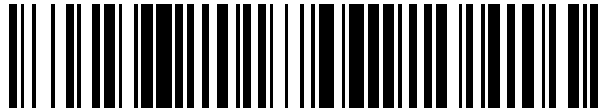


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 818**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2008 E 08789738 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2173376**

54 Título: **Vacunas contra la gripe multiepitópicas multiméricas**

30 Prioridad:

**02.08.2007 US 953498 P**

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

**06.07.2015**

73 Titular/es:

**BIONDVAX PHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)  
Weizmann Science Park, 14 Einstein Street (4th  
floor), P.O. Box 4143  
74140 Ness-Ziona, IL**

72 Inventor/es:

**BEN-YEDIDIA, TAMAR y  
SINGER, YOSSI**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 539 818 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).

**Vacunas contra la gripe multiepitópicas multiméricas****Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a vacunas basadas en péptidos multiepitópicas multiméricas. En particular, la presente invención se refiere al uso de vacunas basadas en péptidos multiepitópicas multiméricas que provocan inmunidad protectora a la gripe.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**Vacunas multiepitópicas

15 Se sabe que los epítopes de linfocitos B, epítopes de linfocitos T colaboradores y epítopes de linfocitos T citotóxicos desempeñan todas funciones importantes en estas dos respuestas inmunitarias. Obviamente, deben inducirse respuestas humorales y celulares de amplio espectro y de larga duración para la eficaz vacunación. Todavía no hay vacunas de amplio espectro y eficaces contra virus con altas velocidades de mutación, tales como el virus de la gripe y el virus de la inmunodeficiencia humana.

20

Hay una estrecha relación entre la dosis de antígeno y la eficiencia de la respuesta de linfocitos B específica. Estudios usando una proteína transportadora químicamente acoplada y sistema de péptidos epitópicos, que consisten en la misma cantidad de proteína transportadora acoplada a cantidades variables de péptido epitópico, han mostrado que la densidad de epítopes afectó espectacularmente las respuestas de IgG dependientes de linfocitos T colaboradores (Jegerlehner y col., Eur J Immunol. 2002, 32:3305-14). Liu y col. (Vaccine. 2004 23(3):366-71) observaron un efecto positivo de la densidad de epítopes sobre la respuesta humoral de ratones y conejos inmunizados con proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa que llevan diversos números de copias del epítipo peptídico M2e (1, 2, 4, 8 y 16 copias) de la proteína M2 del virus de la gripe. En el mismo estudio, un ensayo de exposición letal mostró que la proteína de fusión con las mayores densidades de epítopes produjo mayores tasas de supervivencia y pérdidas de peso más lentas.

30

Se han desarrollado vacunas multiepitópicas, concretamente las vacunas que comprenden más de un epítipo, para una amplia variedad de aplicaciones. Una lista no exhaustiva de los ejemplos incluye, por ejemplo, un vacuna multivalente recombinante para bacterias estreptocócicas desvelada en la patente de EE. UU. n° 6.063.386; una vacuna para el tratamiento de malaria que comprende una única proteína que comprende péptidos derivados de diferentes etapas del ciclo de vida del parásito *Plasmodium falciparum*, desvelada en la patente de EE.UU. n° 6.828.416; composiciones inmunogénicas antitumorales que comprenden un polipéptido que comprende epítopes antigénicos de citoblastos de la próstata, desveladas en la solicitud de patente de EE.UU. 2007/0056315; y vacunas antivirales multiepitópicas contra el VIH (publicación internacional WO 01/24810), virus de la rubeola (véase la publicación internacional WO 93/14206) y virus de la hepatitis C (publicación internacional WO 01/21189).

35

40

La publicación internacional WO 2006/069262 desvela composiciones, proteínas de fusión y polipéptidos que comprenden patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y epítopes de proteínas del virus de la gripe usadas para estimular respuestas inmunitarias en un sujeto. Los PAMP son motivos moleculares (por ejemplo, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos) encontrados en microorganismos que pueden desencadenar una respuesta inmunitaria innata en un huésped, es decir, actuar de adyuvante. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión incluyen múltiples copias del epítipo de la gripe M2e. La publicación internacional WO 2006/078657 desvela proteínas de fusión y polipéptidos similares que comprenden uno o más PAMP y múltiples epítopes de proteínas flavivirales.

50

Gripe

La gripe es una enfermedad producida por virus de tres subtipos principales, gripe A, B y C, que se clasifican según sus determinantes antigénicos. El virión de la gripe consiste en un genoma de ARN monocatenario estrechamente asociado a una nucleoproteína (NP) y envuelto por una envoltura de lipoproteína revestida por proteína de la matriz (M1) y que lleva dos antígenos de glucoproteína de superficie principales, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Las glucoproteínas HA y NA son las más susceptibles a cambiar; por ejemplo, hay 16 inmunoclasas de HA y 9 clases de NA diferentes que proporcionan la base para los diferentes subtipos del virus de la gripe como H1N1 o H3N2. El virus de la gripe A tienen una glucoproteína de transmembrana adicional, M2, que está altamente conservada entre los diferentes subtipos de HN. El gen M2 codifica una proteína que tiene 96-97 aminoácidos que se expresa como un tetrámero sobre la superficie celular del virión. Está compuesto de aproximadamente 24 aminoácidos extracelulares, aproximadamente 19 aminoácidos de transmembrana y aproximadamente 54 residuos citoplásmicos (Lamb y col., Cell. 1985; 40:627-633).

60

65 Los virus de la gripe A y B son las causas más comunes de la gripe en el hombre. La gripe tiene un enorme impacto sobre la salud pública con graves implicaciones económicas, además de los devastadores problemas de salud, que

incluyen morbilidad e incluso mortalidad. La infección puede ser leve, moderada o grave, que oscila de infección respiratoria superior y traqueobronquitis asintomática a leve a una neumonía viral grave, ocasionalmente letal. El virus de la gripe tiene dos características inmunológicas importantes que suponen un reto a la preparación de vacunas. La primera se refiere a cambios genéticos que se producen en las glucoproteínas de superficie cada algunos años, denominado "desplazamiento antigénico". Este cambio antigénico produce virus que eluden la resistencia provocada por vacunas existentes. La segunda característica de gran preocupación para la salud pública es que el virus de la gripe, en particular el virus de la gripe A, puede intercambiar material genético y mezclarse. Este proceso, conocido como "desplazamiento antigénico", produce nuevas cepas diferentes de ambos virus parentales, que pueden ser cepas pandémicas letales.

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

La inmunización contra el virus de la gripe está limitada por la variación antigénica del virus y por la restricción de la infección a las membranas mucosas respiratorias. Las vacunas contra la gripe actualmente disponibles se basan o bien en virus inactivos completos, en proteínas virales presentadas sobre la superficie de células bacterianas, o bien en determinantes antigénicos virales que llevan flagelina. La HA es un inmunogén fuerte y es el antígeno más significativo en definir la especificidad serológica de las diferentes cepas de virus.

La molécula de HA (75-80 kD) comprende una pluralidad de determinantes antigénicos, varios de los cuales están en regiones que experimentan cambios de secuencia en diferentes cepas (determinantes específicos de cepa) y otros en regiones que están conservadas en muchas moléculas de HA (determinantes comunes). Debido a estos cambios, las vacunas de la gripe necesitan modificarse al menos cada algunos años.

Se conocen en la técnica muchos antígenos de la gripe, y vacunas preparadas a partir de los mismos. La patente de EE.UU. 4.474.757 desvela una vacuna contra infecciones por el virus de la gripe que consiste en un péptido sintético correspondiente a un fragmento antigénico de HA unido a un vehículo macromolecular adecuado, tal como polímeros de aminoácidos o toxoide tetánico.

La publicación internacional PCT WO 93/20846 por algunos de los inventores de la presente invención enseña una vacuna recombinante sintética contra una pluralidad de diferentes cepas del virus de la gripe que comprende al menos una proteína recombinante que comprende la secuencia de aminoácidos de flagelina y al menos una secuencia de aminoácidos de un epítipo del virus de la gripe HA o NP, o un agregado de dicha proteína quimérica. Siguiendo este enfoque, se encontró que una vacuna contra la gripe recombinante sintética basada en tres epítopes era altamente eficaz en ratones. Las vacunas ejemplificadas incluyeron quimeras de flagelina que comprenden el epítipo HA 91-108, un epítipo de linfocitos B de la HA que está conservado en todas las cepas H3 y provoca anticuerpos neutralizantes contra la gripe, junto con uno o ambos epítopes de linfocitos T colaboradores o CTL NP (NP 55-69 y NP 147-158, respectivamente), que inducen respuestas inmunitarias limitadas por MHC. Se consideró que una vacuna que comprende una combinación de las tres quimeras anteriormente mencionadas proporciona la principal protección a la infección viral.

La patente de EE.UU. n° 6.740.325 por algunos de los inventores de la presente invención enseña una vacuna contra la gripe basada en péptidos sintéticos humanos que comprende al menos cuatro epítopes del virus de la gripe, siendo dichos epítopes del virus de la gripe reactivos con células humanas, comprendiendo dichos epítopes:

- (i) un epítipo de hemaglutinina (HA) de linfocitos B; (ii) un epítipo de hemaglutinina (HA) o nucleoproteína (NP) de linfocitos T colaboradores que puede unirse a muchas moléculas de HA; y (iii) al menos dos epítopes de nucleoproteína (NP) o proteína de la matriz (M) de linfocitos citotóxicos (CTL) que están limitados a las moléculas de HA más predominantes en diferentes poblaciones humanas, en particular grupos étnicos o raciales específicos. Los epítopes peptídicos de la gripe pueden expresarse dentro de flagelina de *Salmonella* recombinante. Esa vacuna requiere la engorrosa preparación de al menos cuatro polipéptidos quiméricos.

La publicación internacional PCT WO 2007/066334 por algunos de los inventores de la presente invención desvela una vacuna capaz de provocar protección a largo plazo y de cepas cruzadas que comprende una pluralidad de proteínas quiméricas que comprenden al menos dos epítopes peptídicos del virus de la gripe en las que al menos un epítipo es un epítipo peptídico de la proteína de la matriz M del virus de la gripe A y el segundo epítipo es un epítipo peptídico de hemaglutinina HA. En este caso, los epítopes peptídicos de la gripe también pueden expresarse dentro de flagelina de *Salmonella* recombinante.

Los mamíferos tienen frecuentemente respuestas inmunitarias adquiridas a antígenos flagelares. Sin embargo, datos clínicos han mostrado que dosis eficaces de gripe de flagelina recombinante en animales tienen efectos adversos en sujetos humanos, que incluyen fiebre alta, probablemente debida a la alta relación de flagelina/antígeno. También se sospecha que altas concentraciones de flagelina tienen un efecto transitorio sobre el corazón.

El documento WO 2006/128294 se refiere a la producción de vacunas contra el virus de la gripe que proporcionan una mezcla de diferentes péptidos todos derivados de hemaglutinina (HA), para provocar una respuesta inmunitaria

humoral, es decir, producción de anticuerpos.

Caro-Aguilar I. y col., *Microbes and Infection* 7 (2005), pág. 1324-1337, enseñan que puede producirse una vacuna que proporciona péptidos sintéticos derivados de cepas de esporozoítos específicas, y que representan homo- o heteropolímeros de péptidos particulares, conocidos por representar epítopes de linfocitos B y T. Se enseña que los péptidos individuales, a partir de los cuales van a producirse los homo-/heteropolímeros, contienen un residuo de cisteína en el extremo amino y carboxi, que por una parte permite una polimerización espontánea, y obviamente también elevada antigenicidad de los péptidos. Cuando se administran a los animales de laboratorio junto con el adyuvante Montanide ISA 51, podría obtenerse inmunidad protectora.

El documento WO 2009/026465, un documento según el Art. 54(3) del CPE, se refiere a una composición que comprende un multímero de un dominio extracelular de proteína de la matriz de la gripe (M2e). M2e se presenta al sistema inmunitario como una expresión multimérica y puede inducir una respuesta inmunitaria en un individuo. La composición puede usarse en una vacuna contra la gripe.

Así, existe una necesidad sin cumplir para una vacuna contra la gripe basada en epítopes peptídicos que puede inducir respuestas humorales y celulares que son de larga duración con amplia especificidad. También existe la necesidad de una vacuna con producción simplificada y procesos de control de calidad.

## RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona vacunas contra la gripe que vencen los inconvenientes de las vacunas conocidas contra la gripe, que incluyen los efectos adversos de alta relación de vehículo con respecto a antígeno y alta relación de adyuvante con respecto a antígeno. La vacuna de la presente invención comprende polipéptido que comprende múltiples copias de pluralidad de epítopes peptídicos del virus de la gripe, proporcionando vacuna de alta densidad de multidiversidad como se define en las reivindicaciones. Según la presente invención, el polipéptido multiepitópico multimérico puede producirse recombinantemente, como un polipéptido aislado o como una proteína de fusión, o sintéticamente conectando una pluralidad de péptidos sintéticos, o puede mezclarse o formularse con un adyuvante externo.

Los polipéptidos multiméricos de la invención contienen una combinación de epítopes de linfocitos B del virus de la gripe, epítopes de linfocitos T colaboradores y epítopes de linfocitos citotóxicos (CTL). Los epítopes están seleccionados preferentemente de péptidos de hemaglutinina (HA), péptidos de proteína de la matriz (M1 y M2) y péptidos de nucleoproteína (NP). Los epítopes tienen una actividad de protección cruzada demostrable contra varios subtipos de la gripe humana y se eligen por su capacidad mejorada para inducir una respuesta inmunitaria celular y humoral.

Se encontró sorprendentemente que varios polipéptidos multiméricos según la invención son activos en provocar una respuesta inmunitaria incluso sin acoplarse a o sin ser parte de una proteína transportadora. Además, debido a la alta densidad y la variedad de epítopes inmunogénicos llevados por el polipéptido, la vacuna provoca una fuerte respuesta inmunitaria incluso sin la necesidad de un adyuvante. Además, la inclusión de un gran número de diferentes epítopes inmunogénicos en un único polipéptido facilita los procedimientos de producción y control de calidad.

La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. Dentro del contexto de la presente invención, un polipéptido "multimérico" es un polipéptido que contiene una pluralidad de repeticiones (al menos dos, normalmente al menos tres o más), no necesariamente adyacentes, de un estiramiento de aminoácidos del polipéptido. Por tanto, el término "multiepitópico multimérico" se refiere a un polipéptido que contiene una pluralidad de repeticiones de una pluralidad de epítopes.

Tabla 1: Epítopes peptídicos de la gripe E1 a E9

Epítopo	Tipo de Epítopo	Residuos de proteína	Secuencia de Aminoácidos	SEC ID N°:
E1	B célula	HA 354-372	PAKLLKERGGFFGAIAGFLE	82
E2	B célula	HA 91-108	SKAYSNCYPYDVPDYASL	48
E3	B célula & CTL	M1 2-12	SLLTEVETYVL	25
E4	B célula	HA 150-159	WLTGKNGLYP	52
E5	B célula	HA 143-149	WTGVTQN	51
E6	Auxiliar T	NP 206-229	FWRGENGRKTRSAYERMC NILKKGK	64
E7	Auxiliar T	HA 307-319	PKYVKQNTLKLAT	59
E8	CTL	NP 335-350	SAAFEDLRVLSFIRGY	69
E9	CTL	NP 380-393	ELRSRYWAIRTRSG	70

Para mejorar la exposición de los epítopes al sistema inmunitario, los epítopes están preferentemente separados por un espaciador, que puede consistir en un único aminoácido y puede comprender al menos un aminoácido o ser un péptido. Preferentemente, el espaciador consiste en 1-4 residuos de aminoácidos neutros.

Se proporcionan diversas configuraciones a modo de ejemplo, que comprenden epítopes seleccionados de la Tabla 1, en la que el número de repeticiones para cada epítopo es el mismo o diferente, y en las que el polipéptido puede estar dispuesto en una estructura polimérica secuencial alternante o una estructura de copolímero de bloques. El término estructura "polimérica secuencial alternante" significa que una única copia de todos los epítopes contenida en el polipéptido está dispuesta secuencialmente y esta disposición se repite secuencialmente varias veces igual al número de repeticiones. Por ejemplo, si el polipéptido multiepitópico multimérico comprende cuatro repeticiones de tres epítopes  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  en una estructura secuencial alternante, el polipéptido tiene la siguiente estructura polimérica:  $X_1X_2X_3-X_1X_2X_3-X_1X_2X_3-X_1X_2X_3$ , también escrita  $[X_1X_2X_3]_4$ . El término estructura de "copolímero de bloques" significa que todas las copias de un único epítopo contenidas en el polipéptido están dispuestas adyacentemente. Por ejemplo, un polipéptido multiepitópico multimérico similar que comprende cuatro repeticiones de tres epítopes  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  en una estructura de copolímero de bloques tiene la siguiente estructura polimérica:  $X_1X_1X_1X_1-X_2X_2X_2X_2-X_3X_3X_3X_3$ , también escrita  $[A]_4-[B]_4-[C]_4$ .

Otras realizaciones de la presente invención serán evidentes de la descripción detallada facilitada en el presente documento más adelante. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se facilitan a modo de ilustración solo.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las **Figuras 1A** y **1B** muestran un polipéptido multimérico que comprende cinco repeticiones de nueve epítopes peptídicos de la gripe dispuestos en una estructura polimérica secuencial alternante: (HA354-372---HA91-108---M1,2-12---HA150-159---HA143-149---NP206-229-HA307-319---NP335-350---NP380-393)<sub>5</sub>. (A) Secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 83) de la construcción usada para producir un polipéptido multimérico; (B) Secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 84) del polipéptido multimérico codificado por la secuencia de nucleótidos de A. Están subrayados los epítopes en la primera secuencia de nueve epítopes.

Las **Figuras 2A** y **2B** muestran un polipéptido multimérico que comprende tres repeticiones de nueve epítopes peptídicos de la gripe dispuestos en una estructura de copolímero de bloques: (HA354-372)<sub>3</sub>-(HA91-108)<sub>3</sub>---(M12-12)<sub>3</sub>---(HA150-159)<sub>3</sub>---(HA143-149)<sub>3</sub>---(NP206-229)<sub>3</sub>---(HA307-319)<sub>3</sub>---(NP335-350)<sub>3</sub>---(NP380-393)<sub>3</sub>. (A) Secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 85) de la construcción usada para producir el polipéptido. (B) Secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 86) del polipéptido multimérico. Las tres repeticiones del primer epítopo están subrayadas.

Las **Figuras 3A** y **3B** muestran un polipéptido multimérico que comprende tres repeticiones de nueve epítopes peptídicos de la gripe dispuestos en una estructura polimérica secuencial alternante: (HA354-372---HA91-108---M1,2-12---HA150-159---HA143-149---NP206-229-HA307-319---NP335-350---NP380-393)<sub>3</sub>. (A) Secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 87) de la construcción usada para producir el polipéptido. (B) Secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 88) del polipéptido multimérico. Están subrayados los epítopes en la primera secuencia de nueve epítopes.

La **Figura 4** muestra la respuesta inmunitaria celular a varias cepas del virus de la gripe, de ratones vacunados

con dos vacunas multiméricas: n° 11 y n° 14. Se midió la respuesta inmunitaria celular a dos concentraciones diferentes de un virus estimulante y se muestra como el índice de proliferación para linfocitos incubados con un virus estimulante.

5 La **Figura 5** muestra el efecto protector de la vacuna multimérica n° 14 contra una dosis altamente letal de una cepa del virus de la gripe H3N2 adaptada al ratón (A/Texas/1/77). El efecto protector de la vacuna se demuestra por una reducción significativa en el título de virus en los pulmones de ratones vacunados en comparación con ratones de control (PBS).

10 Las **Figuras 6A y 6B** muestran la eficacia de varias vacunas multiméricas en proteger ratones de una exposición viral. El efecto protector de la vacuna multimérica n° 11, n° 12 y n° 14 se demuestra por una mayor tasa de supervivencia (Fig. 6A) de ratones vacunados en comparación con ratones de control (PBS), tras la infección con una dosis letal de una cepa del virus de la gripe H3N2 adaptada al ratón (A/Texas/1/77) y por una carga viral significativamente menor en los pulmones (Fig. 6B) de ratones vacunados en comparación con ratones de control (50 % de Gly/PBS).

15 La **Figura 7** compara la eficacia de inmunización de ratones con varias vacunas que comprenden construcciones multiméricas en 50 % de glicerol en PBS (n° 11, n° 12 y n° 14) o en emulsión con adyuvante incompleto de Freund (n° 11-IFA, n° 12-IFA y n° 14-IFA). El efecto protector de las diferentes vacunas y el efecto de IFA se miden por la tasa de supervivencia de ratones vacunados en comparación con ratones de control después de la exposición a la cepa del virus de la gripe H3N2 adaptada al ratón (A/Texas/1/77).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 La presente invención proporciona polipéptidos multiepitópicos multiméricos y vacunas basadas en estos polipéptidos, que comprenden una pluralidad de epítopes peptídicos del virus de la gripe como se define por las reivindicaciones. La presente invención también proporciona vacunas basadas en tales polipéptidos y usos de las mismas.

30 Los epítopes peptídicos derivados de proteínas de la gripe son útiles en preparar vacunas contra la gripe. Sin embargo, cada péptido solo es casi invisible para el sistema inmunitario, se degrada rápidamente y excita una respuesta inmunitaria insuficiente. Cuando múltiples copias de péptidos inmunogénicos se presentan al sistema inmunitario como polipéptido individual, se potencia la magnitud de la respuesta inmunitaria específica del epítope. Por ejemplo, vacunas basadas en una proteína de fusión de flagelina recombinante que contiene una única copia de un epítope peptídico de la gripe proporcionan una relación de epítope/flagelina de aproximadamente 1:28. Usando vacunas multiepitópicas, que contienen una pluralidad de epítopes en varias copias cada uno, puede obtenerse una relación de epítope/flagelina de hasta 2:1. La presente invención desvela polipéptidos multiepitópicos multiméricos con inmunogenicidad potenciada en comparación con las construcciones y configuraciones conocidas. Los polipéptidos contienen cada uno una pluralidad de epítopes, en los que cada epítope se repite en múltiples copias. Las múltiples copias o repeticiones de cada epítope pueden estar contiguas como un bloque de cada epítope. Alternativamente, la pluralidad de epítopes puede parecer una secuencia predeterminada en la que esta secuencia se repite varias veces dentro del polipéptido. Se ha mostrado ahora que ambas de estos tipos de configuraciones de los múltiples epítopes tienen inesperadamente resultados superiores que confieren inmunidad contra la gripe en un sujeto.

### Definiciones

Por conveniencia, ciertos términos empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones se describen en el presente documento.

50 El término "presentación de antígeno" significa la expresión del antígeno sobre la superficie de una célula en asociación con moléculas de clase I o clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I o MHC-II) de animales o con el HLA-I y HLA-II de seres humanos.

55 El término "inmunogenicidad" o "inmunogénico" se refiere a la capacidad de una sustancia para estimular o provocar una respuesta inmunitaria. La inmunogenicidad se mide, por ejemplo, determinando la presencia de anticuerpos específicos para la sustancia. La presencia de anticuerpos se detecta por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando un ensayo de ELISA.

60 Los epítopes de la gripe pueden clasificarse como tipo linfocito B, tipo linfocito T o tanto tipo linfocito B como linfocito T, dependiendo del tipo de respuesta inmunitaria que provoquen. La definición de epítope peptídico de linfocitos B o linfocitos T no es inequívoca; por ejemplo, un epítope peptídico puede inducir la producción de anticuerpos, pero al mismo tiempo ese epítope puede poseer una secuencia que permite la unión a la molécula de HA humana, haciéndola accesible a CTL, de ahí una clasificación doble de linfocito B y linfocito T para ese epítope particular. "CTL", "linfocitos T asesinos" o "linfocitos T citotóxicos" es un grupo de linfocitos T diferenciados que reconocen y lisan células diana que llevan un antígeno extraño específico que funciona en defensa contra infección viral y células

cancerosas. "Linfocito T colaborador" o "Th" es cualquiera de los linfocitos T que cuando se estimula por un antígeno específico libera citocinas que promueven la activación y función de linfocitos B y linfocitos T asesinos.

5 El término "proteína de fusión de flagelina recombinante" se refiere a un polipéptido de flagelina que comprende un epítipo peptídico o un polipéptido multiepitépico multimérico incorporado dentro de su secuencia, o alternativamente, a una porción de un polipéptido de flagelina fusionado con un epítipo peptídico o un polipéptido multiepitépico multimérico en tanto su extremo N como C.

10 "Secuencia de aminoácidos", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de oligopéptidos, péptidos, polipéptidos o de proteínas, y fragmento de la misma, y a moléculas que se producen naturalmente o sintéticas.

15 En la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, el término "espaciador" indica cualquier compuesto químico que puede estar presente en la secuencia de polipéptidos, en uno de los extremos o entre dos epítopes. Preferentemente, el espaciador consiste en 1-4 residuos de aminoácidos. El espaciador puede comprender una secuencia que puede escindirse por medios enzimáticos, o puede descomponerse espontáneamente. El espaciador puede imponer o inducir la beneficiosa conformación al polipéptido. El espaciador puede comprender opcionalmente una secuencia escindible específica de proteasa.

20 Epítopes peptídicos útiles en la preparación de una vacuna

Los epítopes peptídicos se derivan de proteínas de la gripe seleccionadas del grupo que consiste en HA, M1, M2 y NP. Los epítopes también pueden seleccionarse según su tipo: tipo linfocito B, tipo Th y tipo CTL.

25 Debe observarse que los epítopes peptídicos enumerados en el presente documento se proporcionan solo para fines a modo de ejemplo. Las proteínas del virus de la gripe varían entre cepas aisladas, proporcionando así múltiples secuencias de variante para cada proteína de la gripe. Por consiguiente, la presente divulgación engloba epítopes peptídicos que tienen una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos.

30 La proteína de la matriz M1 es un componente estructural importante de partículas del virus de la gripe y forma una capa interna de la envoltura derivada de células lipídicas. Dentro del virión y en células infectadas en estadios tardíos de la replicación del virus, la proteína M1 se asocia con las ribonucleoproteínas virales (RNPs), que están compuestas de moléculas de ARN viral, múltiples copias de las nucleoproteínas y las tres subunidades de la polimerasa viral que contienen los extremos de los ARN virales. El dominio del extremo N de M1 se refiere a los aminoácidos 1 a aproximadamente el aminoácido 20 de la proteína M1.

35 La proteína de la matriz M2 es un canal de iones hidrógeno que produce la disociación del complejo de matriz y nucleoproteína dentro de las vacuolas. Este canal de iones libera el genoma que posibilita que el ARN viral entre en el núcleo de la célula infectada e inicie la replicación viral. Sustancias terapéuticas contra la gripe, tales como amantadina y rimantadina, actúan bloqueando la actividad de M2. La gripe B tiene una proteína homóloga conocida como NB; aunque no hay similitud de secuencias entre M2 y NB, son ambas proteínas transmembrana y pueden compartir función similar. El dominio extracelular de la proteína M2, que es una proteína transmembrana del virus de la gripe A, es casi invariante en todas las cepas de gripe A. El dominio del extremo N de M2 se refiere al extremo N de la secuencia de aminoácidos con respecto al dominio transmembrana.

40 La Tabla 2 proporciona una lista a modo de ejemplo de epítopes peptídicos de M1 y M2 que pueden usarse para la preparación de polipéptidos multiméricos.

50

55

60

65

# ES 2 539 818 T3

Tabla 2. Epítopes peptídicos de M1 y M2

	Tipo de Epítopo	Residuos de proteína	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°:
5		M2 6-9	EVET	1
	Th	M21-15	MSLLTEVETHTRNGW	2
		M2 10-18	PIRNEWGCR	3
10		M2 8-15	ETPIRNEWGC	4
	M2 10-20	M2 10-20	PIRNEWGRCN	5
	CTL	M2 3-11	LLTEVETPI	6
15	CTL	M2 2-10	SLLTEVETP	7
	CTL	M2 2-11	SLLTEVETPI	8
	CTL	M2 4-11	LTEVETPLT	9
20	Th	M2 1-15	MSLLTEVETPIRNEW	10
	Th	M2 1-18	MSLLTEVETPIRNEWGCR	11
	Th	M2 1-15	MSLLTEVETLTNGW	12
25	Th	M21-15	MSLLTEVETLTRNGW	13
	CTL	M2 4-12	LTEVETPIR	14
	CTL	M2 4-13	LTEVETPIRN	15
30	CTL	M2 6-14	EVETPIRNE	16
	CTL	M2 6-15	EVETPIRNEW	17
	CTL	M2 4-14	LTEVETPIRNE	18
35	Th	M2 4-18	LTEVETPIRNEWGCR	19
	B cell	M2 6-13	EVETPIRN	20
	B cell	M2 1-18	MSLLTEVETPTRNEWECR	21
40	B cell	M2 2-24	SLLTEVETPTRNEWECRCDSSD	22
	B cell	M2 2-24	SLLTEVETPIRNEWGRCRNDSSD	23
	B cell	M2 7-15	VETPIRNEW	24
45	B cell	M1 2-12	SLLTEVETYVL	25
	CTL	M1 2-12	SLLTEVETYVP	26
	CTL	M1 3-11	LLTEVETYV	27
50	CTL	M1 13-21	SIVPSGPL	28
	CTL	M1 17-31	SGPLKAEIAQRLEDV	29
	CTL	M1 18-29	GPLKAEIAQRLE	30
55	CTL	M1 27-35	RLEDVFAGK	31
	CTL	M1 41-51	ALMEWLKTRPI	32
	CTL	M1 50-59	PILSPLTKGI	33
60	CTL	M1 51-59	ILSPLTKGI	34
	CTL	M1 55-73	LTKGILGFVFTLTVPSERG	35
	CTL	M1 56-68	TKGILGFVFTLTV	36
65	TL	M1 57-68	KGILGFVFTLTV	37



5  
10  
15  
20

Tipo de Epítipo	Residuo de proteína	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°:
CTL	M1 58-66	GILGFVFTL	38
CTL	M1 60-68	LGFVFTLTV	39
CTL	M1 59-67	ILGFVFTLT	40
TL	M1 128-135	ASCMGLIY	41
CTL	M1 134-142	RMGAVTTEV	42
CTL	M1 145-155	GLVCATCEQIA	43
CTL	M1 164-172	QMVATTNPL	44
CTL	M1 164-173	QMVATTNPLI	45
CTL	M1 178-187	RMVLASTTAK	46
CTL	M1 232-240	DLLLENLQTY	47

25  
30  
35

La nucleoproteína (NP) es uno de los grupos de antígenos específicos, que distingue entre los virus de la gripe A, B y C. A diferencia de la HA, la NP está altamente conservada, estando el 94 % conservada en todos los virus de la gripe A. El anticuerpo específico para NP del virus de la gripe A no tiene actividad neutralizante de virus, pero NP es una diana importante para linfocitos T citotóxicos (CTL) que son reactivos de forma cruzada con todos los virus de tipo A (Townsend, J Exp Med 1984 160(2):552-63). Los CTL reconocen péptidos sintéticos cortos correspondientes a regiones lineales de la molécula NP de la gripe.

La hemaglutinina (HA) es un trímero de glucoproteína incorporado en la envoltura de la gripe. Es responsable de la unión y penetración del virus en la célula huésped. Los anticuerpos para la HA neutralizan la infectividad viral. Las variaciones antigénicas de esta molécula son responsables de los frecuentes brotes de gripe y del mal control de la infección por la inmunización (Ada y Jones, Curr Top Microbial Immunol 1986;128:1-54).

La ARN polimerasa del virus de la gripe es un heterocomplejo compuesto de las tres proteínas de polimerasa (P) PB1, PB2 y PA presentes en una relación 1:1:1. No se ha aclarado completamente su función en la virulencia de la gripe. Ejemplos no limitantes de epítipes peptídicos HA, NP, PB1 y PB2 se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 3: Epítipe peptídicos HA, NP y PB.

40  
45  
50  
55  
60  
65

Tipo de Epítipo	Residuos de proteína	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°:
B célula	HA 91-108	SKAYSNCYPYDVPDYASL	48
B célula	HA 91-108	SKAFSNCYPYDVPDYASL	49
B célula	HA 107-124	STAYSNCYPYDVPDYASL	50
B célula	HA 143-149	WTGVTQN	51
B célula	HA 150-159	WLTGKNGLYP	52
B célula	HA 166-175	WLTEKEGSYP	53
Th	HA 306-324	PKYVKQNTLKLATGMRNVP	54
CTL	HA 521-531	GVKLESMGIYQ	55
CTL	HA 518-528	EISGVKLESMG	56
CTL	HA 458-467	NVKNLYEKVK	57
Th	HA 128-145	KVKILPKDRWTQHHTTGG	58
Th	HA 307-319	PKYVKQNTLKLAT	59
Th	NP 91-99	KTGGPIYRR	60
CTL	NP 44-52	CTELKLSDY	61
CTL	NP 82-95	HPSAGKDPKKTGGP	62

Tipo de Epítipo	Residuo de proteína	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°:
CTL	NP 82-94	HPSAGKDPKKTGG	63
Th	NP 206-229	FWRGENGRKTRSAYERMCNILKGGK	64
CTL	NP 265-273	ILRGSVAHK	65
CTL	NP 305-313	KLLQNSQVY	66
CTL	NP 335-349	SAAFEDLRVLSFIRG	67
CTL	NP 335-350	SAAFEDLRVSSFIRGT	68
CTL	NP 335-350	SAAFEDLRVLSFIRGY	69
CTL	NP380-393	ELRSRYWAIRTRSG	70
CTL	NP 380-388	ELRSRYWAI	71
CTL	NP 383-391	SRYWAIRTR	72
CTL	NP 384-394	YWAIRTRSGG	73
CTL	NP 382-390	SRYWAIRTR	74
CTL	NP 418-426	LFPDKPTIM	75
CTL	PB1 591-599	VSDGGPNLY	76
CTL	PB1 571-579	RRSFELKKL	77
CTL	PB2 368-376	RRATAILRK	78
CTL(gripe B)	NP 30-38	RPIIRPATL	79
CTL(gripe B)	NP 263-271	ADRGLLRDI	80
Th (gripe B)	HA 308-320	PYYTGEHAKAIGN	81
B (gripe B)	HA 354-372	PAKLLKERGFFGAIAGFLE	82

#### Moléculas quiméricas o recombinantes

“Proteína quimérica”, “polipéptido quimérico” o “proteína recombinante” se usan indistintamente y se refieren a un polipéptido multimérico de la gripe operativamente ligado a un polipéptido distinto del polipéptido del que se derivó el epítipo peptídico. Los polipéptidos multiepitópicos multiméricos pueden prepararse por expresión en un vector de expresión por sí mismo o como una proteína quimérica. Los métodos para producir una proteína quimérica o recombinante que comprende uno o más epítipes peptídicos de la gripe son conocidos para aquellos expertos en la materia. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica uno o más epítipes peptídicos de la gripe puede insertarse en un vector de expresión para la preparación de una construcción de polinucleótido para la propagación y expresión en células huésped. Una construcción de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que comprende múltiples repeticiones de varios epítipes, tales como un polipéptido multiepitópico multimérico, puede prepararse por ligación de construcciones de polinucleótidos más pequeñas que llevan sitios de restricción apropiados en sus extremos 3' y 5'.

En un ejemplo no limitante, el polipéptido quimérico puede incluir quimeras de un epítipo peptídico de la gripe con uno de los siguientes polipéptidos: flagelina, toxina del cólera, toxina del tétanos, ovoalbúmina, proteína de choque térmico de la tuberculosis, toxoide diftérico, proteína G del virus respiratorio sincitial, proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*, nucleoproteína del virus de la estomatitis vesicular, glucoproteína del virus de la estomatitis vesicular, proteína rica en glutamato del antígeno de *Plasmodium falciparum*, proteína 3 de la superficie de merozoítos o proteína de la envuelta de virus.

El término “vector de expresión” y “vector de expresión recombinante”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ADN, por ejemplo, un plásmido, flagelina o virus, que contiene secuencias de ácidos nucleicos deseadas y apropiadas necesarias para la expresión de epítipes peptídicos recombinantes para la expresión en una célula huésped particular. Como se usa en el presente documento, “operativamente ligado” se refiere a un enlace funcional de al menos dos secuencias. Operativamente ligado incluye enlace entre un promotor y una segunda secuencia, por ejemplo, un ácido nucleico de la presente invención, en el que la secuencia promotora inicia y media en la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia.

Las regiones reguladoras necesarias para la transcripción de los epítopes peptídicos pueden proporcionarse por el vector de expresión. La naturaleza precisa de las regiones reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar entre vectores y células huésped. Generalmente, se requiere un promotor que puede unir ARN polimerasa y promover la transcripción de una secuencia de ácidos nucleicos operativamente asociada. Las regiones reguladoras pueden incluir aquellas secuencias no codificantes de 5' que participan con iniciación y traducción de la transcripción, tales como la caja TATA, secuencia de encapuchado, secuencia CAAT y similares. La región no codificante 3' con respecto a la secuencia codificante puede contener secuencias reguladoras de la terminación transcripcional, tales como terminadores y sitios de poliadenilación. También puede proporcionarse un codón de iniciación de la traducción (ATG).

Con el fin de clonar las secuencias de ácidos nucleicos en el sitio de clonación de un vector, se añaden conectores o adaptadores que proporcionan los sitios de restricción compatibles apropiados durante la síntesis de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, puede introducirse un sitio de enzima de restricción adecuado en un fragmento de ADN por amplificación del ADN por uso de PCR con cebadores que contienen el sitio de enzima de restricción deseado.

Una construcción de expresión que comprende una secuencia de epítipo peptídico operativamente asociada a regiones reguladoras puede introducirse directamente en células huésped apropiadas para la expresión y producción del polipéptido multiepitópico multimérico por sí mismo o como proteínas de fusión recombinantes. Los vectores de expresión que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, cósmidos, fago, fagémidos, flagelina o virus modificados. Normalmente, tales vectores de expresión comprenden un origen funcional de replicación para la propagación del vector en una célula huésped apropiada, uno o más sitios de endonucleasa de restricción para la inserción de la secuencia de genes deseada y uno o más marcadores de selección.

La construcción de polinucleótidos recombinante que comprende el vector de expresión y un polipéptido multimérico debe entonces transferirse a una célula huésped bacteriana en la que puede replicarse y expresarse. Esto puede llevarse a cabo por métodos conocidos en la técnica. El vector de expresión se usa con una célula huésped procarionta o eucariota compatible que puede derivarse de bacteria, levadura, insectos, mamíferos y seres humanos.

Según un ejemplo no limitante, el vector de expresión es un vector de flagelina, por ejemplo, como se desvela en el documento US 6.130.082. El vector plasmídico puede contener el gen flagelina *fliC* con sitios de restricción únicos, en los que el polipéptido multimérico se inserta dentro de la región hipervariable de la flagelina y la proteína de fusión de flagelina recombinante que contiene el polipéptido multiepitópico se expresa en *Salmonella* o *E. coli* mutante deficiente en flagelos. Las células huésped que expresan la proteína de fusión de flagelina recombinante pueden formularse como vacunas vivas.

#### Producción del polipéptido multimérico

Una vez expresado por la célula huésped, el polipéptido multimérico puede separarse de componentes no deseados por varios métodos de purificación de proteínas. Un método tal usa una marca de polihistidina sobre la proteína recombinante. Una marca de polihistidina consiste en al menos seis residuos de histidina (His) añadidos a una proteína recombinante, frecuentemente en el extremo N o C. Las marcas de polihistidina se usan frecuentemente para purificación por afinidad de proteínas recombinantes marcadas con polihistidina que se expresan en *E. coli* u otros sistemas de expresión procariontas. Las células bacterianas se recogen por centrifugación y el sedimento de células resultante puede lisarse por medios físicos o con detergentes o enzimas tales como lisozima. El lisado en bruto contiene en esta etapa la proteína recombinante entre varias otras proteínas derivadas de las bacterias y se incuban con medios de afinidad tales como NTA-agarosa, resina HisPur o resina Talon. Estos medios de afinidad contienen iones metálicos unidos, bien níquel o cobalto, con los que la marca de polihistidina se une con afinidad micromolar. Entonces, la resina se lava con tampón fosfato para eliminar proteínas que no interactúan específicamente con el ión cobalto o níquel. La eficiencia de lavado puede mejorarse mediante la adición de imidazol 20 mM y entonces las proteínas se eluyen normalmente con imidazol 150-300 mM. La marca de polihistidina puede eliminarse posteriormente usando enzimas de restricción, endoproteasas o exoproteasas. Pueden comprarse kits para la purificación de proteínas marcadas con histidina, por ejemplo, de Qiagen.

Otro método es mediante la producción de cuerpos de inclusión, que son agregados inactivos de proteína que pueden formarse cuando un polipéptido recombinante se expresa en un procarionta. Mientras que el ADNc puede codificar apropiadamente un ARNm traducible, la proteína que resulta puede no plegarse correctamente, o la hidrofobia de los epítipes peptídicos añadidos puede hacer que el polipéptido recombinante se vuelva insoluble. Los cuerpos de inclusión se purifican fácilmente por métodos muy conocidos en la técnica. Se conocen en la técnica diversos procedimientos para la purificación de cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión pueden recuperarse de lisados bacterianos por centrifugación y se lavan con detergentes y agentes quelantes para eliminar tanta proteína bacteriana como sea posible de la proteína recombinante agregada. Para obtener proteína soluble, los cuerpos de inclusión lavados se disuelven en agentes desnaturizantes y la proteína liberada se vuelve a plegar entonces por eliminación gradual de los reactivos desnaturizantes por dilución o diálisis (como se describe, por ejemplo, en Molecular cloning: a laboratory manual, 3ª edición, Sambrook, J. y Russell, D. W., 2001; CSHL Press).

Alternativamente, la proteína de fusión de flagelina recombinante retiene la capacidad para formar flagelos intactos. Se conocen en la materia diversos procedimientos para la purificación de los flagelos intactos. Las moléculas de flagelina recombinantes expresadas por una cepa inmóvil deficiente en flagelina parental de bacterias producen flagelos funcionales.

5

#### Formulación de vacuna

Las vacunas de la presente invención comprenden un polipéptido multiepitópico y opcionalmente un adyuvante. La vacuna puede formularse para administración en uno de muchos modos diferentes. Según una realización de la divulgación, la vacuna se administra intranasalmente. La formulación de vacuna puede aplicarse al tejido linfático de la nariz de cualquier manera conveniente. Sin embargo, se prefiere aplicarla como una corriente líquida o gotitas líquidas a las paredes de la fosa nasal. La composición intranasal puede formularse, por ejemplo, en forma líquida como gotas nasales, espray, o adecuada para inhalación, como polvo, como crema o como emulsión. La composición puede contener una variedad de aditivos, tales como adyuvante, excipiente, estabilizadores, tampones o conservantes.

Para aplicación directa, la composición de vacuna se suministra preferentemente en un recipiente apropiado para distribución del polipéptido o proteína de fusión recombinante en forma de gotas nasales o un aerosol. En ciertas realizaciones preferidas, la vacuna se formula para administración a la mucosa, en particular administración nasal (Arnon y col., *Biologicals*. 2001; 29(3-4):237-42; Ben-Yedidia y col., *Int Immunol*. 1999; 11(7):1043-51).

En otra realización de la divulgación, la administración es oral y la vacuna puede presentarse, por ejemplo, en forma de un comprimido o revestida en una cápsula de gelatina o una microcápsula.

En otra realización más, la vacuna se formula para administración parenteral. En algunas realizaciones, la vacuna se formula para la inoculación masiva, por ejemplo, para su uso con un inyector de chorro o un cartucho de un solo uso. Según todavía otra realización, la administración es intramuscular.

Según otra realización más, la administración es intradérmica. Se conocen en la técnica agujas específicamente diseñadas para depositar la vacuna intradérmicamente como se desvela, por ejemplo, en los documentos 6.843.781 y 7.250.036, entre otros. Según otras realizaciones, la administración se realiza con un inyector sin aguja.

La formulación de estas modalidades es conocimiento general para aquellos expertos en la materia.

Los liposomas proporcionan otro sistema de administración para administración y presentación de antígenos. Los liposomas son vesículas bicapa compuestas de fosfolípidos y otros esteroides que rodean un centro normalmente acuoso en el que los antígenos u otros productos pueden estar encapsulados. La estructura del liposoma es altamente versátil con muchos tipos que oscilan en tamaños de nanómetros a micrómetros, de aproximadamente 25 nm a aproximadamente 500  $\mu$ m. Se ha encontrado que los liposomas son eficaces en administrar agentes terapéuticos a superficies dérmicas y de la mucosa. Los liposomas pueden modificarse adicionalmente para administración elegida como diana, por ejemplo, incorporando anticuerpos específicos en la membrana superficial, o alterarse para encapsular bacterias, virus o parásitos. El tiempo de supervivencia promedio o la semivida de la estructura intacta del liposoma puede prolongarse con la inclusión de ciertos polímeros, por ejemplo, polietilenglicol, permitiendo la liberación prolongada *in vivo*. Los liposomas pueden ser unilaminares o multilaminares.

La composición de vacuna puede formularse: encapsulando un antígeno o un complejo de antígeno/adyuvante en liposomas para formar antígeno encapsulado en liposoma y mezclar el antígeno encapsulado en liposoma con un vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba. Si no se usa un complejo de antígeno/adyuvante en la primera etapa, puede añadirse un adyuvante adecuado al antígeno encapsulado en liposoma, a la mezcla de antígeno encapsulado en liposoma y vehículo, o al vehículo antes de que el vehículo se mezcle con el antígeno encapsulado en liposoma. El orden del proceso puede depender del tipo de adyuvante usado. Normalmente, si se usa un adyuvante como alumbre, el adyuvante y el antígeno se mezclan primero para formar un complejo de antígeno/adyuvante, seguido de encapsulación del complejo de antígeno/adyuvante con liposomas. El antígeno encapsulado en liposoma resultante se mezcla entonces con el vehículo. El término "antígeno encapsulado en liposoma" puede referirse a la encapsulación del antígeno solo o a la encapsulación del complejo de antígeno/adyuvante dependiendo del contexto. Esto promueve el íntimo contacto entre el adyuvante y el antígeno y puede explicar, al menos en parte, la respuesta inmunitaria cuando se usa alumbre como adyuvante. Si se usa otro, el antígeno puede encapsularse primero en liposomas y el antígeno encapsulado en liposoma resultante se mezcla entonces en el adyuvante en una sustancia hidrófoba.

En la formulación de una composición de vacuna que está sustancialmente libre de agua, el antígeno o complejo de antígeno/adyuvante se encapsula con liposomas y se mezcla con una sustancia hidrófoba. En la formulación de una vacuna en una emulsión de agua en una sustancia hidrófoba, el antígeno o complejo de antígeno/adyuvante se encapsula con liposomas en un medio acuoso seguido de mezcla del medio acuoso con una sustancia hidrófoba. En el caso de la emulsión, para mantener la sustancia hidrófoba en la fase continua, el medio acuoso que contiene los liposomas puede añadirse en alícuotas con mezcla a la sustancia hidrófoba.

En todos los métodos de formulación, el antígeno encapsulado en liposoma puede liofilizarse antes de mezclarse con la sustancia hidrófoba o con el medio acuoso según lo requiera el caso. En algunos casos, un complejo de antígeno/adyuvante puede encapsularse por liposomas seguido de liofilización. En otros casos, el antígeno puede encapsularse por liposomas, seguido de la adición de adyuvante, luego liofilización para formar un antígeno liofilizado encapsulado en liposoma con adyuvante externo. En otro caso más, el antígeno puede encapsularse por liposomas seguido de liofilización antes de la adición de adyuvante. La liofilización puede promover la mejor interacción entre el adyuvante y el antígeno, produciendo una vacuna más eficaz.

La formulación del antígeno encapsulado en liposoma en una sustancia hidrófoba también puede implicar el uso de un emulsionante para promover la distribución más uniforme de los liposomas en la sustancia hidrófoba. Emulsionantes típicos son muy conocidos en la técnica e incluyen oleato de manida (Arlacel™ A), lecitina, Tween™ 80, Spans™ 20, 80, 83 y 85. El emulsionante se usa en una cantidad eficaz para promover la distribución uniforme de los liposomas. Normalmente, la relación de volumen (v/v) de sustancia hidrófoba con respecto a emulsionante está en el intervalo de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1.

Micropartículas y nanopartículas emplean pequeñas esferas biodegradables que actúan de depósitos para la administración de vacunas. La principal ventaja que poseen las microesferas de polímero con respecto a otros adyuvantes de efecto depósito es que son extremadamente seguras y han sido autorizadas por la Agencia Estadounidense del Medicamento para su uso en medicina humana como suturas adecuadas y para su uso como sistema de administración de fármacos biodegradable (Langer R. Science. 1990; 249(4976):1527-33). Las tasas de hidrólisis del copolímero están muy bien caracterizadas, que a su vez permite la fabricación de micropartículas con liberación de antígeno sostenida durante periodos de tiempo prolongados (O'Hagen, y col., Vaccine. 1993;11(9):965-9).

La administración parenteral de micropartículas provoca inmunidad a largo plazo, especialmente si incorporan características de liberación prolongada. La tasa de liberación puede modularse por la mezcla de polímeros y sus pesos moleculares relativos, que se hidrolizarán durante periodos de tiempo variables. Sin desear quedar ligado a teoría, la formulación de partículas de diferentes tamaños (1 µm a 200 µm) puede también contribuir a respuestas inmunológicas de larga duración, ya que grandes partículas deben romperse en partículas más pequeñas antes de estar disponibles para la captación por macrófagos. De este modo podría desarrollarse una vacuna de una sola inyección que integra diversos tamaños de partícula, prolongando así la presentación del antígeno y beneficiando enormemente a los productores de ganado.

En algunas aplicaciones, un adyuvante o excipiente puede incluirse en la formulación de vacuna. Montanide™ (adyuvante incompleto de Freund) y alumbre, por ejemplo, son adyuvantes preferidos para uso humano. La elección del adyuvante se determinará en parte por el modo de administración de la vacuna. Por ejemplo, la vacunación no inyectada conducirá a un mejor cumplimiento global y menores costes globales. Un modo de administración preferido es la administración intramuscular. Otro modo de administración preferido es la administración intranasal. Ejemplos no limitantes de adyuvantes intranasales incluyen polvo de quitosano, microesferas de PLA y PLG, QS-21, nanopartículas de fosfato de calcio (CAP) y mCTA/LTB (toxina del cólera mutante E112K con la subunidad pentamérica B de enterotoxina lábil al calor).

El adyuvante usado también puede ser, teóricamente, cualquiera de los adyuvantes conocidos para vacunas basadas en péptidos o proteínas. Por ejemplo: adyuvantes inorgánicos en forma de gel (hidróxido de aluminio/fosfato de aluminio, Warren y col., 1986; fosfato de calcio, Relyvelt, 1986); adyuvantes bacterianos tales como monofosforil lípido A (Ribi, 1984; Baker y col., 1988) y muramil péptidos (Ellouz y col., 1974; Allison y Byars, 1991; Waters y col., 1986); adyuvantes en partículas tales como los llamados ISCOM ("complejos inmunoestimulantes", Mowat y Donachie, 1991; Takahashi y col., 1990; Thapar y col., 1991), liposomas (Mbawuiké y col. 1990; Abraham, 1992; Phillips y Emili, 1992; Gregoriadis, 1990) y microesferas biodegradables (Marx y col., 1993); adyuvantes basados en emulsiones y emulsionantes de aceite tales como IFA ("adyuvante incompleto de Freund" (Stuart-Harris, 1969; Warren y col., 1986), SAF (Allison y Byars, 1991), saponinas (tales como QS-21; Newman y col., 1992), escualeno/escualano (Allison y Byars, 1991); adyuvantes sintéticos tales como copolímeros de bloques no iónicos (Hunter y col., 1991), análogos de muramil péptidos (Azuma, 1992), lípido A sintético (Warren y col., 1986; Azuma, 1992), polinucleótidos sintéticos (Harrington y col., 1978) y adyuvantes policatiónicos (documento WO 97/30721).

Adyuvantes para su uso con inmunógenos de la presente invención incluyen sales de aluminio o de calcio (por ejemplo, hidróxido o sales de fosfato). Un adyuvante particularmente preferido para su uso en el presente documento es un gel de hidróxido de aluminio tal como Alhydrogel™. Las nanopartículas de fosfato de calcio (CAP) es un adyuvante desarrollado por Biosante, Inc (Lincolnshire, Ill.). El inmunogén de interés puede estar tanto recubierto en el exterior de las partículas como encapsulado dentro del interior [He y col. (November 2000) Clin. Diagn. Lab. Immunol., 7(6):899-903].

Otro adyuvante para su uso con un inmunogén de la presente invención es una emulsión. Una emulsión contemplada puede ser una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite. Además de las partículas

de proteínas quiméricas inmunogénicas, tales emulsiones comprenden una fase de aceite de escualeno, escualano, aceite de cacahuete o similares como es muy conocido, y un agente dispersante. Se prefieren agentes dispersantes no iónicos y tales materiales incluyen mono- y di-ésteres de ácidos grasos C<sub>12</sub>-C<sub>24</sub> de sorbitano y manida tales como mono-estearato de sorbitano, mono-oleato de sorbitano y mono-oleato de manida.

Tales emulsiones son, por ejemplo, emulsiones de agua en aceite que comprenden escualeno, glicerol y un tensioactivo tal como mono-oleato de manida (Arlacel™ A), opcionalmente con escualano, emulsionadas con las partículas de proteínas quiméricas en una fase acuosa. Componentes alternativos de la fase acuosa incluyen alfa-tocoferol, di- y triglicéridos de cadena mixta y ésteres de sorbitano. Ejemplos muy conocidos de tales emulsiones incluyen Montanide™ ISA-720 y Montanide™ ISA 703 (Seppic, Castres, Francia). Otros adyuvantes de emulsión de aceite en agua incluyen los desvelados en los documentos WO 95/17210 y EP 0 399 843.

También se contempla el uso de adyuvantes de molécula pequeña en el presente documento. Un tipo de adyuvante de molécula pequeña útil en el presente documento es un derivado de 7-sustituido-8-oxo- u 8-sulfo-guanosina descrito en la patente de EE.UU. n° 4.539.205, la patente de EE.UU. n° 4.643.992, la patente de EE.UU. n° 5.011.828 y la patente de EE.UU. n° 5.093.318. Se ha mostrado que la 7-alil-8-oxoguanosina (loxoribina) es particularmente eficaz en inducir una respuesta específica de antígeno-(inmunógen).

Un adyuvante útil incluye monofosforil lípido A (MPL®), 3-desacil monofosforil lípido A (3D-MPL®), un adyuvante muy conocido fabricado por Corixa Corp. de Seattle, antiguamente Ribi Immunochem, Hamilton, Mont. El adyuvante contiene tres componentes extraídos de bacterias: monofosforil lípido (MPL) A, trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS) (MPL+TDM+CWS) en una emulsión al 2 % de escualeno/Tween™ 80. Este adyuvante puede prepararse por los métodos enseñados en el documento GB 2122204B.

Otros compuestos están estructuralmente relacionados con el adyuvante MPL® llamados fosfatos de aminoalquilglucosamida (AGP) tales como aquellos disponibles de Corixa Corp. bajo la designación adyuvante RC-529™ {2-[(R)-3-tetra-decanoiloxitetradecanoilamino]-etil-2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetra-decanoiloxitetradecanoil-amino]-p-D-glucopiranosido de sal de trietilamonio}. Un adyuvante RC-529 está disponible en una emulsión de escualeno comercializada como RC-529SE y en una formulación acuosa como RC-529AF disponible de Corixa Corp. (véase la patente de EE.UU. n° 6.355.257 y la patente de EE.UU. n° 6.303.347; la patente de EE.UU. n° 6.113.918; y la publicación de EE.UU. n° 03-0092643).

Otros adyuvantes contemplados incluyen adyuvantes de oligonucleótidos sintéticos que contienen el motivo de nucleótido CpG una o más veces (más secuencias flanqueantes) disponible de Coley Pharmaceutical Group. El adyuvante designado QS21, disponible de Aquila Biopharmaceuticals, Inc., es una fracción de saponina inmunológicamente activa que tiene actividad de adyuvante derivada de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina (por ejemplo, Quil™ A), y el método de su producción se desvela en la patente de EE.UU. n° 5.057.540. También se desvelan derivados de Quil™ A, por ejemplo, QS21 (una fracción purificada por HPLC derivada de Quil™ A también conocida como QA21), y otras fracciones tales como QA17. También son útiles derivados semi-sintéticos y sintéticos de saponinas de Quillaja Saponaria Molina, tales como aquellos descritos en la patente de EE.UU. n° 5.977.081 y la patente de EE.UU. n° 6.080.725. El adyuvante denominado MF59 disponible de Chiron Corp. se describe en la patente de EE.UU. n° 5.709.879 y la patente de EE.UU. n° 6.086.901.

También se contemplan adyuvantes de muramil dipéptido e incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thur-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina [CGP 11637, denominado nor-MDP] y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmidadol-s-n-glicero-3-hidroxifosforiloxi)etilamina [(CGP) 1983A, denominado MTP-PE]. Los llamados análogos de muramil dipéptido se describen en la patente de EE.UU. n° 4.767.842.

Otras mezclas de adyuvantes incluyen combinaciones de 3D-MPL y QS21 (documento EP 0 671 948 B1), emulsiones de aceite en agua que comprenden 3D-MPL y QS21 (documentos WO 95/17210, PCT/EP98/05714), 3D-MPL formulado con otros vehículos (documento EP 0 689 454 B1), QS21 formulado en liposomas que contienen colesterol (documento WO 96/33739) u oligonucleótidos inmunoestimulantes (documento WO 96/02555). También es útil el adyuvante SBAS2 (ahora ASO2) disponible de SKB (ahora Glaxo-SmithKline) que contiene QS21 y MPL en una emulsión de aceite en agua. Adyuvantes alternativos incluyen aquellos descritos en el documento WO 99/52549 y suspensiones no en partículas de polioxietilén éter (solicitud de patente de RU n° 9807805.8).

También es opcional el uso de un adyuvante que contiene uno o más agonistas para el receptor 4 similar a Toll (TLR-4) tal como un adyuvante MPL® o un compuesto estructuralmente relacionado tal como un adyuvante RC-529® o un mimético del lípido A, solo o junto con un agonista para TLR-9 tal como un oligodesoxinucleótido no metilado que contiene el motivo CpG.

Otro tipo de mezcla de adyuvantes comprende una emulsión de agua en aceite estable que contiene adicionalmente fosfatos de aminoalquilglucosamina tal como se describen en la patente de EE.UU. n° 6.113.918. De los fosfatos de aminoalquilglucosamina, la molécula conocida como RC-529 {sal de trietilamonio de 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxi-tetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-p-D-glucopiranosido de (2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etilo)} es la más preferida. Una emulsión de agua en aceite preferida se describe

en el documento WO 9956776.

Los adyuvantes se utilizan en una cantidad de adyuvante que puede variar con el adyuvante, animal huésped e inmunogén. Cantidades típicas pueden variar de aproximadamente 1 mcg a aproximadamente 1 mg por inmunización. Aquellos expertos en la materia saben que pueden determinarse fácilmente concentraciones o cantidades apropiadas.

Las composiciones de vacuna que comprenden un adyuvante basado en emulsión de aceite en agua también se incluyen dentro del alcance de la presente invención. La emulsión de agua en aceite puede comprender un aceite metabolizable y una saponina, tal como, por ejemplo, como se describe en el documento US 7.323.182. El aceite y una saponina están presentes, por ejemplo, en una relación de entre 1:1 y 200:1.

Según varias realizaciones, las composiciones de vacuna según la presente invención pueden contener uno o más adyuvantes, caracterizados porque está presente como una disolución o emulsión que está sustancialmente libre de iones de sal inorgánica, en las que dicha disolución o emulsión contiene una o más sustancias solubles en agua o emulsionables en agua que pueden hacer la vacuna isotónica o hipotónica. Las sustancias solubles en agua o emulsionables en agua pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en: maltosa; fructosa; galactosa; sacarosa; alcohol de azúcar; lípido; y combinaciones de los mismos.

Las formulaciones de la presente invención pueden comprender opcionalmente un agente que potencia la administración a la mucosa tal como, por ejemplo, un péptido permeabilizante que potencia reversiblemente el transporte paracelular epitelial a la mucosa modulando la estructura y/o fisiología de la unión epitelial, como se describe en el documento US 2004/0077540.

Los polipéptidos multiepitópicos multiméricos de la presente invención pueden comprender según varias realizaciones específicas un adyuvante de proteosoma. El adyuvante de proteosoma comprende una preparación purificada de proteínas de la membrana externa de meningococos y preparaciones similares de otras bacterias. Estas proteínas son altamente hidrófobas, reflejando su función como proteínas transmembrana y purinas. Debido a sus interacciones hidrófobas proteína-proteína, cuando se aíslan apropiadamente, las proteínas forman estructuras multimoleculares que consisten en vesículas de la membrana completas o fragmentadas de aproximadamente 60-100 nm de diámetro. Este estado físico similar al liposoma permite actuar al adyuvante de proteosoma de vehículo de proteína y también actuar de adyuvante.

El uso de adyuvante de proteosoma se ha descrito en el estado de la técnica y se revisa por Lowell GH en "New Generation Vaccines", segunda edición, Marcel Dekker Inc, New York, Basel, Hong Kong (1997) páginas 193-206. Las vesículas de adyuvante de proteosoma se describen como de tamaño comparable a ciertos virus que son hidrófobos y seguros para uso humano. La revisión describe la formulación de composiciones que comprenden complejos no covalentes entre diversos antígenos y vesículas de adyuvante de proteosoma que se forman cuando el detergente solubilizante se elimina de forma seleccionable usando una exhaustiva tecnología de diálisis.

Los polipéptidos de la presente invención se complejan opcionalmente con las vesículas de antígeno de proteosoma mediante restos hidrófobos. Por ejemplo, un antígeno está conjugado con un resto de lípido tal como un grupo acilo graso. Un resto hidrófobo tal puede enlazarse directamente al polipéptido multimérico o, alternativamente, un espaciador corto, por ejemplo, de uno, dos, tres o cuatro, hasta seis o diez aminoácidos, puede usarse para enlazar el polipéptido multimérico al grupo graso. Este anclaje hidrófobo interacciona con la membrana hidrófoba de las vesículas de adyuvante de proteosoma, mientras que presenta el péptido antigénico generalmente hidrófilo.

En particular, un anclaje hidrófobo puede comprender un grupo acilo graso unido al extremo amino o próximo al extremo carboxilo del polipéptido multimérico. Un ejemplo es la cadena de doce carbonos lauroilo ( $\text{CH}_3(\text{CH}_{10})\text{CO}$ ), aunque cualquier grupo acilo graso que sirve similarmente que incluye, pero no se limita a, grupos acilo que tienen longitudes de cadena de ocho, diez, catorce, dieciséis, dieciocho o veinte carbonos también puede servir de anclajes hidrófobos. El anclaje puede ligarse al antígeno de péptido usando un espaciador inmunopotenciador. Un conector tal puede consistir en 1-10 aminoácidos, que pueden ayudar en el mantenimiento de la estructura conformacional del péptido.

Los dos componentes, es decir, el polipéptido multimérico y el adyuvante de proteosoma, pueden formularse mezclando los componentes en una disolución seleccionada de detergente(s) y eliminando luego el (los) detergente(s) por métodos de diafiltración/ultrafiltración. En general, la relación de adyuvante de proteosoma con respecto a polipéptido multimérico contenido en la composición es preferentemente superior a 1:1 y puede ser, por ejemplo, 1:2, 1:3, 1:4 hasta 1:5, 1:10 ó 1:20 (en peso). Las disoluciones basadas en detergente de los dos componentes pueden contener el mismo detergente o detergentes diferentes y más de un detergente puede estar presente en la mezcla sometida a ultrafiltración/diafiltración. Detergentes adecuados incluyen Triton, Empigen y Mega-10. También pueden usarse otros detergentes adecuados. Los detergentes sirven para solubilizar los componentes usados para preparar la composición.

Pueden producirse vacunas que comprenden diferentes polipéptidos multiméricos mezclando varios péptidos

antigénicos diferentes con adyuvante de proteosoma. Alternativamente, pueden producirse dos o más composiciones de adyuvante de proteosoma / péptido antigénico y mezclarse posteriormente.

5 Mientras que las vacunas contra la gripe comerciales que se producen en huevos inducen alergia en individuos que son sensibles a los huevos de gallina, la vacuna multimérica no provocó tales respuestas como se manifestó por el título de IgE antes y después de la inmunización.

10 El contenido de antígeno se define mejor por el efecto biológico que provoca. Naturalmente, debe estar presente antígeno suficiente para provocar la producción de cantidades medibles de anticuerpo protector. Una prueba conveniente para la actividad biológica de virus implica la capacidad del material antigénico que se somete a prueba para agotar un antisuero positivo conocido de su anticuerpo protector. El resultado se informa en el logaritmo negativo de la dosis  $DL_{50}$  (dosis letal, 50 %) para ratones tratados con organismos virulentos que se pretratan con un antisuero conocido que por sí mismo se pretrató con diversas diluciones del material antigénico que se evalúa. Por tanto, un alto valor refleja un alto contenido de material antigénico que ha ocupado los anticuerpos en el antisuero conocido, reduciendo o eliminando así el efecto del antisuero sobre el organismo virulento haciendo una dosis letal pequeña. Se prefiere que el material antigénico presente en la formulación final esté a un nivel suficiente para aumentar el logaritmo negativo de la  $DL_{50}$  al menos 1, preferentemente 1,4, en comparación con el resultado del organismo virulento tratado con el antisuero sin tratar. Los valores absolutos obtenidos para el control de antisuero y el material de vacuna adecuado son, por supuesto, dependientes del organismo virulento y los patrones de antisuero seleccionados.

20 El siguiente método también puede usarse para lograr la formulación de vacuna ideal: a partir de un antígeno definido, que pretende provocar la respuesta inmunitaria deseada, en una primera etapa se encuentra un adyuvante que se corresponde con el antígeno, como se describe en la bibliografía de especialista, particularmente en el documento WO 97/30721. En una siguiente etapa, la vacuna se optimiza añadiendo diversas sustancias de preparación isotónica como se define en las presentes invenciones, preferentemente azúcares y/o alcoholes de azúcar, en una concentración isotónica o ligeramente hipotónica, a la mezcla de antígeno y adyuvante, siendo la composición por lo demás idéntica, y ajustando la disolución a un pH fisiológico en el intervalo de pH 4,0 a 10,0, particularmente 7,4. Entonces, en una primera etapa, se determinan las sustancias o la concentración de las mismas que mejorará la solubilidad de la composición de antígeno/adyuvante en comparación con una solución salina tamponada convencional. La mejora en las características de solubilidad por una sustancia candidata es una primera indicación de que esta sustancia puede provocar un aumento en la actividad inmunogénica de la vacuna.

30 Ya que uno de los posibles requisitos previos para un aumento en la respuesta inmunitaria celular es la elevada unión del antígeno a APC (células presentadoras de antígeno), en una siguiente etapa puede hacerse una investigación para ver si la sustancia conduce o no a un aumento de este tipo. El procedimiento usado puede ser análogo al descrito en la definición del adyuvante, por ejemplo, incubando APC con péptido o proteína marcada con fluorescencia, adyuvante y sustancia de preparación isotónica. Puede determinarse una elevada captación o unión del péptido a APC provocada por la sustancia comparando con células que se han mezclado con el péptido y adyuvante solo o con una composición de péptido/adyuvante que está presente en disolución de tampón salina convencional, usando citometría de flujo.

40 En una segunda etapa, las sustancias candidatas pueden investigarse *in vitro* para ver si y a qué grado su presencia puede aumentar la presentación de un péptido a APC; la concentración de MHC sobre las células puede medirse usando los métodos descritos en el documento WO 97/30721 para probar péptidos.

50 Otra posible forma de probar la eficiencia de una formulación es usar un sistema modelo *in vitro*. En éste, las APC se incuban juntas con adyuvante, péptido y sustancia candidata y se mide la activación relativa de un clon de linfocitos T que reconoce específicamente el péptido usado (Coligan y col., 1991; Lopez y col., 1993).

La eficiencia de la formulación también puede demostrarse opcionalmente por la respuesta inmunitaria celular detectando una reacción de "hipersensibilidad de tipo retrasado" (DTH) en animales inmunizados.

Finalmente, la actividad inmunomoduladora de la formulación se mide en ensayos con animales.

60 Los péptidos y polipéptidos multiméricos de la presente invención pueden sintetizarse químicamente usando métodos conocidos en la técnica para la síntesis de péptidos, multímeros de péptidos y polipéptidos. Estos métodos generalmente se basan en los principios conocidos de la síntesis de péptidos; lo más convenientemente, los procedimientos pueden realizarse según los principios conocidos de la síntesis de péptidos en fase sólida.

65 Como se usa en el presente documento, "péptido" indica una secuencia de aminoácidos ligada por enlaces peptídicos. Los péptidos según la presente invención comprenden una secuencia de 4 a 24 residuos de aminoácidos. Los polipéptidos multiméricos comprenden al menos dos repeticiones y máximo 50 repeticiones de los epítopes peptídicos.

Análogos de péptidos y peptidomiméticos también están incluidos dentro del alcance de la invención, además están



englobados sales y ésteres de los péptidos de la invención. Un análogo de péptido según la presente invención puede comprender opcionalmente al menos un aminoácido no natural y/o al menos un grupo de bloqueo en tanto el extremo C como el extremo N. Las sales de los péptidos de la invención son sales orgánicas e inorgánicas fisiológicamente aceptables. El diseño de "análogos" apropiados puede estar asistido por ordenador.

El término "peptidomimético" significa que un péptido según la invención se modifica de tal forma que incluye al menos un enlace no peptídico tal como, por ejemplo, enlace urea, enlace carbamato, enlace sulfonamida, enlace hidracina, o cualquier otro enlace covalente. El diseño de "peptidomiméticos" apropiado puede estar asistido por ordenador.

Las sales y ésteres de los péptidos de la invención están englobados dentro del alcance de la invención. Las sales de los péptidos de la invención son sales orgánicas e inorgánicas fisiológicamente aceptables. Derivados funcionales de los péptidos de la invención cubren derivados que pueden prepararse a partir de los grupos funcionales que se producen como cadenas laterales sobre los residuos o los grupos del extremo N o C, por medios conocidos en la técnica, y están incluidos en la invención en tanto que sigan siendo farmacéuticamente aceptables, es decir, no destruyan la actividad del péptido y no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen. Estos derivados pueden incluir, por ejemplo, ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo producidas mediante reacción con amoniaco o con aminas primarias o secundarias, derivados de N-acilo de grupos amino libres de los residuos de aminoácidos formados mediante reacción con restos acilo (por ejemplo, grupos alcanóilo o aroílo carbocíclicos) o derivados de O-acilo del grupo hidroxilo libre (por ejemplo, aquel de residuos de serilo o treonilo) formados mediante reacción con restos acilo.

El término "aminoácido" se refiere a compuestos que tienen un grupo amino y un grupo ácido carboxílico, preferentemente en un patrón de sustitución 1,2- 1,3- o 1,4- en un esqueleto de carbono. Los  $\alpha$ -aminoácidos son los más preferidos, e incluyen los 20 aminoácidos naturales (que son L-aminoácidos, excepto la glicina) que se encuentran en proteínas, los D-aminoácidos correspondientes, los N-metilaminoácidos correspondientes, aminoácidos modificados en la cadena lateral, los aminoácidos biosintéticamente disponibles que no se encuentran en proteínas (por ejemplo, 4-hidroxiprolina, 5-hidroxilisina, citrulina, ornitina, canavanina, ácido djenkólico,  $\beta$ -cianolanina) y  $\alpha$ -aminoácidos sintéticamente derivados, tales como ácido amino-isobutírico, norleucina, norvalina, homocisteína y homoserina. La  $\beta$ -alanina y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico son ejemplos de 1,3 y 1,4-aminoácidos, respectivamente, y muchos otros son muy conocidos para la materia. Los isómeros similares a estatinas (un dipéptido que comprende dos aminoácidos en los que el enlace CONH está sustituido con un CHO), isómeros de hidroxietileno (un dipéptido que comprende dos aminoácidos en los que el enlace CONH está sustituido con un CHOCH<sub>2</sub>), isómeros de amidas reducidas (un dipéptido que comprende dos aminoácidos en los que el enlace CONH está sustituido con un enlace CH<sub>2</sub>NH) y los isómeros de tioamida (un dipéptido que comprende dos aminoácidos en los que el enlace CONH está sustituido con un enlace CSNH) también son residuos útiles para la presente invención.

Los aminoácidos usados en la presente invención son aquellos que están disponibles comercialmente o están disponibles por métodos sintéticos rutinarios. Ciertos residuos pueden requerir métodos especiales para la incorporación en el péptido, y enfoques sintéticos secuenciales, divergentes o convergentes a la secuencia de péptidos son útiles en la presente invención. Aminoácidos codificados naturales y sus derivados se representan por los códigos de tres letras según los convenios de la IUPAC. Si no hay indicación, se usó el isómero L.

Sustituciones conservativas de aminoácidos como se conocen para aquellos expertos en la materia están dentro del alcance de la presente invención. Sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen la sustitución de un aminoácido con otro que tiene el mismo tipo de grupo funcional o cadena lateral, por ejemplo, alifático, aromático, positivamente cargado, negativamente cargado. Estas sustituciones pueden potenciar la biodisponibilidad oral, penetración en el sistema nervioso central, direccionamiento a poblaciones de células específicas y similares. Un experto reconocerá que sustituciones, deleciones o adiciones individuales a la secuencia de péptidos, polipéptidos o proteínas que alteran, añaden o delecionan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante conservativamente modificada" en la que la alteración produce la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica.

Los seis siguientes grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

1) Alanina (A), serina (S), treonina (T);

2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);

3) Asparagina (N), glutamina (Q);

4) Arginina (R), lisina (K);

5) Isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); y

6) Fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W).

Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente algunas realizaciones de la invención.

## EJEMPLOS

### Materiales y métodos

**Polipéptidos multiepitópicos multiméricos:** Se presentan ejemplos de polipéptidos multiepitópicos multiméricos que comprenden varias repeticiones de los epítopes peptídicos del virus de la gripe E1 a E9 enumerados en la Tabla 1. Los polipéptidos incluyen aminoácidos y péptidos cortos como espaciadores. Los polipéptidos están dispuestos en una estructura polimérica secuencial alternante o una estructura de copolímero de bloques. Los polipéptidos se preparan por expresión en un vector de expresión de una construcción de polinucleótido que comprende diversos sitios de restricción para manipulación adicional del polipéptido. La construcción de polinucleótido se suministra de una fuente comercial.

**Vacunas:** Se usaron vacunas preparadas a partir de los polipéptidos multiepitópicos multiméricos presentados en los Ejemplos 1 - 3 para los estudios de inmunización de diversas cepas de ratón. Ejemplos de vacunas específicas producidas y probadas son:

**Multimérica nº 11** se prepara a partir del polipéptido multimérico que comprende cinco repeticiones de nueve epítopes peptídicos de la gripe dispuestos en la estructura polimérica secuencial alternante [E1E2E3E4E5E6E7E8E9]<sub>5</sub> presentada en el Ejemplo 1.

**Multimérica nº 12** se prepara a partir del polipéptido multimérico que comprende tres repeticiones de nueve epítopes peptídicos de la gripe dispuestos en la estructura polimérica secuencial alternante [E1E2E3E4E5E6E7E8E9]<sub>3</sub> presentada en el Ejemplo 3.

**Multimérica nº 14** se prepara a partir del polipéptido multimérico que comprende tres repeticiones de nueve epítopes peptídicos de la gripe dispuestos en la estructura de copolímero de bloques [E1]<sub>3</sub>-[E2]<sub>3</sub>-[E3]<sub>3</sub>-[E4]<sub>3</sub>-[E5]<sub>3</sub>-[E6]<sub>3</sub>-[E7]<sub>3</sub>-[E8]<sub>3</sub>-[E9]<sub>3</sub> presentada en el Ejemplo 2.

**Estudios de inmunización:** Se usaron tres cepas de ratones: una cepa exogámica (ICR), una cepa endogámica (BALB/c) y una cepa transgénica para moléculas de HLA A\*0201 humanas (HLA A\*0201), para los estudios de inmunización, además de conejos en algunos experimentos. Los virus usados incluyeron los siguientes: A/Texas/1/77, A/Wisconsin/67/05 (WISC), A/WSN/33 (WSN), B/Malasia/2506/04 (MAL), A/California/07-2007, A/Nueva Caledonia20/99 (NC) y otros. Todos los estudios se realizaron con administración intramuscular de 150 mcg de polipéptido multiepitópicos multiméricos en 100 microlitros, administrado igualmente en ambas extremidades traseras.

**Ejemplo 1: Polipéptido multimérico con cinco repeticiones de una unidad que contiene nueve epítopes diferentes dispuestos en estructura secuencial alternante.**

Éste es un ejemplo de un polipéptido multimérico que comprende cinco repeticiones de nueve epítopes peptídicos de la gripe dispuestos en la estructura polimérica secuencial alternante [E1E2E3E4E5E6E7E8E9]<sub>5</sub>. El peso molecular estimado es 80 kD.

La secuencia de aminoácidos de este polipéptido multimérico, que incluye la marca de histidina, se muestra en la Figura 1B. La secuencia de ADN de la construcción de polinucleótido usada para preparar este péptido multimérico se muestra en la Figura 1A.

**Ejemplo 2: Polipéptido multimérico con tres repeticiones de cada uno de los nueve epítopes diferentes dispuestos en estructura de copolímero de bloques.**

En este ejemplo, la secuencia de ADN de una construcción de polinucleótido usada para preparar un péptido multimérico que comprende tres repeticiones de nueve epítopes peptídicos de la gripe dispuestos en la estructura de copolímero de bloques [E1]<sub>3</sub>-[E2]<sub>3</sub>-[E3]<sub>3</sub>-[E4]<sub>3</sub>-[E5]<sub>3</sub>-[E6]<sub>3</sub>-[E7]<sub>3</sub>-[E8]<sub>3</sub>-[E9]<sub>3</sub> se muestra en la Figura 2A y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en la Figura 2B. El peso molecular estimado es 48 kD.

**Ejemplo 3: Polipéptido multimérico con tres repeticiones de una unidad que contiene nueve epítopes dispuestos en estructura secuencial alternante.**

Éste es un ejemplo de un polipéptido multimérico que comprende tres repeticiones de nueve epítopes peptídicos de la gripe dispuestos en la estructura polimérica secuencial alternante [E1E2E3E4E5E6E7E8E9]<sub>3</sub>. El peso molecular estimado es 48 kD.

La secuencia de aminoácidos de este polipéptido multimérico se muestra en la Figura 3B. La secuencia de ADN de la construcción de polinucleótido usada para preparar este péptido multimérico se muestra en la Figura 3A.

Ejemplo 4: Respuesta inmunitaria celular.

Se evaluaron las respuestas inmunitarias celulares a dos concentraciones diferentes de un virus estimulante de la gripe de las cepas A/Texas/1/77, A/WisxWisc/67/05, A/California/07-2007 y B/Malasia/2506/04. Se vacunaron ratones transgénicos (transgénesis para HLA A\*0201) una vez con dos vacunas multiméricas: n° 11 y n° 14, emulsionadas dentro de IFA (adyuvante incompleto de Freund). 7-10 días después de la inmunización, se extirparon su bazo y ganglios linfáticos (LN) y se incubaron adicionalmente con los virus anteriormente mencionados. La proliferación se midió por captación de timidina y se muestra en la Figura 4, como el índice de proliferación para linfocitos incubados con el virus estimulante. La proliferación se asoció a secreción de IFN-gamma, en el intervalo de 300-1300 pg/ml. Esta respuesta está indicando una respuesta inmunitaria Th1 mediada por célula a la vacuna que podría conferir una inmunidad más sólida a la infección del virus por exposición.

Ejemplo 5: Reconocimiento de antígeno inmunizante y de virus por suero inmune

Se inmunizaron ratones ICR con el polipéptido multiepitópico multimérico que comprende cinco repeticiones de nueve epítopes dispuestos en la estructura polimérica secuencial alternante [E1E2E3E4E5E6E7E8E9]<sub>5</sub> (Multimérica n° 11), o con el polipéptido multiepitópico multimérico que comprende tres repeticiones de nueve epítopes dispuestos en la estructura de copolímero de bloques [E1]<sub>3</sub>-[E2]<sub>3</sub>-[E3]<sub>3</sub>-[E4]<sub>3</sub>-[E5]<sub>3</sub>-[E6]<sub>3</sub>-[E7]<sub>3</sub>-[E8]<sub>3</sub>-[E9]<sub>3</sub> (Multimérica n° 14) suspensa en 50 % de glicerol en PBS, o suspensa en IFA como adyuvante, o con 50 % de glicerol en PBS como control de vehículo. El reconocimiento de protector conocido de los epítopes de la gripe HA 91-108 y M2 2-12, y de varios virus de la gripe (WISC, WSN, NC y MAL), por sueros de ratones inmunizados con polipéptido antigénico (n° 11 y n° 14, respectivamente), se determinó por ELISA y los resultados se resumen en las Tablas 4a y 4b. Un reconocimiento significativo se define como una elevación de al menos 4 veces en el título entre los sueros preinmunes y los sueros después de tres inmunizaciones IM a intervalos de 2-3 semanas.

Tabla 4a: Veces de elevación en el título a diversos antígenos de sueros preinmunes y sueros después de 3 inmunizaciones con polipéptido multiepitópico multimérico en 50 % de glicerol en PBS

Inmunización	#11 en 50% glicerol en PBS		#14 en 50% glicerol en PBS			
	ICR	BALB/c	ICR	BALB/c	C57B1/6j	Conejo
Ratón						
Ab a #11	16		64			
Ab a #14	256		1024			
Ab a HA91-108	1	1	64	200	1600	10
Ab a M2 1-18	1	2	64	5	3	1.5
Ab a WISC		2		8	2	2
Ab a WSN		4		4	2	2
Ab a NC		ND		8	8	2
Ab a MAL		2		4	2	2

Tabla 4b: Veces de elevación en el título a diversos antígenos de sueros preinmunes y sueros después de 3 inmunizaciones con polipéptido multiepitópico multimérico en IFA como adyuvante

Inmunización	#11 en auxiliar	#14 en auxiliar		
	BALB/c	BALB/c	C57B1/6j	Conejos
Ratón				
Ab a WISC	4	8	4	8
Ab a WSN	4	8	2	16
Ab a NC	ND	8	2	8
Ab a MAL	2	4	2	8

Ambos grupos muestran alto reconocimiento del antígeno inmunizante, los péptidos HA91-108 y M2 2-18 solo se reconocieron por los sueros de ratones inmunizados con n° 14, pero no con los sueros de ratones inmunizados con n° 11.

Los sueros humanos normales podrían reconocer candidatos a vacuna multimérica, indicando el potencial de respuestas de memoria a ser provocadas tras la inmunización de sujetos humanos con esta vacuna. Los títulos medios de 4 sueros humanos a n° 11 y n° 14 fueron 6000 y 6400, respectivamente.

#### Ejemplo 6. Protección contra una exposición altamente letal con H3N2 A/Texas/1/77

Se inmunizaron grupos de ocho ratones transgénicos tres veces, a intervalos de 3 semanas, intramuscularmente con la vacuna multimérica n° 14 o con PBS. Se administró una infección por exposición con una dosis altamente letal (DL<sub>50</sub> 300) de H3N2 A/Texas/1/77 tres semanas después del último refuerzo. Los ratones se sacrificaron cinco días después de la infección. Se observó una reducción significativa del título de virus en los pulmones de ratones, como se describe en la Figura 5, a pesar de la gran cantidad de virus usados para la infección.

#### Ejemplo 7: Estudios de eficacia *in vivo*

Se han evaluado dos versiones de vacuna *in vivo*: el polipéptido multimérico suspenso en 50 % de glicerol en PBS o en adyuvante incompleto de Freund.

La vacuna purificada se usa en varios modelos de ratón para establecer su eficacia, mecanismo de acción y datos de toxicología preliminares antes de la toxicología de dosis repetidas. La respuesta humoral, además de los estudios farmacodinámicos, se realizan en varias cepas de ratones. Un modelo animal que se emplea para la evaluación de la vacuna es los ratones transgénicos para HLA A\*0201. Este modelo se usa para la determinación de la dosis óptima, además de para parámetros celulares de la respuesta inmunitaria a revelar su mecanismo de acción.

#### Ejemplo 8:

La eficacia de la vacuna se demostró en dos estudios preliminares usando ratones ICR y transgénicos (HLA A\*0201). Los ratones se vacunaron intramuscularmente tres veces con intervalo de 3 semanas con una dosis de 150 mcg/ratón de vacunas n° 11, n° 12 y n° 14 con y sin adyuvante (IFA). Tres a cuatro semanas después de la última inmunización, los ratones se infectaron con una DL<sub>50</sub> de 300 de una cepa del virus de la gripe H3N2 adaptada al ratón (A/Texas/1/77). Cinco días después de la infección, se monitorizó la tasa de supervivencia. Se compararon grupos tratados y de control inmunizados con 50 % de glicerol en PBS con y sin IFA.

La tasa de supervivencia (Figura 6A) tras la infección con DL<sub>50</sub> de 300 en ratones ICR fue del 100 %, mientras que en los grupos de control (50 % de glicerol en PBS) se demostró tasa de supervivencia del 20 %.

La carga viral en sus pulmones se detalla en la Figura 6B para las vacunas n° 11 y n° 14 solo. La carga viral en los grupos en los que se encontró supervivencia del 100 % es significativamente menor que la carga viral en los grupos de control (p<0,05). Debido al pequeño número de ratones por grupo (5 ratones), el análisis estadístico se hizo usando la prueba exacta de Fisher bilateral. El valor de p del 5 % o menos se considera estadísticamente significativo. Los datos se analizaron usando SAS® versión 9.1 (SAS Institute, Cary North Carolina).

En cuanto a la supervivencia en ratones transgénicos (Figura 7) inmunizados con la vacuna en PBS/50 % de glicerol, usando los mismos procedimientos de vacunación e infección mencionados anteriormente, las tasas de supervivencia fueron del 80 % y 60 % con respecto a la vacunación con n° 11 y n° 14, respectivamente, en comparación con el 20 % en el grupo de control. La vacuna n° 12 no fue protectora en este modelo de ratón, además de las vacunas adyuvantadas (IFA) probadas. Parece que en este modelo animal o al menos en este estudio, la adición de adyuvante fue innecesaria e incluso redujo el potencial protector de la vacuna.

#### Ejemplo 9: Toxicología de dosis repetidas

Se realizan ensayos de toxicología de dosis repetidas con la vacuna n° 14 (vacuna multimérica en repeticiones de tres bloques suspenso en 50 % de glicerol en PBS o en adyuvante incompleto de Freund, según un protocolo basado en: [http://www3.niaid.nih.gov/daids/vaccine/Science/VRTT/06\\_SafetyTest.htm](http://www3.niaid.nih.gov/daids/vaccine/Science/VRTT/06_SafetyTest.htm).

Se realiza un estudio de toxicología relacionado con la dosis preliminar en ratones exogámicos ICR. Se emplean tres animales por sexo por dosis para cada momento de tiempo de sacrificio para probar la histopatología de sus órganos principales tras la administración intramuscular de la vacuna una, dos y tres veces.

Es probable que la mayor dosis prevista para la clínica empleada en una dosificación de repetición de 6 semanas que contiene tres vacunaciones quincenales sea suficiente para evaluar la toxicidad del producto y permitir dos repetidas. Los estudios incluyen monitorizar el estado *in vivo*, seguido de un intervalo completo de parámetros toxicológicos, que incluyen autopsia y examen histopatológico completo de todos los órganos principales en los días 2 días y 2 semanas después de la inmunización con el fin de demostrar que cualquier efecto toxicológico observado durante el periodo de tratamiento era reversible.

Ejemplo 10: Ensayo clínico de fase I/IIa

El objetivo primario de este estudio clínico es examinar la seguridad de la vacuna contra la gripe preventiva después de una administración intramuscular simple o doble. El estudio se realiza bajo práctica clínica controlada entre voluntarios sanos de edades de 18 años de edad a 49 años de edad. El objetivo secundario es estimar la inmunogenicidad inducida por la administración de la vacuna multimérica. Este estudio de fase I/II evalúa los efectos adversos agudos más comunes y examina el tamaño de dosis que los pacientes pueden tomar con seguridad sin una alta incidencia de efectos secundarios.

Ejemplo 11: Respuesta antiviral en sueros de ratones inmunizados con vacuna comercial contra la gripe, seguido de inmunización con vacuna multimérica

Se inmunizaron ratones transgénicos para HLA A\*0201 con la vacuna contra la gripe inactivada comercial (virión fraccionado) BP Vaxigrip® tres veces, en los días 0, 60, 81, o con Vaxigrip® una vez, en el día 0, y 2 inmunizaciones adicionales (en los días 60 y 81) con las vacunas multiméricas n° 11, n° 12 y n° 14. La extracción de sangre se realizó antes de la inmunización (preinmune) y después de la última inmunización. Los anticuerpos para varias cepas de la gripe se determinaron en sueros reunidos: H3N2: A/Wisconsin/67/05, A/Texas/1/77, A/California/07/2007, A/Fujian/411/2002, A/Moscú/10/99 y A/Panamá/2007/99; H1N1: A/Nueva Caledonia/20/99, A/WSN/33, A/PR8/34 B: B/Malasia/2506/04, B/Lee/40.

Después de la primera inmunización con Vaxigrip®, que está previsto para una única inmunización en el ser humano, no hubo elevación significativa en los títulos para todos los virus (excepto x4 veces la elevación del título para A/California).

Los resultados se muestran en las Tablas 5A y 5B. Con las formulaciones multiméricas, antes de la inmunización con Vaxigrip® no se elevó significativamente la respuesta a los virus en comparación con los otros datos de estudios de inmunización en los que se demostraron respuestas humorales similares. Se observó un máximo de 8 veces la elevación en títulos de post/preinmune después de dos inmunizaciones con la vacuna multimérica. El grupo de control administrado con PBS fue negativo para todos los virus. En la comparación de las diferentes variantes multiméricas, el n° 14 fue el mejor candidato en términos de respuesta humoral a virus.

Tabla 5A. H3N2

Tratamiento	inmune	WISC		Texas		Califor		Fujian		Moscú		Panamá	
		t	f	t	f	t	f	t	f	t	f	t	f
1x Vaxigrip + 2x Multi #11	0	200		200		800		400		400		400	
	1	400	2	400	1	800	1	800	2	800	2	800	2
	2+	800	4	400	4	3200	4	800	2	800	2	1600	4
1x Vaxigrip + 2x Multi #12	0	400		200		400		400		800		800	
	1	800	2	400	2	1600	4	400	1	800	1	800	1
	2+	800	2	400	2	3200	8	1600	4	1600	2	3200	4
1x Vaxigrip + 2x Multi #14	0	200		200		800		400		400		800	
	1	800	4	400	2	1600	2	800	2	1600	4	3200	4
	2+	1600	8	1600	8	3200	4	1600	4	3200	8	6400	8
PBS	1	200		100		200		200		200		200	
	2	200	1	100	1	200	1	200	1	200	1	400	2

t=título, f=carpeta

Tabla 5B. H1N1 y gripe B

5	Tratamiento	inmune	NC		WSN		PR8/34		B/Malasia		B/Lee	
			t	f	t	f	t	f	t	f	t	f
10	1x Vaxigrip + 2x Multi #11	0	100		200		400		400		200	
		1	400	4	400	2	800	2	1600	4	400	2
		2+	400	4	800	4	800	2	1600	4	400	2
15	1x Vaxigrip + 2x Multi #12	0	200		200		200		800		100	
		1	400	2	400	2	400	2	800	1	400	4
		2+	400	2	800	4	400	2	800	1	400	4
20	1x Vaxigrip + 2x Multi #14	0	100		200		100		200		200	
		1	400	4	800	4	400	4	400	2	400	2
		2+	400	4	1600	8	400	4	1600	8	400	2
25	PBS	1	100		100		100		100		100	
		2	100	1	200	2	200	2	200	1	100	1
t=título, f=carpeta												

Ejemplo 12. Síntesis de péptidos

30 Se sintetizaron péptidos y péptidos multiméricos usando síntesis de péptidos típica en fase sólida con los siguientes materiales: se compraron aminoácidos protegidos, 9-fluorenilmetiloxycarbonil-N-hidroxisuccinimida (Fmoc-OSu), hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidona-fosfonio (PyBrop), resinas de amida de Rink-metilbenzhdridamina (MBHA)-poliestireno y muchos productos orgánicos y soportes para la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) de Nova Biochemicals (Laufelfingen, Suiza). Se compró bis(triclorometil)carbonato (BTC) de Lancaster (Lancashire, Inglaterra), ácido trifluoroacético (TFA) y se compraron disolventes para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de Bio-Lab (Jerusalén, Israel).

40 Los disolventes para la química orgánica se compraron de Frutarom (Haifa, Israel). Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron en un espectrómetro Bruker AMX-300 MHz. Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro de masas con trampa iónica Finnigan LCQ DUO. La cromatografía en capa fina (CCF) se realizó en placas de gel de sílice Merck F245 60 (Darmstadt, Alemania). El análisis de HPLC se realizó usando una columna de RP analítica Vydac (C18, 4,6 x 250 mm, número de catálogo 201TP54), y se llevaron a cabo en una bomba Merck-Hitachi L-7100 y un detector de longitud de onda variable Merck-Hitachi L-7400 que operaba a 45 215 nm. La fase móvil consistió en un sistema de gradiente, con disolvente A correspondiente a agua con 0,1 % de TFA y disolvente B correspondiente a acetonitrilo (ACN) con 0,1 % de TFA. La fase móvil empezó con 95 % de A de 0 a 5 min, seguido de gradiente lineal del 5 % de B al 95 % de B de 5 a 55 min. El gradiente permaneció al 95 % de B durante 5 min adicionales, y a continuación se añadió gota a gota al 95 % de A y 5 % de B de 60 a 65 min. El gradiente permaneció al 95 % de A durante 5 min adicionales para lograr el equilibrio de la columna. La velocidad de flujo de la fase móvil fue 1 ml/min. La purificación de péptidos se realizó por HPLC de fase inversa (RP-HPLC) (en 50 bomba L-6200A, Merck-Hitachi, Japón), usando una columna de RP preparativa Vydac (C8, 22 x 250 mm, número de catálogo 218TP1022). Todas las HPLC preparativas se llevaron a cabo usando un sistema en gradiente con disolvente A correspondiente a agua con 0,1 % de TFA y disolvente B correspondiente a ACN con 0,1 % de TFA.

55 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BiondVax Pharmaceuticals Ltd.

<120> VACUNAS MULTIMÉRICAS MULTIEPÍTOPES CONTRA LA GRIPE

60 <130> BNDVX/005/PCT

<160> 88

65 <170> PatentIn version 3.3

ES 2 539 818 T3

<210> 1  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial  
5  
<220>  
<223> Péptido Sintético  
10  
<400> 1  
Glu Val Glu Thr  
1  
15  
<210> 2  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial  
20  
<220>  
<223> Péptido Sintético  
<400> 2  
25  
Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr His Thr Arg Asn Gly Trp  
1 5 10 15  
30  
<210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial  
35  
<220>  
<223> Péptido Sintético  
<400> 3  
Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg  
1 5  
40  
<210> 4  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial  
45  
<220>  
<223> Péptido Sintético  
<400> 4  
50  
Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys  
1 5 10  
55  
<210> 5  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial  
60  
<220>  
<223> Péptido Sintético  
<400> 5  
65  
Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn  
1 5 10

<210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 <400> 6  
 10  
 Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile  
 1 5  
 15  
 <210> 7  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 <400> 7  
 25  
 Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro  
 1 5  
 30  
 <210> 8  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 35  
 <400> 8  
 Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile  
 1 5 10  
 40  
 <210> 9  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 <400> 9  
 50  
 Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Leu Thr  
 1 5  
 55  
 <210> 10  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 60  
 <400> 10  
 65  
 Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp  
 1 5 10 15



ES 2 539 818 T3

<210> 11  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 <400> 11  
 10  
 Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly  
 1 5 10 15  
 15  
 Cys Arg  
 <210> 12  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 <400> 12  
 25  
 Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Lys Asn Gly Trp  
 1 5 10 15  
 30  
 <210> 13  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 <400> 13  
 40  
 Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Arg Asn Gly Trp  
 1 5 10 15  
 45  
 <210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 50  
 <400> 14  
 Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg  
 1 5  
 55  
 <210> 15  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 <400> 15  
 65

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

5 <210> 16  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 16

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu  
 1 5

15 <210> 17  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 17

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

30 <210> 18  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 18

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

40 <210> 19  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 19

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

55 <210> 20  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 20

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn  
 1 5

5 <210> 21  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 21

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

Cys Arg

20 <210> 22  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 22

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

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp  
 20

35 <210> 23  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Péptido Sintético

45 <400> 23

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

50 Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp  
 20

55 <210> 24  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 24

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

<210> 25  
<211> 11  
<212> PRT  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> Péptido Sintético

10 <400> 25

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

15 <210> 26  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 26

25

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

30 <210> 27  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 27

40

Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val  
1 5

45 <210> 28  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 28

55

Ser Ile Val Pro Ser Gly Pro Leu  
1 5

60 <210> 29  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial

65 <220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 29

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

5 <210> 30  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 <400> 30

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

20 <210> 31  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 <400> 31

**Arg Leu Glu Asp Val Phe Ala Gly Lys**  
**1 5**

35 <210> 32  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 <400> 32

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

45 <210> 33  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 <400> 33

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

60 <210> 34  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

65 <220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 34

Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile  
 1 5

5

<210> 35  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10

<220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 35

15

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

20

Glu Arg Gly

<210> 36  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25

<220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 36

30

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

35

<210> 37  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40

<220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 37

45

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

50

<210> 38  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Péptido Sintético

55

<400> 38

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu  
 1 5

60

<210> 39  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

65

<220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 39

5

Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val  
1 5

10 <210> 40  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 40

20

Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr  
1 5

25 <210> 41  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 41

35

Ala Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr  
1 5

40 <210> 42  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 42

50

Arg Met Gly Ala Val Thr Thr Glu Val  
1 5

<210> 43  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

55 <220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 43

60

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

65 <210> 44  
<211> 9

<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 44

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

<210> 45  
<211> 10  
<212> PRT  
15 <213> Artificial

<220>  
<223> Péptido Sintético

20 <400> 45

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

25 <210> 46  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 46

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

40 <210> 47  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 47

50 Asp Leu Leu Gln Asn Leu Gln Thr Tyr  
1 5

<210> 48  
<211> 18  
<212> PRT  
55 <213> Artificial

<220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 48

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

65 Ser Leu



ES 2 539 818 T3

<210> 49  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> Péptido Sintético

10

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

15

**Ser Leu**

<210> 50  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

20

<220>  
<223> Péptido Sintético

25

<400> 50

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

30

**Ser Leu**

<210> 51  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

35

<220>  
<223> Péptido Sintético

40

<400> 51

1  
Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn  
1 5

45

<210> 52  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

50

<220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 52

55

1  
Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro  
1 5 10

60

<210> 53  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

65

<220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 53

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

5

<210> 54  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10

<220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 54

15

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

20

Asn Val Pro

<210> 55  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25

<220>  
 <223> Péptido Sintético

30

<400> 55

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

35

<210> 56  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40

<220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 56

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

45

<210> 57  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

50

<220>  
 <223> Péptido Sintético

55

<400> 57

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

60

<210> 58  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

65

<220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 58

5

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

10 Gly Gly

<210> 59  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Péptido Sintético

20 <400> 59

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

25

<210> 60  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30

<220>  
 <223> Péptido Sintético

35 <400> 60

Lys Thr Gly Gly Pro Ile Tyr Arg Arg  
 1 5

40

<210> 61  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45

<220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 61

50 Cys Thr Glu Leu Lys Leu Ser Asp Tyr  
 1 5

55

<210> 62  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Péptido Sintético

60 <400> 62

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

65

<210> 63  
 <211> 13

<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 63

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

<210> 64  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Péptido Sintético

20 <400> 64

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

Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly Lys  
20

30 <210> 65  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 65

40 Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys  
1 5

45 <210> 66  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 66

55 Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Tyr  
1 5

60 <210> 67  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 67

65

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

5 <210> 68  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 <400> 68

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

15 <210> 69  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 25 <400> 69

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

30 <210> 70  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 40 <400> 70

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

45 <210> 71  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> Péptido Sintético  
 <400> 71

**Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile**  
**1 5**

55 <210> 72  
 <211> 9  
 60 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Péptido Sintético  
 65 <400> 72

**Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg**  
**1 5**

5  
<210> 73  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

10  
<220>  
<223> Péptido Sintético

15  
<400> 73

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

20  
<210> 74  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

25  
<220>  
<223> Péptido Sintético  
  
<400> 74

30  
**Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg**  
**1 5**

35  
<210> 75  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

40  
<220>  
<223> Péptido Sintético  
  
<400> 75

45  
**Leu Pro Phe Asp Lys Pro Thr Ile Met**  
**1 5**

50  
<210> 76  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

55  
<220>  
<223> Péptido Sintético  
  
<400> 76

**Val Ser Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr**  
**1 5**

60  
<210> 77  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

65  
<220>

<223> Péptido Sintético

<400> 77

5 Arg Arg Ser Phe <sup>1</sup>Glu Leu Lys Lys Leu  
1 5

<210> 78

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Péptido Sintético

<400> 78

20 Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys  
1 5

<210> 79

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Sintético

<400> 79

30 Arg Pro Ile Ile Arg Pro Ala Thr Leu  
1 5

35 <210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

40 <220>

<223> Péptido Sintético

<400> 80

45 Ala Asp Arg Gly Leu Leu Arg Asp Ile  
1 5

50 <210> 81

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

55 <223> Péptido Sintético

<400> 81

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

<210> 82

<211> 19

65 <212> PRT

<213> Artificial

ES 2 539 818 T3

<220>  
<223> Péptido Sintético

<400> 82

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

10          Phe Leu Glu

<210> 83  
<211> 2199  
<212> ADN  
<213> Artificial

15

<220>  
<223> Polinucleótido Sintético

20

<400> 83

          atgcatatga gatctccagc taaacttctg aaagaacgtg gatttttcgg tgcaatcgct       60

25       ggttttctgg aggggctgaa agcctacagt aactgttacc cctacgatgt gcccgattat       120

          gccagcctgg gtagcctcct tacagaagtt gaaacttatg tgctcggctg gctgacaggg       180

          aaaaacggcc tttatcctgt gtggaccggc gtgacgcaga acggattctg gcgtggcgaa       240

30       aatggacgta aaactcgcag tgcgtatgag cgcattgtgta acatcctcaa aggtaaaggc       300

          ccgaaatatg tgaaacagaa tacattaaaa ttagccaccg gcgcgagcgc tgcctttgaa       360

35       gacctccgtg tgctcagttt tatccgcggt tatggggaac tgcgttctcg ctattgggcg       420

          atccgtaccc ggtcaggggg tccaccggcg aagctgctga aagaacgtgg gttcttcggt       480

          gcgattgccg gtttcttgga aggatcaaaa gcgtattcga actgctaccc gtatgatgtg       540

40       ccagattacg ccagcctggg ctccctcttg acagaggtcg aaacctatgt actggggttg       600

          ctgaccggta agaacgggtct gtatccggtt tggactggtg tgacacaaaa cggcttttgg       660

          cggggggaaa acggccggaa aaccgcgagc gcttacgagc gcatgtgcaa cattctgaaa       720

45       ggcaaaggcc cgaataacgt gaagcagaat acgctcaaac ttgccacggg cgcaagcgca       780

50

55

60

65



ES 2 539 818 T3

gcctttgaag acctgctgggt cttgagcttt atccgcgggt acggggagct gcggtcgcgc 840  
 tactgggcga ttcgtacgcg tagtggtgga cctcccgcga aacttctgaa agagcggggc 900  
 5 ttctttggag cgattgcggg cttcttggag ggaagcaaag cctactctaa ttgttaccca 960  
 tacgatgtgc ctgattatgc gagcctcggg agcttgctga cagaagtgga aacctacggt 1020  
 10 ctcggctggc tgacgggcaa aaatggtctc taccagtggt ggaccggagt taccagaat 1080  
 gggttctggc gcggtgagaa cggccgtaaa acacgttcag cgtacgagcg gatgtgcaac 1140  
 atcttaaaag gcaaaggacc gaaatacgtc aagcagaata ctctgaagtt agccactggg 1200  
 15 gcctcagccg cctttgaaga ccttcgcgtc ttgagtttta tccgggggta tggggaactg 1260  
 cggagccgct actgggctat tcgtacgcgg tcgggtggcc cactcgagcc ggccaaattg 1320  
 ctcaaagaac gtggtttctt cggagcgcgc gcaggttttc ttgaaggctc taaagcgtac 1380  
 20 agcaactggt atccatacga tgtgccggat tacgccagtc tgggttcctt cctgaccgag 1440  
 gtggaaacgt atgtactagg atggctcacg ggtaaaaatg gtctctatcc tgtgtggacg 1500  
 25 ggcgtaacc agaacggctt ttggcggggc gaaaacggcc gcaaaaccg tagcgcatac 1560  
 gagcgtatgt gtaacatcct taaaggcaaa ggtccaaaat acgttaagca gaataccctg 1620  
 aaactggcta cgggcgccag tgcggccttc gaagatttac gggtgctgtc cttcatccgc 1680  
 30 ggctatggtg aactgcgctc tcgttactgg gcaatccgta cccgcagtgg cggacctccg 1740  
 gctaaactgt tgaaagaacg cggcttcttt ggtgctatcg caggttttct ggaaggaagt 1800  
 aaagcatatt cgaattgta tcctacgac gtgccggatt atgcgtcgtc cggttcgtg 1860  
 35 ctgaccgagg tgaaaccta cgttctaggc tggttgacag gtaagaacgg gctttaccg 1920  
 gtatggaccg gcgttaccca gaacggtttt tggcgcggtg aaaatggccg taaaactcgg 1980  
 40 tcagcatac gacggatgtg caatatcttg aaaggtaaag gaccgaaata cgtaaacag 2040  
 aacacgctga aactggcaac aggcgccagc gcggcgtttg aggatttacg cgtcctgtca 2100  
 tttattcggg gctacggcga attacgtagt cgttattggg cgattcgtac ccgcagcgga 2160  
 45 gggctcgagt aataaaagct ttctagacat atgatgcat 2199

<210> 84

<211> 723

<212> PRT

50 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

55 <400> 84

Met His Met Arg Ser Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe  
 1 5 10 15

60 Gly Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys  
 20 25 30

65 Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Leu Thr

ES 2 539 818 T3

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

ES 2 539 818 T3

Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Leu Thr Glu Val  
 325 330 335  
 5  
 Glu Thr Tyr Val Leu Gly Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro  
 340 345 350  
 10  
 Val Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly  
 355 360 365  
 15  
 Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly  
 370 375 380  
 20  
 Lys Gly Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly  
 385 390 395 400  
 25  
 Ala Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly  
 405 410 415  
 30  
 Tyr Gly Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly  
 420 425 430  
 35  
 Gly Pro Leu Glu Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly  
 435 440 445  
 40  
 Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr  
 450 455 460  
 45  
 Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Leu Thr Glu  
 465 470 475 480  
 50  
 Val Glu Thr Tyr Val Leu Gly Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr  
 485 490 495  
 55  
 Pro Val Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Phe Trp Arg Gly Glu Asn  
 500 505 510  
 60  
 Gly Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys  
 515 520 525  
 65  
 Gly Lys Gly Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr  
 530 535 540  
 70  
 Gly Ala Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg  
 545 550 555 560  
 75  
 Gly Tyr Gly Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser  
 565 570 575  
 80  
 Gly Gly Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala  
 580 585 590

Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro  
 595 600 605

5 Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Leu Thr Glu Val  
 610 615 620

10 Glu Thr Tyr Val Leu Gly Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro  
 625 630 635 640

15 Val Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly  
 645 650 655

20 Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly  
 660 665 670

25 Lys Gly Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly  
 675 680 685

30 Ala Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly  
 690 695 700

35 Tyr Gly Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly  
 705 710 715 720

Gly Leu Glu

35 <210> 85  
 <211> 1299  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Polinucleótido Sintético

<400> 85

45 atgcatatga gatctccagc taaacttctg aaagaacgtg gatttttcg g t gcaatcgct 60  
 ggttttctgg agccaccggc gaagctgctg aaagaacgtg ggttcttcg g t gcgattgcc 120  
 ggtttcttgg aacctccgc gaaacttctg aaagagcggg gcttctttg g t agcgattgcg 180  
 50 ggcttcttgg agccatcgaa agcctacagt aactgttacc cctacgatgt gcccgattat 240  
 gccagcctgc cttcaaaagc gtattcgaac tgctacccgt atgatgtgcc agattacgcc 300  
 agcctgccaa gcaaagccta ctctaattgt taccatacag atgtgcctga ttatgcgagc 360  
 55 ctccctagcc tccttacaga agttgaaact tatgtgctca gcttgctgac agaagtggaa 420  
 acctacgttc tcagcttgct gacagaagtg gaaacctacg ttctctggct gacagggaaa 480  
 aacggccttt atccttggt gaccggtaag aacggctctgt atccgtggct gacgggcaaa 540  
 60 aatggtctct acccatggac cggcgtgacg cagaaccctt ggactgggtg gacacaaaac 600  
 ccatggaccg gagttacca gaatcctttc tggcgtggcg aaaatggacg taaaactcgc 660  
 65 agtgcgtatg agcgcgatgtg taacatcctc aaaggtaaac ctttttggcg gggggaaaac 720

ES 2 539 818 T3

ggccggaaaa cccgcagcgc ttacgagcgc atgtgcaaca ttctgaaagg caaaccattc 780  
 tggcgcggtg agaacggccg taaaacacgt tcagcgtacg agcggatgtg caacatctta 840  
 5 aaaggcaaac ctccgaaata cgtgaagcag aatacgtca aacttgccac gccaccgaaa 900  
 tacgtcaagc agaatactct gaagttagcc actccgccga aatacgtcaa gcagaatact 960  
 ctgaagttag ccactccttc agccgccttt gaagaccttc gcgtcttgag ttttatccgg 1020  
 10 ggttatccaa gcgcagcctt tgaagacctg cgggtcttga gctttatccg cggttaccct 1080  
 tcagccgcct ttgaagacct tcgcgtcttg agttttatcc ggggttatcc agaactgcgt 1140  
 tctcgctatt gggcgatccg taccgggtca gggccggagc tgcggtcgcg ctactgggcg 1200  
 15 attcgtacgc gtagtgggtcc agaactgcgg agccgtact gggctattcg tacgcggctg 1260  
 ggtaataaac tcgagaggct ttctagacat atgatgcat 1299

20 <210> 86  
 <211> 421  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Polipéptido Sintético

<400> 86

30 Met His Met Arg Ser Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe  
 1 5 10 15  
 35 Gly Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu  
 20 25 30  
 40 Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Pro Pro Ala Lys  
 35 40 45  
 45 Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu  
 50 55 60  
 50 Pro Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr  
 65 70 75 80  
 55 Ala Ser Leu Pro Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val  
 85 90 95  
 60 Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Pro Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro  
 100 105 110  
 65 Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Pro Ser Leu Leu Thr Glu Val  
 115 120 125  
 70 Glu Thr Tyr Val Leu Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu  
 130 135 140  
 75 Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Trp Leu Thr Gly Lys

ES 2 539 818 T3

	145				150					155				160		
5	Asn	Gly	Leu	Tyr	Pro 165	Trp	Leu	Thr	Gly	Lys 170	Asn	Gly	Leu	Tyr	Pro 175	Trp
10	Leu	Thr	Gly	Lys 180	Asn	Gly	Leu	Tyr	Pro 185	Trp	Thr	Gly	Val	Thr 190	Gln	Asn
15	Pro	Trp	Thr 195	Gly	Val	Thr	Gln	Asn 200	Pro	Trp	Thr	Gly	Val 205	Thr	Gln	Asn
20	Pro	Phe 210	Trp	Arg	Gly	Glu	Asn 215	Gly	Arg	Lys	Thr	Arg 220	Ser	Ala	Tyr	Glu
25	Arg 225	Met	Cys	Asn	Ile	Leu 230	Lys	Gly	Lys	Pro	Phe 235	Trp	Arg	Gly	Glu	Asn 240
30	Gly	Arg	Lys	Thr	Arg 245	Ser	Ala	Tyr	Glu	Arg 250	Met	Cys	Asn	Ile	Leu 255	Lys
35	Gly	Lys	Pro	Phe 260	Trp	Arg	Gly	Glu	Asn 265	Gly	Arg	Lys	Thr	Arg 270	Ser	Ala
40	Tyr	Glu	Arg 275	Met	Cys	Asn	Ile	Leu 280	Lys	Gly	Lys	Pro	Pro 285	Lys	Tyr	Val
45	Lys	Gln 290	Asn	Thr	Leu	Lys	Leu 295	Ala	Thr	Pro	Pro	Lys 300	Tyr	Val	Lys	Gln
50	Asn 305	Thr	Leu	Lys	Leu	Ala 310	Thr	Pro	Pro	Lys	Tyr 315	Val	Lys	Gln	Asn	Thr 320
55	Leu	Lys	Leu	Ala	Thr 325	Pro	Ser	Ala	Ala	Phe 330	Glu	Asp	Leu	Arg	Val 335	Leu
60	Ser	Phe	Ile	Arg 340	Gly	Tyr	Pro	Ser	Ala 345	Ala	Phe	Glu	Asp	Leu 350	Arg	Val
65	Leu	Ser	Phe 355	Ile	Arg	Gly	Tyr	Pro 360	Ser	Ala	Ala	Phe 365	Glu	Asp	Leu	Arg
70	Val	Leu 370	Ser	Phe	Ile	Arg	Gly 375	Tyr	Pro	Glu	Leu	Arg 380	Ser	Arg	Tyr	Trp
75	Ala 385	Ile	Arg	Thr	Arg	Ser 390	Gly	Pro	Glu	Leu	Arg 395	Ser	Arg	Tyr	Trp	Ala 400
80	Ile	Arg	Thr	Arg	Ser 405	Gly	Pro	Glu	Leu	Arg 410	Ser	Arg	Tyr	Trp	Ala 415	Ile
85	Arg	Thr	Arg	Ser 420	Gly											

ES 2 539 818 T3

<210> 87  
 <211> 1335  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Polinucleótido Sintético

<400> 87

10

	atgagatctc	cggcgaaact	gctgaaagaa	cgtggctttt	ttggcgcgat	tgccgggcttt	60
	ctggaaggca	gcaaagcgta	tagcaactgc	tatccgatg	atgtgccgga	ttacgcgagt	120
15	ctgggctctc	tgctgaccga	agtggaaacc	tatgtgctgg	gctggctgac	cgcaaaaaac	180
	ggcctgtatc	cggtgtggac	cggcgtgacc	cagaacggct	tttggcgtgg	cgaaaacggc	240
20	cgtaaaacc	gtagcgcgta	tgaacgtatg	tgcaacatcc	tgaaaggcaa	aggcccgaaa	300
	tatgtgaaac	agaacaccct	gaaactggcc	accggtgcga	gcgcggcggt	tgaggacctg	360
	cgtgttctga	gctttattcg	tggctatggc	gaactgcgta	gccgttattg	ggcgattcgt	420
25	accgtagcgc	gtgggtccgc	ggccaaactg	ctgaaagaac	gcggtttctt	cggtgcgatc	480
	gccggttttc	tggaaggtag	caaagcctac	tctaattggt	accgtagcga	tggtccggat	540
30	tacgccagcc	tggttagcct	gctgaccgaa	gttgaaacct	acgttctggg	ttggctgacc	600
	ggtaaaaatg	gtctgtacct	ggtttggacc	ggtgttacct	agaatggttt	ctggcgcggt	660
	gaaaatggtc	gcaaaaaccg	cagcgcctac	gaacgcatgt	gtaatattct	gaaaggtaaa	720
35	ggtccgaaat	acgttaaaca	gaataccctg	aaactggcca	ccggcgcag	cgccgccttc	780
	gaggacctgc	gcgttctgag	cttcatccgc	ggttacggtg	aactgcgcag	ccgctactgg	840
40	gccatccgca	cccgcagcgg	tggtccgccg	gcaaaactgc	tgaaagaacg	cggttttttt	900
	ggtgccattg	cggtttttct	ggaaggtagc	aaagcctatt	ctaactgcta	tccgtacgat	960
	gttccggatt	atgagagcct	gggtagcctg	ctgaccgaag	tgaaaccta	tgttctgggt	1020
45	tggtgaccg	gcaaaaacgg	tctgtatccg	gtttggaccg	gtgtgacca	gaacggtttt	1080
	tggtgcggtg	aaaacggccg	taaaaccgc	agcgcctatg	aacgcatgtg	caacattctg	1140
50	aaaggcaaag	gtccgaaata	cgtgaaacag	aacaccctga	aactggccac	cggtgcgagc	1200
	gcggcctttg	aggacctgcg	cgttctgagc	tttattcgcg	gctatggtga	actgcgcagc	1260
	cgctattggg	cgattcgtac	ccgcagcggc	ggctaataac	tcgagaagct	ttctagacat	1320
55	atgatgcatg	agctc					1335

<210> 88  
 <211> 431  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60

<220>  
 <223> Polipéptido Sintético

65

<400> 88

Met Arg Ser Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



**Reivindicaciones**

1. Un polipéptido multiepitópico multimérico que comprende múltiples copias de una pluralidad de epítopes peptídicos del virus de la gripe dispuestos en una configuración seleccionada de estructura polimérica secuencial alternante  $(X_1X_2X_3...X_9)_n$  y una estructura de copolímero de bloques  $(X_1)_n(X_2)_n(X_3)_n...(X_9)_n$ , en el que n es en cada aparición independientemente un número entero de 3-5; y cada uno de  $X_1$ - $X_9$  es un epítope peptídico de la gripe diferente seleccionado del grupo que consiste en HA 354-372 correspondiente a E1 y SEC ID N°: 82, HA 91-108 correspondiente a E2 y SEC ID N°: 48, M1 2-12 correspondiente a E3 y SEC ID N°: 25, HA 150-159 correspondiente a E4 y SEC ID N°: 52, HA 143-149 correspondiente a E5 y SEC ID N°: 51, NP 206-229 correspondiente a E6 y SEC ID N°: 64, HA 307-319 correspondiente a E7 y SEC ID N°: 59, NP 335-350 correspondiente a E8 y SEC ID N°: 69 y NP 380-393 correspondiente a E9 y SEC ID N°: 70.
2. El polipéptido según la reivindicación 1 que comprende:
- (i) nueve epítopes peptídicos del virus de la gripe diferentes dispuestos en la siguiente estructura polimérica secuencial alternante  $[E1E2E3E4E5E6E7E8E9]_n$ , en la que n es 3 ó 5; o
- (ii) tres repeticiones de nueve epítopes peptídicos del virus de la gripe diferentes dispuestos en la siguiente estructura de copolímero de bloques  $[E1E1E1-E2E2E2-E3E3E3-E4E4E4-E5E5E5-E6E6E6-E7E7E7-E8E8E8-E9E9E9]$ .
3. El polipéptido según la reivindicación 1 como se expone en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 84, SEC ID N°: 86 y SEC ID N°: 88.
4. El polipéptido según la reivindicación 1 que comprende además una secuencia de vehículo.
5. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido multiepitópico de la gripe según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
6. El polinucleótido aislado según la reivindicación 5 que codifica una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 84, SEC ID N°: 86 y SEC ID N°: 88; o que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 83, SEC ID N°: 85 y SEC ID N°: 87.
7. Una vacuna para la inmunización de un sujeto contra la gripe que comprende al menos un polipéptido según la reivindicación 1.
8. La vacuna según la reivindicación 7, que comprende además un adyuvante.
9. Una vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 para su uso en inducir una respuesta inmunitaria y conferir protección contra la gripe.
10. Uso de un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la preparación de una composición de vacuna para la inmunización contra la gripe.

ATGCATATGAGATCTCCAGCTAAACTTCTGAAAGAACGTGGATTTTTCGGTGCAATCGCT  
 GGTTTTCTGGAGGGGTCGAAAGCCTACAGTAACTGTTACCCCTACGATGTGCCCGATTAT  
 GCCAGCCTGGGTAGCCTCCTTACAGAAGTTGAAACTTATGTGCTCGGCTGGCTGACAGGG  
 AAAAACGGCCTTTATCCTGTGTGGACCGGCGTGACGCAGAACGGATTCTGGCGTGGCGAA  
 AATGGACGTAAACTCGCAGTGCATGAGCGCATGTGTAACATCCTCAAAGGTAAAGGC  
 CCGAAATATGTGAAACAGAATACATTTAAATTAGCCACCGGCGGAGCGCTGCCTTTGAA  
 GACCTCCGTGTGCTCAGTTTTATCCGCGGTTATGGGGAACCTGCGTTCTCGCTATTGGGCG  
 ATCCGTACCCGGTCAGGGGGTCCACCGGCGAAGCTGCTGAAAGAACGTGGGTTCTTCGGT  
 GCGATTGCCGTTTTCTTGAAGGATCAAAGCGTATTCGAACTGCTACCCGTATGATGTG  
 CCAGATTACGCCAGCCTGGGCTCCCTCTTGACAGAGGTCGAAACCTATGTAAGTGGGTTGG  
 CTGACCGGTAAGAACGGTCTGTATCCGTTTTGGACTGGTGTGACACAAAACGGCTTTTGG  
 CGGGGGGAAAACGGCCGGAAAACCCGCGAGCGTTACGAGCGCATGTGCAACATTCTGAAA  
 GGCAAAGGCCCGAAATACGTGAAGCAGAATACGCTCAAACCTGCCACGGGCGCAAGCGCA  
 GCCTTTGAAGACCTGCGGGTCTTGAGCTTTATCCGCGGTTACGGGGAGCTGCGGTCGCGC  
 TACTGGGCGATTTCGTACGCGTAGTGGTGGACCTCCCGCGAAAACCTCTGAAAGAGCGGGGC  
 TTCTTTGGAGCGATTGCGGGCTTCTTGGAGGGAAGCAAAGCCTACTCTAAATGTTACCCA  
 TACGATGTGCCTGATTATGCGAGCCTCGGTAGCTTGTGACAGAAAGTGGAAACCTACGTT  
 CTCGGCTGGCTGACGGGCAAAAATGGTCTTACCCAGTGTGGACCGGAGTTACCCAGAAT  
 GGGTTCTGGCGCGGTGAGAACGGCCGTAACACGTTACGCGTACGAGCGGATGTGCAAC  
 ATCTTAAAAGGCAAAGGACCGAAATACGTCAAGCAGAATACTCTGAAGTTAGCCACTGGG  
 GCCTCAGCCGCTTTGAAGACCTTCGCGTCTTGAGTTTTATCCGGGTTATGGGGAACCTG  
 CGGAGCCGCTACTGGGCTATTCGTACGCGGTCGGGTGGCCACTCGAGCCGGCCAAATTG  
 CTCAAAGAACGTGGTTTTCTTCGGAGCGATCGCAGGTTTTCTTGAAGGCTCTAAAGCGTAC  
 AGCAACTGTTATCCATACGATGTGCCGGATTACGCCAGTCTGGGTTCCCTCCTGACCGAG  
 GTGGAACCGTATGTACTAGGATGGCTCACGGGTAAAAATGGTCTCTATCCTGTGTGGACG  
 GCGTAACCCAGAACGGCTTTTGGCGGGCGAAAACGGCCGAAAACCCGTAGCGCATAAC  
 GAGCGTATGTGAACATCCTTAAAGGCAAAGGTCCAAAATACGTTAAGCAGAATACCCCTG  
 AACTGGCTACGGGCGCCAGTGCAGCCTTCGAAGATTTACGGGTGCTGTCTTCATCCGC  
 GGCTATGGTGAACGCGCTCTCGTTACTGGGCAATCCGTACCCGAGTGGCGGACCTCCG  
 GCTAAACTGTTGAAAGAACCGCGCTTCTTGGTGCTATCGCAGGTTTTCTGGAAGGAAGT  
 AAAGCATATTCGAATTGTTATCCCTACGACGTGCCGGATTATGCGTTCGCTCGGTTTCGCTG  
 CTGACCGAGGTGGAACCTACGTTCTAGGCTGGTTGACAGGTAAGAACGGGCTTTACCCG  
 GTATGGACCGCGTTACCCAGAACGGTTTTTGGCGGGTAAAATGGCCGTAACACTCGG  
 TCAGCATACGAACGGATGTGCAATATCTTGAAGGTAAAGGACCGAAATACGTTAAACAG  
 AACACGCTGAAACTGGCAACAGGCGCCAGCGCGGCTTTGAGGATTTACGCGTCTGTCA  
 TTTATTGGGGCTACGGCGAATTACGTAGTCGTTATTGGGCGATTTCGTACCCGCGAGCGGA  
 GGGCTCGAGTAATAAAAGCTTTCTAGACATATGATGCAT

FIG. 1 A

M H M R S P A K L L K E R G F F G A I A G F L E G S K A Y S  
 N C Y P Y D V P D Y A S L G S L L T E V E T Y V L G W L T G  
 K N G L Y P V W T G V T Q N G F W R G E N G R K T R S A Y E  
 R M C N I L K G K G P K Y V K Q N T L K L A T G A S A A F E  
 D L R V L S F I R G Y G E L R S R Y W A I R T R S G G P P A  
 K L L K E R G F F G A I A G F L E G S K A Y S N C Y P Y D V  
 P D Y A S L G S L L T E V E T Y V L G W L T G K N G L Y P V  
 W T G V T Q N G F W R G E N G R K T R S A Y E R M C N I L K  
 G K G P K Y V K Q N T L K L A T G A S A A F E D L R V L S F  
 I R G Y G E L R S R Y W A I R T R S G G P P A K L L K E R G  
 F F G A I A G F L E G S K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S L G  
 S L L T E V E T Y V L G W L T G K N G L Y P V W T G V T Q N  
 G F W R G E N G R K T R S A Y E R M C N I L K G K G P K Y V  
 K Q N T L K L A T G A S A A F E D L R V L S F I R G Y G E L  
 R S R Y W A I R T R S G G P L E P A K L L K E R G F F G A I  
 A G F L E G S K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S L G S L L T E  
 V E T Y V L G W L T G K N G L Y P V W T G V T Q N G F W R G  
 E N G R K T R S A Y E R M C N I L K G K G P K Y V K Q N T L  
 K L A T G A S A A F E D L R V L S F I R G Y G E L R S R Y W  
 A I R T R S G G P P A K L L K E R G F F G A I A G F L E G S  
 K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S L G S L L T E V E T Y V L G  
 W L T G K N G L Y P V W T G V T Q N G F W R G E N G R K T R  
 S A Y E R M C N I L K G K G P K Y V K Q N T L K L A T G A S  
 A A F E D L R V L S F I R G Y G E L R S R Y W A I R T R S G  
 G L E

FIG. 1B

ATGCATATGAGATCTCCAGCTAAACTTCTGAAAGAACGTGGATTTTTTCGGTGCAATCGCT  
 GGTTTTCTGGAGCCACCGGCGAAGCTGCTGAAAGAACGTGGGTTCTTCGGTGCGATTGCC  
 GGTTTCTTGGAACTCCCGCGAAACTTCTGAAAGAGCGGGGCTTCTTTGGAGCGATTGCC  
 GGCTTCTTGGAGCCATCGAAAGCCTACAGTAACTGTACCCCTACGATGTGCCCGATTAT  
 GCCAGCCTGCCTTCAAAAGCGTATTCTGAACTGCTACCCGTATGATGTGCCAGATTACGCC  
 AGCCTGCCAAGCAAAGCCTACTCTAATTGTTACCCATACGATGTGCCCTGATTATGCCGAGC  
 CTCCTAGCCTCCTTACAGAAGTTGAAACTTATGTGCTCAGCTTGCTGACAGAAGTGGAA  
 ACCTACGTTCTCAGCTTGCTGACAGAAGTGGAAACCTACGTTCTCTGGCTGACAGGGAAA  
 AACGGCCTTTATCCTTGGCTGACCGGTAAGAACGGTCTGTATCCGTGGCTGACGGGCAAA  
 AATGGTCTTACCCATGGACCGGCTGACGCGAACCCTTGGACTGGTGTGACACAAAAC  
 CCATGGACCGGAGTTACCCAGAATCCTTTCTGGCGTGGCGAAAATGGACGTAAAACTCGC  
 AGTGCATATGAGCGCATGTGTAACATCCTCAAAGGTAACCCTTTTGGCGGGGGGAAAAC  
 GGCCGAAAACCCGAGCGCTTACGAGCGCATGTGCAACATTCTGAAAGGCAAACCATTCT  
 TGGCGCGGTGAGAACGGCCGTAACACGTTTACGCGTACGAGCGGATGTGCAACATCTTA  
 AAAGGCAAACCTCCGAAATACGTGAAGCAGAATACGCTCAAACCTGCCACGCCACCGAAA  
 TACGTCAAGCAGAACTCTGAAGTTAGCCACTCCGCCGAAATACGTCAAGCAGAACTACT  
 CTGAAGTTAGCCACTCCTTACGCCGCTTTGAAGACCTTCGCGTCTTGAGTTTTATCCGG  
 GGTATCCAAGCGCAGCCTTTGAAGACCTGCGGGTCTTGAGCTTTATCCGCGGTTACCCT  
 TCAGCCGCTTTGAAGACCTTCGCGTCTTGAGTTTTATCCGGGGTTATCCAGAACTGCGT  
 TCTCGCTATTGGGCGATCCGTACCCGGTCAGGGCCGGAGCTGCGGTGCGCTACTGGGCG  
 ATTCGTACGCGTAGTGGTCCAGAACTGCGGAGCCGCTACTGGGCTATTCGTACGCGGTCG  
 GTTAATAACTCGAGAGGCTTTCTAGACATATGATGCAT

FIG. 2A

M H M R S P A K L L K E R G F F G A I A G F L E P P A K L L  
K E R G F F G A I A G F L E P P A K L L K E R G F F G A I A  
G F L E P S K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S L P S K A Y S N  
 C Y P Y D V P D Y A S L P S K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S  
 L P S L L T E V E T Y V L S L L T E V E T Y V L S L L T E V  
 E T Y V L W L T G K N G L Y P W L T G K N G L Y P W L T G K  
 N G L Y P W T G V T Q N P W T G V T Q N P W T G V T Q N P F  
 W R G E N G R K T R S A Y E R M C N I L K G K P F W R G E N  
 G R K T R S A Y E R M C N I L K G K P F W R G E N G R K T R  
 S A Y E R M C N I L K G K P P K Y V K Q N T L K L A T P P K  
 Y V K Q N T L K L A T P P K Y V K Q N T L K L A T P S A A F  
 E D L R V L S F I R G Y P S A A F E D L R V L S F I R G Y P  
 S A A F E D L R V L S F I R G Y P E L R S R Y W A I R T R S  
 G P E L R S R Y W A I R T R S G P E L R S R Y W A I R T R S  
 G

**FIG. 2B**

ATGAGATCTCCGGCGAAACTGCTGAAAAGAACGTGGCTTTTTTGGCGCGATTGCGGGCTTT  
 CTGGAAGGCAGCAAAGCGTATAGCAACTGCTATCCGTATGATGTGCCGGATTACGCGAGT  
 CTGGGCTCTCTGCTGACCGAAGTGAAACCTATGTGCTGGGCTGGCTGACCGGCAAAAAC  
 GGCTGTATCCGGTGTGGACCGCGTGACCCAGAACGGCTTTTTGGCGTGGCGAAAACGGC  
 CGTAAAACCCGTAGCGCGTATGAACGTATGTGCAACATCCTGAAAGGCAAAGGCCCGAAA  
 TATGTGAAACAGAACCCCTGAAACTGGCCACCGGTGCGAGCGCGCGTTTGGAGACCTG  
 CGTGTCTGAGCTTTATTCGTGGCTATGGCGAACTGCGTAGCCGTTATTGGGCGATTTCGT  
 ACCCGTAGCGGTGGTCCGCCGGCCAAACTGCTGAAAAGAACGCGGTTTCTTCGGTGGGATC  
 GCCGGTTTTCTGGAAGGTAGCAAAGCCTACTCTAATTGTTACCCGTACGATGTTCCGGAT  
 TACGCCAGCCTGGGTAGCCTGCTGACCGAAGTTGAAACCTACGTTCTGGGTTGGCTGACC  
 GGTAAAAATGGTCTGTACCCGGTTGGACCGGTGTACCCAGAATGGTTTCTGGCGCGGT  
 GAAATGGTCGCAAAACCCGAGCGCTACGAACGCATGTGTAATATPCTGAAAGGTAAA  
 GGTCCGAAATACGTTAAACAGAATACCCTGAAACTGGCCACCGGCCAGCGCCCGCTTC  
 GAGGACCTGCGCGTTCTGAGCTTCATCCGCGGTTACGGTGAAC TGCCGAGCCGCTACTGG  
 GCCATCCGCACCCGAGCGGTGGTCCGCCGGCGAAACTGCTGAAAAGAACGCGGTTTTTTT  
 GGTGCCATTGCGGGTTTTCTGGAAGGTAGCAAAGCCTATTCTAACTGCTATCCGTACGAT  
 GTTCCGGATTATGCGAGCCTGGGTAGCCTGCTGACCGAAGTGGAACCTATGTTCTGGGT  
 TGGCTGACCGGCAAAAACGGTCTGTATCCGGTTTGGACCGGTGTGACCCAGAACGGTTTT  
 TGGCGCGGTGAAAACGGCCGTAAAACCCGAGCGCTATGAACGCATGTGCAACATTCTG  
 AAAGGCAAAGGTCCGAAATACGTGAAACAGAACCCCTGAAACTGGCCACCGGCGGAGC  
 GCGGCCTTTGAGGACCTGCGCGTCTGAGCTTTATTCGCGGCTATGGTGAAC TGCGCAGC  
 CGCTATTGGGCGATTTCGTACCCGAGCGGCGGCTAATAACTCGAGAAGCTTTCTAGACAT  
 ATGATGCATGAGCTC

FIG. 3A

M R S P A K L L K E R G F F G A I A G F L E G S K A Y S N C  
Y P Y D V P D Y A S L G S L L T E V E T Y V L G W L T G K N  
G L Y P V W T G V T Q N G F W R G E N G R K T R S A Y E R M  
C N I L K G K G P K Y V K Q N T L K L A T G A S A A F E D L  
R V L S F I R G Y G E L R S R Y W A I R T R S G G P P A K L  
L K E R G F F G A I A G F L E G S K A Y S N C Y P Y D V P D  
Y A S L G S L L T E V E T Y V L G W L T G K N G L Y P V W T  
G V T Q N G F W R G E N G R K T R S A Y E R M C N I L K G K  
G P K Y V K Q N T L K L A T G A S A A F E D L R V L S F I R  
G Y G E L R S R Y W A I R T R S G G P P A K L L K E R G F F  
G A I A G F L E G S K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S L G S L  
L T E V E T Y V L G W L T G K N G L Y P V W T G V T Q N G F  
W R G E N G R K T R S A Y E R M C N I L K G K G P K Y V K Q  
N T L K L A T G A S A A F E D L R V L S F I R G Y G E L R S  
R Y W A I R T R S G G

*FIG. 3B*

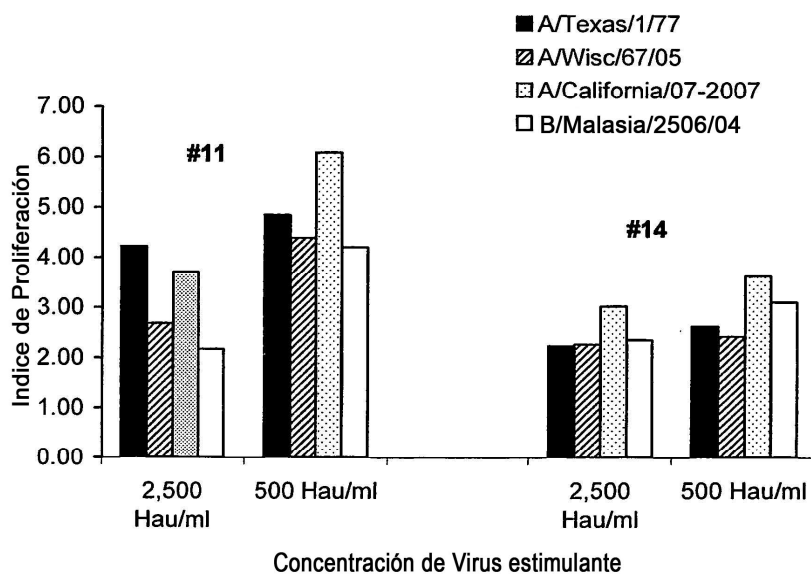
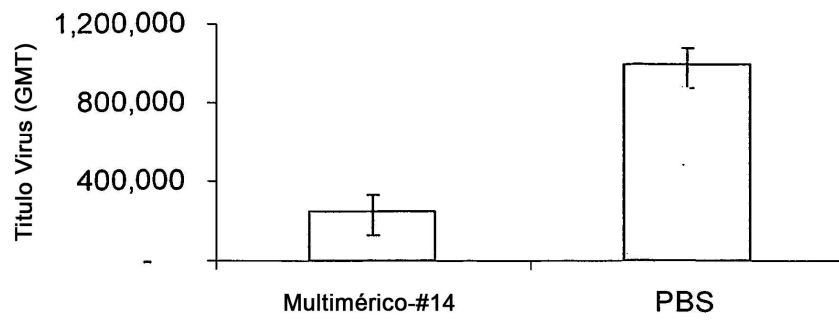


FIG. 4





*FIG. 5*

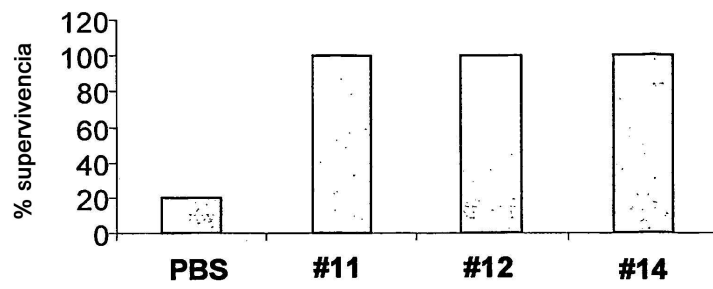


FIG. 6A

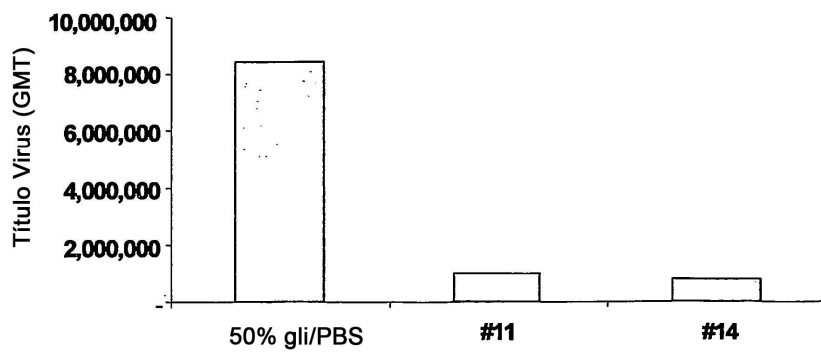


FIG. 6B

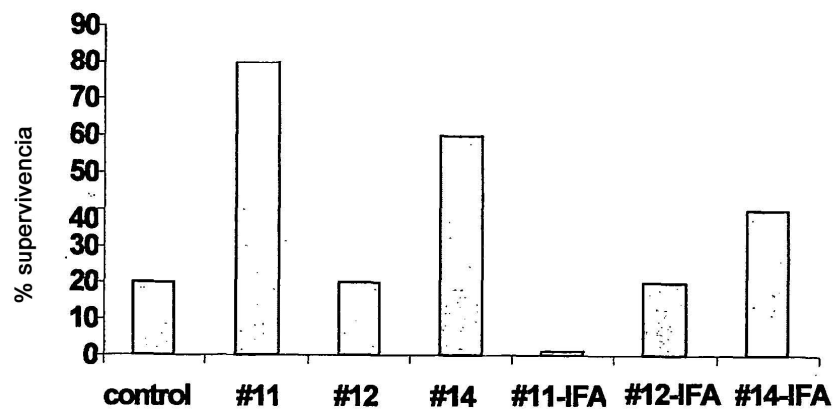


FIG. 7