliC_{Δ174-400}.**

La Figura 14 consiste en una fotografía de una electroforesis en SDS-PAGE de fracciones recogidas como se representa en la Figura 13 después de la tinción con azul de Coomassie.

Descripción detallada de la invención

35 Según la presente invención se ha mostrado que los compuestos novedosos inducen una actividad inmunoadyuvante mucosa *in vivo* que permite la inducción de una respuesta inmunitaria contra un antígeno diana, cuando dichos compuestos novedosos se administran con el (los) antígeno(s) correspondiente(s) adecuado(s).

40 En particular, se ha mostrado en la presente memoria que los novedosos compuestos de adyuvante de la invención ejercen sus propiedades inmunoadyuvantes también después de administración intranasal a ratones. Dichos compuestos inmunoadyuvantes de la invención son así capaces de potenciar respuesta inmunitaria sistémica y mucosa.

Se ha demostrado que dicho compuesto inmunoadyuvante derivado de flagelina de la invención tiene propiedades de adyuvante mucoso mediado por TLR5, con efecto pro-inflamatorio mucoso *in vivo*, pero no muestra ningún efecto secundario pro-inflamatorio sistémico significativo después de inyección sistémica.

Además, los resultados contenidos en los ejemplos en la presente memoria muestran que dicho compuesto inmunoadyuvante derivado de flagelina no muestra efecto antigénico intrínseco significativo, es decir, la molécula de interés previene o atenúa la potencia para desencadenar anticuerpos específicos para flagelina, en particular en suero o lavado broncoalveolar (LBA) cuando se administran por vía intranasal.

- 5 Los resultados anteriores muestran que dicho compuesto inmunoadyuvante derivado de flagelina de la invención puede usarse como un adyuvante eficaz de la respuesta inmunitaria, especialmente para inducir respuestas inmunitarias mucosas.

Dicho compuesto de péptido puede así ser útil en particular cuando está comprendido en (i) composiciones de vacuna mucosa para prevenir o para tratar enfermedades que inducen una respuesta inmunitaria mucosa dentro del cuerpo del organismo objeto, o en (ii) una composición inmunogénica para potenciar o desencadenar una respuesta inmunitaria contra un antígeno deseado.

En particular, como se muestra en los ejemplos en la presente memoria, los inventores han encontrado que, inesperadamente, la señalización de TLR5 está compartimentalizada, ya que la nueva flagelina FliC_{Δ174-400} particular (es decir, un péptido derivado de flagelina de la que la secuencia de péptidos SEC ID N° 1 de la flagelina FliC de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* ATCC14028 se suprime de la posición 174 a la posición 400) estimula inmunidad en la mucosa, pero carece de cualquier efecto pro-inflamatorio sistémico significativo.

Los inventores también han establecido que la flagelina FliC_{Δ174-400} tiene importantes propiedades beneficiosas, debido a su mala capacidad para generar anticuerpos específicos para FliC neutralizantes.

Además, se ha encontrado en la presente memoria que la flagelina FliC_{Δ174-400} está fuertemente atenuada para señalización sistémica en comparación con la flagelina natural, mientras que la actividad mucosa no se afectó.

También se ha mostrado en la presente memoria que otras flagelinas suprimidas de la región hipervariable, que incluyen FliC_{Δ161-405} y FliC_{Δ138-405}, están dotadas de propiedades inmunoadyuvantes.

Péptidos inmunoadyuvantes de la invención

Los hallazgos permiten que los inventores diseñen una familia de péptidos, que debería tener las mismas propiedades y ventajas que las flagelinas FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405} y FliC_{Δ138-405}.

Dicha familia de péptidos se define a partir de las flagelinas FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405} y FliC_{Δ138-405} estudiadas en los ejemplos en la presente memoria, y basadas en la secuencia de péptidos de flagelina SEC ID N° 1 y en la estructura cristalográfica del péptido, para predecir versiones truncadas que puedan tener actividad estimulante de TLR5 residual.

Así, la presente invención se refiere ventajosamente al compuesto inmunoadyuvante que comprende:

- 30 a) un péptido del extremo N-terminal que tiene una secuencia de aminoácidos que comienza en el residuo de aminoácido localizado en la posición 1 de SEC ID N° 1 y que termina en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos localizados en las posiciones 99 a 173 de SEC ID N° 1; y
- 35 b) un péptido del extremo C-terminal que tiene una secuencia de aminoácidos que comienza en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos localizados en las posiciones 401 a 406 de SEC ID N° 1 y que termina en el residuo de aminoácido localizado en la posición 494 de SEC ID N° 1,

en el que:

- dicho péptido del extremo C-terminal está directamente ligado al péptido del extremo N-terminal, o
- 40 - dicho péptido del extremo N-terminal y el péptido del extremo C-terminal están directamente ligados, el uno con el otro, mediante una cadena espaciadora intermedia.

El compuesto de la invención puede llamarse indistintamente en la presente memoria "compuesto inmunoadyuvante" o "péptido derivado de flagelina".

Por "compuesto inmunoadyuvante" se entiende que el péptido derivado de flagelina de la invención puede inducir y/o potenciar la respuesta inmunitaria contra un antígeno cuando se administra a un sujeto o un animal.

También pretende significar una sustancia que actúa generalmente para acelerar, prolongar o potenciar la calidad de respuestas inmunitarias específicas a un antígeno específico.

Como se describen en esto, dicho compuesto inmunoadyuvante puede usarse en una vacuna o composición inmunogénica, junto con uno o más antígenos y excipientes farmacéuticamente aceptables.

La secuencia de péptidos de SEC ID N° 1 anteriormente mencionada se origina de la flagelina FliC de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* ATCC14028 (número de acceso AAL20871).

- 5 La numeración de polipéptidos empieza en el primer aminoácido después de la eventual metionina del extremo N-terminal (no mostrada en la SEC ID N° 1), que normalmente se escinde por metionina aminopeptidasa en células huésped de bacteria como se menciona más adelante.

10 Los péptidos del extremo N-terminal y extremo C-terminal del péptido derivado de flagelina de la invención tienen ventajosamente al menos el 90 %, e incluso más, de identidad de aminoácidos con la porción de secuencia de aminoácidos correspondiente de SEC ID N° 1.

Descripciones de identidad y cómo esta puede determinarse son muy conocidas para los expertos en la materia.

15 Como se prevé en la presente memoria, una secuencia de aminoácidos dada de interés posee el 90 % o más de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia cuando dichas secuencias de aminoácidos de interés poseen al menos el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 69 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 99,5 % de identidad de aminoácidos con dicha secuencia de aminoácidos de referencia.

Para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima. Por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos para alineamiento óptimo y pueden ignorarse secuencias no homólogas para fines de comparación.

20 Para fines de comparación óptima, el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos puede lograrse con CLUSTAL W (versión 1.82) con los siguientes parámetros : (1) MODO DE CPU = ClustalW mp; (2) ALINEAMIENTO = « completo » ; (3) FORMATO DE SALIDA = « aln w/números » ; (4) ORDEN DE SALIDA = « alineado » ; (5) ALINEAMIENTO DE COLOR = « no » ; (6) KTUP (tamaño de palabra) = « defecto » ; (7) LONGITUD DE VENTANA = « defecto » ; (8) TIPO DE PUNTUACIÓN = « porcentaje » ; (9) TOPDIAG = « defecto » ; (10) HUECO DEL PAR = « defecto » ; (11) ÁRBOL FILOGENÉTICO/TIPO DE ÁRBOL = « ninguno » ; (12) MATRIZ = « defecto » ; (13) ABERTURA POR HUECO = « defecto » ; (14) HUECOS TERMINALES = « defecto » ; (15) EXTENSIÓN POR HUECO = « defecto » ; (16) DISTANCIAS ENTRE HUECOS = « defecto » ; (17) TIPO DE ÁRBOL = « cladograma » y(18) DISTANCIAS ENTRE HUECOS DEL ÁRBOL = « ocultar ».

30 En particular, se entiende que pueden hacerse modificaciones menores sin destruir las ventajas y actividad del péptido derivado de flagelina de la invención.

Tales modificaciones están incluidas dentro del significado de los términos “compuesto inmunoadyuvante” o “péptido derivado de flagelina” de la invención, mientras que se preserve la actividad inmune particular, en particular las propiedades de adyuvante mucoso mediado por TLR5 sin ningún efecto pro-inflamatorio sistémico significativo secundario.

35 Además, diversas moléculas pueden unirse, covalentemente o no covalentemente, al péptido derivado de flagelina de la invención, que incluye, por ejemplo, otros polipéptidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos o lípidos.

Estas moléculas unidas consisten eventualmente en el antígeno contra el que se busca la respuesta inmunitaria. Tales modificaciones están incluidas dentro de la definición de la invención.

40 Modificaciones menores también pueden referirse, por ejemplo, a sustituciones conservativas de aminoácidos naturales y además de alteraciones estructurales que incorporan aminoácidos que no se producen naturalmente, análogos de aminoácidos y miméticos funcionales. Por ejemplo, un residuo de aminoácido lisina se considera que es una sustitución conservativa para el residuo de aminoácido arginina.

45 Así, como se ha previsto en la presente memoria, un primer polipéptido que tiene al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con un segundo polipéptido de referencia engloba primeros polipéptidos que comprenden una o más diferencias de aminoácidos con respecto al segundo polipéptido de referencia y en el que dichas diferencias de aminoácidos están seleccionadas del grupo que consiste en (i) una o más sustituciones de aminoácidos, (ii) una o más supresiones de aminoácidos y (iii) una o más adiciones de aminoácidos, o cualquier combinación de (i), (ii) y (iii).

50 Generalmente, así, la invención engloba polipéptidos de variante que tienen una o más sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos, con respecto a un polipéptido de referencia, preferentemente 1, 2, ,3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 sustituciones de aminoácidos, y/o 1, 2, ,3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2, ,3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 adiciones de aminoácidos con respecto al polipéptido de referencia.

Los expertos en la materia saben o pueden determinar qué estructura constituye análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos funcionalmente equivalentes.

5 Como se ha mencionado anteriormente, los péptidos del extremo C-terminal y del extremo N-terminal de péptido derivado de flagelina de la invención pueden estar directamente ligados, ventajosamente covalentemente, por un enlace peptídico.

En una realización alternativa, dichos péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal del péptido derivado de flagelina de la invención están directamente ligados, el uno con el otro, mediante una cadena espaciadora.

La cadena espaciadora debe elegirse de manera que no interfiera con la actividad biológica del compuesto final y también de manera que la inmunogenicidad del compuesto final no aumente significativamente.

10 La cadena espaciadora está preferentemente constituida de aminoácidos ligados juntos por enlaces peptídicos, y ligados covalentemente entre las secuencias del extremo N-terminal y del extremo C-terminal del péptido derivado de flagelina de la invención. Así, en realizaciones preferidas, la cadena espaciadora consiste en de 1 a 20 aminoácidos ligados por enlaces peptídicos, en la que los aminoácidos están seleccionados de los 20 aminoácidos naturales. En una realización más preferida, los 1 a 20 aminoácidos están seleccionados de Gly, Ala, Pro, Asn, Gln, Cys, Lys. Incluso
15 más preferentemente, la cadena espaciadora está constituida por la secuencia NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH.

También son posibles ligadores de no péptido: por ejemplo, ligadores de alquilo. Estos ligadores de alquilo pueden estar adicionalmente sustituidos con cualquier grupo de impedimento no estérico, acilo inferior, halógeno, CN, NH₂, fenilo, etc. Otro tipo de ligador de no péptido es un grupo polietilenglicol.

20 El experto en la materia conoce bien estas cadenas espaciadoras, y puede elegir la cadena espaciadora adecuada, en particular dependiendo de las secuencias de péptidos del extremo N-terminal y de péptidos del extremo C-terminal que tiene que enlazar entre sí.

Además, el residuo de aminoácido asparagina de la secuencia del extremo C, localizado en la posición de aminoácido 488 de SEC ID N° 1, se sustituye ventajosamente con un residuo de serina.

25 Esta sustitución se ha introducido para marcar específicamente péptido derivado de flagelina de la invención. Tal sustitución se produce naturalmente en flagelinas de otras especies bacterianas como *Legionella pneumophila*, sin alterar la actividad estimulante de TLR5. Otras sustituciones pueden introducirse en posiciones que no alteran la actividad estimulante de TLR5 del adyuvante para marcar adicionalmente el péptido derivado de flagelina de la invención.

Realizaciones preferidas del péptido derivado de flagelina de la invención

30 Según realizaciones preferidas, en vista de la secuencia de péptidos de flagelina SEC ID N° 1 y de la estructura cristalográfica, el péptido del extremo N-terminal del compuesto inmunoadyuvante de la invención se selecciona ventajosamente del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos 1-99, 1-137, 1-160 y 1-173 de SEC ID N° 1.

35 En particular, la estructura 3D de flagelina FliC muestra que el dominio del extremo N-terminal está organizado en 3 hélices alfa separadas por giros beta, seguido de hojas beta y giros beta. La(s) parte(s) de retención de estas estructuras secundarias en el extremo N-terminal puede(n) ser suficientes para retener la actividad estimulante de TLR5 (y en particular actividad estimulante de TLR5 mucosa), es decir, las secuencias de aminoácidos 1-99 de SEC ID N° 1 contienen las 2 primeras hélices alfa, las secuencias de aminoácidos 1-137 de SEC ID N° 1 contienen las 3 primeras hélices alfa y las secuencias de aminoácidos 1-173 de SEC ID N° 1 contienen las estructuras del extremo N-terminal encontradas en la flagelina FliC_{Δ174-400}.

40 En otras realizaciones preferidas, dicho péptido del extremo C-terminal del compuesto inmunoadyuvante está seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos 401-494 y 406-494 de SEC ID N° 1.

45 En particular, la estructura 3D de flagelina FliC muestra que el dominio del extremo C-terminal está organizado en 2 hélices alfa separadas por giros beta. La(s) parte(s) de retención de estas estructuras secundarias en el extremo N-terminal puede(n) ser suficientes para retener la actividad estimulante de TLR5 (y en particular actividad estimulante de TLR5 mucosa): las secuencias de aminoácidos 401-494 de SEC ID N° 1 es la secuencia encontrada en flagelina FliC_{Δ174-400} mientras que las secuencias de aminoácidos 406-494 de SEC ID N° 1 contienen solo las dos hélices alfa secundarias del extremo C.

50 En ciertas realizaciones preferidas, el péptido del extremo N-terminal del compuesto inmunoadyuvante de la invención consiste en la secuencia de aminoácidos que comienza en el residuo de alanina localizado en la posición 1 de SEC ID N° 1 y termina en un residuo de aminoácido localizado en una posición de SEC ID N° 1 seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos localizados en las posiciones 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145,

146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172 y 173

5 En ciertas realizaciones preferidas, el péptido del extremo C-terminal del compuesto inmunoadyuvante de la invención consiste en la secuencia de aminoácidos que comienza en un residuo de aminoácido localizado en una posición de SEC ID N° 1 seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos localizados en las posiciones 401, 402, 403, 404, 405 y 406, y termina en el residuo de arginina localizado en la posición 494 de SEC ID N° 1.

10 En un aspecto específico de estas realizaciones preferidas, dicho péptido del extremo N-terminal y dicho péptido del extremo C-terminal del compuesto inmunoadyuvante de la invención están ventajosamente ligados, el uno con el otro, mediante la cadena espaciadora NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH anteriormente mencionada (es decir, en sustitución de la secuencia 174-400 suprimida); el residuo de aminoácido asparagina localizado en la posición 488 de SEC ID N° 1 también está ventajosamente sustituido con un residuo de serina.

Realizaciones ilustrativas de tales compuestos inmunoadyuvantes descritos anteriormente engloban FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405} y FliC_{Δ138-405} que se muestran en los ejemplos en la presente memoria; y que también se describen en más detalle más adelante.

15 En otra realización más, dichos péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal del compuesto inmunoadyuvante de interés consisten en las secuencias de aminoácidos 1-173 y 401-494 de SEC ID N° 1, respectivamente.

20 En otra realización más, dichos péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal del compuesto inmunoadyuvante de interés consisten en las secuencias de aminoácidos 1-160 y 406-494 de SEC ID N° 1, respectivamente.

En otra realización más, dichos péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal del compuesto inmunoadyuvante de interés consisten en las secuencias de aminoácidos 1-137 y 406-494 de SEC ID N° 1, respectivamente.

25 En algunas realizaciones, los compuestos inmunoadyuvantes según la invención comprenden un residuo de metionina adicional en su extremo N, especialmente cuando estos compuestos se producen como proteínas recombinantes en células bacterianas.

30 En la realización en la que dichos péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal del compuesto inmunoadyuvante de interés consisten en las secuencias de aminoácidos 1-173 y 401-494 de SEC ID N° 1, el péptido derivado de flagelina de la invención consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1, suprimida de la secuencia de aminoácidos que se extiende de la posición de aminoácido 174 a la posición de aminoácido 400. La secuencia de péptidos de flagelina de la invención también se llama en la presente descripción "FliC_{Δ174-400}" o "flagelina FliC_{Δ174-400}".

35 Según una realización preferida, dicho péptido del extremo N-terminal y dicho péptido del extremo C-terminal del compuesto inmunoadyuvante de la invención están ventajosamente ligados, el uno con el otro, mediante la cadena espaciadora NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH anteriormente mencionada (es decir, en sustitución de la secuencia 174-400 suprimida); el residuo de aminoácido asparagina localizado en la posición 488 de SEC ID N° 1 también está ventajosamente sustituido con un residuo de serina.

El péptido derivado de flagelina de la invención así obtenido es una secuencia de 271 aminoácidos, de la que la secuencia de péptidos consiste en SEC ID N° 2.

40 La numeración de polipéptidos empieza en el primer aminoácido después de la eventual metionina del extremo N-terminal (no mostrada en SEC ID N° 2), que normalmente se escinde por metionina aminopeptidasa en células huésped de bacteria como se desvela más adelante.

45 En la realización en la que dichos péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal del compuesto inmunoadyuvante de interés consisten en las secuencias de aminoácidos 1-160 y 406-494 de SEC ID N° 1, el péptido derivado de flagelina de la invención consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1, suprimida de la secuencia de aminoácidos que se extiende de la posición de aminoácido 161 a la posición de aminoácido 405. La secuencia de péptidos de flagelina de la invención también se llama en la presente descripción "FliC_{Δ161-405}" o "flagelina FliC_{Δ161-405}".

50 Según una realización preferida, dicho péptido del extremo N-terminal y dicho péptido del extremo C-terminal del compuesto inmunoadyuvante de la invención están ventajosamente ligados, el uno con el otro, mediante la cadena espaciadora NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH anteriormente mencionada (es decir, en sustitución de la secuencia 161-405 suprimida); el residuo de aminoácido asparagina localizado en la posición 488 de SEC ID N° 1 también está ventajosamente sustituido con un residuo de serina.

El péptido derivado de flagelina de la invención así obtenido es una secuencia de 253 aminoácidos, de la que la secuencia de péptidos consiste en SEC ID N° 25.

La numeración de polipéptidos empieza en el primer aminoácido después de la eventual metionina del extremo N-terminal (no mostrada en SEC ID N° 25), que normalmente se escinde por metionina aminopeptidasa en células huésped de bacteria como se desvela más adelante.

En la realización en la que dichos péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal del compuesto inmunoadyuvante de interés consisten en las secuencias de aminoácidos 1-137 y 406-494 de SEC ID N° 1, el péptido derivado de flagelina de la invención consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1, suprimida de la secuencia de aminoácidos que se extiende de la posición de aminoácido 138 a la posición de aminoácido 405. La secuencia de péptidos de flagelina de la invención también se llama en la presente descripción "FliC_{Δ138-405}" o "flagelina FliC_{Δ138-405}".

Según una realización preferida, dicho péptido del extremo N-terminal y dicho péptido del extremo C-terminal del compuesto inmunoadyuvante de la invención están ventajosamente ligados, el uno con el otro, mediante la cadena espaciadora NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH anteriormente mencionada (es decir, en sustitución de la secuencia 138-405 suprimida); el residuo de aminoácido asparagina localizado en la posición 488 de SEC ID N° 1 también está ventajosamente sustituido con un residuo de serina.

El péptido derivado de flagelina de la invención así obtenido es una secuencia de 230 aminoácidos, de la que la secuencia de péptidos consiste en SEC ID N° 26.

La numeración de polipéptidos empieza en el primer aminoácido después de la eventual metionina del extremo N-terminal (no mostrada en SEC ID N° 26), que normalmente se escinde por metionina aminopeptidasa en células huésped de bacteria como se desvela más adelante.

En la realización en la que dichos péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal del compuesto inmunoadyuvante de interés consisten en las secuencias de aminoácidos 1-99 y 406-494 de SEC ID N° 1, el péptido derivado de flagelina de la invención consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1, suprimida de la secuencia de aminoácidos que se extiende de la posición de aminoácido 100 a la posición de aminoácido 405. La secuencia de péptidos de flagelina de la invención también se llama en la presente descripción "FliC_{Δ100-405}" o "flagelina FliC_{Δ100-405}".

Según una realización preferida, dicho péptido del extremo N-terminal y dicho péptido del extremo C-terminal del compuesto inmunoadyuvante de la invención están ventajosamente ligados, el uno con el otro, mediante la cadena espaciadora NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH anteriormente mencionada (es decir, en sustitución de la secuencia 100-405 suprimida); el residuo de aminoácido asparagina localizado en la posición 488 de SEC ID N° 1 también está ventajosamente sustituido con un residuo de serina.

El péptido derivado de flagelina de la invención así obtenido es una secuencia de 192 aminoácidos, de la que la secuencia de péptidos consiste en SEC ID N° 27.

La numeración de polipéptidos empieza en el primer aminoácido después de la eventual metionina del extremo N-terminal (no mostrada en SEC ID N° 27), que normalmente se escinde por metionina aminopeptidasa en células huésped de bacteria como se desvela más adelante.

Síntesis del péptido inmunoadyuvante de la invención

El péptido derivado de flagelina de la invención puede sintetizarse por células recombinantes obtenidas por ingeniería genética, o por uno cualquiera de los procedimientos para síntesis química o enzimática de péptidos, que son muy conocidos por un experto en la materia.

1. Síntesis por células recombinantes

El péptido derivado de flagelina según la invención puede producirse recombinantemente por células recombinantes que se han transfectado con un ácido nucleico que codifica su secuencia de aminoácidos y permite su eficaz producción dentro de las células transfectadas.

Secuencia de ácidos nucleicos que codifica péptido derivado de flagelina de la invención

Las modificaciones de dicha secuencia de péptidos de flagelina pueden generarse usando técnicas de mutagénesis de ADN recombinante.

Numerosos procedimientos para construir y modificar la secuencia de ADN son conocidos para los expertos en la materia, y la elección de dichos procedimientos recombinantes será conocida por los expertos en la materia.

Las técnicas de "mutagénesis recombinante" comprenden, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis por

PCR (véase en particular Current Protocols in Molecular Biology, 2007 por John Wiley and Sons, Inc., Capítulo 8 y 15).

Dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es particularmente útil para una amplia variedad de procedimientos y aplicaciones de mutación. Los procedimientos de mutagénesis por PCR han hecho posible modificar y manipular fácilmente y eficazmente cualquier ADN diana. Esto incluye la introducción de, por ejemplo, mutaciones puntuales, supresiones o inserciones.

Estas técnicas se implementan, por ejemplo, en el gen *fliC* natural de SEC ID N° 3, aislado de las cepas de *S. typhimurium* ATCC14028 que codifican el péptido de flagelina identificado por SEC ID N° 1.

En una realización preferida, el gen *fliC* anteriormente mencionado se suprime por la porción central de su longitud por mutagénesis por PCR (véase en particular Current Protocols in Molecular Biology, 2007 por John Wiley and Sons, Inc., Capítulo 8 y 15) usando pares de cebadores adecuados elegidos en función de las secuencias del extremo N-terminal y del extremo C-terminal deseadas buscadas para el péptido de la invención.

Por ejemplo, basándose en un plásmido derivado de pBR322 que aloja dicho gen *fliC* natural de SEC ID N° 3, bajo el control de su propio promotor, los siguientes pares de cebadores pueden usarse en la técnica de mutagénesis por PCR:

- 15 - SEC ID N° 4 y SEC ID N° 5, para péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal que consisten en las secuencias de aminoácidos 1-99 y 401-494 de SEC ID N° 1, respectivamente;
- SEC ID N° 4 y SEC ID N° 6, para péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal que consisten en las secuencias de aminoácidos 1-99 y 406-494 de SEC ID N° 1, respectivamente;
- 20 - SEC ID N° 7 y SEC ID N° 5, para péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal que consisten en las secuencias de aminoácidos 1-137 y 401-494 de SEC ID N° 1, respectivamente;
- SEC ID N° 7 y SEC ID N° 6, para péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal que consisten en las secuencias de aminoácidos 1-137 y 406-494 de SEC ID N° 1, respectivamente;
- SEC ID N° 8 y SEC ID N° 5, para péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal que consisten en las secuencias de aminoácidos 1-160 y 401-494 de SEC ID N° 1, respectivamente;
- 25 - SEC ID N° 8 y SEC ID N° 6, para péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal que consisten en las secuencias de aminoácidos 1-160 y 406-494 de SEC ID N° 1, respectivamente;
- SEC ID N° 9 y SEC ID N° 5, para péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal que consisten en las secuencias de aminoácidos 1-173 y 401-494 de SEC ID N° 1, respectivamente;
- 30 - SEC ID N° 9 y SEC ID N° 6, para péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal que consisten en las secuencias de aminoácidos 1-173 y 406-494 de SEC ID N° 1, respectivamente.

Para cambiar la asparagina de la posición 488 de SEC ID N° 1 a una serina, por ejemplo, puede usarse mutagénesis dirigida al sitio con los siguientes cebadores SEC ID N° 10 y SEC ID N° 11.

Para introducir el ligador NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH en la unión 1-99, 1-137, 1-160 ó 1-173 con 401-494 ó 406-494 de los péptidos recombinantes de flagelina, la siguiente secuencia de ADN GGTGCAGCTGGA puede añadirse al extremo 5' de las secuencias de cebadores SEC ID N° 5 y SEC ID N° 6, dando lugar a cebadores llamados, respectivamente, "F-ligador-401" de secuencia SEC ID N° 12 y "F-ligador-406" de secuencia SEC ID N° 13.

La secuencia de ADN adecuada para producir el péptido derivado de flagelina de la invención FliC_{Δ174-400} es, por ejemplo, de secuencia SEC ID 14.

Un ácido nucleico adecuado para producir el péptido derivado de flagelina de la invención FliC_{Δ161-405} es, por ejemplo, de secuencia SEC ID 28.

Un ácido nucleico adecuado para producir el péptido derivado de flagelina de la invención FliC_{Δ138-405} es, por ejemplo, de secuencia SEC ID 29.

Un ácido nucleico adecuado para producir el péptido derivado de flagelina de la invención FliC_{Δ100-405} es, por ejemplo, de secuencia SEC ID 30.

45 Selección y uso de un vector replicable

La secuencia de ácidos nucleicos desvelada en la presente memoria, que codifica el péptido derivado de flagelina de

interés, puede insertarse en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión.

Diversos vectores están públicamente disponibles. El vector puede, por ejemplo, estar en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio(s) de endonucleasa de restricción apropiado(s) usando técnicas conocidas en la técnica.

Los componentes de vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de una secuencia señal si la secuencia va a secretarse, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligación convencionales que son conocidas para el experto.

El péptido derivado de flagelina de interés puede producirse recombinantemente no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína madura o péptido. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el polipéptido de interés que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procarionota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o líderes de enterotoxina II estables al calor. Para la secreción de levadura, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, el líder de factor alfa (incluyendo líderes de factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, el último descrito en la patente de EE.UU. nº 5.010.182), o el líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179 publicado del 4 de abril de 1990), o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión en células de mamífero, las secuencias señal de mamífero pueden usarse para dirigir la secreción de la proteína, tal como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o de especies relacionadas, además de líderes secretores virales.

Tanto los vectores de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Tales secuencias son muy conocidas para una variedad de bacterias, levadura y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen de plásmido 2.mu. es adecuado para levadura, y diversos orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero.

Los vectores de expresión y de clonación normalmente contendrán un gen de selección, también llamado un marcador de selección. Genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para bacilos.

Un ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para capturar el ácido nucleico que codifica el péptido derivado de flagelina de interés tal como DHFR o timidina cinasa. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR natural es la línea celular CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada como se describe por Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su uso en levadura es el gen trp 1 presente en el plásmido de levadura YRp7. Stinchcomb y col., Nature, 282: 39 (1979); Kingsman y col., Gene, 7: 141 (1979); Tschemper y col., Gene, 10: 157 (1980). El gen trp1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de cultivarse en triptófano, por ejemplo, ATCC nº 44076 o PEP4-1. Jones, Genetics, 85: 12 (1977).

Los vectores de expresión y de clonación normalmente contienen un promotor operativamente ligado a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido derivado de flagelina para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por una variedad de posibles células huésped son muy conocidos. Los promotores adecuados para uso con huéspedes procarionotas incluyen los sistemas promotores de beta-lactamasa y lactosa (Chang y col., Nature, 275:615 (1978); Goeddel y col., Nature, 281:544 (1979)), fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (trp) (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); documento EP 36.776) y promotores híbridos tales como el promotor tac (deBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)). Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente ligada al ADN que codifica el péptido derivado de flagelina de interés.

Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato cinasa (Hitzeman y col., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)) u otras enzimas glucolíticas (Hess y col., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)) tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato

mutasa, piruvato cinasa, trisfosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

Otros promotores de levadura que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por condiciones de crecimiento son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas al metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levadura se describen adicionalmente en el documento EP 73.657.

La transcripción de ácidos nucleicos de interés a partir de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus simio 40 (SV40); por promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina; y por promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

La transcripción de un ADN que codifica el péptido derivado de flagelina de interés por eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, normalmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína, e insulina). Sin embargo, normalmente se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia que codifica los polipéptidos de interés, pero preferentemente está localizado en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (células de levadura, de hongo, de insecto, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles a partir de regiones sin traducir en 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc de eucariota o vírico. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción sin traducir del ARNm que codifica el péptido derivado de flagelina de interés.

Todavía otros procedimientos, vectores y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis del péptido derivado de flagelina de interés en cultivo de células de vertebrados recombinantes se describen en Gething y col., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei y col., Nature, 281:40-46 (1979); documentos EP 117.060; y EP 117.058.

Selección y transformación de células huésped

Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o de clonación descritos en la presente memoria para la producción de péptidos derivados de flagelina y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las condiciones de cultivo, tales como medio, temperatura, pH y similares, pueden ser seleccionadas por el experto sin experimentación adicional. En general, el principio, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares pueden encontrarse en Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).

Los procedimientos de transfección son conocidos para el experto habitual en la técnica, por ejemplo, tratamiento con CaPO_4 y electroporación. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas habituales apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en Sambrook y col., arriba, o la electroporación se usan generalmente para procariontes u otras células que contienen barreras célula-pared sustanciales. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células vegetales como se describe por Shaw y col., Gene, 23:315 (1983) y el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para células de mamífero sin tales paredes celulares puede emplearse el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978). Los aspectos generales de las transformaciones del sistema huésped de células de mamífero se han descrito en la patente de EE.UU. nº 4.399.216. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo normalmente según el procedimiento de Van Solingen y col., J. Bact., 130:946 (1977) y Hsiao y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). Sin embargo, también pueden usarse otros procedimientos para introducir ADN en células tales como por microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policones, por ejemplo, polibreno o poliornitina. Para diversas técnicas para transformar células de mamífero véanse Keown y col., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) y Mansour y col., Nature, 336:348-352 (1988).

Células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en la presente memoria incluyen células procariotas, de levadura o eucariotas superiores

Procariotas adecuados incluyen, pero no se limitan a, eubacterias tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *E. coli*. Diversas cepas de *E. coli* están públicamente disponibles tales como la cepa MM294 de *E. coli* K12 (ATCC 31,446); X1776 de *E. coli* (ATCC 31,537); cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27,325); y K5772 (ATCC 53,635). Otras células huésped procariotas adecuadas incluyen Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, además de bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, 41P de *B. licheniformis* desvelada en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en vez de limitantes.

La cepa SIN41 de *Salmonella typhimurium* (*fliC fljB*) es particularmente interesante para la producción de péptido derivado de flagelina, ya que estas células huésped procariotas no secretan ninguna flagelina (Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:13722-7). Sin embargo, las flagelinas son secretadas mediante un sistema de secreción especializado: el llamado "sistema de secreción tipo III". De forma interesante, la cepa SIN41 produce todos los componentes del sistema de secreción tipo III requeridos para la óptima secreción de flagelina. La secuencia de clonación que codifica los nuevos péptidos de flagelina bajo el promotor *fliC* permite la secreción en grandes cantidades de los péptidos derivados de flagelina de interés en la cepa SIN41.

La cepa W3110 también es interesante debido a que es una cepa huésped común para fermentaciones de producto de ADN recombinante. Preferentemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para efectuar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas para el huésped, incluyendo ejemplos de tales huéspedes cepa 1A2 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo tonA; cepa 9E4 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo tonA ptr3; cepa 27C7 de *E. coli* W3110 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan.sup.r; cepa 37D6 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo tona ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan.sup.r; cepa 40B4 de *E. coli* W3110, que es la cepa 37D6 con una mutación de supresión degP no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante desvelada en la patente de EE.UU. nº 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Las cepas de *E. coli* MG1655, MG1655 Δ *fimA-H* o MKS12, una cepa MG1655 de *fliD*- y *-fimA-H* suprimidos, también son candidatos interesantes para la producción de flagelinas recombinantes como proteínas secretadas (Nat Biotechnol. 2005; (4):475-81). Alternativamente, son adecuados procedimientos *in vitro* de clonación, por ejemplo, PCR u otras reacciones de polimerasa de ácido nucleico.

Además de microbios procariotas, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican el péptido derivado de flagelina.

Saccharomyces cerevisiae es un microorganismo huésped eucariota inferior comúnmente usado. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; documento EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1985); huéspedes de *Kluyveromyces* (patente de EE.UU. nº 4.943.529; Fler y col., Bio/Technology, 9: 968-975 (1991)) tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt y col., J. Bacteriol., 737 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilaram* (ATCC 36.906; Van den Berg y col., Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070; Sreekrishna y col., J. Basic Microbiol., 28: 265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538 publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991), y huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]; Tilbum y col., Gene, 26: 205-221 [1983]; Yelton y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985]). Las levaduras metilótropicas son adecuadas en la presente memoria e incluyen, pero no se limitan a, levadura que puede crecer sobre metanol seleccionada de los géneros que consisten en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son a modo de ejemplo de esta clase de levaduras puede encontrarse en C. Anthony, The Biochemistry of Methyloproths, 269 (1982).

Células huésped adecuadas para la expresión de ácido nucleico que codifica péptido derivado de flagelina de interés se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células invertebradas incluyen células de insecto tales como S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera*, además de células vegetales. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y COS. Ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen. Virol., 36: 59 (1977)); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de Sertoli

de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). La selección de la célula huésped apropiada se considera que está dentro de la experiencia en la materia.

Procedimientos generales para la purificación del péptido derivado de flagelina de interés

- 5 Formas de péptido derivado de flagelina de interés pueden recuperarse a partir de medio de cultivo o de lisados de células huésped.

Si está unido a membrana, puede liberarse de la membrana usando una disolución de detergente adecuada (por ejemplo, TRITON-X.TM. 100) o por escisión enzimática.

- 10 Células empleadas en la expresión de ácido nucleico que codifica el péptido derivado de flagelina de interés pueden romperse por diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica o agentes de lisado de células.

- 15 Puede desearse purificar el polipéptido de interés a partir de las proteínas o polipéptidos de la célula recombinante. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A-Sepharose para eliminar contaminantes tales como IgG; y columnas quelantes de metales para unir formas marcadas con epítopes del péptido derivado de flagelina de interés.

- 20 Pueden emplearse diversos procedimientos de purificación de proteínas y tales procedimientos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (Springer-Verlag, Nueva York, 1982). La(s) etapa(s) de purificación seleccionada(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción usado y del péptido derivado de flagelina particular producido.

- 25 En una realización preferida, el péptido derivado de flagelina se purifica a partir del sobrenadante de *S. typhimurium* SIN41 recombinante (*fliC fliB*), como se desvela en los ejemplos.

- 30 En particular, se cultivaron *Salmonella* en caldo Luria-Bertani (LB) durante 6-18 horas a 37 °C con agitación. El sobrenadante se filtró y se saturó con 60 % de sulfato de amonio (Sigma Aldrich, EE.UU.). Los materiales precipitados se recuperaron por centrifugación, solubilización en Tris/HCl 20 mM a pH 7,5 y luego diálisis. Las proteínas se purificaron adicionalmente por rondas sucesivas de hidroxapatita, cromatografía de intercambio aniónico y por exclusión de tamaño (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.; GE Healthcare, Suecia). Finalmente, las proteínas se agotaron en lipopolisacárido (LPS) usando una columna de polimixina B (Pierce, EE.UU.). Usando el ensayo de Limulus (Associates of Cape Cod Inc., EE.UU.) se determinó que la concentración de LPS residual era inferior a 30 pg de LPS por µg de flagelina recombinante.

Purificación del péptido derivado de flagelina de interés por cromatografía de inmunoafinidad

- 35 En otras realizaciones, un péptido derivado de flagelina según la invención puede purificarse por separación sobre un sustrato de cromatografía de inmunoafinidad.

- 40 Dicho sustrato de cromatografía de inmunoafinidad comprende anticuerpos anti-flagelina que se han inmovilizado sobre el mismo. Por anticuerpos "anti-flagelina" está previsto en la presente memoria anticuerpos que se unen a tanto una flagelina nativa como a una flagelina suprimida en la región hipervariable, que incluye aquellas englobadas por la presente invención.

Preferentemente, los anticuerpos anti-flagelina consisten en anticuerpos monoclonales, que incluyen anticuerpos de ratón anti-flagelina.

- 45 Se ha mostrado según la invención que los anticuerpos anti-flagelina que han sido obtenidos mediante un procedimiento que comprende una etapa de inmunizar ratones con la flagelina suprimida de la región hipervariable FliC_{Δ174-400} que se desvela en cualquier parte en esta memoria descriptiva reconocen tanto flagelina nativa como una cualquiera de las flagelinas suprimidas de la región hipervariable que se desvela en la presente memoria.

Así, en ciertas realizaciones preferidas de un sustrato de cromatografía de inmunoafinidad, dicho sustrato comprende anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra FliC_{Δ174-400}.

Dicho sustrato de cromatografía de inmunoafinidad preferido puede prepararse del siguiente modo

- Se purificaron ascitis de ratón que contienen anticuerpos monoclonales anti-FliC_{Δ174-400} sobre columnas de proteína A Econo-Pac (nº 732-2022 Affi-gel; Bio-Rad).
- Los anticuerpos monoclonales anti-FliC_{Δ174-400} purificados resultantes (que también pueden llamarse "B23C5") se acoplaron covalentemente mediante grupos amino primarios a la columna de alto rendimiento Sepharose™ activada con N-hidroxisuccinimida (nº 17-0716-01 Hitrap HP activada con NHS de GE Healthcare), dando lugar a la columna de afinidad específica de flagelina. El rendimiento del acoplamiento fue del 98 %.

Como se muestra en los ejemplos en la presente memoria, la columna de afinidad específica de flagelina anterior permite una separación altamente específica de flagelina nativa, y así también de una cualquiera de las flagelinas suprimidas de la región hipervariable que se desvelan en la presente memoria, de los otros constituyentes de proteína o constituyentes de no proteína contenidos en la muestra inicial.

Un procedimiento para purificar flagelina o una cualquiera de las flagelinas suprimidas de la región hipervariable que se desvelan en la presente memoria se describe a continuación:

- Sobrenadantes que contienen flagelina de cultivo de SIN41 de *S. typhimurium* recombinante o *E. coli* se centrifugaron, se filtraron a través de una membrana de 0,22 µm, se diluyeron uno a uno con tampón de unión (Tris-HCl 75 mM a pH 8) y se aplicaron sobre la columna de afinidad específica para flagelina descrita anteriormente.
- Entonces, la columna de afinidad específica para flagelina se lavó con 15-20 VC (volúmenes de columna) de tampón de unión.
- Entonces, las proteínas se eluyeron con 3 VC de tampón de elución (glicina-HCl 100 mM, NaCl 0,5M, pH 2,7) y las fracciones se neutralizaron inmediatamente con 500 µl de Tris 1,5 M a pH8,9 para evitar la prolongada exposición a pH ácido.

Entonces, la columna se regeneró con 10 VC de tampón de unión y se guardó a 4 °C con 0,02 % de azida de sodio.

Un perfil de cromatografía típico se ilustra en la Figura 13, que representa tanto (i) la curva de absorbancia (D.O.) a 280 nm (línea con recuadros cuadrados rellenos) como (ii) la curva de electroconductividad. Los números de las flechas en la Figura 13 se corresponden con los periodos de tiempo en los que las fracciones del líquido que fluyen de la columna se han recogido sucesivamente en vista de posteriores análisis de su contenido de flagelina (véase la Figura 14 y el párrafo siguiente). Las fracciones recogidas numeradas consisten en, respectivamente:

- **nº1** - 5 µl de la muestra antes de aplicarla (3µg)=cantidad total de entrada=900µg
- **nº2** - 20 µl de la muestra aplicada después de la ejecución de la columna
- **nº3** - 20 µl del lavado de columna
- **nº4** - 20 µl del lavado de columna
- **nº 5, 6 y 7**- 20 µl de cada una de las fracciones respectivas después del tampón de elución: cantidad total = 900 µg
- **nº8** – 20 µl de la re-equilibración de la columna

La Figura 14 representa la fotografía de un ensayo de transferencia Western que se ha realizado usando las fracciones 1 a 8 referidas en la Figura 13 como el material de partida respectivo.

2. Síntesis química

En ciertas realizaciones, un péptido de la invención puede sintetizarse mediante técnicas convencionales de síntesis química de péptidos.

Por ejemplo, la secuencia de péptidos derivados de flagelina de interés puede producirse por síntesis directa de péptidos usando técnicas en fase sólida, como aquellas descritas por Stewart y col., Solid-Phase Peptide Synthesis (W.H. Freeman Co.: San Francisco, Calif., (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963); Fields GB, Noble RL; 1990; Int. J. Pept. Protein Res.; vol. 35 : 161-214).

La síntesis *in vitro* de proteínas puede realizarse usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada puede llevarse a cabo, por ejemplo, con un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, Calif.) usando instrucciones del fabricante.

Diversas porciones del péptido de interés pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el péptido de longitud completa de interés.

Composiciones que comprenden un péptido derivado de flagelina de la invención

5 Otro objetivo de la invención consiste en una composición, en particular una composición farmacéutica, que comprende un compuesto adyuvante como se define en la presente descripción, en combinación en particular con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

La presente invención también se refiere a una composición inmunogénica que comprende un compuesto inmunoadyuvante como se define en la presente memoria descriptiva, junto con uno o más antígenos.

10 Una “composición inmunogénica”, una vez se ha administrado a un sujeto o un animal, provoca una respuesta inmunitaria protectora contra dicho uno o más antígenos que está(n) comprendido(s) en la presente memoria.

La presente invención también se refiere a una composición de vacuna que comprende un compuesto inmunoadyuvante como se define en la presente memoria descriptiva, junto con uno o más antígenos.

15 Como se usa en la presente memoria, una composición de vacuna, una vez se ha administrado al sujeto o al animal, induce una respuesta inmunitaria protectora contra, por ejemplo, un microorganismo, o para proteger eficazmente al sujeto o animal contra la infección.

Una composición de vacuna es útil para prevenir o mejorar una afección patológica que responderá favorablemente a modulación de la respuesta inmunitaria.

Inmunoadyuvante

20 Como se ha mencionado anteriormente, el término “inmunoadyuvante” cuando se usa con referencia a una composición inmunogénica o vacuna pretende significar una sustancia que actúa generalmente para acelerar, prolongar o potenciar la calidad de respuestas inmunitarias específicas a un antígeno.

El inmunoadyuvante puede también reducir ventajosamente el número de inmunizaciones o la cantidad de antígeno requerida para inmunización protectora.

Antígeno

25 Pueden usarse una variedad de sustancias como antígenos en un compuesto o formulación, de tipo inmunogénico o vacuna. Por ejemplo, patógenos virales y bacterianos atenuados e inactivados, macromoléculas purificadas, polisacáridos, toxoides, antígenos recombinantes, organismos que contienen un gen extraño de un patógeno, péptidos sintéticos, poli(ácidos nucleicos), anticuerpos y células tumorales pueden usarse para preparar (i) una composición inmunogénica útil para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo o (ii) una vacuna útil para tratar una afección patológica.

Por tanto, un péptido derivado de flagelina de la invención puede combinarse con una amplia variedad de antígenos para producir una composición inmunogénica o una vacuna útil para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo.

Los expertos en la materia podrán seleccionar un antígeno apropiado para tratar una afección patológica particular y sabrán cómo determinar si un antígeno en bruto o aislado se favorece o no en una formulación de vacuna particular.

35 Los expertos en la materia también podrán determinar si es preferible o no enlazar covalentemente, o no enlazar covalentemente, el inmunoadyuvante de la invención con dicho uno o más antígenos.

Las presentes pruebas *in vivo* demostraron que la actividad adyuvante mucosa no necesita ningún enlace entre el péptido derivado de flagelina de interés y el antígeno diana, cuando se administran juntos por vía mucosa, y en particular vía intranasal.

40 Un antígeno aislado puede prepararse usando una variedad de procedimientos muy conocidos en la técnica. Un gen que codifica cualquier polipéptido inmunogénico puede aislarse y clonarse, por ejemplo, en células bacterianas, de levadura, insecto, reptil o de mamífero usando procedimientos recombinantes muy conocidos en la técnica y descritos, por ejemplo, en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1992) y en Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1998). Varios genes que codifican antígenos de superficie de patógenos virales, bacterianos y protozoicos se han clonado, expresado y usado satisfactoriamente como antígenos para el desarrollo de vacunas. Por ejemplo, el principal antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, HbsAg, la subunidad P de la toxina del cólera, la enterotoxina de *E. coli*, la proteína del circunsporozoito del parásito de la malaria y un antígeno de membrana de la glucoproteína del virus de Epstein-Barr, además de antígenos de células tumorales, se han expresado en diversos sistemas de vector/huésped

muy conocidos, purificado y usado en vacunas.

Un péptido derivado de flagelina de la invención induce una respuesta inmunitaria innata mediante el sistema mucoso mediado por TLR5 que puede potenciar beneficiosamente una respuesta inmunitaria a un antígeno recombinante.

5 Una célula patológicamente anómala que va a usarse en una vacuna puede obtenerse de cualquier fuente tal como uno o más individuos que tienen una afección patológica o células cultivadas *ex vivo* o *in vitro* obtenidas de uno o más de tales individuos, que incluyen un individuo específico que va a tratarse con la vacuna resultante.

Moléculas inmunomoduladoras

10 También puede usarse una variedad de moléculas inmunomoduladoras en combinación con el péptido derivado de flagelina de la invención, para alterar una respuesta inmunitaria en un individuo. El tipo de alteración deseada determinará el tipo de molécula inmunomoduladora seleccionada para combinarse con dicho péptido derivado de flagelina de la invención.

15 Por ejemplo, para potenciar la respuesta inmunitaria innata, el péptido derivado de flagelina de la invención puede combinarse con otra molécula inmunomoduladora que promueve una respuesta inmunitaria innata, tal como otro PAMP o región conservada conocida o que se sospecha que induce una respuesta inmunitaria innata. Se conocen una variedad de PAMP que estimulan las actividades de diferentes miembros de la familia de receptores similares a toll.

Tales PAMP pueden combinarse para estimular una combinación particular de receptores similares a toll que inducen un perfil de citocinas beneficioso. Por ejemplo, pueden combinarse PAMP para estimular un perfil de citocinas que induce una respuesta inmunitaria de Th1 o Th2.

20 Otros tipos de moléculas inmunomoduladoras que promueven respuestas inmunitarias humorales o mediadas por células pueden combinarse con un péptido derivado de flagelina de la invención. Por ejemplo, pueden administrarse citocinas para alterar el equilibrio de respuestas inmunitarias de Th1 y Th2. Los expertos en la materia sabrán cómo determinar las citocinas apropiadas útiles para obtener una alteración beneficiosa en la respuesta inmunitaria para una afección patológica particular.

Administración del péptido derivado de flagelina de la invención

25 El péptido derivado de flagelina de la invención se administrará en "cantidad inmunogénica" con una o más moléculas, que pretende significar una cantidad, tal como un antígeno u otra molécula inmunomoduladora, requerida para desencadenar una respuesta inmunitaria.

30 La dosificación del péptido derivado de flagelina de la invención, independientemente o en combinación con una o más moléculas, dependerá, por ejemplo, de la afección patológica que va a tratarse, el peso y condición del individuo y terapias previas o concurrentes. La cantidad apropiada considerada que es una dosis inmunogénica para una aplicación particular del procedimiento puede determinarse por los expertos en la materia. Los expertos en la materia entenderán que la afección del paciente necesita monitorizarse durante el transcurso de la terapia y que la cantidad de la composición que se administra puede ajustarse según la respuesta del paciente a la terapia.

35 Como inmunoadyuvante de vacuna, los péptidos derivados de flagelina de la invención pueden contribuir a la eficacia de la vacuna, por ejemplo, potenciando la inmunogenicidad de antígenos más débiles tales como antígenos altamente purificados o recombinantes, reduciendo la cantidad de antígeno requerida para una respuesta inmunitaria, reduciendo la frecuencia de inmunización requerida para proporcionar inmunidad protectora, mejorar la eficacia de vacunas en individuos con respuestas inmunitarias reducidas o debilitadas, tales como recién nacidos, los individuos ancianos e inmunodeprimidos, y potenciar la inmunidad en un tejido diana, tal como inmunidad mucosa, o promover la inmunidad mediada por células o humoral provocando un perfil de citocinas particular.

El péptido derivado de flagelina de la invención induce una respuesta inmunitaria innata mediante la activación del sistema de TLR5, en particular aquí la respuesta mucosa mediada por TLR5 cuando se administra por vía mucosa.

En particular, las pruebas *in vivo* muestran que el péptido derivado de flagelina de la invención presenta actividad adyuvante mucosa, que puede potenciar las respuestas sistémicas y mucosas contra un antígeno diana.

45 La respuesta inmunitaria innata aumenta la respuesta inmunitaria a un antígeno estimulando la respuesta inmunitaria adaptativa. Por tanto, una combinación del péptido derivado de flagelina de la invención, con uno o más antígenos, proporciona una composición inmunogénica eficaz o vacuna para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo.

50 Una combinación de un antígeno y/o molécula inmunomoduladora, con un péptido derivado de flagelina de la invención, puede probarse en una variedad de estudios toxicológicos y de seguridad preclínicos muy conocidos en la técnica.

Por ejemplo, una combinación tal puede evaluarse en un modelo animal en el que el antígeno se ha encontrado que es inmunogénico y que puede inmunizarse reproduciblemente por la misma vía propuesta para prueba clínica humana.

5 Una combinación de un antígeno y/o molécula inmunomoduladora, con un péptido derivado de flagelina de la invención, puede probarse, por ejemplo, por un enfoque expuesto por el Centro para Evaluación e Investigación Biológica/Agencia Estadounidense del Medicamento e Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (Goldenthal, KL y col. AID Res Hum Retroviruses, 9: S45-9 (1993)).

10 Los expertos en la materia sabrán cómo determinar para una combinación particular de antígeno y/o molécula inmunomoduladora, con péptido derivado de flagelina de la invención, la carga de antígeno apropiada, vía de inmunización, volumen de dosis, pureza de antígeno y pauta de vacunación útil para tratar una afección patológica particular en una especie animal particular.

Una composición inmunogénica o una vacuna de la invención, para inducir una respuesta inmunitaria, puede administrarse como una disolución o suspensión junto con un medio farmacéuticamente aceptable.

15 Un medio farmacéuticamente aceptable tal puede ser, por ejemplo, agua, solución salina tamponada con fosfato, solución salina normal u otra solución salina fisiológicamente tamponada, u otro disolvente o vehículo tal como glicol, glicerol y aceite tal como aceite de oliva o cualquier éster orgánico inyectable. Un medio farmacéuticamente aceptable también puede contener liposomas o micelas, y puede contener complejos inmunoestimulantes preparados mezclando antígenos de polipéptido o péptido con detergente y un glucósido, tal como Quil A.

20 Otros procedimientos para preparar y administrar un péptido derivado de flagelina de la invención en un medio farmacéuticamente aceptable se presentan más adelante, en referencia a compuestos que inducen una respuesta mucosa mediada por TLR5.

La composición inmunogénica o vacuna de la invención puede administrarse mediante una variedad de vías para estimular una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, estas moléculas inmunomoduladoras pueden administrarse subcutánea, intradérmica, intralinfática, intramuscular, intratumoral, intravesical, intraperitoneal e intracerebralmente.

25 Los expertos en la materia sabrán cómo seleccionar vías de administración apropiadas para formulaciones particulares de péptidos derivados de flagelina de la invención.

En una realización preferida de la invención, los procedimientos de vacunación para tratar o prevenir infección en un mamífero comprenden uso de la vacuna de la invención que va a administrarse por particularmente una superficie mucosa (por ejemplo, ocular, intranasal, oral, gástrica, pulmonar, intestinal, rectal, vaginal o vías urinarias).

30 Las vías de administración nasal pueden ser útiles para inducir tanto respuestas inmunitarias mucosas como sistémicas. Una variedad de dispositivos son posibles para la administración conveniente y eficaz de formulaciones a la fosa nasal y tejidos pulmonares.

La vía de administración nasal puede ser particularmente interesante aquí ya que el péptido derivado de flagelina de la invención muestra una actividad adyuvante significativa en el compartimento mucoso, sin que tenga ningún efecto secundario pro-inflamatorio sistémico significativo.

35 En un protocolo de vacunación, la vacuna puede administrarse ventajosamente por la vía mucosa, como una única dosis o preferentemente, varias veces, por ejemplo, dos veces, tres o cuatro veces a la semana o intervalos mensuales, según un modo de sensibilización/refuerzo. La dosificación apropiada depende de diversos parámetros.

40 El protocolo de vacunación puede ser un protocolo mucoso estricto o un protocolo mixto en el que la dosis de sensibilización de la vacuna se administra por la mucosa, por ejemplo, vía intranasal y la(s) dosis de refuerzo se administra(n) parenteralmente o viceversa.

Formulación

Los procedimientos de preparación de formulaciones farmacéuticas o composiciones incluyen la etapa de poner el (los) principio(s) activo(s) en asociación con el vehículo y, opcionalmente, uno o más componentes accesorios.

45 En general, las formulaciones se preparan poniendo uniforme e íntimamente el (los) principio(s) activo(s) en asociación con vehículos líquidos, o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si fuera necesario, moldeando el producto.

Formas de dosificación líquidas para administración por vía oral de los principios activos incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del (de los) principio(s) activo(s), las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la

5 materia, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuate, maíz, germen, oliva, ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos.

Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumes y conservantes.

10 Las suspensiones, además del (de los) principio activo(s), pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

15 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la invención para administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio, que puede prepararse mezclando el (los) principio(s) activo(s) con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de supositorio o salicilato y que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a la temperatura corporal y, por tanto, se fundirá en el recto o cavidad vaginal y liberará el (los) principio(s) activo(s). Las formulaciones de la presente invención que son adecuadas para administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en spray que contienen tales vehículos como se sabe en la técnica que son apropiados

20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para administración parenteral comprenden el (los) principio(s) activo(s) en combinación con uno o más disoluciones acuosas o no acuosas isotónicas estériles, dispersiones, suspensiones o emulsiones farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes.

25 Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y por el uso de tensoactivos.

30 Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. También puede desearse incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse por la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

35 Formas de liberación prolongada inyectables se preparan formando matrices de microcápsulas del (de los) principio(s) activo(s) en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación del (de los) principio(s) activo(s) con el polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, la tasa de liberación del (de los) principio(s) activo(s) puede controlarse. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). También se preparan formulaciones inyectables de liberación prolongada atrapando el (los)

40 principio(s) activo(s) en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido del cuerpo. Los materiales inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias.

45 Las formulaciones pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales, y pueden almacenarse en una condición liofilizada que solo requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes de uso. Pueden prepararse disoluciones y suspensiones de inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito anteriormente.

50 La cantidad de antígeno, y compuesto inmunoadyuvante en la composición de vacuna según la invención, las dosificaciones administradas, se determinan por técnicas muy conocidas para los expertos en la técnica farmacéutica, teniendo en cuenta factores tales como el antígeno particular, la edad, sexo, peso, especie y afección del animal o paciente particular, y la vía de administración.

En una realización preferida, la composición de vacuna según la invención comprende además uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en tensoactivos, promotores de la absorción, polímeros absorbentes de agua, sustancias que inhiben la degradación enzimática, alcoholes, disolventes orgánicos, aceites, agentes que controlan del pH, conservantes, agentes que controlan la presión osmótica, propulsores, agua y mezcla de

los mismos.

La composición de vacuna según la invención puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. La cantidad del vehículo dependerá de las cantidades seleccionadas para los otros componentes, la concentración deseada del antígeno, la selección de la vía de administración, oral o parenteral, etc. El vehículo puede añadirse a la vacuna en cualquier momento conveniente. En el caso de una vacuna liofilizada, el vehículo puede añadirse, por ejemplo, inmediatamente antes de la administración. Alternativamente, el producto final puede fabricarse con el vehículo.

Ejemplos de vehículos apropiados incluyen, pero no se limitan a, agua estéril, solución salina, tampones, solución salina tamponada con fosfato, cloruro sódico tamponado, aceites vegetales, medio esencial mínimo (MEM), MEM con tampón HEPES, etc.

Opcionalmente, la composición de vacuna de la invención puede contener adyuvantes secundarios convencionales en cantidades variables dependiendo del adyuvante y el resultado deseado. La cantidad usual oscila de aproximadamente el 0,02 % a aproximadamente el 20 % en peso, dependiendo de los otros componentes y efecto deseado.

Ejemplos de adyuvantes secundarios adecuados incluyen, pero no se limitan a, estabilizadores; emulsionantes; hidróxido de aluminio; fosfato de aluminio; ajustadores del pH tales como hidróxido sódico, ácido clorhídrico, etc.; tensioactivos tales como Tween.RTM. 80 (polisorbato 80, comercialmente disponible de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.); liposomas; adyuvante Iscom; gluco péptidos sintéticos tales como muramildipéptidos; sustancias de relleno tales como dextrano o combinaciones de dextrano, por ejemplo, con fosfato de aluminio; carboxipolimetileno; paredes celulares bacterianas tales como extracto de pared celular micobacteriana; sus derivados tales como *Corynebacterium parvum*; *Propionibacterium acne*; *Mycobacterium bovis*, por ejemplo, bacilo Calmette-Guerin (BCG); proteínas de la variolovacuna o de poxvirus animales; adyuvantes de partículas subvirales tales como orbivirus; toxina del cólera; N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)-propanodiamina (piridina); monofosforil lípido A; bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA, comercialmente disponible de Kodak, Rochester, N.Y.); productos sintéticos y mezclas de los mismos. Deseablemente, el hidróxido de aluminio se mezcla con otros adyuvantes secundarios o un inmunoadyuvante tal como Quil A.

Ejemplos de estabilizadores adecuados incluyen, pero sin limitación, sacarosa, gelatina, peptona, extractos de proteína digerida tales como NZ-Amina o NZ-Amina AS. Ejemplos de emulsionantes incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, aceite vegetal, aceite de cacahuete y otros aceites no tóxicos metabolizables convencionales útiles para composiciones inyectables o de vacunas intranasales.

A objeto de la presente invención, estos adyuvantes se identifican en la presente memoria como "secundarios" simplemente para mostrar la diferencia con el compuesto inmunoadyuvante anteriormente descrito, que consiste en un activador de Rho GTPasa, que es un componente esencial en la composición de vacuna para su efecto en combinación con una sustancia antigénica para aumentar significativamente la respuesta inmunitaria humoral a la sustancia antigénica. Los adyuvantes secundarios se incluyen principalmente en la formulación de vacuna como ayudas de procesamiento, aunque ciertos adyuvantes poseen propiedades inmunológicamente potenciadoras a algún grado y tienen un fin dual.

Pueden añadirse conservantes convencionales a la composición de vacuna en cantidades eficaces que oscilan de aproximadamente el 0,0001 % a aproximadamente el 0,1 % en peso. Dependiendo del conservante empleado en la formulación, cantidades inferiores o superiores a este intervalo pueden ser útiles. Conservantes típicos incluyen, por ejemplo, sorbato de potasio, metabisulfito de sodio, fenol, metilparabeno, propilparabeno, timerosal, etc.

La elección de composición de vacuna inactivada, modificada u otro tipo de composición de vacuna y procedimiento de preparación de la formulación de composición de vacuna mejorada de la presente invención son conocidos o se determinan fácilmente por los expertos habituales en la materia.

Una cantidad farmacológicamente eficaz del compuesto inmunoadyuvante según la invención puede administrarse, por ejemplo, por vía oral, parenteralmente o de otro modo, y en preferencia por vía mucosa, simultáneamente con, secuencialmente a o poco después de la administración de una sustancia antigénica con el fin de potenciar, acelerar o extender la inmunogenicidad del antígeno.

Aunque la dosificación de la composición de vacuna depende en particular del antígeno, especie del huésped vacunado o que va a vacunarse, etc., la dosificación de una cantidad farmacológicamente eficaz de la composición de vacuna oscilará normalmente de aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 500 µg (y en particular 50 µg a aproximadamente 500 µg) del compuesto inmunoadyuvante de la invención por dosis (basado en particular en los resultados mostrados en la Figura 6).

Aunque la cantidad de la sustancia antigénica particular en la combinación influirá en la cantidad del compuesto

inmunoadyuvante según la invención, necesaria para mejorar la respuesta inmunitaria, se contempla que el médico puede ajustar fácilmente la cantidad de dosificación eficaz del compuesto inmunoadyuvante mediante pruebas rutinarias para cumplir las circunstancias particulares.

5 Como regla general, la composición de vacuna de la presente invención se administra convenientemente por vía oral, parenteralmente (subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica o intraperitonealmente), intrabucal, intranasal, o transdérmicamente. La vía de administración contemplada por la presente invención dependerá de la sustancia antigénica y los co-formulantes. Por ejemplo, si la composición de vacuna contiene saponinas, aunque no son tóxicas por vía oral o intranasalmente, debe tenerse cuidado de no inyectar los glucósidos de sapogenina en la corriente sanguínea ya que funcionan como fuertes hemolíticos. Por tanto, muchos antígenos no serán eficaces si se toman por
10 vía oral. Preferentemente, la composición de vacuna se administra subcutánea, intramuscular o intranasalmente.

La dosificación de la composición de vacuna dependerá en particular del antígeno seleccionado, la vía de administración, especies y otros factores convencionales. Se contempla que un experto habitual en la materia pueda valorar fácilmente y inmediatamente la dosificación apropiada para una respuesta inmunogénica para cada antígeno para lograr la cantidad inmunizante eficaz y el procedimiento de administración.

15 Como ya se ha especificado en cualquier parte en la presente descripción, otro objetivo de la invención es una composición de vacuna según la invención, para administración a una superficie mucosa.

Este modo de administración presenta un gran interés. De hecho, las membranas mucosas contienen numerosas células dendríticas y células de Langerhans que son excelentes células detectoras de antígeno y presentadoras de antígeno. Las membranas mucosas también están conectadas a órganos linfoides llamados tejido linfoide asociada a mucosa, que pueden remitir una respuesta inmunitaria a otras áreas mucosas. Un ejemplo de un epitelio tal es la membrana epitelial nasal, que consiste en prácticamente una única capa de células epiteliales (epitelio pseudoestratificado) y la membrana mucosa en las vías respiratorias superiores está conectada a los dos tejidos linfoides, las amígdalas faríngeas de Luschka y las amígdalas. La amplia red de capilares de sangre bajo la mucosa nasal de la alta densidad de linfocitos B y T, es particularmente adecuada para proporcionar un rápido reconocimiento del antígeno y proporcionar una rápida respuesta inmunológica.
20
25

Preferentemente, la superficie mucosa está seleccionada del grupo que consiste en superficies mucosas de la nariz, pulmones, boca, ojo, oído, tubo gastrointestinal, aparato genital, vagina, recto y la piel.

Ejemplos

Ejemplo 1 : Efecto inmunoadyuvante de flagelinas suprimidas de la región hipervariable

30 **Materiales y procedimientos**

Producción de flagelinas recombinantes.

Las flagelinas recombinantes se originaron a partir de flagelina FliC de *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* ATCC14028 (número de acceso AAL20871).

35 Las flagelinas FliC y FliC_{Δ205-293} se aislaron tanto de las cepas SIN22 (fliB) y SJW46 de *S. Typhimurium*, como se ha descrito previamente (Yoshioka y col., 1995. Flagellar filament structure and cell motility of *Salmonella typhimurium* mutants lacking part of the outer domain of flagellin. *J. Bacteriol.* 177:1090-1093; Didierlaurent y col., 2004. Flagellin Promotes Myeloid Differentiation Factor 88-Dependent Development of Th2-Type Response. *J. Immunol.* 172:6922-6930; Siervo y col., 2001, Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13722-13727) como se compraron de Alexis Biochemicals (Suiza).

40 Las construcciones que codifican FliC_{Δ174-400} y FliC_{Δ191-352} se generaron por PCR sobre un plásmido derivado de pBR322 que alojaba el gen flic natural de SEC ID N° 3, bajo el control de su propio promotor y usando los siguientes pares de cebadores: AGCACcattcagcgatccagacc (SEC ID N° 15) /GCTGGTgctacaaccaccgaaaac (SEC ID N° 16), y TCGAGatctctgtaacagttgcagcc (SEC ID N° 17) /ACTCGAGgacggtacatccaaaactgcac (SEC ID N° 18) (las bases que codifican un ligador están en cursiva).

45 La mutagénesis dirigida al sitio también se realizó sobre el plásmido que alojaba FliC_{Δ174-400} con el fin de sustituir los residuos 89-96 (QRVRELAV) implicados en la detección de TLR5 con las secuencias correspondientes de una flagelina no de señalización (DTVKKVAT); así, la proteína resultante fue FliC_{Δ174-400/89-96*}.

En FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ191-352} y FliC_{Δ174-400/89-96*}, la asparagina localizada 6 residuos desde el extremo se cambió a una serina.

50 Las flagelinas truncadas se purificaron a partir del sobrenadante de SIN41 de *S. typhimurium* recombinante (fliC fliB)

del siguiente modo. Se cultivaron *Salmonella* en caldo Luria-Bertani (LB) durante 18 horas a 37 °C con agitación. El sobrenadante se filtró y se saturó con 60 % de sulfato de amonio (Sigma Aldrich, EE.UU.). Los materiales precipitados se recuperaron por centrifugación, solubilización en Tris/HCl 20 mM a pH 7,5 y luego diálisis. Las proteínas se purificaron adicionalmente por rondas sucesivas de hidroxapatita y cromatografía de intercambio aniónico (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.). Finalmente, las proteínas se agotaron en lipopolisacárido (LPS) usando una columna de polimixina B (Pierce, EE.UU.). Usando el ensayo de Limulus (Associates of Cape Cod Inc., EE.UU.) se determinó que la concentración de LPS residual era inferior a 30 µg de LPS por µg de flagelina recombinante.

Cuando se especifique, las flagelinas se trataron durante 1 h a 37 °C con 0,017 % de tripsina-EDTA (Invitrogen, EE.UU.) para hidrolizar totalmente las proteínas, seguido de calentamiento a 70 °C durante 1 h para inactivar la tripsina. Las proteínas se analizaron usando SDS-PAGE convencional e inmunotransferencia con anticuerpos policlonales específicos para FliC.

Experimentos con animales.

Se compraron ratones NMRI hembra (6-8 semanas de edad) de Charles River Laboratories (Francia) y se mantuvieron en una instalación sin patógenos específica en un establecimiento acreditado (nº A59107; Instituto Pasteur de Lille). Todos los experimentos cumplieron con las actuales reglamentaciones nacionales e institucionales y las pautas éticas.

Para la hiperinmunización, los animales se inyectaron subcutáneamente (s.c.) con la flagelina FliC (1 µg por inyección) emulsionada en 200 µl de adyuvante completo de Freund (CFA)/SBF en el día 1 y adyuvante incompleto de Freund (IFA)/SBF en los días 21, 35 y 49. En el día 63, los ratones se administraron con 200 µl de flagelina/SBF i.v. y se sacrificaron 2 h después por inyección intraperitoneal (i.p.) de 5 mg de pentobarbital sódico (CEVA Santé Animale, Francia) para el muestreo y análisis de suero y tejido.

Para caracterizar la respuesta innata mucosa y las propiedades de los adyuvantes, 20 µl de proteínas de SBF se administraron intranasalmente (i.n.) a ratones anestesiados i.p. con 1,5 mg de ketamina (Merial, Francia) y 0,3 mg de xilazina (Bayer, Alemania) por 25 g de animal.

Para estudiar las respuestas pro-inflamatorias, los ratones se muestrearon tanto a las 2 h (para ensayos de ARN y de expresión génica) como a las 6 h (para probar la producción de citocinas).

Para ensayos de inmunización, los ratones se administraron i.n. con SBF ± ovoalbúmina agotada en LPS (OVA) (20 µg, Sigma, calidad VII, EE.UU.) ± flagelinas (1 µg) en los días 1 y 21. Los lavados broncoalveolares (LBA) y el suero se muestrearon en el día 35.

Para evaluar la neutralización, sueros inmunes y simulados se calentaron durante 30 min a 56 °C para inactivar el complemento. Diluciones de suero sucesivas (en 200 µl de SBF) se transfirieron pasivamente a animales por vía i.v. 1 h antes de la activación sistémica con flagelinas. En algunos experimentos, los sueros se mezclaron con flagelinas diluidas en SBF y se administraron i.n. para probar la neutralización mucosa.

Se recogieron LBA después de la inyección intratraqueal de 1 ml de SBF con mezcla completa de inhibidores de proteasas (Roche, Suiza) y se aclararon por centrifugación.

Se recogieron muestras de sangre y se coagularon a temperatura ambiente, separándose entonces el suero por centrifugación.

Se prepararon extractos de proteína de pulmón homogeneizando tejido con 2 ml de reactivo de extracción de proteínas de tejido T-PER (Pierce, EE.UU.) complementado con inhibidores de proteasas. Todas las muestras se almacenaron a -80 °C antes del análisis.

Análisis de respuestas de anticuerpos específicos para antígeno.

Se evaluaron los niveles de anticuerpos específicos para OVA o flagelina en muestras de suero y LBA usando ELISA.

Brevemente, OVA (20 µg por pocillo en tampón fosfato 0,2 M a pH 6,5) y flagelina FliC (100 ng por pocillo en SBF) se recubrieron sobre microplacas MaxiSorp (Nalge Nunc Int., EE.UU.) durante la noche a 4 °C. Todas las microplacas se lavaron con SBF/Tween20 al 0,05 % y luego se bloquearon con SBF/leche en polvo al 1 % durante 1 h a temperatura ambiente.

Las diluciones sucesivas de muestras se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente antes del revelado. Se usaron anticuerpos dirigidos contra IgG o IgA de ratón biotinilada (Southern Biotechnology Associates, EE.UU.), estreptavidina conjugada con HRP (GE Healthcare, EE.UU.) y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Becton Dickinson Bioscience, EE.UU.) como reactivos de revelado. La reacción se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ y se determinó la DO a 450 nm.

El título de IgG se definió como el recíproco de la mayor dilución de muestra que da un valor de absorbancia de 0,15 DO para OVA y 0,5 DO para FliC y se comparó sistemáticamente con un suero de referencia. Los títulos se facilitan como medias geométricas de títulos de ratones individuales.

- 5 Se midieron niveles de IgA total e IgA específica para OVA en LBA y se normalizaron usando una curva de calibración con IgA de ratón comercial (Sigma). Se determinó la relación de IgA específica (expresada en ng de IgA específica para OVA por μg de IgA total) para cada ratón.

ELISA específico para citocinas y expresión génica

Se midieron niveles de CXCL2 y CCL20 de ratón y de IL-8 humana (CXCL8) en suero, LBA, pulmón total y/o sobrenadante de cultivo celular usando kits de ELISA comerciales (R&D Systems, EE.UU.).

- 10 Se extrajo ARN total de pulmones de ratón con el kit Nucleospin RNA II (Macherey Nagel, Alemania) y se transcribió de forma inversa con el kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, EE.UU.). El ADNc resultante se amplificó usando PCR en tiempo real basada en SYBR Green (Applied Biosystems).

- 15 Los cebadores específicos son CGTCATCCATGGCGAACTG (SEC ID N° 19)/ GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT (SEC ID N° 20) (ACTB, que codifican β -actina), TTTTGGGATGGAATTGGACAC (SEC ID N° 21)/ TGCAGGTGAAGCCTTCAACC (SEC ID N° 22) (CCL20) y CCCTCAACGGAAGAACCAAA (SEC ID N° 23)/ CACATCAGGTACGATCCAGGC (SEC ID N° 24) (CXCL2). Se determinaron niveles relativos de ARNm ($2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$) comparando (a) los umbrales de ciclo de PCR (Ct) para el gen de interés y ACTB (ΔCt) y (b) valores de ΔCt para grupos tratados y de control ($\Delta\Delta\text{Ct}$), como se describe previamente (Sierro y col., 2001, Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:13722-13727).

- 20 Ensayos basados en células.

La línea celular de adenocarcinoma de colon humano Caco-2 se transfectó establemente con el plásmido que alojaba un gen luciferasa bajo el control del promotor *CCL20* humano (Rumbo y col., 2004, Lymphotoxin beta receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium. Gastroenterol. 127:213-223), dando lugar a la línea Caco-Rumbo.

- 25 Estas células epiteliales intestinales se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con 10 % de suero bovino fetal, HEPES 10 mM, aminoácidos no esenciales 1X, penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 U/ml) y (para la selección de transgenes) 0,7 mg/ml de G418 (Invitrogen).

La línea celular epitelial bronquial humana BEAS-2B se cultivó en medio nutritivo Kaigh's F12 complementado como para medio de Caco-Rumbo más piruvato de sodio 1 mM y mezcla de insulina-transferrina-selenio (Invitrogen).

- 30 Las células se estimularon con flagelinas recombinantes durante 6 h para ensayos de luciferasa o durante 16 h antes de recoger el sobrenadante para ELISA.

- 35 La actividad de luciferasa en extractos celulares se midió usando el ensayo de luciferasa Bright Glo (Promega, EE.UU.). La luminiscencia relativa (URL) se normalizó como un porcentaje de la actividad máxima con flagelina natural para la prueba de activación con las flagelinas recombinantes. Para la prueba de neutralización *in vitro*, la URL se normalizó como un porcentaje de la actividad máxima para cada proteína: $[(\text{URL}_{\text{tratada}}/\text{URL}_{\text{sintratar}})/(\text{URL}_{\text{máx}}/\text{URL}_{\text{sintratar}})] \times 100$.

Análisis estadístico.

Las diferencias estadísticas se analizaron usando la prueba de Mann-Whitney y se consideró que eran significativas para valores de $p < 0,05$. A menos que se especifique de otro modo, los resultados se expresan como medias aritméticas \pm desviación estándar.

- 40

Resultados

La supresión de la región hipervariable de flagelina altera la antigenicidad pero no modifica la actividad estimulante de TLR5

- 45 Se construyeron dos novedosas moléculas de flagelina (FliC $_{\Delta 191-352}$ y FliC $_{\Delta 174-400}$, compuestas respectivamente de 336 y 271 aminoácidos) por supresión interna (Fig. 1A).

Como control, los presentes inventores usaron la variante FliC $_{\Delta 204-292}$ previamente caracterizada, que tiene una supresión parcial en el dominio antigénico (Yoshioka y col., 1995, Flagellar filament structure and cell motility of Salmonella typhimurium mutants lacking part of the outer domain of flagellin. J. Bacteriol. 177:1090-1093) (Fig. 1A).

Como control negativo para experimentos *in vitro* e *in vivo*, mutaciones que alteran la señalización de TLR5 se introdujeron en FliC_{Δ174-400}, dando la proteína recombinante FliC_{Δ174-400/89-96*}.

Las estructuras previstas de las flagelinas respectivas indicaron que el motivo 89-96 y la estructura global de las regiones conservadas permanecieron invariables (Fig. 1A).

- 5 Con la excepción de FliC_{Δ204-292}, las variantes fueron incapaces de complementar la motilidad de bacterias deficientes en flagelina y se secretaron en el sobrenadante de cultivo.

A continuación, los presentes inventores evaluaron la antigenicidad intrínseca de las flagelinas recombinantes. Para este fin, concentraciones saturantes de las flagelinas se recubrieron sobre microplacas y se sondaron por ELISA, usando un suero hiperinmune específico para FliC o FliC_{Δ174-400}.

- 10 Como se ilustra en la Fig. 1B, los presentes inventores observaron títulos de anticuerpos 3 a 10 veces menores cuando el suero anti-FliC se valoró contra variantes de FliC que contra FliC natural.

A diferencia, la reactividad del suero hiperinmune específico para FliC_{Δ174-400} fue similar, cualquiera que fuera la flagelina diana (Fig. 1C).

Estos resultados sugieren que la región hipervariable central es la principal diana para anticuerpos anti-flagelina.

- 15 Finalmente, los presentes inventores buscaron establecer si las moléculas recombinantes retuvieron o no cualquier actividad estimulante de TLR5.

Se realizó un análisis de respuesta a dosis usando células indicadoras Caco-Rumbo y la línea celular epitelial de pulmón BEAS-2B. La activación se evaluó midiendo la actividad de luciferasa en células Caco-Rumbo y la secreción de IL-8 por células BEAS-2B (las líneas celulares epiteliales intestinales humanas son indicadores únicos de la actividad estimulante de flagelina/TLR5, basándose en la expresión de quimiocinas CCL20, también conocidas como "quimiocinas activadas y reguladas por el hígado" o "LARC, y IL-8).

- 20 Como se muestra en la Fig. 2A-B, FliC_{Δ204-292}, FliC_{Δ191-352} y FliC_{Δ174-400} fueron todas potentes activadores celulares. Los valores de CE₅₀ respectivos de flagelinas variaron ligeramente con el tipo de célula, pero se encontraron dentro del intervalo de ng/ml previamente descrito (Smith y col., 2003, Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin protofilament formation and bacterial motility. Nat. Immunol. 4:1247-1253).

Se encontró que la actividad de flagelinas recombinantes era completamente dependiente de TLR5, ya que FliC_{Δ174-400/89-96*} fue incapaz de activar células epiteliales.

- 30 El requisito para la señalización de TLR5 se confirmó adicionalmente usando macrófagos de médula ósea derivados de ratones deficientes en TLR5; las células no sintetizaron ningún p40 de IL-12 tras la estimulación con flagelinas recombinantes (datos no mostrados).

Flagelinas suprimidas estimulan respuestas innatas mucosas dependientes de TLR5

Entonces se estudió la estimulación de TLR5 por flagelinas recombinantes *in vivo* por vía mucosa.

Para este fin, la expresión de CCL20 y CXCL2 en los pulmones de ratones tratados i.n. con flagelinas se cuantificó usando qRT-PCR (Fig. 2C).

- 35 En el plazo de 2 horas, los niveles pulmonares de ARNm de CCL20 fueron aproximadamente 30 veces mayores en animales tratados con flagelinas naturales o recombinantes que en animales con tratamiento simulado.

Además, la producción de quimiocinas CCL20 se detectó 6 h después de la instilación, tanto en homogeneizados de pulmón como LBA (Fig. 2D). En experimentos de control, FliC_{Δ174-400/89-96*} y flagelinas digeridas con tripsina no indujeron este tipo de efecto. Se observaron hallazgos similares para CXCL2 (datos no mostrados).

- 40 Estos resultados confirmaron que la respuesta pro-inflamatoria *in vivo* fue exclusivamente debida a las flagelinas recombinantes.

En general, las flagelinas con supresiones en la región hipervariable mostraron propiedades pro-inflamatorias mucosas equivalentes a aquellas del homólogo de FliC natural.

Flagelinas recombinantes presentan actividad adyuvante mucosa

- 45 Con el fin de caracterizar las propiedades del adyuvante de las moléculas recombinantes de los presentes inventores, se estudiaron respuestas de anticuerpos en suero y secreciones después de inmunizaciones i.n.

Se usó ovoalbúmina (OVA) como antígeno modelo, formulada con o sin las diversas flagelinas o con toxina del cólera (TC) como adyuvante mucoso estándar de oro.

5 La co-administración de FliC con OVA aumentó significativamente la respuesta de IgG específica para OVA (tanto en suero como en LBA, aproximadamente 300 y 100 veces, respectivamente), en comparación con animales inmunizados con OVA sola (Fig. 3A-B).

Además, la respuesta de IgG específica para OVA se potenció en LBA, sugiriendo así que FliC promueve la respuesta secretora arquetípica de anticuerpos de un adyuvante mucoso (Fig. 3C). De forma interesante, el efecto de FliC fue similar al de TC.

10 Al igual que FliC, las flagelinas recombinantes FliC_{Δ204-292}, FliC_{Δ191-352} y FliC_{Δ174-400} fueron así capaces de potenciar respuestas sistémicas y mucosas.

A diferencia, FliC_{Δ174-400/89-96*} y flagelinas tratadas con tripsina carecieron de potencia (Fig. 3 y Tabla 1).

Por tanto, la supresión de la región hipervariable de flagelina no influyó significativamente en las propiedades mediadas por TLR5 de adyuvante mucoso. Los datos de los presentes inventores también mostraron que se correlacionaron los efectos respectivos de las moléculas recombinantes sobre inmunidad innata y adaptativa.

15 La supresión de la región hipervariable altera la capacidad para provocar anticuerpos anti-flagelina.

Se espera que la supresión del dominio antigénico reduzca la respuesta inmunitaria específica para flagelina y así cualquier neutralización de inmunidad mediada por TLR5, especialmente con administración repetida.

Por tanto, los presentes inventores decidieron evaluar la eficacia de inmunización i.n. con respecto a la inducción de anticuerpos específicos para FliC.

20 Como se muestra, FliC provocó una fuerte respuesta de IgG en suero y LBA (Tabla 1 y Fig. 4). A diferencia, FliC_{Δ204-292} desencadenó niveles de anticuerpo 10 veces menores en ambos fluidos que FliC y se observó un efecto más pronunciado después de la inmunización con FliC_{Δ191-352} y FliC_{Δ174-400}.

25 En conclusión, los dominios antigénicos e inmunoestimulantes de flagelinas están funcionalmente desacoplados. Por tanto, FliC_{Δ191-352} y FliC_{Δ174-400} son moléculas de interés para prevenir o atenuar la generación de anticuerpos específicos para flagelina con actividad neutralizante.

Anticuerpos específicos para flagelina neutralizan la señalización mediada por TLR5

Se sabe que las flagelinas bacterianas provocan fuertes respuestas de anticuerpos, que están principalmente dirigidas contra la región hipervariable. Los presentes inventores supusieron que los anticuerpos anti-flagelina neutralizarían la actividad estimulante de TLR5 por flagelinas.

30 Por tanto, se inmunizaron ratones s.c. con la flagelina FliC o una preparación simulada (SBF solo o el antígeno irrelevante ovoalbúmina (OVA) formulada en CFA), seguido de refuerzos con IFA. Los análisis de ELISA revelaron que los sueros anti-FliC presentaron títulos de IgG específicos $> 10^6$, mientras que los títulos de sueros simulados estuvieron por debajo del umbral de detección del ensayo (10^2).

35 Como se ha mencionado anteriormente, líneas celulares epiteliales intestinales humanas son útiles como indicadores únicos de la actividad estimulante de flagelina/TLR5, basada en la expresión de la quimiocina CCL20 (también conocida como "quimiocina activada y regulada por el hígado", LARC).

Así, usando células Caco-Rumbo que alojan el gen luciferasa bajo el control del promotor CCL20, aquí se ha demostrado que un suero anti-FliC puede neutralizar completamente la actividad agonista de TLR5 por FliC (Fig. 5A).

40 Posteriormente, el efecto neutralizante de anticuerpos específicos para FliC sobre la señalización de TLR5 se evaluó directamente en animales inmunizados. Para este fin, respuestas pro-inflamatorias sistémicas en ratones (producción de quimiocinas CCL20 y CXCL2) se estudiaron después de la inyección i.v. de FliC (Fig. 5B-C).

En animales inmunizados simulados, una exposición a FliC desencadenó un aumento significativo en los niveles en suero de CCL20 y CXCL2, en comparación con una exposición a SBF.

45 Por el contrario, la producción de quimiocinas en animales inmunizados con FliC no se potenció por ninguna de las exposiciones. Usando transferencia de suero pasiva en animales sin tratamiento previo se encontró una estrecha correlación entre la cantidad de anticuerpo inyectado y la respuesta innata sistémica, como se muestra en la Fig. 5D.

En conclusión, la inmunidad preexistente a flagelina puede neutralizar la última actividad estimulante de TLR5, tanto *in*

vitro como *in vivo*.

Esto no es el caso con FliC Δ 174-400, que está fuertemente alterada en su capacidad para promover la producción de anticuerpos específicos para flagelina, que incluyen anticuerpos neutralizantes, como se ha desvelado antes según la Figura 4.

- 5 Se determinaron las dosis eficaces necesarias para iniciar respuestas innatas mediadas por TLR5 por la vía i.n. FliC y FliC Δ 174-400 mostraron perfiles de respuesta a dosis similares y la dosis de 0,1 μ g se seleccionó para los posteriores ensayos de neutralización (Fig. 6).

A dicho fin fin, los animales se hiperinmunizaron i.n. con FliC para provocar fuertes respuestas de IgG mucosas específicas para FliC (título medio - 45.000) y luego se expusieron i.n. a 0,1 μ g de flagelinas FliC o FliC Δ 174-400. Se monitorizó la producción de quimiocinas pro-inflamatorias en LBA.

La exposición a FliC o FliC Δ 174-400 condujo a la producción de CCL20 (4,28 \pm 1,98 frente a 1,08 \pm 0,54 ng/ml y 2,48 \pm 1,22 frente a 0,93 \pm 0,48 ng/ml en ratones inmunizados simulados y con FliC, respectivamente) como se ha observado en animales sin tratamiento previo.

15 Respuestas mucosas y dependientes de TLR5 sistémicas dependen a diferentes grados de la región de flagelina hipervariable

Los presentes inventores también quisieron estudiar la neutralización por anticuerpos específicos para flagelina de respuestas dependientes de TLR5 inducidas después de la inyección i.v. de las flagelinas recombinantes.

Para analizar la activación sistémica de inmunidad innata, la producción en quimiocinas pro-inflamatorias circulantes CCL20 y CXCL2 se midió por ELISA en suero (Fig. 7).

- 20 Inesperadamente, los presentes inventores observaron que FliC Δ 174-400 se alteró aproximadamente 100 veces en su capacidad para desencadenar efectos pro-inflamatorios sistémicos, en comparación con FliC natural.

Mientras que 10 μ g de FliC Δ 174-400 estimularon una ligera producción de quimiocinas, la variante mutada dentro del motivo de TLR5 FliC Δ 174-400/89-96* careció de actividad (0,85 \pm 0,27 frente a 0,02 \pm 0,00 ng/ml para CCL20).

Esto contrastó con FliC Δ 204-292 y FliC Δ 191-352, que fueron ambos potentes activadores similares a FliC.

- 25 Por tanto, se requieren ciertos determinantes moleculares sobre la región hipervariable (o dependiente de la última) para estimulación de TLR5 sistémica, pero no estimulación de TLR5 mucosa. Tomados en conjunto, los resultados de los presentes inventores indican que la activación de TLR5 dentro de los compartimentos mucosos y sistémicos está controlada por distintos mecanismos.

30 **Ejemplo 2: Actividad biológica de flagelinas suprimidas de la región hipervariable seleccionadas del grupo que consiste en FliC Δ 174-400, FliC Δ 161-405 y FliC Δ 138-405. Producción de flagelinas suprimidas de la región hipervariable recombinantes.**

Se produjeron recombinantemente diversas flagelinas suprimidas de la región hipervariable producidas realizando el mismo procedimiento que se ha desvelado en el Ejemplo 1 anterior, concretamente FliC Δ 174-400, FliC Δ 161-405 y FliC Δ 138-405 y FliC Δ 100-405.

- 35 Las Figuras 8 y 9 representan el análisis de dichas proteínas recombinantemente producidas.

La Figura 8 muestra el resultado de una electroforesis en SDS-PAGE que se ha realizado sobre las proteínas recombinantes recogidas del sobrenadante de cultivo de las correspondientes células bacterianas SIN41 de *S. typhimurium* recombinantes, después de una etapa de precipitación de proteína con TCA.

- 40 La Figura 9 muestra el resultado de un ensayo de transferencia Western usando anticuerpos policlonales anti-FliC que se ha realizado sobre el sobrenadante de cultivo de las correspondientes células bacterianas SIN41 de *S. typhimurium* recombinantes, después de una etapa de precipitación de proteína con TCA.

Actividad biológica de las flagelinas suprimidas de la región hipervariable FliC Δ 174-400, FliC Δ 161-405 y FliC Δ 138-405.

Se ensayó el efecto de FliC Δ 174-400, FliC Δ 161-405 y FliC Δ 138-405 sobre la inducción de CCL20 y CXCL2, realizando el ensayo de ELISA específico para citocinas que se describe en el Ejemplo 1.

- 45 Brevemente, C3H/HeJ (deficientes en TLR4) se inyectaron intraperitonealmente con 10 μ g de las diversas flagelinas recombinantes suprimidas de posiciones 174-400, 161-405 y 138-405.

Después de 2 h, el suero se muestreó y se procesó para ELISA específico para citocinas (CCL20 y CXCL2).

Las preparaciones de flagelina se derivaron de sobrenadante de *Salmonella* recombinante que se había precipitado previamente con sulfato de amonio y dializado (Fig. 8 y 9). Como esta preparación en bruto puede contaminarse con endotoxina, los presentes inventores usaron ratones deficientes para la señalización de TR4, ya que el LPS puede ser un contaminante importante en esta preparación en bruto. Además, los presentes inventores usaron tratamiento con tripsina para demostrar que la actividad biológica está presente en la fracción de proteína de preparaciones en bruto.

Los resultados se representan en las Figuras 10 (inducción de CCL20) y 11 (inducción de CXCL2).

Los resultados de las Figuras 10 y 11 sugieren que las flagelinas recombinantes FliC Δ 161-405 y FliC Δ 138-405 son competentes para señalización *in vivo* como se describe para FliC Δ 174-400.

Estos resultados sugieren que FliC Δ 161-405 y FliC Δ 138-405 son eficaces agonistas de TLR5 y, por tanto, pueden representar compuestos adyuvantes eficaces.

Ejemplo 3: Actividad adyuvante de FliC Δ 174-400 sobre las respuestas inmunitarias contra el antígeno gp140 del virus del VIH1.

Los protocolos de inmunización y el análisis de las respuestas específicas de antígeno-anticuerpo son los mismos que se describen en el Ejemplo 1, excepto para características específicas que pueden especificarse a continuación.

Brevemente, la actividad adyuvante de flagelina nativa FliC y FliC Δ 174-400 recombinante sobre el antígeno gp140 del VIH1 se realizó del siguiente modo: ratones NMRI (n=8) se inmunizaron en el día 1 y en el día 21 intranasalmente con 20 μ l de SBF que contenía gp140 (5 μ g por ratón) sin o con FliC o FliC Δ 174-400 (1 μ g por ratón).

Se muestrearon suero y lavados broncoalveolares (LBA) en el día 35 y el título de anticuerpos se determinó por ELISA específico para gp140.

Los resultados se representan en la Figura 12, en la que cada símbolo representa ratones individuales y la barra representa la media geométrica.

Los símbolos significan ratones administrados intranasalmente con, respectivamente: (i) Círculos: gp140 del VIH1 solo; (ii) diamante: gp140 del VIH1 + FliC Δ 174-400; (iii) triángulo: gp140 + FliC.

Los títulos de anticuerpos de las muestras de suero se representan como símbolos rellenos en la parte izquierda de la Figura 12 (símbolos cerrados). Los títulos de anticuerpos de las muestras de lavado broncoalveolar se representan como círculos abiertos en la parte derecha de la Figura 12.

Los resultados muestran que las diversas flagelinas suprimidas de la región hipervariable como se define en la presente memoria descriptiva consisten en compuestos inmunoadyuvantes eficaces.

Tabla 1: Respuestas inmunitarias sensibles a proteasas inducidas por flagelinas recombinantes*

Inmunización intranasal*	IgG anti-OVA **				IgG anti-FliC **			
	suero		LBA		suero		LBA	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
SBF	ND***	0,0	ND	0,0	ND	0,0	ND	0,0
OVA	2,4	0,8	1,1	0,7	ND	0,0	ND	0,0
FliC + OVA	5,7	0,1	3,9	0,5	5,9	0,6	3,0	0,7
FliC Δ 204-292 + OVA	5,5	0,9	3,4	0,8	3,3	0,8	1,0	0,5
FliC Δ 191-352 + OVA	4,5	1,3	2,9	0,9	2,2	0,3	ND	0,0
FliC Δ 174-400 + OVA	4,9	0,9	2,7	0,9	2,0	0,1	0,1	0,2
TRP + OVA	3,4	1,2	1,3	0,8	ND	0,0	ND	0,0
FliC/TRP + OVA	2,8	0,5	1,1	0,6	ND	0,0	0,3	0,3

ES 2 445 798 T3

FliC _{D204-292} /TRP + OVA	3,0	1,4	0,8	1,0	ND	0,0	ND	0,0
FliC _{D191-352} /TRP + OVA	2,6	0,7	0,8	0,9	ND	0,0	ND	0,0
FliC _{D174-400} /TRP + OVA	2,6	0,4	1,1	0,9	ND	0,0	ND	0,0

* Los ratones (n=8) se inmunizaron con SBF, ovoalbúmina (OVA), OVA + flagelinas/péptidos derivados de flagelina o OVA + flagelinas tratadas con tripsina (TRP) en los días 1 y 21. En el día 35 se midieron los títulos de IgG específica para OVA y FliC en suero y LBA.

La significancia estadística (p>0,05) se determinó en una prueba de Mann-Whitney. ** Los valores se expresan como Log10 (títulos recíprocos) ± desviación estándar (DE). En suero y LBA, el límite de detección es 2 y 0,3 (1/100 de dilución de suero y 1/2 de dilución de LBA), respectivamente.

*** "ND" representa "No detectado".

Tabla 2: Secuencias

SEC ID Nº	Tipo	Descripción
1	péptido	Flagelina (FliC)
2	péptido	FliC _{Δ174-400}
3	ácido nucleico	Flagelina (FtiC)
4	ácido nucleico	cebador
5	ácido nucleico	cebador
6	ácido nucleico	cebador
7	ácido nucleico	cebador
8	ácido nucleico	cebador
9	ácido nucleico	cebador
10	ácido nucleico	cebador
11	ácido nucleico	cebador
12	ácido nucleico	cebador
13	ácido nucleico	cebador
14	ácido nucleico	FliC _{Δ174-400}
15	ácido nucleico	cebador
16	ácido nucleico	cebador
17	ácido nucleico	cebador
18	ácido nucleico	cebador
19	ácido nucleico	cebador
20	ácido nucleico	cebador
21	ácido nucleico	cebador
22	ácido nucleico	cebador
23	ácido nucleico	cebador

24	ácido nucleico	cebador
25	péptido	FliC _{Δ161-405}
26	péptido	FliC _{Δ138-405}
27	péptido	FliC _{Δ100-405}
28	ácido nucleico	FliC _{Δ161-405}
29	ácido nucleico	FliC _{Δ138-405}
30	ácido nucleico	FliC _{Δ100-405}

Listado de secuencias

<110> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)

5 <120> Novedosos compuestos inmunoadyuvantes y uso de los mismos

<130> V882EU - INSERM

<160> 30

10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 494

15

<212> PRT

<213> Salmonella enterica

<400> 1

ES 2 445 798 T3

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn
 1 5 10 15

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
 20 25 30

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

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
 50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
 65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
 85 90 95

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln
 100 105 110

Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln
 115 120 125

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr
 130 135 140

Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys
 145 150 155 160

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

ES 2 445 798 T3

Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe
 420 425 430

Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser
 435 440 445

Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn
 450 455 460

Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala
 465 470 475 480

Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg
 485 490

<210> 2

<211> 271

5

<212> PRT

<213> Salmonella enterica

<400> 2

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn
 1 5 10 15

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
 20 25 30

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

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
 50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
 65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
 85 90 95

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln
 100 105 110

Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln
 115 120 125

10

ES 2 445 798 T3

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr
 130 135 140

Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys
 145 150 155 160

Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Thr Leu Asn Gly Ala Ala
 165 170 175

Gly Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu
 180 185 190

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

Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr
 210 215 220

Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser
 225 230 235 240

Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu
 245 250 255

Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Leu Arg
 260 265 270

<210> 3

<211> 1488

5

<212> ADN

<213> Salmonella enterica

<400> 3

atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa 60
 tcccagtcog ctctggggcac cgctatcgag cgtctgtctt cgggtctgog tatcaacagc 120
 gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccggt ttaccgogaa catcaaaggt 180
 ctgactcagg cttccogtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgogcagac cactgaaggc 240
 gogctgaacg aatcaacaa caacctgag cgtgtgogtg aactggoggt tcagtctgct 300
 aacagacca actcccagtc tgacctgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcogctg 360
 aacgaaatcg accgtgtatc oggocagact cagttaacg gogtgaaagt cctggogcag 420
 gacaacacc tgaccatcca ggttggtgcc aacgacggtg aaactatoga tatogatctg 480
 aagcagatca actctcagac cctgggtctg gatacogtga atgtgcaaca aaaatataag 540
 gtcagcgata oggctgcaac tgttacagga tatgocgata ctacgattgc tttagacaat 600

10

ES 2 445 798 T3

agtactttta aagcctcggc tactggtcct ggtggtactg accagaaaat tgatggcgat 660
 ttaaaatttg atgatacgac tggaaaatat tacgcaaag ttaccgttac ggggggaact 720
 ggtaaagatg gctattatga agtttccgtt gataagacga acggtgaggt gactcttgct 780
 ggcggtgcga cttccccgct tacaggtgga ctacctgca cagcaactga ggatgtgaaa 840
 aatgtacaag ttgcaaatgc tgatttgaca gaggctaaag ccgcattgac agcagcaggt 900
 gttaccggca cagcatctgt tgtaagatg tcttatactg ataataacgg taaaactatt 960
 gatggtggtt tagcagttaa ggtagcgcat gattactatt ctgcaactca aaataaagat 1020
 ggttccataa gtattaatac tacgaaatac actgcagatg acggtacatc caaaactgca 1080
 ctaaacaac tgggtggcgc agacggcaaa accgaagttg tttctattgg tggtaaaact 1140
 tacgctgcaa gtaaagccga aggtcacaac tttaaagcac agcctgatct ggcggaagcg 1200
 gctgctacaa ccaccgaaaa cccgctgcag aaaattgatg ctgctttggc acaggttgac 1260
 acgttacgtt ctgacctggg tgcggtacag aaccgtttca actccgctat taccaacctg 1320
 ggcaacaccg taaacaacct gacttctgcc cgtagccgta tcgaagattc cgactacgcg 1380
 accgaagttt ccaacatgtc tcgcgcgag attctgcage aggccggtac ctccgttctg 1440
 gcgcaggcga accaggttcc gcaaacgctc ctctctttac tgcgttaa 1488

<210> 4

<211> 18

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

10

<400> 4

agcagactga accgccag 18

<210> 5

15 <211> 19

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

20 <223> cebador

ES 2 445 798 T3

<400> 5
gctacaacca ccgaaaacc 19

<210> 6
5 <211> 19
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
10 <223> cebador

<400> 6
aaccgctgc agaaaattg 19

15 <210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 7
caggacttc acgccgtt 18

25 <210> 8
<211> 26
<212> ADN
<213> secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador

<400> 8
35 cttcagatcg atatcgatag tttcac 26

<210> 9
<211> 18
<212> ADN
<213> secuencia artificial
5
<220>
<223> cebador
<400> 9
10 attcagcgta tccagacc 18
<210> 10
<211> 27
<212> ADN
15 <213> secuencia artificial
<220>
<223> cebador
20 <400> 10
gttccgcaaa ggcctctc ttactg 27
<210> 11
<211> 27
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> cebador
30 <400> 11
cagtaaagag aggacgctt gcggaac 27
<210> 12
35 <211> 31

ES 2 445 798 T3

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

5 <223> cebador

<400> 12

ggtcgagctg gagctacaac caccgaaaac c 31

10 <210> 13

<211> 31

<212> ADN

<213> secuencia artificial

15 <220>

<223> cebador

<400> 13

ggtcgagctg gaaacccgct gcagaaaatt g 31

20

<210> 14

<211> 819

<212> ADN

<213> Salmonella enterica

25

<400> 14

ES 2 445 798 T3

atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctggtga cccagaataa cctgaacaaa 60
 tcccagtcgg cctcggggcac cgctatcgag cgtctgtctt cgggtctgcg tatcaacagc 120
 gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccggt ttaccgcgaa catcaaaggt 180
 ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgcgagac cactgaaggc 240
 gcgctgaacg aatcaacaa caacctgcag cgtgtgctg aactggcggg tcagtctgct 300
 aacagcacca actcccagtc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgcctg 360
 aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttaacg gcgtgaaagt cctggcgcag 420
 gacaacacc tgaccatcca ggttggtgcc aacgacgggt aaactatcga tatcgatctg 480
 aagcagatca actctcagac cctgggtctg gatacgtga atggtgctgc tgggtctaca 540
 accaccgaaa acccgctgca gaaaattgat gctgctttgg cacaggttga cacgttacgt 600
 tctgacctgg gtgcggtaca gaaccgttc aactccgcta ttaccaacct gggcaacacc 660
 gtaaacaacc tgacttctgc ccgtagccgt atcgaagatt ccgactacgc gaccgaagtt 720
 tccaacatgt ctgcgcgca gattctgcag caggccggta cctccgttct ggcgcaggcg 780
aaccaggttc cgcaaagcgt cctctcttta ctgcgttaa 819

5 <210> 15

<211> 24

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> cebador

<400> 15

agcaccattc agcgtatcca gacc 24

15 <210> 16

<211> 24

<212> ADN

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> cebador

<400> 16

ES 2 445 798 T3

gctggtgcta caaccaccga aaac 24

<210> 17
<211> 27
5 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

10 <400> 17
tcgagatc ctgtaacagt tgcagcc 27

<210> 18
15 <211> 29
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
20 <223> cebador

<400> 18
actcgaggac ggtacatcca aaactgcac 29

25 <210> 19
<211> 19
<212> ADN
<213> secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador

<400> 19
35 cgtcatccat ggcgaactg 19

<210> 20
<211> 21
<212> ADN
<213> secuencia artificial
5
<220>
<223> cebador
<400> 20
10 gcttctttgc agctccttg t 21
<210> 21
<211> 21
<212> ADN
15 <213> secuencia artificial
<220>
<223> cebador
20 <400> 21
ttttgggatg gaattggaca c 21
<210> 22
<211> 20
25 <212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> cebador
30 <400> 22
tgcaggtgaa gcctcaacc 20
<210> 23
35 <211> 20

<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
5 <223> cebador

<400> 23
ccctcaacgg aagaaccaaa 20

10 <210> 24
<211> 21
<212> ADN
<213> secuencia artificial

15 <220>
<223> cebador

<400> 24
cacatcaggt acgatccagg c 21

20 <210> 25
<211> 253
<212> PRT
<213> Salmonella enterica

25 <400> 25

ES 2 445 798 T3

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn
1 5 10 15

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
20 25 30

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

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
85 90 95

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln
100 105 110

Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln
115 120 125

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr
130 135 140

Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys
145 150 155 160

Gly Ala Ala Gly Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln
165 170 175

Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn
180 185 190

Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser Ala
195 200 205

Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met
210 215 220

Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln
225 230 235 240

Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Leu Arg
245 250

<210> 26

5 <211> 230

<212> PRT

ES 2 445 798 T3

<213> Salmonella enterica

<400> 26

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn
 1 5 10 15

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
 20 25 30

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

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
 50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
 65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
 85 90 95

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln
 100 105 110

Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln
 115 120 125

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Gly Ala Ala Gly Asn Pro Leu
 130 135 140

Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp
 145 150 155 160

Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly
 165 170 175

Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser
 180 185 190

Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln
 195 200 205

Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser
 210 215 220

Val Leu Ser Leu Leu Arg
 225 230

5

<210> 27

<211> 192

ES 2 445 798 T3

<212> PRT

<213> Salmonella enterica

<400> 27

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn
 1 5 10 15
 Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
 20 25 30
 Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala
 35 40 45
 Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
 50 55 60
 Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
 65 70 75 80
 Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
 85 90 95
 Gln Ser Ala Gly Ala Ala Gly Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala
 100 105 110
 Leu Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn
 115 120 125
 Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu
 130 135 140
 Thr Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val
 145 150 155 160
 Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val
 165 170 175
 Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Leu Arg
 180 185 190

5

<210> 28

<211> 765

10

<212> ADN

<213> Salmonella enterica

<400> 28

ES 2 445 798 T3

atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctggtga cccagaataa cctgaacaaa 60
 tcccagtccg ctctggggcac cgctatcgag cgtctgtctt cgggtctgag tatcaacagc 120
 gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccggt ttaccgcgaa catcaaaggt 180
 ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgagac cactgaaggc 240
 gcgctgaacg aatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggg tcagtctgct 300
 aacagcacca actcccagtc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgcctg 360
 aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctggcgcag 420
 gacaacaccc tgaccatcca ggttggtgcc aacgacgggt aaactatcga tatcgatctg 480
 aagggtgcag ctggaaaccc gctgcagaaa attgatgctg ctttggcaca ggttgacacg 540
 ttacgttctg acctgggtgc ggtacagAAC cgtttcaact ccgctattac caacctgggc 600
 aacaccgtaa acaacctgac ttctgcccgt agccgtatcg aagattccga ctacgcgacc 660
 gaagtttcca acatgtctcg cgcgcagatt ctgcagcagg cgggtacctc cgttctggcg 720
 caggcgaacc aggttccgca aagcgtcctc tctttactgc gttaa 765

<210> 29

<211> 696

5

<212> ADN

<213> Salmonella enterica

<400> 29

atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctggtga cccagaataa cctgaacaaa 60
 tcccagtccg ctctggggcac cgctatcgag cgtctgtctt cgggtctgag tatcaacagc 120
 gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccggt ttaccgcgaa catcaaaggt 180
 ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgagac cactgaaggc 240
 gcgctgaacg aatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggg tcagtctgct 300
 aacagcacca actcccagtc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgcctg 360
 aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctgggtgca 420
 gctggaaacc cgctgcagaa aattgatgct gctttggcac aggttgacac gttacgttct 480
 gacctgggtg cgttacagaa ccgtttcaac tccgctatta ccaacctggg caacaccgta 540
 aacaacctga cttctgcccg tagccgtatc gaagattccg actacgcgac cgaagtttcc 600
 aacatgtctc gcgcgcagat tctgcagcag gccggtacct ccgttctggc gcaggcgaac 660
 caggttccgc aaagcgtcct ctctttactg cgttaa 696

10

<210> 30

ES 2 445 798 T3

<211> 582

<212> ADN

<213> Salmonella enterica

5

<400> 30

```
atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctggtga cccagaataa cctgaacaaa      60
tcccagtcgg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggtctgcg tatcaacagc      120
gcgaaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccggt ttaccgcaa catcaaaggt      180
ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgagac cactgaaggc      240
gcgctgaacg aatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggc tcagtctgct      300
ggtgcagctg gaaacccgct gcagaaaatt gatgctgctt tggcacaggt tgacacgtta      360
cgttctgacc tgggtgcggc acagaaccgt ttcaactccg ctattaccaa cctgggcaac      420
accgtaaaca acctgacttc tgcccgtagc cgtatogaag attccgacta cgcgaccgaa      480
gtttccaaca tgtctcgcg cagattctg cagcaggccg gtacctccgt tctggcgag      540
gccaaccagg ttccgcaaag cgtcctctct ttactgcggt aa                          582
```

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto inmunoadyuvante que comprende:

5 a) un péptido del extremo N-terminal que tiene al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comienza en el residuo de aminoácido localizado en la posición 1 de SEC ID N° 1 y que termina en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos localizados en las posiciones 99 a 173 de SEC ID N° 1; y

10 b) un péptido del extremo C-terminal que tiene al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comienza en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos localizados en las posiciones 401 a 406 de SEC ID N° 1 y que termina en el residuo de aminoácido localizado en la posición 494 de SEC ID N° 1, en el que:

- dicho péptido del extremo N-terminal está directamente ligado a dicho péptido del extremo C, o

15 - dicho péptido del extremo N-terminal y dicho péptido del extremo C-terminal están directamente ligados, el uno con el otro, mediante una cadena espaciadora, en el que la cadena espaciadora consiste en 1-20 aminoácidos ligados por enlaces peptídicos, en el que los aminoácidos están seleccionados de los 20 aminoácidos naturales y en el que el compuesto no es SEC ID N°: 15, 628, 630, 632, 634, 713, 715, 717, 719 ó 721 del documento WO 2009/128950.

2. Un compuesto inmunoadyuvante que comprende:

20 a) un péptido del extremo N-terminal que tiene al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comienza en el residuo de aminoácido localizado en la posición 1 de SEC ID N° 1 y que termina en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos localizados en las posiciones 99 a 173 de SEC ID N° 1; y

25 b) un péptido del extremo C-terminal que tiene al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comienza en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos localizados en las posiciones 401 a 406 de SEC ID N° 1 y que termina en el residuo de aminoácido localizado en la posición 494 de SEC ID N° 1, en el que:

- dicho péptido del extremo N-terminal está directamente ligado a dicho péptido del extremo C, o

30 - dicho péptido del extremo N-terminal y dicho péptido del extremo C-terminal están directamente ligados, el uno con el otro, mediante una cadena espaciadora, en el que la cadena espaciadora consiste en 1-20 aminoácidos ligados por enlaces peptídicos, en el que los aminoácidos están seleccionados de los 20 aminoácidos naturales

en el que dicho péptido del extremo N-terminal está seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos 1-99, 1-137, 1-160 y 1-173 de SEC ID N° 1.

3. Un compuesto inmunoadyuvante que comprende:

35 a) un péptido del extremo N-terminal que tiene al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comienza en el residuo de aminoácido localizado en la posición 1 de SEC ID N° 1 y que termina en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos localizados en las posiciones 99 a 173 de SEC ID N° 1; y

40 b) un péptido del extremo C-terminal que tiene al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comienza en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos localizados en las posiciones 401 a 406 de SEC ID N° 1 y que termina en el residuo de aminoácido localizado en la posición 494 de SEC ID N° 1, en el que:

- dicho péptido del extremo N-terminal está directamente ligado a dicho péptido del extremo C, o

45 - dicho péptido del extremo N-terminal y dicho péptido del extremo C-terminal están directamente ligados, el uno con el otro, mediante una cadena espaciadora, en el que la cadena espaciadora consiste en 1-20 aminoácidos ligados por enlaces peptídicos, en el que los aminoácidos están seleccionados de los 20 aminoácidos naturales

en el que dicho péptido del extremo C-terminal está seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos 401- 494 y 406-494 de SEC ID N° 1.

4. El compuesto inmunoadyuvante según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en el que dichos péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal consisten en las secuencias de aminoácidos 1-173 y 401-494 de SEC ID N° 1, respectivamente.
- 5 5. El compuesto inmunoadyuvante según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en el que dichos péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal consisten en las secuencias de aminoácidos 1-160 y 406-494 de SEC ID N° 1, respectivamente.
6. El compuesto inmunoadyuvante según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en el que dichos péptidos del extremo N-terminal y del extremo C-terminal consisten en las secuencias de aminoácidos 1-137 y 406-494 de SEC ID N° 1, respectivamente.
- 10 7. El compuesto inmunoadyuvante según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dicho péptido del extremo N-terminal y dicho péptido del extremo C-terminal están directamente ligados, el uno con el otro, mediante una cadena espaciadora intermedia que consiste en una secuencia de péptidos NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH.
8. Un compuesto inmunoadyuvante que comprende:
- 15 a) un péptido del extremo N-terminal que tiene al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comienza en el residuo de aminoácido localizado en la posición 1 de SEC ID N° 1 y que termina en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos localizados en las posiciones 99 a 173 de SEC ID N° 1; y
- 20 b) un péptido del extremo C-terminal que tiene al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comienza en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos localizados en las posiciones 401 a 406 de SEC ID N° 1 y que termina en el residuo de aminoácido localizado en la posición 494 de SEC ID N° 1, en el que:
- dicho péptido del extremo N-terminal está directamente ligado a dicho péptido del extremo C, o
- dicho péptido del extremo N-terminal y dicho péptido del extremo C-terminal están directamente ligados, el uno con el otro, mediante una cadena espaciadora, en el que la cadena espaciadora consiste en 1-20
- 25 aminoácidos ligados por enlaces peptídicos, en el que los aminoácidos están seleccionados de los 20 aminoácidos naturales
- en el que el residuo de aminoácido asparagina localizado en la posición 488 de SEC ID N° 1 está sustituido con una serina.
9. Un compuesto inmunoadyuvante según cualquier reivindicación precedente en el que dicho compuesto comprende un residuo de metionina adicional en el extremo N-terminal.
- 30 10. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto inmunoadyuvante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
11. Una composición inmunogénica que comprende un compuesto inmunoadyuvante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, junto con uno o más antígenos.
- 35 12. Una composición de vacuna que comprende un compuesto inmunoadyuvante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, junto con uno o más antígenos.
13. La composición inmunogénica según la reivindicación 11 o la composición de vacuna según la reivindicación 12, en la que dicho compuesto inmunoadyuvante no está ligado covalentemente a dichos uno o más antígenos.
- 40 14. El compuesto inmunoadyuvante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso como un medicamento.
15. El uso de un compuesto inmunoadyuvante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para fabricar una composición farmacéutica.
16. Un ácido nucleico que codifica el compuesto inmunoadyuvante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 45 17. Un vector recombinante que comprende, insertado en el mismo, el ácido nucleico de la reivindicación 16, el ácido nucleico codificando un compuesto inmunoadyuvante que comprende:
- a) un péptido del extremo N-terminal que tiene al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comienza en el residuo de aminoácido localizado en la posición 1 de SEC ID N° 1 y que

termina en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos localizados en las posiciones 99 a 173 de SEC ID N° 1; y

5 b) un péptido del extremo C-terminal que tiene al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comienza en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos localizados en las posiciones 401 a 406 de SEC ID N° 1 y que termina en el residuo de aminoácido localizado en la posición 494 de SEC ID N° 1, en el que:

- dicho péptido del extremo N-terminal está directamente ligado a dicho péptido del extremo C, o

10 - dicho péptido del extremo N-terminal y dicho péptido del extremo C-terminal están directamente ligados, el uno con el otro, mediante una cadena espaciadora, en el que la cadena espaciadora consiste en 1-20 aminoácidos ligados por enlaces peptídicos, en el que los aminoácidos están seleccionados de los 20 aminoácidos naturales.

18. Una célula huésped transfectada o transformada con el vector recombinante de la reivindicación 17 o con un ácido nucleico que codifica un compuesto inmunoadyuvante que comprende:

15 a) un péptido del extremo N-terminal que tiene al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comienza en el residuo de aminoácido localizado en la posición 1 de SEC ID N° 1 y que termina en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos localizados en las posiciones 99 a 173 de SEC ID N° 1; y

20 b) un péptido del extremo C-terminal que tiene al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comienza en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos localizados en las posiciones 401 a 406 de SEC ID N° 1 y que termina en el residuo de aminoácido localizado en la posición 494 de SEC ID N° 1, en el que:

- dicho péptido del extremo N-terminal está directamente ligado a dicho péptido del extremo C, o

25 - dicho péptido del extremo N-terminal y dicho péptido del extremo C-terminal están directamente ligados, el uno con el otro, mediante una cadena espaciadora, en el que la cadena espaciadora consiste en 1-20 aminoácidos ligados por enlaces peptídicos, en el que los aminoácidos están seleccionados de los 20 aminoácidos naturales.

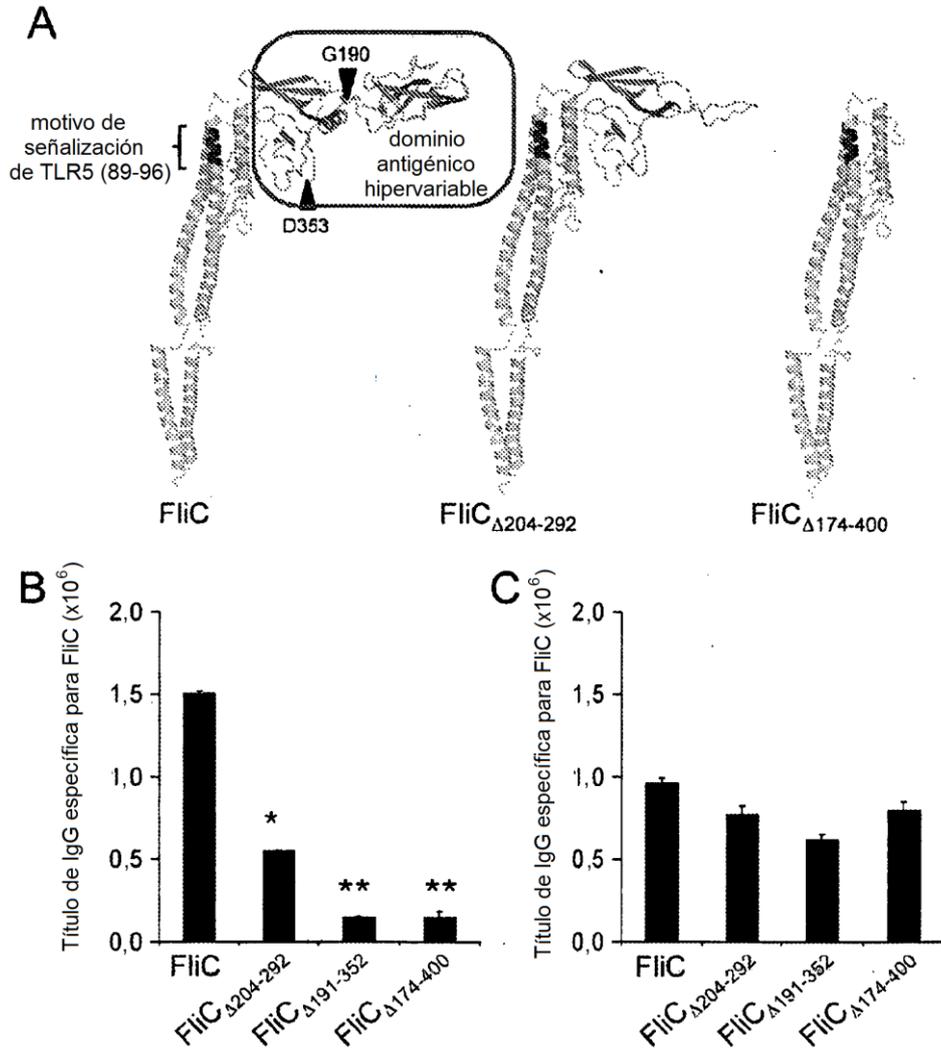


Figura 1

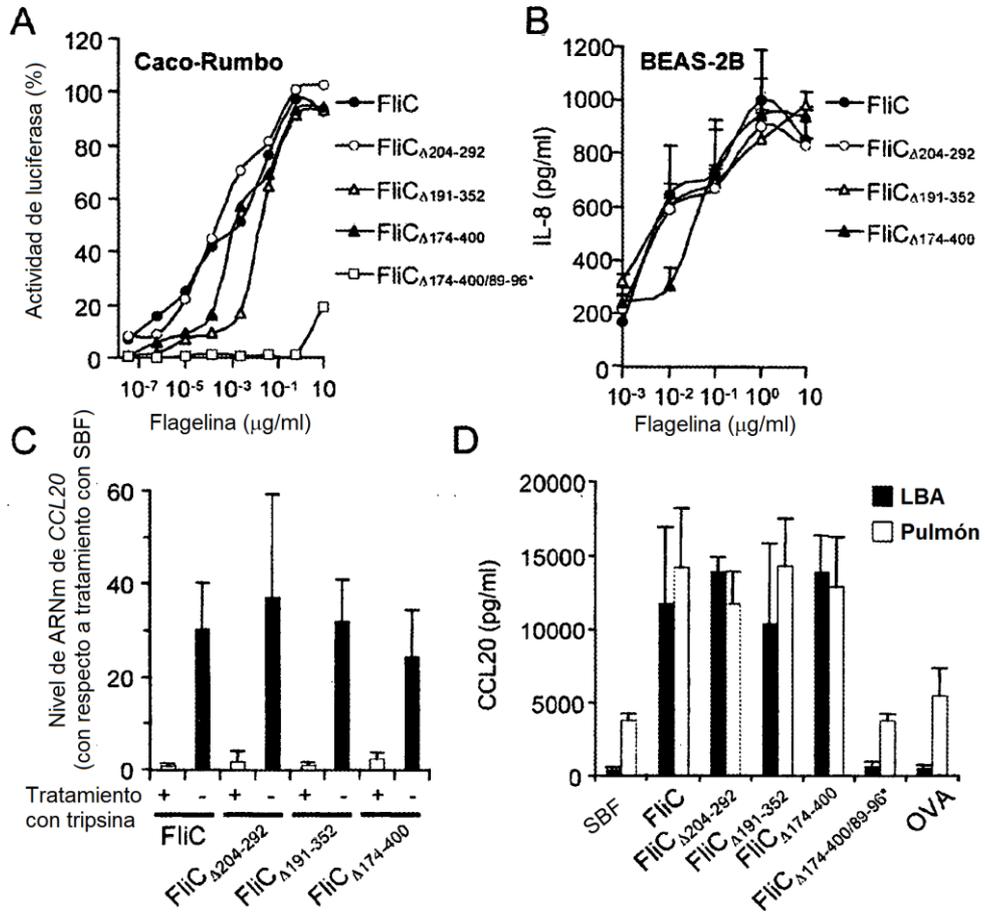


Figura 2

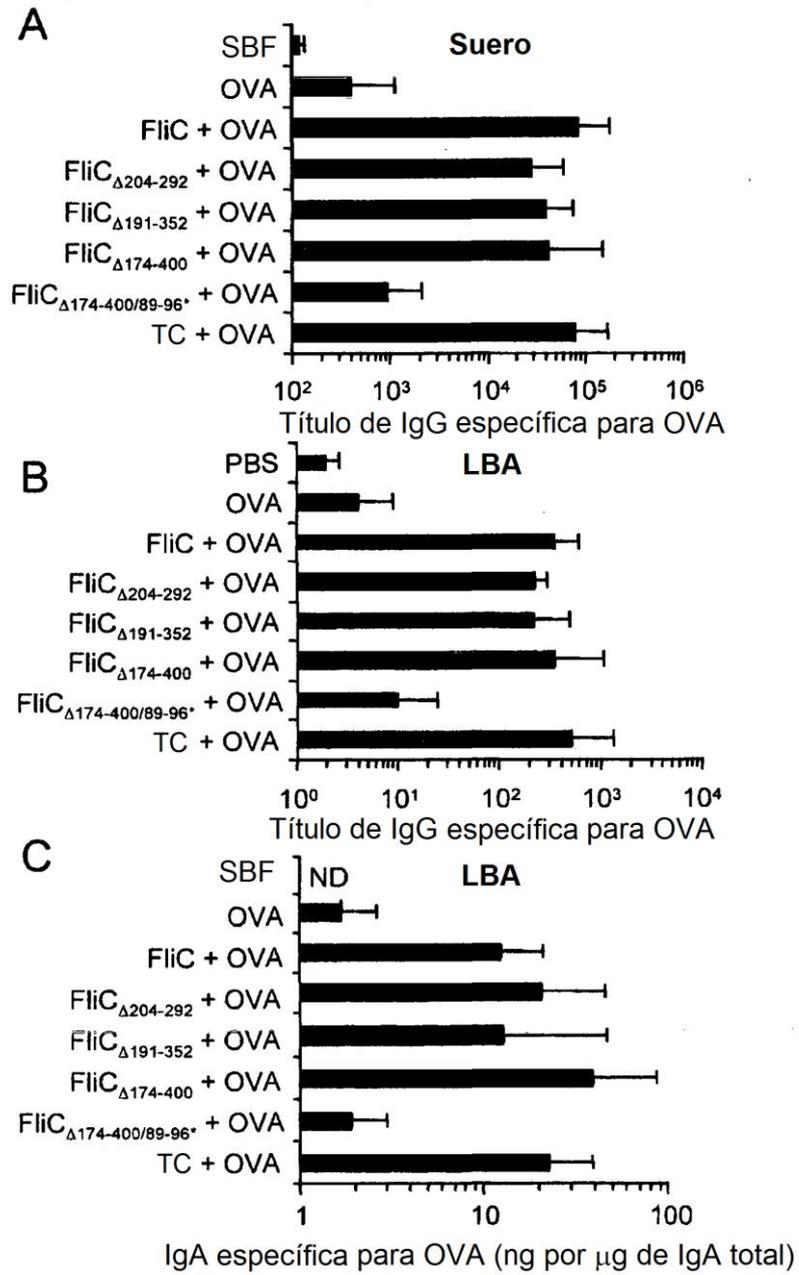


Figura 3

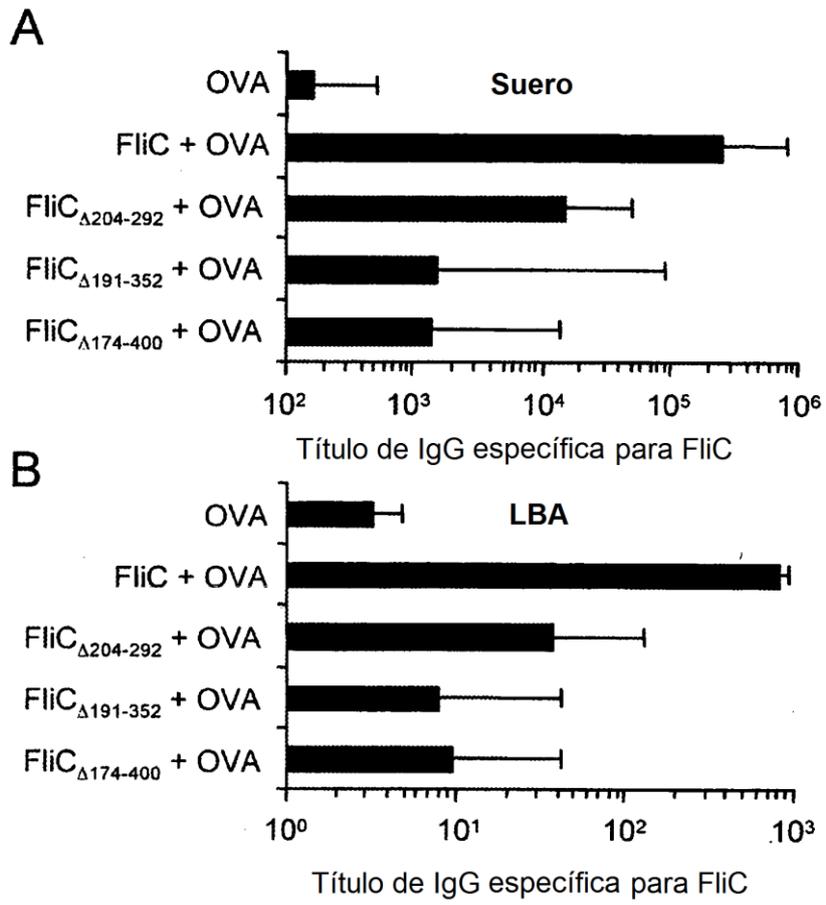


Figura 4

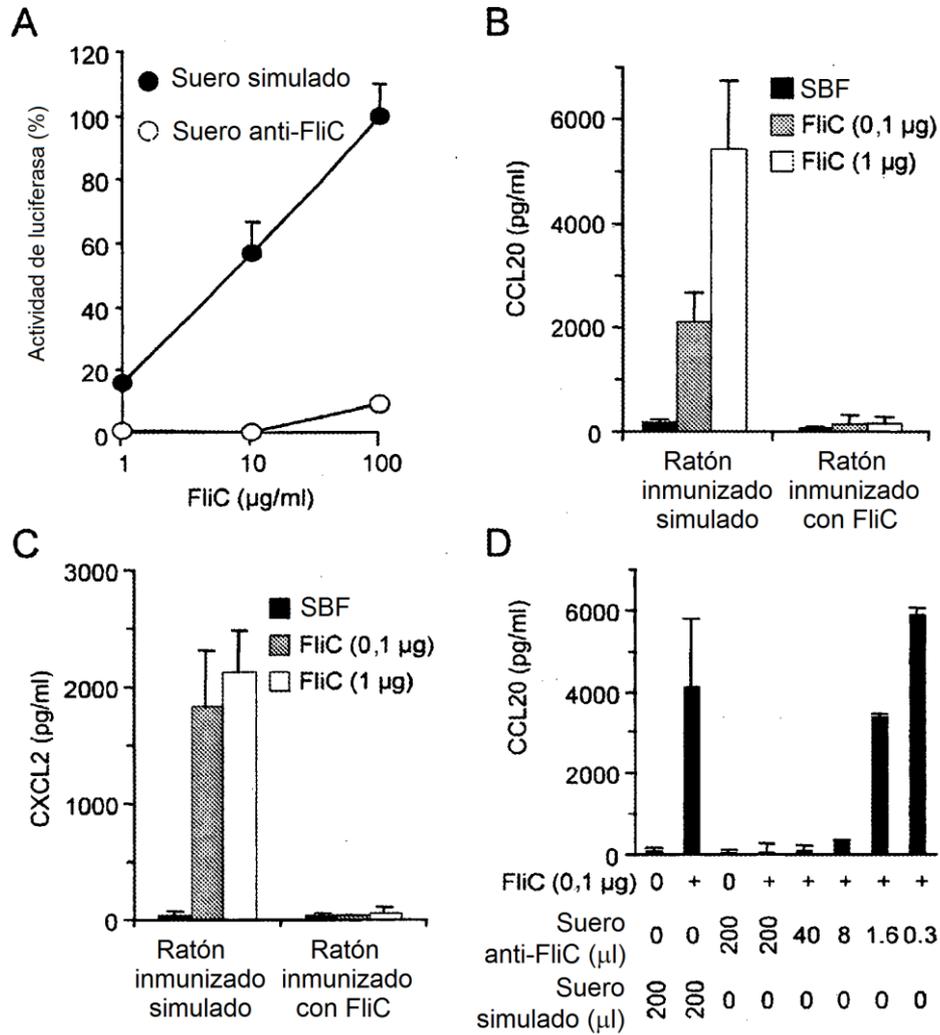


Figura 5

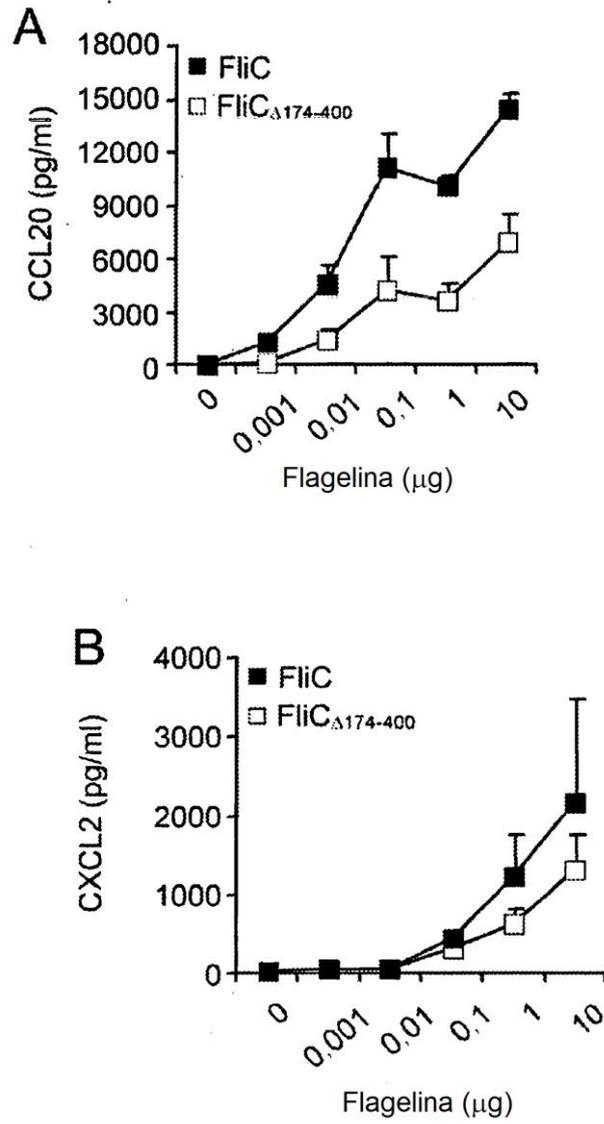


Figura 6

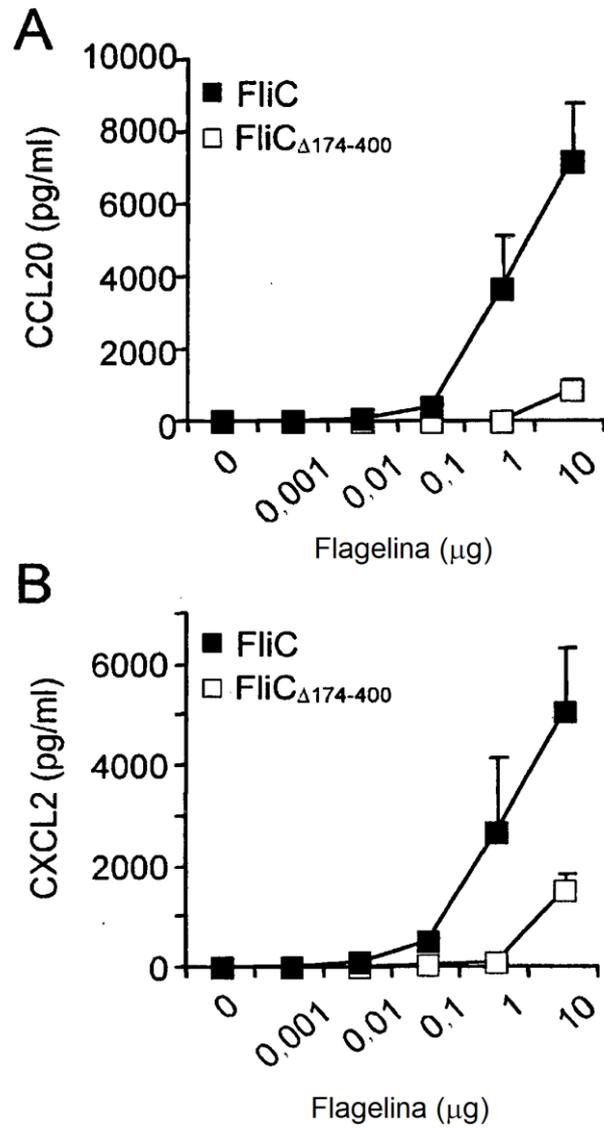


Figura 7

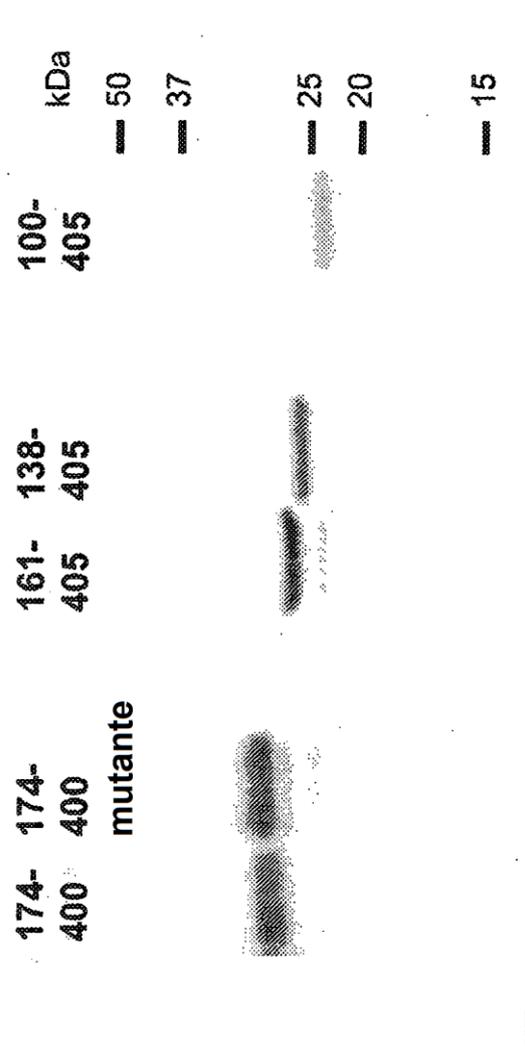


Figura 9

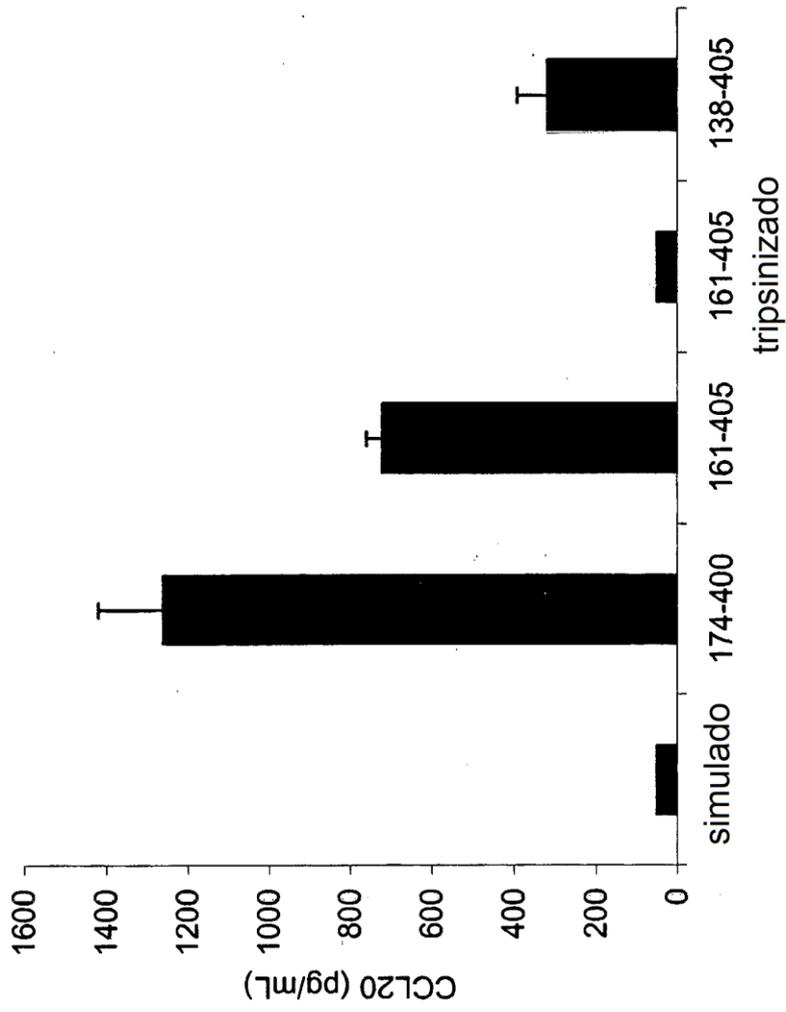


Figura 10

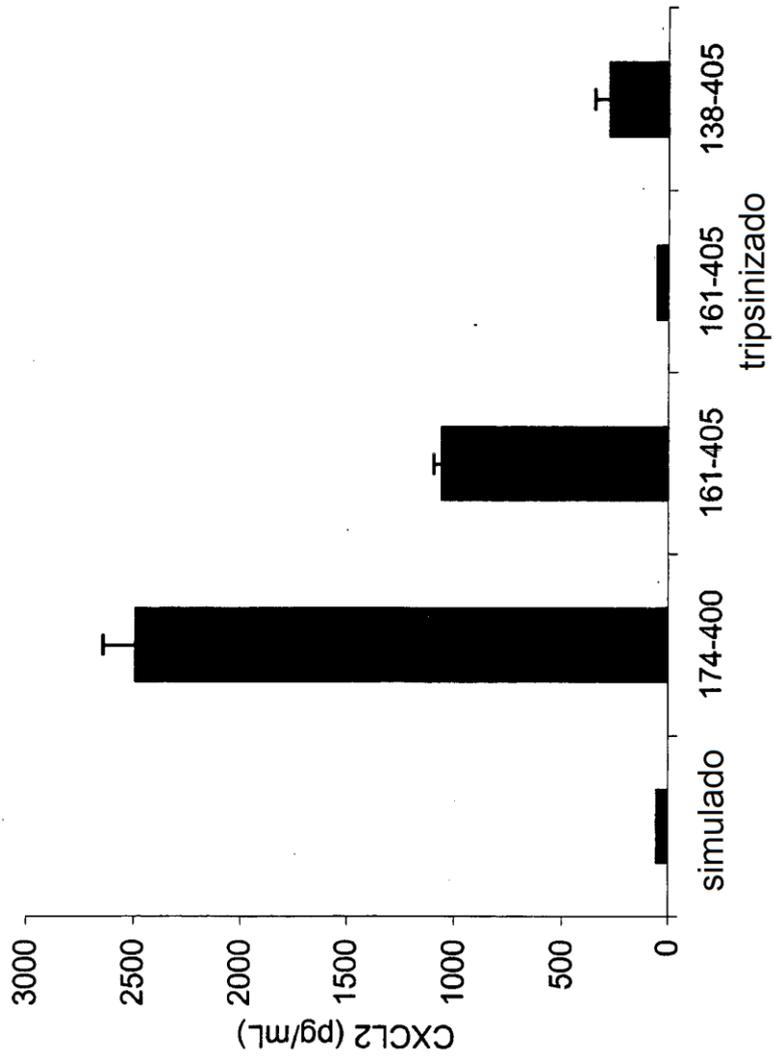
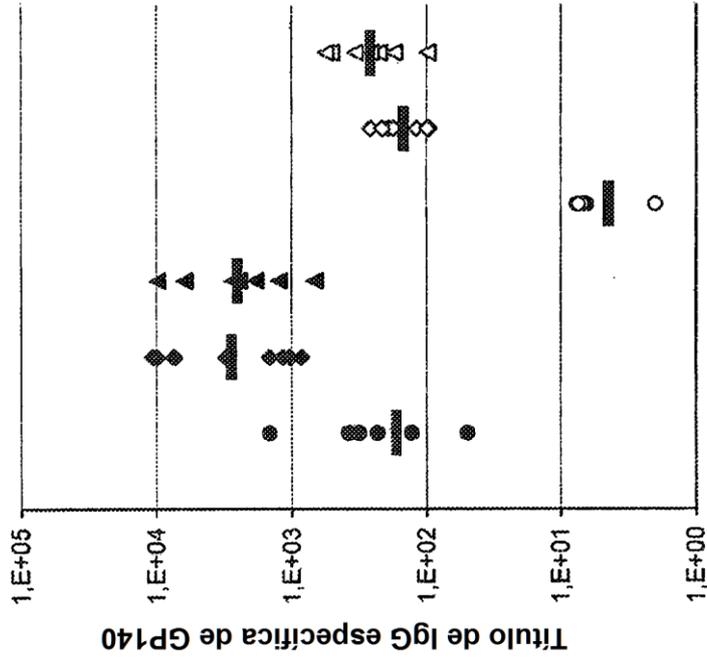


Figura 11



GP140	+	+	+	+	+	+	+
FliCΔ174-400	-	+	-	-	-	+	-
FliC	-	-	-	+	-	-	+

Figura 12

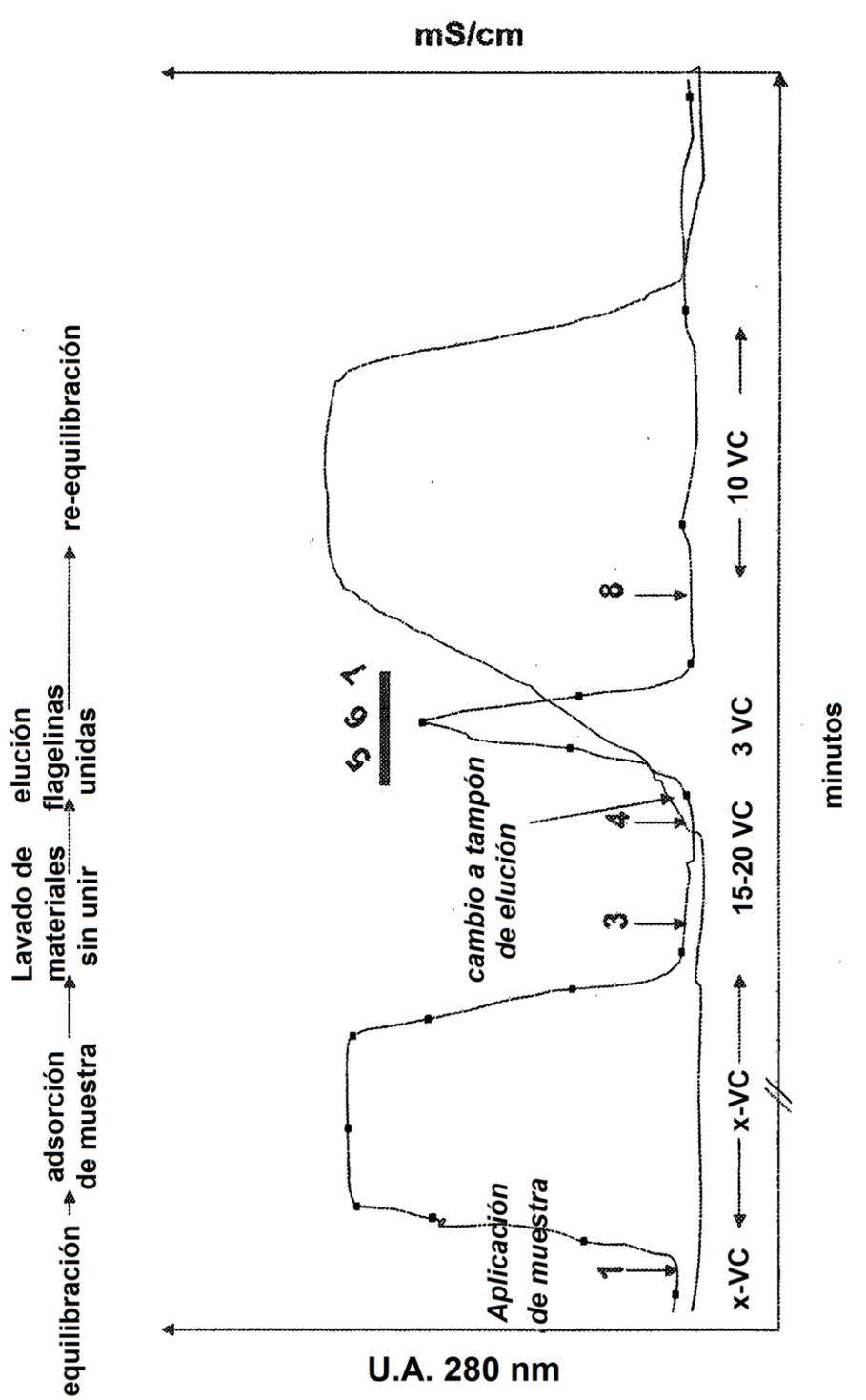


Figura 13

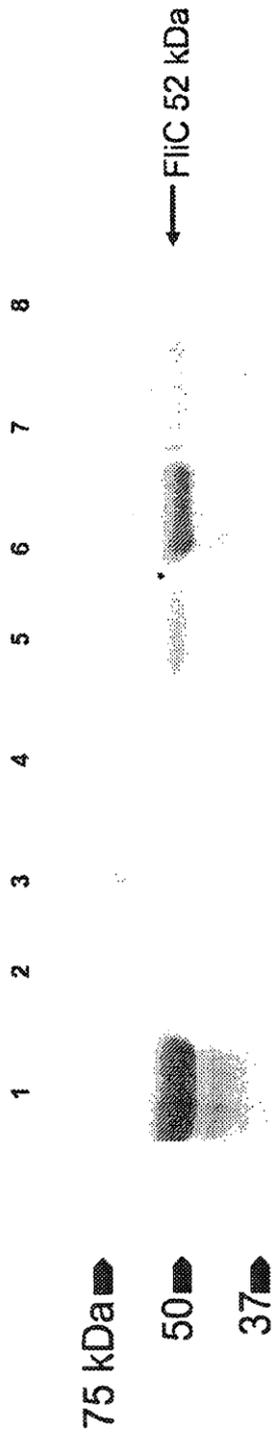


Figure 14