

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 890**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2011 PCT/US2011/022642**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2011 WO11094358**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2011 E 11737613 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2528626**

54 Título: **Moléculas de ácido nucleico de gripe y vacunas preparadas a partir de estas**

30 Prioridad:

26.01.2010 US 694238

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

13.02.2017

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**WEINER, DAVID, B.;
YAN, JIAN y
MORROW, MATTHEW, P.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 600 890 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Moléculas de ácido nucleico de gripe y vacunas preparadas a partir de estas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a vacunas virales de la gripe mejoradas, su uso en métodos mejorados para inducir respuestas inmunitarias contra la gripe, métodos mejorados para diagnosticar huéspedes mamíferos de gripe vacunados frente a infectados y para inmunizar profiláctica y/o terapéuticamente individuos contra la gripe.

10

Antecedentes de la invención

La influenza, denominada comúnmente como gripe, es una enfermedad infecciosa causada por virus de ARN de la familia *Orthomyxoviridae*. Los virus de la gripe infectan aves y mamíferos. Tres de los cinco géneros de *Orthomyxoviridae* son virus de la gripe: Gripe A, Gripe B y Gripe C. De estas, la Gripe A es la más común.

15

La gripe se transmite normalmente por el aire en aerosoles producidos por toses o estornudos y por contacto directo con líquidos corporales que contienen el virus o superficies contaminadas. Las epidemias estacionales de gripe se producen en todo el mundo y provocan cientos de miles de muertes anualmente. Algunos años, se producen pandemias y causan millones de muertes. Además, el ganado, particularmente aviar y porcino, también es susceptible a epidemias anuales y pandemias ocasionales que causan gran número de muertes animales y pérdidas económicas.

20

Estructuralmente, los virus de la gripe son similares, teniendo partículas de virus generalmente esféricas o filamentosas de aproximadamente 80-120 nm compuestas por un componente molecular similar. Un núcleo central que comprende proteínas virales y ARN viral está cubierto por una envuelta viral compuesta por dos glucoproteínas diferentes y un revestimiento lipídico derivado de la célula en la que se produce la partícula viral. Dos glucoproteínas diferentes adicionales están ancladas dentro de la envuelta viral e incluyen partes que se proyectan hacia fuera en la superficie.

25

30

El genoma de ARN del virus de la gripe se dispone normalmente como ocho segmentos de ARN de sentido negativo, monocatenarios diferentes que, juntos, componen los once genes virales del genoma que codifican las once proteínas (HA, NA, NP, M1, M2, NS1, NEP, PA, PB1, PB1-F2, PB2). Los ocho segmentos de ARN son: 1) HA, que codifica hemaglutinina (se necesitan aproximadamente 500 moléculas de hemaglutinina para formar un virión); 2) NA, que codifica neuraminidasa (se necesitan aproximadamente 100 moléculas de neuraminidasa para formar un virión); 3) NP, que codifica nucleoproteína; 4) M, que codifica dos proteínas de la matriz (la M1 y la M2) usando marcos de lectura diferentes del mismo segmento de ARN (se necesitan aproximadamente 3000 moléculas de proteína de la matriz para formar un virión); 5) NS, que codifica dos proteínas no estructurales distintas (NS1 y NEP) usando diferentes marcos de lectura del mismo segmento de ARN; 6) PA, que codifica una ARN polimerasa; 7) PB1, que codifica una ARN polimerasa y la proteína PB1-F2 (induce apoptosis) usando diferentes marcos de lectura del mismo segmento de ARN; y 8) PB2, que codifica una ARN polimerasa.

35

40

De estas once proteínas, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) son dos grandes glucoproteínas ancladas en la envuelta viral y presentes en la superficie externa de las partículas virales. Estas proteínas sirven como inmunógenos para respuestas inmunitarias contra la gripe. La HA, que es una lectina que media en la unión del virus a células diana y la entrada del genoma viral en la célula diana, se expresa como un único producto génico, HA0, y a continuación es procesada por proteasas del huésped para producir dos subunidades, HA1 y HA2, que juntas forman un complejo en la superficie de partículas virales de la gripe. La NA está implicada en la liberación de partículas virales maduras recién producidas, producidas en células infectadas.

45

50

Existen dieciséis serotipos de HA conocidos y nueve serotipos de NA conocidos para virus de la gripe A. La identidad de los diferentes serotipos presentes en una partícula viral normalmente se usa para describir un virus. Por ejemplo, H1N1 es un virus de la gripe con serotipo H1 de HA y serotipo N1 de NA; H5N1 es un virus de la gripe con serotipo H5 de HA y serotipo N1 de NA. Solamente los serotipos H1, H2 y H3, y los serotipos N1 y N2 infectan habitualmente a seres humanos.

55

Las cepas de gripe son generalmente específicas de especie o género; es decir una cepa de gripe que puede infectar cerdos (un virus de la gripe porcina) normalmente no infecta seres humanos o aves; una cepa de gripe que puede infectar aves (un virus de la gripe aviar) no infecta seres humanos o cerdos; y una cepa de gripe que puede infectar seres humanos (un virus de la gripe humana) no infecta aves o cerdos. Las cepas de gripe, sin embargo, pueden mutar y volverse infectivas de una especie a otra. Por ejemplo, una cepa que solamente infecta cerdos, una gripe porcina, puede mutar o recombinarse para convertirse en una cepa que puede infectar seres humanos solamente o tanto cerdos como seres humanos. Un virus de la gripe denominado comúnmente "gripe porcina" es una cepa del virus de la gripe, tal como una cepa H1N1, que puede infectar seres humanos y que se derivó de una cepa que era previamente específica para cerdos (es decir un virus de la gripe porcina es una gripe humana de origen porcino o gripe humana derivada del cerdo). Un virus de la gripe denominado comúnmente "gripe aviar" es

60

65

una cepa de virus de la gripe, tal como una cepa H5N1, que puede infectar seres humanos y que se derivó de una cepa que era previamente específica para aves (un virus de la gripe aviar es una gripe humana de origen aviar o gripe humana derivada de aves).

5 Se proporcionan vacunaciones contra la gripe de forma estacional a muchos seres humanos en países desarrollados y algunas veces al ganado. Las vacunas usadas son de resultados protectores limitados, dado que las respuestas inmunitarias inducidas por las vacunas son específicas para ciertos subtipos de virus. Diferentes vacunas de la gripe se desarrollan y administran anualmente basándose en vigilancia internacional y estimaciones de los científicos de qué tipos y cepas de virus circularán en un año dado. El virus cambia significativamente por mutación, 10 recombinación y reorganización de los segmentos. De este modo, las vacunas administradas un año no se consideran protectoras contra las cepas estacionales que son transmitidas ampliamente el año siguiente.

La "vacuna antigripal" promovida comúnmente por los Centros para el control y la prevención de enfermedades en los EE. UU., contiene habitualmente tres virus de la gripe destruidos/inactivados: un virus A (H3N2), un virus A (H1N1), y un virus B. Por lo tanto, es evidente que las vacunaciones están limitadas a predicciones de subtipos, y la 15 disponibilidad de una vacuna específica para ese subtipo.

La administración directa de secuencias de ácido nucleico para vacunar contra enfermedades animales y humanas se ha estudiado y se han centrado muchos esfuerzos en medios eficaces y eficientes de suministro de ácido 20 nucleico con el fin de producir la expresión necesaria de los antígenos deseados, dando como resultado una respuesta inmunológica y, en última instancia, el éxito de esta técnica.

Las vacunas de ADN presentan muchas ventajas conceptuales respecto a métodos de vacunación más tradicionales, tales como virus atenuados vivos y vacunas basadas en proteínas recombinantes. Las vacunas de 25 ADN son seguras, estables, se producen fácilmente, y son bien toleradas en seres humanos con ensayos preclínicos que indican pocos indicios de integración en plásmidos [Martin, T., et al., Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. *Hum Gene Ther*, 1999. 10(5): p. 759-68; Nichols, W.W., et al., Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. 772: p. 30-9]. Además, las vacunas de ADN son muy adecuadas para administración repetida debido al hecho de que la eficacia de la vacuna no está influida por valores cuantitativos de anticuerpos pre-existentes para el vector [Chattergoon, M., J. Boyer, y D.B. Weiner, Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. *FASEB J*, 1997. 11(10): p. 753-63]. Sin embargo, un obstáculo fundamental para la adopción clínica de vacunas de ADN ha sido una disminución de la inmunogenicidad de la plataforma cuando se muda a animales más grandes [Liu, M.A. y J.B. Ulmer, Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet*, 2005. 55: p. 25-40]. Recientes avances tecnológicos en el diseño de inmunógeno de vacuna de ADN, tales como la optimización de codones, optimización de ARN y la adición de secuencias líder de inmunoglobulina han mejorado la expresión y la inmunogenicidad de las vacunas de ADN [Andre, S., et al., Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J Virol*, 1998. 72(2): p. 1497-503; Deml, L., et al., Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J Virol*, 2001. 75(22): p. 10991-1001; Laddy, D.J., et al., Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza. *Vaccine*, 2007. 25(16): p. 2984-9; Frelin, L., et al., Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. *Gene Ther*, 2004. 11(6): p. 522-33], así como, tecnología desarrollada recientemente en sistemas de suministro de plásmidos tal como electroporación [Hirao, L.A., et al., Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine*, 2008. 26(3): p. 440-8; Luckay, A., et al., Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *J Virol*, 2007. 81(10): p. 5257-69; Ahlen, G., et al., In vivo electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3+ T cells. *J Immunol*, 2007. 179(7): p. 4741-53]. Además, estudios han sugerido que el uso de inmunógenos consenso puede ser capaz de incrementar la amplitud de la respuesta inmunitaria celular en comparación con antígenos nativos en solitario [Yan, J., et al., Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. *Mol Ther*, 2007. 15(2): p. 411-21; Rolland, M., et al., Reconstruction and function of ancestral center-of-tree human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J Virol*, 2007. 81(16): p. 8507-14]. 50

Un método para suministrar secuencias de ácido nucleico tales como ADN plasmídico es la técnica de electroporación (EP). La técnica ha sido usada en ensayos clínicos en seres humanos para suministrar fármacos anti-cáncer, tales como bleomicina, y en muchos estudios preclínicos en gran número de especies animales. 55

El documento WO2009/026397 se refiere a vacunas de la gripe, antígenos, composiciones y métodos profilácticos y terapéuticos. 60

Sigue existiendo una necesidad de una proteína hemaglutinina consenso de gripe inmunógena, de construcciones de ácido nucleico que codifican dicha proteína y de composiciones útiles para inducir respuestas inmunitarias contra múltiples cepas de gripe. Sigue existiendo una necesidad de vacunas eficaces contra la gripe que sean económicas y eficaces para numerosos subtipos de gripe para tratar individuos. 65

Sumario de la invención

El objeto para el que se busca protección es tal como se define en las reivindicaciones.

5 En particular, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican, cada una, un antígeno de hemaglutinina de gripe B (BHA) consenso adecuado para inducir una respuesta inmunitaria contra múltiples serotipos de gripe, en la que las una o más secuencias de ácido nucleico se seleccionan entre el grupo que consiste en:

10 a) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 13, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 13; un fragmento de la SEQ ID NO: 13 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 13 que comprende al menos 60 nucleótidos; y

15 b) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 15, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 15; un fragmento de la SEQ ID NO: 15 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 15 que comprende al menos 60 nucleótidos.

20 La presente invención también proporciona una composición que comprende:

a) una pluralidad de una o más moléculas de ácido nucleico que comprenden una o más secuencias de ácido nucleico que codifican, cada una, un antígeno de hemaglutinina de gripe B (BHA) consenso adecuado para inducir una respuesta inmunitaria contra múltiples serotipos de gripe, en la que las una o más secuencias de ácido nucleico se seleccionan entre el grupo que consiste en:

25 i) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 13, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 13; un fragmento de la SEQ ID NO: 13 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 13 que comprende al menos 60 nucleótidos; y

30 ii) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 15, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 15; un fragmento de la SEQ ID NO: 15 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 15 que comprende al menos 60 nucleótidos;

y

40 b) una o más secuencias de ácido nucleico adicionales que codifican una o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en una o más de: una hemaglutinina H1 de gripe A, una hemaglutinina H2 de gripe A, una hemaglutinina H3 de gripe A, una hemaglutinina H4 de gripe A, una hemaglutinina H5 de gripe A, una hemaglutinina H6 de gripe A, una hemaglutinina H7 de gripe A, una hemaglutinina H8 de gripe A, una hemaglutinina H9 de gripe A, una hemaglutinina H10 de gripe A, una hemaglutinina H11 de gripe A, una hemaglutinina H12 de gripe A, una hemaglutinina H13 de gripe A, una hemaglutinina H14 de gripe A, una hemaglutinina H15 de gripe A, una hemaglutinina H16 de gripe A, una neuraminidasa N1 de gripe A, una neuraminidasa N2 de gripe A, una neuraminidasa N3 de gripe A, una neuraminidasa N4 de gripe A, una neuraminidasa N5 de gripe A, una neuraminidasa N6 de gripe A, una neuraminidasa N7 de gripe A, una neuraminidasa N8 de gripe A, una neuraminidasa N9 de gripe A, una hemaglutinina de gripe B y una neuraminidasa de gripe B.

La presente invención proporciona además un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico de la invención unido de forma operativa a elementos reguladores que son funcionales en una célula humana, o que comprende una composición de la invención en la que las secuencias de ácido nucleico están, cada una, unidas de forma operativa a elementos reguladores que son funcionales en una célula humana.

La presente invención aún proporciona además una secuencia de ácido nucleico o composición de la invención para uso en la inducción de una respuesta inmunitaria y una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico de la invención para uso en la protección de un individuo contra infección por gripe, preferentemente por una cepa de gripe A humana de origen porcino o para uso en el tratamiento de la gripe, preferentemente infección por una cepa de gripe A humana de origen porcino.

La presente invención proporciona además una composición que comprende:

65 a) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno de hemaglutinina de gripe B (BHA) consenso adecuado para inducir una respuesta inmunitaria contra múltiples serotipos de gripe, en la que las una

o más secuencias de ácido nucleico se seleccionan entre el grupo que consiste en:

i) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 13, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 13; un fragmento de la SEQ ID NO: 13 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 13 que comprende al menos 60 nucleótidos; y

ii) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 15, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 15; un fragmento de la SEQ ID NO: 15 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 15 que comprende al menos 60 nucleótidos; y

b) una o más secuencias de ácido nucleico adicionales que codifican una o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en una o más de: una hemaglutinina H1 de gripe A, una hemaglutinina H2 de gripe A, una hemaglutinina H3 de gripe A, una hemaglutinina H4 de gripe A, una hemaglutinina H5 de gripe A, una hemaglutinina H6 de gripe A, una hemaglutinina H7 de gripe A, una hemaglutinina H8 de gripe A, una hemaglutinina H9 de gripe A, una hemaglutinina H10 de gripe A, una hemaglutinina H11 de gripe A, una hemaglutinina H12 de gripe A, una hemaglutinina H13 de gripe A, una hemaglutinina H14 de gripe A, una hemaglutinina H15 de gripe A, una hemaglutinina H16 de gripe A, una neuraminidasa N1 de gripe A, una neuraminidasa N2 de gripe A, una neuraminidasa N3 de gripe A, una neuraminidasa N4 de gripe A, una neuraminidasa N5 de gripe A, una neuraminidasa N6 de gripe A, una neuraminidasa N7 de gripe A, una neuraminidasa N8 de gripe A, una neuraminidasa N9 de gripe A, una hemaglutinina de gripe B y una neuraminidasa de gripe B;

para uso en la protección de un individuo contra infección por gripe, preferentemente por una cepa de gripe A humana de origen porcino, o para uso en el tratamiento de la gripe, preferentemente infección por gripe A humana de origen porcino.

En el presente documento se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 1, una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a la SEQ ID NO: 1; un fragmento de la SEQ ID NO: 1; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a un fragmento de la SEQ ID NO: 1; la SEQ ID NO: 3; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a la SEQ ID NO: 3; un fragmento de la SEQ ID NO: 3; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a un fragmento de la SEQ ID NO: 3; la SEQ ID NO: 6; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a la SEQ ID NO: 6; un fragmento de la SEQ ID NO: 6; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a un fragmento de la SEQ ID NO: 6; la SEQ ID NO: 9; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a la SEQ ID NO: 9; un fragmento de la SEQ ID NO: 9; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a un fragmento de la SEQ ID NO: 9; la SEQ ID NO: 11; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a la SEQ ID NO: 11; un fragmento de la SEQ ID NO: 11; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a un fragmento de la SEQ ID NO: 11; la SEQ ID NO: 13; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a la SEQ ID NO: 13; un fragmento de la SEQ ID NO: 13; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a un fragmento de la SEQ ID NO: 13; y la SEQ ID NO: 15; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a la SEQ ID NO: 15; un fragmento de la SEQ ID NO: 15; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a un fragmento de la SEQ ID NO: 15.

También se proporcionan composiciones que comprenden: a) una primera secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en una o más de: la SEQ ID NO: 1, una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a la SEQ ID NO: 1; un fragmento de la SEQ ID NO: 1; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a un fragmento de la SEQ ID NO: 1; la SEQ ID NO: 3; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a la SEQ ID NO: 3; un fragmento de la SEQ ID NO: 3; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a un fragmento de la SEQ ID NO: 3; la SEQ ID NO: 6; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a la SEQ ID NO: 6; un fragmento de la SEQ ID NO: 6; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a un fragmento de la SEQ ID NO: 6; la SEQ ID NO: 9; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a la SEQ ID NO: 9; un fragmento de la SEQ ID NO: 9; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a un fragmento de la SEQ ID NO: 9; la SEQ ID NO: 11; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a la SEQ ID NO: 11; un fragmento de la SEQ ID NO: 11; y una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a un fragmento de la SEQ ID NO: 11; la SEQ ID NO: 13; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a la SEQ ID NO: 13; un fragmento de la SEQ ID NO: 13; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a un fragmento de la SEQ ID NO: 13; la SEQ ID NO: 15; una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a la SEQ ID NO: 15; un fragmento de la SEQ ID NO: 15; y una secuencia de ácido nucleico que es el 95 % homóloga a un fragmento de la SEQ ID NO: 15; y b) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en una o más de: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9 de gripe A, hemaglutinina, neuraminidasa de gripe B y fragmentos de las mismas.

Algunos aspectos de la invención proporcionan moléculas y/o composiciones de ácido nucleico de la invención para uso en método de inducción de una respuesta inmunitaria.

5 Aspectos adicionales de la invención proporcionan moléculas y/o composiciones de ácido nucleico de la invención para uso en métodos de protección de un individuo contra infección. Los métodos comprenden la etapa de: administrar a dicho individuo una cantidad profilácticamente eficaz de una molécula de ácido nucleico que comprende dichas secuencia o composiciones de ácido nucleico; en la que la secuencia de ácido nucleico se expresa en células de dicho individuo y una respuesta inmunitaria protectora es inducida contra una proteína codificada por dicha secuencia de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria es una
10 respuesta inmunitaria protectora contra gripe humana de origen porcino.

En algunos aspectos de la invención, se proporcionan moléculas y/o composiciones de ácido nucleico de la invención para uso en métodos para tratar a un individuo que ha sido infectado por la gripe. Los métodos comprenden la etapa de: administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de dichas moléculas y/o
15 composición de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria terapéutica contra gripe humana de origen porcino.

Breve descripción de las figuras

20 La figura 1 es un mapa del plásmido vector de estructura principal de 2999 pares de bases pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad CA). El promotor de CMV está ubicado en las bases 137-724. El promotor/sitio de cebado de T7 está en las bases 664-683. Sitios de clonación múltiple están en las bases 696-811. Una señal de poliadenilación GH bovina está en las bases 829-1053. El gen de resistencia a kanamicina está en las bases 1226-2020. El origen de pUC está en las bases 2320-2993.
25 Basándose en la secuencia de pVAX1 disponible de Invitrogen, se descubrieron las siguientes mutaciones en la secuencia de pVAX1 que se usó como la estructura principal para pGX2009:

C>G 241 en el promotor de CMV
30 C>T estructura principal de 1942, cadena abajo de la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (bGHpolyA)
A> - estructura principal de 2876, cadena abajo de el gen de kanamicina
C>T 3277 en la mutación de elevado número de copias del origen de replicación (Ori) de pUC (véase Nucleic Acid Research 1985)
35 G>C 3753 en el mismo extremo de Ori de pUC cadena arriba del sitio de ARNasa H
Los pares de bases 2, 3 y 4 se cambian de ACT a CTG en la estructura principal, cadena arriba del promotor de CMV.

La figura 2 muestra dos mapas del plásmido pGX2009, que también se denomina pH1HA09. La secuencia de ácido nucleico del plásmido pGX2009 (SEQ ID NO: 5) incluye la secuencia codificante para la construcción de proteína H1 consenso (aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 codificada por la SEQ ID NO: 3) que incluye el líder de IgE (aminoácidos de la SEQ ID NO: 17) unido al extremo N de la secuencia de aminoácidos de H1 consenso (aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 codificada por la SEQ ID NO: 1) que está unida en su extremo C a la marca HA (SEQ ID NO: 18). La proteína H1 consenso (aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 codificada por la SEQ ID NO: 3) está marcada SwiHum Con HA y H1HA09.
40

45 La figura 3 muestra un mapa del plásmido pGX2006. La secuencia de ácido nucleico del plásmido pGX2006 (SEQ ID NO: 8) incluye la secuencia codificante para la proteína H2 consenso (aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 codificada por la SEQ ID NO: 6) que está marcada H2HA.

La figura 4 muestra datos de ensayos de inhibición de la hemaglutinación realizados con sueros de hurones inmunizados.

50 La figura 5 muestra resultados de una provocación de hurones inmunizados y sin inmunizar con una cepa de H1N1 novedosa.

Descripción detallada

55 Se proporcionan secuencias de aminoácidos consenso de cada H1 y H2 de la gripe A (denominadas en el presente documento "H1 consenso" (SEQ ID NO: 2) y "H2 consenso" (SEQ ID NO: 7), respectivamente), así como una novedosa secuencia de aminoácidos de hemaglutinina H1 de gripe A consenso híbrida sintética (denominada en el presente documento "U2 consenso" (SEQ ID NO: 10)) y una secuencia de aminoácidos de hemaglutinina de gripe B consenso (denominada en el presente documento "BHA consenso" (SEQ ID NO: 13)), que pueden proporcionar
60 protección de mamíferos contra la gripe. Además, se proporcionan proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de H1 consenso, la secuencia de aminoácidos de H2 consenso, la secuencia de aminoácidos de U2 consenso y/o la secuencia de aminoácidos de BHA consenso. En algunos aspectos, se proporcionan secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de H1 consenso (por ejemplo (SEQ ID NO: 1) o (SEQ ID NO: 3)), la secuencia de aminoácidos de H2 consenso (por ejemplo (SEQ ID NO: 6)), la
65 secuencia de aminoácidos de U2 consenso (por ejemplo (SEQ ID NO: 9) o (SEQ ID NO: 11)), y/o la secuencia de aminoácidos de BHA consenso (por ejemplo (SEQ ID NO: 13) o (SEQ ID NO: 15)).

Sin desear quedar ligados a la teoría científica, una vacuna que puede usarse para desencadenar una respuesta inmunitaria (humoral, celular, o ambas) de forma amplia contra múltiples subtipos de gripe puede comprender una o más de las siguientes: 1) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de H1 consenso; 2) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de H1 consenso; 3) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de H2 consenso; 4) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de H2 consenso; 5) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de U2 consenso; 6) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de U2 consenso; 7) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de BHA consenso; y 8) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de BHA consenso.

Pueden realizarse métodos de inmunización y pueden prepararse vacunas que usan y/o combinan dos o más de los siguientes componentes: 1) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de H1 consenso; 2) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de H1 consenso; 3) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de H2 consenso; 4) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de H2 consenso; 5) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de U2 consenso; 6) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de U2 consenso; 7) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de BHA consenso, y 8) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de BHA consenso. Para tratamientos de más amplia espectro contra la gripe, pueden realizarse métodos de inmunización y pueden prepararse vacunas que usan y/o combinan una o más proteínas de la gripe diferentes tales como H1-H16 de gripe A, N1-N9 de gripe A, hemaglutinina de gripe B, neuraminidasa de gripe B y/o genes que codifican estas proteínas junto con uno o más de los siguientes componentes: 1) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de H1 consenso; 2) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de H1 consenso; 3) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de H2 consenso; 4) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de H2 consenso; 5) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de U2 consenso; 6) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de U2 consenso; 7) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de BHA consenso, y 8) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de BHA consenso.

1. Definiciones.

La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones particulares solamente y no pretende ser limitante. Tal como se usan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Para la enumeración de intervalos numéricos en el presente documento, cada número intermedio entre ellos con el mismo grado de precisión está contemplado explícitamente. Por ejemplo, para el intervalo de 6-9, los números 7 y 8 están contemplados además de 6 y 9, y para el intervalo 6,0-7,0, los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0 están contemplados explícitamente.

a. Adyuvante

"Adyuvante", tal como se usa en el presente documento, significa cualquier molécula añadida a las vacunas de plásmido de ADN descritas en el presente documento para mejorar la inmunogenicidad de los antígenos codificados por los plásmidos de ADN y las secuencias de ácido nucleico codificantes descritas en lo sucesivo.

b. Anticuerpo

"Anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, significa un anticuerpo de clases IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, o fragmentos, fragmentos o derivados de los mismos, incluyendo Fab, F(ab')₂, Fd, y anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos bifuncionales y derivados de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo aislado a partir de la muestra de suero de un mamífero, un anticuerpo policlonal, anticuerpo purificado por afinidad, o mezclas de los mismos que muestra suficiente especificidad de unión a un epítipo deseado o una secuencia derivada del mismo.

c. Secuencia codificante

"Secuencia codificante" o "ácido nucleico codificante", tal como se usa en el presente documento, significa los ácidos nucleicos (molécula de ARN o ADN) que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína. La secuencia codificante puede incluir además señales de iniciación y terminación unidas de forma operativa a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación capaz de dirigir la expresión en las células de un individuo o mamífero al que se administra el ácido nucleico.

d. Complemento

5 “Complemento” o “complementario”, tal como se usan en el presente documento, significan un ácido nucleico, puede significar apareamiento de bases de Watson-Crick (por ejemplo, A-T/U y C-G) o Hoogsteen entre nucleótidos o análogos de nucleótidos de moléculas de ácido nucleico.

e. Consenso o secuencia consenso

10 “Consenso” o “secuencia consenso”, tal como se usan en el presente documento, significan una secuencia polipeptídica basada en el análisis de un alineamiento de múltiples subtipos de un antígeno de la gripe particular. Pueden prepararse secuencias de ácido nucleico que codifican una secuencia polipeptídica consenso. Pueden usarse vacunas que comprenden proteínas que comprenden secuencias consenso y/o moléculas de ácido nucleico que codifican dichas proteínas, para inducir inmunidad amplia contra múltiples subtipos o serotipos de un antígeno de la gripe particular. Los antígenos de la gripe consenso pueden incluir las secuencias de aminoácidos de hemaglutinina H1 consenso, H2 consenso, o consenso de gripe B.

f. Corriente constante

20 “Corriente constante”, tal como se usa en el presente documento, significa una corriente que es recibida o experimentada por un tejido, o células que definen dicho tejido, durante la duración de un pulso eléctrico suministrado al mismo tejido. El pulso eléctrico es suministrado desde los dispositivos de electroporación descritos en el presente documento. Esta corriente permanece a un amperaje constante en dicho tejido durante la vida de un pulso eléctrico, dado que el dispositivo de electroporación proporcionado en el presente documento tiene un elemento de retroalimentación, que preferentemente tiene retroalimentación instantánea. El elemento de retroalimentación puede medir la resistencia del tejido (o las células) durante toda la duración del pulso y hacer que el dispositivo de electroporación altere su salida de energía eléctrica (por ejemplo, incremente la tensión) de modo que la corriente en el mismo tejido permanezca constante durante todo el pulso eléctrico (del orden de microsegundos), y de un pulso a otro. En algunas realizaciones, el elemento de retroalimentación comprende un controlador.

g. Retroalimentación de corriente o retroalimentación

35 “Retroalimentación de corriente” o “retroalimentación” pueden usarse indistintamente y significan la respuesta activa de los dispositivos de electroporación proporcionados, que comprende medir la corriente en el tejido entre electrodos y alterar la salida de energía suministrada por el dispositivo de EP en consecuencia con el fin de mantener la corriente a un nivel constante. Este nivel constante es preestablecido por un usuario antes del inicio de una secuencia de pulsos o un tratamiento eléctrico. La retroalimentación puede conseguirse mediante el componente de electroporación, por ejemplo, controlador, del dispositivo de electroporación, dado que el circuito eléctrico en su interior es capaz de monitorizar de forma continua la corriente en el tejido entre electrodos y comparar esa corriente monitorizada (o corriente dentro del tejido) con una corriente preestablecida y realizar de forma continua ajustes de salida de energía para mantener la corriente monitorizada a niveles preestablecidos. El bucle de retroalimentación puede ser instantáneo dado que es una retroalimentación en bucle cerrado analógica.

45 h. Corriente descentralizada

50 “Corriente descentralizada”, tal como se usa en el presente documento, significa el patrón de corrientes eléctricas suministradas desde las diversas matrices de electrodo de aguja de los dispositivos de electroporación descritos en el presente documento, en la que los patrones minimizan, o preferentemente eliminan, la aparición de estrés térmico relacionado con la electroporación en cualquier zona de tejido que esté siendo electroporada.

i. Electroporación

55 “Electroporación”, “electro-permeabilización”, o “potenciación electro-cinética” (“EP”), tal como se usan de forma indistinta en el presente documento, significan el uso de un pulso de campo eléctrico transmembrana para inducir trayectorias microscópicas (poros) en una membrana biológica; su presencia permite que biomoléculas tales como plásmidos, oligonucleótidos, ARNip, fármacos, iones, y agua pasen de un lado de la membrana celular al otro.

j. Mecanismo de retroalimentación

60 “Mecanismo de retroalimentación”, tal como se usa en el presente documento, significa un proceso realizado por software o hardware (o firmware), proceso que recibe y compara la impedancia del tejido deseado (antes, durante, y/o después del suministro del pulso de energía) con un valor preestablecido, preferentemente corriente, y ajustar el pulso de energía suministrado para alcanzar el valor preestablecido. Un mecanismo de retroalimentación puede ser realizado por un circuito en bucle cerrado analógico.

k. Fragmento

“Fragmento”, tal como se usa en el presente documento, con respecto a secuencias de ácido nucleico significa una secuencia de ácido nucleico o una parte de la misma, que codifica un polipéptido capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria en un mamífero que reacciona de forma cruzada con un antígeno de gripe de cepa de tipo silvestre de longitud completa, incluyendo, por ejemplo, una hemaglutinina H1 de gripe A, una hemaglutinina H2 de gripe A o una hemaglutinina de gripe B. Los fragmentos pueden ser fragmentos de ADN seleccionados entre al menos una de las diversas secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos consenso y construcciones que comprenden dichas secuencias, incluyendo las SEQ ID NO: 1, 3, 6, 9, 11 13 y 15. Los fragmentos de ADN pueden comprender secuencias codificantes para el líder de inmunoglobulina tales como secuencias de IgE o IgG. Los fragmentos de ADN pueden tener 30 o más nucleótidos de longitud, 45 o más, 60 o más, 75 o más, 90 o más, 120 o más, 150 o más, 180 o más, 210 o más, 240 o más, 270 o más, 300 o más, 360 o más, 420 o más, 480 o más, 540 o más, 600 o más, 660 o más, 720 o más, 780 o más, 840 o más, 900 o más, 960 o más, 1020 o más, 1080 o más, 1140 o más, 1200 o más, 1260 o más, 1320 o más, 1380 o más, 1440 o más, 1500 o más, 1560 o más, 1620 o más, 1680 o más, 1740 o más, 1800 o más, 1860 o más, 1820 o más, 1880 o más, 1940 o más, 2000 o más, 2600 o más, 2700 o más, 2800 o más, 2900 o más, 2910 o más, 2920 o más, 2930 o más, 2931 o más, 2932 o más, 2933 o más, 2934 o más, 2935 o más, 2936 o más, 2937 o más, o 2938 o más de longitud. Los fragmentos de ADN pueden ser de menos de 10 nucleótidos, menos de 20, menos de 30, menos de 40, menos de 50, menos de 60, menos de 75, menos de 90, menos de 120, menos de 150, menos de 180, menos de 210, menos de 240, menos de 270, menos de 300, menos de 360, menos de 420, menos de 480, menos de 540, menos de 600, menos de 660, menos de 720, menos de 780, menos de 840, menos de 900, menos de 960, menos de 1020, menos de 1080, menos de 1140, menos de 1200, menos de 1260, menos de 1320, menos de 1380, menos de 1440, menos de 1500, menos de 1560, menos de 1620, menos de 1680, o menos de 1740 nucleótidos, menos de 1800, menos de 1860, menos de 1820, menos de 1880, menos de 1940, menos de 2000, menos de 2600, menos de 2700, menos de 2800, menos de 2900, menos de 2910, menos de 2920, menos de 2930, menos de 2931, menos de 2932, menos de 2933, menos de 2934, menos de 2935, menos de 2936, menos de 2937, o menos de 2938.

“Fragmento”, con respecto a secuencias polipeptídicas, significa un polipéptido capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria en un mamífero que reacciona de forma cruzada con un antígeno de gripe de cepa de tipo silvestre de longitud completa, incluyendo, por ejemplo, una hemaglutinina H1 de gripe A, una hemaglutinina H2 de gripe A o una hemaglutinina de gripe B. El fragmento puede ser un fragmento polipeptídico seleccionado entre al menos una de las diversas secuencias polipeptídicas de la presente invención, incluyendo las SEQ ID NO: 2, 4, 7, 10, 12, 14 y 16. Los fragmentos polipeptídicos pueden analizarse para contactar con al menos un epítipo antigénico según lo proporcionado por una base de datos disponible al público tal como la Base de datos de secuencias de Ha del Los Alamos National Laboratory. Los fragmentos de HA polipeptídicos pueden comprender además secuencias de aminoácidos para el líder de inmunoglobulina tales como IgE o IgG. Los fragmentos polipeptídicos pueden tener 30 o más aminoácidos de longitud, 45 o más, 60 o más, 75 o más, 90 o más, 120 o más, 150 o más, 180 o más, 210 o más, 240 o más, 270 o más, 300 o más, 360 o más, 420 o más, 480 o más, 540 o más, 600 o más, 660 o más, o 710 aminoácidos o más de longitud. Los fragmentos polipeptídicos pueden tener menos de 10 aminoácidos, menos de 20, menos de 30, menos de 40, menos de 50, menos de 60, menos de 75, menos de 90, menos de 120, menos de 150, menos de 180, menos de 210, menos de 240, menos de 270, menos de 300, menos de 360, menos de 420, menos de 480, menos de 540, menos de 600, menos de 660, menos de 700, menos de 701, menos de 702, menos de 703, menos de 704, menos de 705, menos de 706, menos de 707, menos de 708, menos de 709, o menos de 710 aminoácidos de longitud.

l. Construcción genética

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “construcción genética” se refiere a las moléculas de ADN o ARN que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína. La secuencia codificante incluye señales de iniciación y terminación unidas de forma operativa a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación capaces de dirigir la expresión en las células del individuo al que se le administra la molécula de ácido nucleico. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “forma expresable” se refiere a construcciones génicas que contienen los elementos reguladores necesarios unidos de forma operativa a una secuencia codificante que codifica una proteína de modo que, cuando está presente en la célula del individuo, la secuencia codificante se expresará.

m. Idéntico/a

“Idéntico/a” o “identidad”, tal como se usan en el presente documento, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, significan que las secuencias tienen un porcentaje de residuos especificados que son iguales en una región especificada. El porcentaje puede calcularse alineando de forma óptima las dos secuencias, comparando las dos secuencias en la región especificada, determinando el número de posiciones en las que el residuo idéntico aparece en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la región especificada, y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. En casos en los que las dos secuencias son de diferentes longitudes o el alineamiento produce uno o más extremos escalonados y la región especificada de comparación

incluye solamente una única secuencia, los residuos de única secuencia están incluidos en el denominador pero no en el numerador del cálculo. Cuando se compara ADN y ARN, timina (T) y uracilo (U) pueden considerarse equivalentes. La identidad puede realizarse manualmente o usando un algoritmo de secuencias informático tal como BLAST o BLAST 2.0.

5 n. Impedancia

10 “Impedancia” puede usarse cuando se describe el mecanismo de retroalimentación y puede convertirse en un valor de corriente de acuerdo con la ley de Ohm, permitiendo de este modo comparaciones con la corriente preestablecida.

o. Respuesta inmunitaria

15 “Respuesta inmunitaria”, tal como se usa en el presente documento, significa la activación del sistema inmunitario de un huésped, por ejemplo, el de un mamífero, en respuesta a la introducción del antígeno tal como un antígeno consenso de hemaglutinina de gripe. La respuesta inmunitaria puede estar en forma de una respuesta celular o humoral, o ambas.

20 p. Ácido nucleico

25 “Ácido nucleico” u “oligonucleótido” o “polinucleótido”, tal como se usa en el presente documento, significa al menos dos nucleótidos unidos covalentemente entre sí. La representación de una cadena sencilla también define la secuencia de la cadena complementaria. Por lo tanto, un ácido nucleico también abarca la cadena complementaria de una cadena sencilla representada. Muchas variantes de un ácido nucleico pueden usarse para el mismo fin que un ácido nucleico dado. Por lo tanto, un ácido nucleico también abarca ácidos nucleicos sustancialmente idénticos y complementos de los mismos. Una cadena sencilla proporciona una sonda que puede hibridar con una secuencia diana en condiciones de hibridación rigurosas. Por lo tanto, un ácido nucleico también abarca una sonda que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas.

30 Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, o pueden contener partes de secuencia tanto bicatenaria como monocatenaria. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN, o un híbrido, donde el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribo- y ribonucleótidos, y combinaciones de bases que incluyen uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Los ácidos nucleicos pueden obtenerse mediante métodos de síntesis química o mediante métodos recombinantes.

35 q. Unido de forma operativa

40 “Unido de forma operativa”, tal como se usa en el presente documento, significa que la expresión de un gen está bajo el control de un promotor con el que está espacialmente conectado. Un promotor puede estar situado 5' (cadena arriba) o 3' (cadena abajo) de un gen bajo su control. La distancia entre el promotor y un gen puede ser aproximadamente la misma que la distancia entre ese promotor y el gen que controla en el gen a partir del que se deriva el promotor. Tal como se conoce en la técnica, la variación de esta distancia puede adaptarse sin pérdida de función del promotor.

45 r. Promotor

50 “Promotor”, tal como se usa en el presente documento, significa una molécula sintética o de origen natural que es capaz de otorgar, activar o mejorar la expresión de un ácido nucleico en una célula. Un promotor puede comprender una o más secuencias reguladoras transcripcionales específicas para mejorar adicionalmente la expresión y/o para alterar la expresión espacial y/o la expresión temporal del mismo. Un promotor también puede comprender elementos potenciadores o represores distales, que pueden estar ubicados hasta varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción. Un promotor puede derivarse de fuentes que incluyen viral, bacteriana, fúngica, plantas, insectos y animales. Un promotor puede regular la expresión de un componente génicos de forma constitutiva, o de forma diferencial con respecto a la célula, el tejido o el órgano en el que se produce la expresión o, con respecto a la fase del desarrollo en la que se produce la expresión, o en respuesta a estímulos externos tales como tensiones fisiológicas, patógenos, iones metálicos, o agentes de inducción. Ejemplos representativos de promotores incluyen el promotor del bacteriófago T7, el promotor del bacteriófago T3, el promotor de SP6, el promotor del operón lac, el promotor tac, promotor tardío de SV40, promotor temprano de SV40, promotor de RSV-LTR, promotor de CMV IE, promotor temprano de SV40 o promotor tardío de SV40 y el promotor IE de CMV.

60 s. Condiciones de hibridación rigurosas

65 “Condiciones de hibridación rigurosas”, tal como se usa en el presente documento, significa condiciones en las que una primera secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, sonda) hibridará con una segunda secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, diana), tal como en una mezcla compleja de ácidos nucleicos. Condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las condiciones rigurosas pueden

seleccionarse para ser de aproximadamente 5-10 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definida. La T_m puede ser la temperatura (a fuerza iónica, pH y concentración nucleica definidas) a la que el 50 % de las sondas complementarias a la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (dado que las secuencias diana están presentes en exceso, a T_m , el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio). Condiciones rigurosas pueden ser aquellas en las que la concentración de sales es menor de aproximadamente ion sodio 1,0 M, tal como concentración de ion sodio (u otras sales) aproximadamente 0,01-1,0 M a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de aproximadamente 10-50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, mayores de aproximadamente 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también pueden conseguirse con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva puede ser al menos de 2 a 10 veces la hibridación de fondo. Condiciones de hibridación rigurosas ejemplares incluyen las siguientes: formamida al 50 %, 5x SSC, y SDS al 1 %, incubación a 42 °C, o, 5x SSC, SDS al 1 %, incubación a 65 °C, con lavado en 0,2x SSC, y SDS al 0,1 % SDS a 65 °C.

15 t. Sustancialmente complementaria

“Sustancialmente complementaria”, tal como se usa en el presente documento, significa que una primera secuencia es al menos el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica al complemento de una segunda secuencia en una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 180, 270, 360, 450, 540, 630, 720, 810, 900, 990, 1080, 1170, 1260, 1350, 1440, 1530, 1620, 1710, 1800, 1890, 1980, 2070 o más nucleótidos o aminoácidos, o que las dos secuencias hibridan en condiciones de hibridación rigurosas.

25 u. Sustancialmente idéntica

“Sustancialmente idéntica”, tal como se usa en el presente documento, significa que una primera y segunda secuencias son al menos el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas en una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 180, 270, 360, 450, 540, 630, 720, 810, 900, 990, 1080, 1170, 1260, 1350, 1440, 1530, 1620, 1710, 1800, 1890, 1980, 2070 o más nucleótidos o aminoácidos, o con respecto a ácidos nucleicos, si la primera secuencia es sustancialmente complementaria al complemento de la segunda secuencia.

35 v. Subtipo o serotipo

“Subtipo” o “serotipo”, tal como se usan en el presente documento, indistintamente, y en referencia a virus de la gripe, significan variantes genéticas de un virus de la gripe, de modo que un subtipo sea reconocido por un sistema inmunitario aparte de un subtipo diferente.

40 w. Variante

“Variante”, usada en el presente documento con respecto a un ácido nucleico, significa (i) una parte o fragmento de una secuencia de nucleótidos referenciada; (ii) el complemento de una secuencia de nucleótidos referenciada o una parte de la misma; (iii) un ácido nucleico que es sustancialmente idéntico a un ácido nucleico referenciado o el complemento del mismo; o (iv) un ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con el ácido nucleico referenciado, el complemento del mismo, o una secuencia sustancialmente idéntica al mismo.

“Variante”, con respecto a un péptido o polipéptido que difiere en secuencia de aminoácidos mediante la inserción, delección, o sustitución conservativa de aminoácidos, pero conserva al menos una actividad biológica. Variante también puede significar una proteína con una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una proteína referenciada con una secuencia de aminoácidos que conserva al menos una actividad biológica. Una sustitución conservativa de un aminoácido, es decir, que sustituye a un aminoácido con un aminoácido diferente de propiedades similares (por ejemplo, hidrofilia, grado y distribución de regiones cargadas) se reconoce en la técnica que normalmente implica un cambio menor. Estos cambios menores pueden identificarse, en parte, considerando el índice hidropático de aminoácidos, tal como se entiende en la técnica. Kyte et al., J. Mol. Biol. 157: 105-132 (1982). El índice hidropático de un aminoácido se basa en una consideración de su hidrofobia y carga. En la técnica se conoce que aminoácidos de índices hidropáticos similares pueden sustituirse y seguir conservando la función de la proteína. En un aspecto, se sustituyen aminoácidos que tienen índices hidropáticos de ± 2 . La hidrofilia de los aminoácidos también puede usarse para revelar sustituciones que darían como resultado proteínas que conservan la función biológica. Una consideración de la hidrofilia de aminoácidos en el contexto de un péptido permite el cálculo de la mayor hidrofilia promedio local de ese péptido, una medida útil que se ha descrito que se correlaciona bien con antigenicidad e inmunogenicidad. Patente de Estados Unidos N.º 4.554.101. La sustitución de aminoácidos que tienen valores de hidrofilia similares puede dar como resultado péptidos que conservan la actividad biológica, por ejemplo inmunogenicidad, tal como se entiende en la técnica. Pueden realizarse sustituciones con aminoácidos que tienen valores de hidrofilia dentro de ± 2 entre sí. Tanto el índice de hidrofobia como el valor de hidrofilia de aminoácidos están influidos por la cadena lateral particular de ese aminoácido. Coherente con esa observación, se entiende que las sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la función biológica dependen de la similitud

relativa de los aminoácidos, y particularmente las cadenas laterales de esos aminoácidos, tal como se revela mediante la hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño y otras propiedades.

x. Vector

“Vector”, tal como se usa en el presente documento, significa una secuencia de ácido nucleico que contiene un origen de replicación. Un vector puede ser un vector, bacteriófago, cromosoma artificial bacteriano o cromatografía artificial de levadura. Un vector puede ser un vector de ADN o ARN. Un vector puede ser un vector extracromosómico auto-replicante, y preferentemente, es un plásmido de ADN.

2. Antígeno de gripe

En el presente documento se proporcionan antígenos capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria en un mamífero contra uno o más serotipos de gripe. El antígeno puede ser capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria en un mamífero contra uno o más serotipos de gripe, incluyendo contra una o más cepas pandémicas, tal como gripe de origen porcino 2009 H1N1. El antígeno puede ser capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria en un mamífero contra uno o más serotipos de gripe, incluyendo contra una o más cepas de gripe humana de origen porcino. El antígeno puede comprender epítomos que le hacen particularmente eficaz como inmunógeno contra el que pueden inducirse respuestas inmunitarias anti-gripe.

El antígeno puede comprender el producto de traducción de longitud completa HA0, subunidad HA1, subunidad HA2, una variante del mismo, un fragmento del mismo o una combinación de los mismos. El antígeno de hemaglutinina de gripe puede ser una secuencia consenso derivada de múltiples cepas de gripe A serotipo H1, una secuencia consenso derivada de múltiples cepas de gripe A serotipo H2, una secuencia híbrida que contiene partes de dos secuencias consenso diferentes derivadas de diferentes conjuntos de múltiples cepas de gripe A serotipo H1 o una secuencia consenso derivada de múltiples cepas de gripe B. El antígeno de hemaglutinina de gripe puede ser de gripe B. El antígeno puede contener al menos un epítomo antigénico que puede ser eficaz contra inmunógenos de gripe particulares contra los que puede inducirse una respuesta inmunitaria. El antígeno puede proporcionar un completo repertorio de sitios inmunógenos y epítomos presentes en un virus de la gripe intacto. El antígeno puede ser una secuencia de antígeno de hemaglutinina consenso que puede derivarse de secuencias de antígeno de hemaglutinina de una pluralidad de cepas de virus de la gripe A de un serotipo tal como una pluralidad de cepas de virus de la gripe A de serotipo H1 o de serotipo H2. El antígeno puede ser una secuencia de antígeno de hemaglutinina consenso híbrida que puede derivarse de combinar dos secuencias de antígeno de hemaglutinina consenso diferentes o partes de las mismas. Cada una de dos secuencias de antígeno de hemaglutinina consenso diferentes puede derivarse de un conjunto diferente de una pluralidad de cepas de virus de la gripe A de un serotipo tal como una pluralidad de cepas de virus de la gripe A de serotipo H1. El antígeno puede ser una secuencia de antígeno de hemaglutinina consenso que puede derivarse de secuencias de antígeno de hemaglutinina de una pluralidad de cepas de virus de la gripe B.

El antígeno de hemaglutinina consenso puede ser una proteína que comprende la SEQ ID NO: 2 (la secuencia de aminoácidos de H1 consenso) en la que los aminoácidos 1-343 corresponden a la subunidad HA1 de la secuencia de aminoácidos H1 consenso HA0 precursora y los aminoácidos 344-566 corresponden a la subunidad HA2 de la secuencia de aminoácidos H1 consenso HA0 precursora. El antígeno de hemaglutinina consenso puede ser una proteína que comprende la SEQ ID NO: 7 (la secuencia de aminoácidos de H2 consenso). El antígeno de hemaglutinina consenso puede ser una secuencia H1 consenso híbrida sintética que comprende partes de dos secuencias H1 consenso diferentes que se derivan, cada una, de un conjunto diferente de secuencias de la otra. Un ejemplo de un antígeno HA consenso que es una proteína H1 consenso híbrida sintética es una proteína que comprende la SEQ ID NO: 10 (la secuencia de aminoácidos de U2). El antígeno de hemaglutinina consenso puede ser una proteína hemaglutinina consenso derivada de secuencias de hemaglutinina de cepas de gripe B, tal como una proteína que comprende la SEQ ID NO: 14 (la secuencia de aminoácidos de BHA consenso).

El antígeno de hemaglutinina consenso puede comprender además uno o más elementos de secuencia de aminoácidos adicionales. El antígeno de hemaglutinina consenso puede comprender además en su extremo N una secuencia de aminoácidos líder de IgE o IgG. La secuencia de aminoácidos líder de IgE puede ser la SEQ ID NO: 17. El antígeno de hemaglutinina consenso puede comprender además una marca inmunógena que es un epítomo inmunógeno único que puede ser detectado por anticuerpos disponibles fácilmente. Un ejemplo de dicha marca inmunógena es la marca HA de gripe de 9 aminoácidos que puede estar unida en el extremo C de hemaglutinina consenso. La secuencia de aminoácidos de la marca HA puede ser la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, el antígeno de hemaglutinina consenso puede comprender además en su extremo N una secuencia de aminoácidos líder de IgE o IgG y en su extremo C una marca HA.

El antígeno de hemaglutinina consenso puede ser una proteína hemaglutinina consenso que consiste en secuencias de aminoácidos de gripe consenso o fragmentos y variantes de las mismas. El antígeno de hemaglutinina consenso puede ser una proteína hemaglutinina consenso que comprende secuencias de proteínas no de gripe y secuencias de proteínas de gripe o fragmentos y variantes de las mismas.

Ejemplos de una proteína H1 consenso incluyen aquellas que pueden consistir en la secuencia de aminoácidos de H1 consenso (SEQ ID NO: 2) o aquellas que comprenden además elementos adicionales tales como una secuencia líder de IgE, o una marca HA o tanto una secuencia líder de IgE como una marca HA. Un ejemplo de la proteína H1 consenso que incluye tanto una secuencia líder de IgE como una marca HA es la SEQ ID NO: 4, que comprende la secuencia codificante de aminoácidos de H1 consenso (SEQ ID NO: 2) unida a la secuencia de aminoácidos líder de IgE (SEQ ID NO: 17) en su extremo N y unida a la marca HA (SEQ ID NO: 18) en su extremo C.

Ejemplos de proteínas H2 consenso incluyen aquellas que pueden consistir en la secuencia de aminoácidos de H2 consenso (SEQ ID NO: 7) o aquellas que comprenden además una secuencia líder de IgE, o una marca HA, o tanto una secuencia líder de IgE como una marca HA.

Ejemplos de proteínas H1 consenso híbridas incluyen aquellas que pueden consistir en la secuencia de aminoácidos de U2 consenso (SEQ ID NO: 10) o aquellas que comprenden además una secuencia líder de IgE, o una marca HA, o tanto una secuencia líder de IgE como una marca HA. Un ejemplo de la proteína U2 consenso es la SEQ ID NO: 12, que comprende la secuencia de aminoácidos de U2 consenso (SEQ ID NO: 10) unida a la secuencia de aminoácidos líder de IgE (SEQ ID NO: 17) en su extremo N y unida a la marca HA (SEQ ID NO: 18) en su extremo C.

Ejemplos de proteínas hemaglutinina de gripe B consenso híbridas incluyen aquellas que pueden consistir en la secuencia de aminoácidos de BHA consenso (SEQ ID NO: 14) o pueden comprender una secuencia líder de IgE, o una marca HA, o tanto una secuencia líder de IgE como una marca HA. Un ejemplo de la proteína BHA consenso es la SEQ ID NO: 16 que comprende la secuencia de aminoácidos de BHA consenso (SEQ ID NO: 14) unida a la secuencia de aminoácidos líder de IgE (SEQ ID NO: 17) en su extremo N y unida a la marca HA (SEQ ID NO: 18) en su extremo C.

La proteína hemaglutinina consenso puede estar codificada por un ácido nucleico de hemaglutinina consenso, una variante del mismo o un fragmento del mismo. A diferencia de la proteína hemaglutinina consenso que puede ser una secuencia consenso derivada de una pluralidad de diferentes secuencias de hemaglutinina de diferentes cepas y variantes, el ácido nucleico de hemaglutinina consenso se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de proteína consenso y las secuencias codificantes usadas pueden diferir de las usadas para codificar las secuencias de aminoácidos particulares en la pluralidad de diferentes secuencias de hemaglutinina a partir de las cuales la secuencia de proteína hemaglutinina consenso se deriva. La secuencia de ácido nucleico consenso puede estar optimizada en codón y/u optimizada en ARN. La secuencia de ácido nucleico de hemaglutinina consenso puede comprender una secuencia de Kozak en la región no traducida 5'. La secuencia de ácido nucleico de hemaglutinina consenso puede comprender secuencias de ácido nucleico que codifican una secuencia líder. La secuencia codificante de una secuencia líder N terminal es 5' de la secuencia codificante de hemaglutinina. El líder N-terminal puede facilitar la secreción. El líder N-terminal puede ser un líder de IgE o un líder de IgG. La secuencia de ácido nucleico de hemaglutinina consenso puede comprender secuencias de ácido nucleico que codifican una marca inmunógena. La marca inmunógena puede estar en el extremo C de la proteína y la secuencia que la codifica es 3' de la secuencia codificante de HA. La marca inmunógena proporciona un epítipo único para el que hay fácilmente disponibles anticuerpos, de modo que dichos anticuerpos puedan usarse en ensayos para detectar y confirmar la expresión de la proteína. La marca inmunógena puede ser una marca H en el extremo C de la proteína.

El ácido nucleico de hemaglutinina consenso puede tener una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 14. Un ácido nucleico de hemaglutinina consenso que codifica la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 14 puede ser la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 13, respectivamente. El ácido nucleico de hemaglutinina consenso puede comprender además una secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos líder de IgE, o una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de la marca HA, o ambas. La SEQ ID NO: 17 es la secuencia polipeptídica de una líder de IgE. La SEQ ID NO: 18 es la secuencia polipeptídica de una marca HA. Los ejemplos de ácidos nucleicos consenso de hemaglutinina que comprenden además secuencias de polinucleótidos que codifican una secuencia líder de IgE y una marca HA incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 16. Un ácido nucleico de hemaglutinina consenso que codifica la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 16 puede ser la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 15, respectivamente.

3. Construcciones genéticas y plásmidos

En el presente documento se proporcionan construcciones genéticas que pueden comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno de hemaglutinina. La construcción genética puede estar presente en la célula como una molécula de funcionamiento extracromosómico que comprende el ácido nucleico que codifica el antígeno de hemaglutinina. La construcción genética que comprende el ácido nucleico que codifica el antígeno de hemaglutinina puede ser un minicromosoma lineal que incluye centrómero, telómeros o plásmidos o cósmidos.

La construcción genética también puede ser parte de un genoma de un vector viral recombinante, que incluye adenovirus recombinante, virus asociado a adenovirus recombinante y vaccinia recombinante. La construcción genética puede ser parte del material genético en microorganismos vivos atenuados o vectores microbianos recombinantes que viven en células.

5 Las construcciones genéticas pueden comprender elementos reguladores para la expresión génica del ácido nucleico de hemaglutinina. Los elementos reguladores pueden ser un promotor, un promotor, un codón de iniciación, un codón de terminación, o una señal de poliadenilación.

10 Las composiciones pueden comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno de hemaglutinina consenso seleccionado entre el grupo que consiste en uno o más de: antígeno H1 de hemaglutinina consenso de gripe A, antígeno H2 de hemaglutinina consenso de gripe A, antígeno U2 de hemaglutinina consenso de gripe A, y proteína hemaglutinina consenso BHA de gripe B, y puede comprender además una o más secuencias de ácido nucleico adicionales que codifica una o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en:
 15 proteínas hemaglutinina de gripe A H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, neuraminidasa de gripe A N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, hemaglutinina de gripe B (BHA) y neuraminidasa de gripe B (BNA). Las primera y adicionales secuencias de ácido nucleico pueden estar presentes en la misma molécula de ácido nucleico o diferentes moléculas de ácido nucleico. La primera y adicionales secuencias de ácido nucleico puede estar bajo el control de elementos reguladores que funcionan en una célula humana. La secuencia codificante adicional puede codificar una o más de H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, BHA y BNA de una o más cepas of influenza, o ser un consenso derivado de una pluralidad de cepas que tienen el serotipo, o ser un híbrido que incluye secuencias de dos o más secuencias consenso.

25 Las secuencias de ácido nucleico pueden componer una construcción genética que puede ser un vector. El vector puede ser capaz de expresar un antígeno de hemaglutinina consenso en la célula de un mamífero en una cantidad eficaz para desencadenar una respuesta inmunitaria en el mamífero. El vector puede ser recombinante. El vector puede comprender un ácido nucleico heterólogo que codifica el antígeno de hemaglutinina consenso. El vector puede ser un plásmido. El vector puede ser útil para transfectar células con un ácido nucleico que codifica un
 30 antígeno de hemaglutinina consenso, que la célula huésped transformada se cultive y se mantenga en condiciones en las que la expresión del antígeno de hemaglutinina consenso tiene lugar.

El vector puede comprender un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de hemaglutinina consenso y puede comprender además un codón de iniciación, que puede estar cadena arriba de la secuencia codificante de hemaglutinina consenso, y un codón de terminación, que puede estar cadena abajo de la secuencia codificante de hemaglutinina consenso. El codón de iniciación y terminación puede estar en marco con la secuencia codificante de hemaglutinina consenso. El vector también puede comprender un promotor que está unido de forma operativa a la secuencia codificante de hemaglutinina consenso. El promotor unido de forma operativa a la secuencia codificante de hemaglutinina consenso puede ser un promotor de virus de simio 40 (SV40), un promotor de virus tumoral mamario de ratón (MMTV), un promotor del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) tal como el promotor de repetición terminal larga del virus de inmunodeficiencia bovina (BIV), un promotor de virus de Moloney, un promotor de virus de leucosis aviar (ALV), un promotor de citomegalovirus (CMV) tal como el promotor inmediato temprano de CMV, promotor del virus Epstein Barr (EBV), o un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV). El promotor también puede ser un promotor de un gen humano tal como actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina del músculo humano, o metalotioneína humana. El promotor también puede ser un promotor específico de tejido, tal como un promotor específico de músculo o e piel, natural o sintético. Los ejemplos de dichos promotores se describen en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US20040175727.

50 El vector también puede comprender una señal de poliadenilación, que puede estar cadena abajo de la secuencia codificante de HA. La señal de poliadenilación puede ser una señal de poliadenilación de SV40, señal de poliadenilación de LTR, señal de poliadenilación de hormona del crecimiento bovina (bGH), señal de poliadenilación de hormona del crecimiento humana (hGH), o señal de poliadenilación de β -globina humana. La señal de poliadenilación de SV40 puede ser una señal de poliadenilación de una vacuna pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA).

55 El vector también puede comprender un potenciador cadena arriba de la secuencia codificante de hemaglutinina consenso. El potenciador puede ser necesario para la expresión de ADN. El potenciador puede ser actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina del músculo humana o un potenciador viral tal como uno de CMV, HA, RSV o EBV. Potenciadores de la función de polinucleótidos se describen en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.593.972, 5.962.428 y WO94/016737.

60 El vector también puede comprender un origen de replicación de mamífero con el fin de mantener el vector de forma extracromosómica y producir múltiples copias del vector en una célula. El vector puede ser pVAX1 (figura 1), pCEP4 o pREP4 de Invitrogen (San Diego, CA), que puede comprender el origen de replicación del virus Epstein Barr y región codificante EBNA-1 del antígeno nuclear, que puede producir replicación episómica de copias elevadas sin integración. El vector puede ser pVAX1 con cambios tales como los descritos en el párrafo que se refiere a la figura
 65 1 en la sección de Breve descripción de las figuras, anteriormente. La estructura principal del vector puede ser

pAV0242. El vector puede ser un vector de adenovirus de tipo 5 (Ad5) defectuoso en replicación.

El vector también puede comprender una secuencia reguladora, que puede ser muy adecuada para la expresión génica en una célula de mamífero o humana en la que se administra el vector. La secuencia codificante de hemaglutinina consenso puede comprender un codón, que puede permitir una transcripción más eficiente de la secuencia codificante en la célula huésped.

El vector puede ser pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede usarse para la producción de proteínas en *Escherichia coli* (*E. coli*). El vector también puede ser pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede usarse para la producción de proteínas en cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El vector también puede ser del sistema de expresión en baculovirus completo MAXBAC™ (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede usarse para la producción de proteínas en células de insecto. El vector también puede ser pcDNA1 o pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede usarse para la producción de proteínas en células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO). El vector puede ser vectores o sistemas de expresión para producir proteínas mediante técnicas rutinarias y materiales de partida fácilmente disponibles incluyendo Sambrook et al., *Molecular Cloning an Laboratory Manual*, Segunda Ed., Cold Spring Harbor (1989), que se incorpora en su totalidad como referencia.

El vector puede ser pGX2009 o pGX2006, que pueden usarse para expresar el antígeno de hemaglutinina consenso. El vector pGX2009 (4739 pb, figura 2; SEQ ID NO: 5) es un plásmido pVAX1 modificado con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína H1 consenso (aminoácidos SEQ ID NO: 4 codificada por la SEQ ID NO: 3) que comprende una secuencia líder de IgE (aminoácidos SEQ ID NO: 12 codificada por la SEQ ID NO: 11) unida a una secuencia de aminoácidos de H1 consenso (aminoácidos SEQ ID NO: 2 codificada por la SEQ ID NO: 1). El vector pGX2006 (4628 pb; figura 3, SEQ ID NO: 8) es un plásmido pVAX1 con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína H2 consenso (aminoácidos SEQ ID NO: 7 codificada por la SEQ ID NO: 6).

Las construcciones genéticas y los componentes desvelados en el presente documento que incluyen secuencias codificantes de hemaglutinina consenso pueden usarse para expresar otras proteínas de gripe tales como H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9 de gripe A, proteína hemaglutinina o neuraminidasa de gripe B con lo que secuencias codificantes para proteínas H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9 de gripe A, proteína hemaglutinina o neuraminidasa de gripe B están incluidas en lugar de la secuencias codificantes de hemaglutinina consenso.

4. Composiciones farmacéuticas

En el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención que comprenden de aproximadamente 1 nanogramo a aproximadamente 10 mg de ADN. En algunas realizaciones, composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden de entre: 1) al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 nanogramos, o al menos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995 o 1000 microgramos, o al menos 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 mg o más; y 2) hasta e incluyendo 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 nanogramos, o hasta e incluyendo 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995, o 1000 microgramos, o hasta e incluyendo 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 mg. En algunas realizaciones, composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden aproximadamente 5 nanogramos a aproximadamente 10 mg de ADN. En algunas realizaciones, composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden de aproximadamente 25 nanogramos a aproximadamente 5 mg de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 50 nanogramos a aproximadamente 1 mg de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 350 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 5

a aproximadamente 250 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 15 a aproximadamente 150 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 35 a aproximadamente 40 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente 10 microgramos a aproximadamente 100 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente 20 microgramos a aproximadamente 80 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente 25 microgramos a aproximadamente 60 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente 30 nanogramos a aproximadamente 50 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente 35 nanogramos a aproximadamente 45 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 350 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 microgramos de ADN.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se formulan de acuerdo con la vía de administración a usar. En casos en los que composiciones farmacéuticas son composiciones farmacéuticas inyectables, estas son estériles, libres de pirógenos y libres de partículas. Una formulación isotónica se usa preferentemente. Generalmente, los aditivos para isotonicidad pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos, se prefieren soluciones isotónicas tales como solución salina tamponada con fosfato. Los estabilizantes incluyen gelatina y albúmina. En algunas realizaciones, se añade un agente de vasoconstricción a la formulación.

Preferentemente, la composición farmacéutica es una vacuna, y más preferentemente una vacuna de ADN.

En el presente documento se proporciona una vacuna capaz de generar en un mamífero una respuesta inmunitaria contra uno o más serotipos de gripe. La vacuna puede comprender la construcción genética tal como se ha descrito anteriormente. La vacuna puede comprender una pluralidad de los vectores dirigidos, cada uno, a uno o más serotipos de gripe A tales como hemaglutinina de gripe B H1-H16 o combinaciones de las mismas. Las vacunas pueden comprender una o más secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más antígenos de hemaglutinina consenso. Cuando la vacuna comprende más de una secuencia de ácido nucleico de hemaglutinina consenso, todas dichas secuencias pueden estar presentes en una única molécula de ácido nucleico o cada una de dichas secuencias pueden estar presentes en una molécula de ácido nucleico diferente. Como alternativa, vacunas que comprenden más de una secuencia de ácido nucleico de hemaglutinina consenso pueden comprender moléculas de ácido nucleico con una única secuencia de ácido nucleico de hemaglutinina consenso y moléculas de ácido nucleico con más de una secuencia de ácido nucleico de hemaglutinina consenso. Además, las vacunas que comprenden una o más secuencias de ácido nucleico de hemaglutinina consenso pueden comprender además secuencias codificantes para una o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9 y neuraminidasa de gripe B.

En algunas realizaciones, las vacunas pueden comprender proteínas. Algunas vacunas pueden comprender uno o más antígenos de hemaglutinina consenso tales como H1, H2, U2 y BHA. Las vacunas pueden comprender una o más otras proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9 y neuraminidasa de gripe B. Las vacunas pueden comprender uno o más antígenos de hemaglutinina consenso en combinación con una o más otras proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, hemaglutinina y neuraminidasa de gripe B.

La vacuna puede ser una vacuna de ADN. La vacuna de ADN puede comprender una pluralidad de los mismos o diferentes plásmidos que comprenden una o más secuencias de ácido nucleico de hemaglutinina consenso. La vacuna de ADN puede comprender una o más secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más antígenos de hemaglutinina consenso. Cuando la vacuna de ADN comprende más de una secuencia de ácido nucleico de hemaglutinina consenso, todas dichas secuencias pueden estar presentes en un único plásmido, o cada una de dichas secuencias puede estar presente en un plásmido diferente, o algunos plásmidos pueden comprender una única secuencia de ácido nucleico de hemaglutinina consenso mientras que otros plásmidos tienen más de una secuencia de ácido nucleico de hemaglutinina consenso. Además, las vacunas de ADN pueden comprender además una o más secuencias codificantes consenso para una o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste

en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9 de gripe A, hemaglutinina y neuraminidasa de gripe B. Dichas secuencias codificantes adicionales pueden estar en los mismos o diferentes plásmidos entre sí y respecto a los plásmidos que comprenden una o más secuencias de ácido nucleico de hemaglutinina consenso.

5 En algunas realizaciones, las vacunas pueden comprender secuencias de ácido nucleico que codifican antígenos de gripe en combinación con antígenos de gripe. En algunas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico codifican uno o más antígenos de hemaglutinina consenso tales como H1, H2, U2 y BHA. En algunas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico codifican una o más otras proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en, H1, 10 H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9 de gripe A, hemaglutinina y neuraminidasa de gripe B. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden uno o más antígenos de hemaglutinina consenso tales como H1, H2, U2 y BHA. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden una o más otras proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, 15 H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9 de gripe A, hemaglutinina y neuraminidasa de gripe B.

En algunas realizaciones, las vacunas comprenden una combinación de tres o más secuencias de ácido nucleico de hemaglutinina consenso que incluyen aquellas que codifican una o más de H1, H2, U2 y BHA. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden una combinación de tres o más secuencias de ácido nucleico de hemaglutinina que incluyen aquellas que codifican U2 consenso, BHA consenso y una hemaglutinina H3. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden una combinación de tres o más secuencias de ácido nucleico de hemaglutinina incluyendo aquellas que codifican BHA consenso, una hemaglutinina H1 y una hemaglutinina H3. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden una o más secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más antígenos de gripe desvelados en la patente estadounidense N.º de serie 12/375.518 y/o la patente estadounidense N.º de serie 12/269.824. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden una secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 19 que codifica la SEQ ID NO: 20 (que es una hemaglutinina H1 desvelada en la patente estadounidense N.º de serie 12/375.518 como la SEQ ID NO: 36 y la SEQ ID NO: 37 respectivamente en su interior) y/o la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 21 que codifica la SEQ ID NO: 22 (que es una hemaglutinina H1 desvelada en documento estadounidense N.º de serie 12/269.824 como la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10 respectivamente en su interior). En algunas realizaciones, las vacunas comprenden una secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 23 que codifica la SEQ ID NO: 24 (que es una hemaglutinina H3 desvelada en la patente estadounidense N.º de serie 12/269.824 como la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12 respectivamente en su interior).

En algunas realizaciones, las vacunas comprenden una combinación de tres o más proteínas hemaglutinina consenso que incluyen una o más de H1, H2, U2 y BHA. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden una combinación de tres o más proteínas hemaglutinina que incluyen U2 consenso, BHA consenso y una hemaglutinina H3. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden una combinación de tres o más proteínas hemaglutininas que incluyen BHA consenso, una hemaglutinina H1 y una hemaglutinina H3. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden uno o más antígenos de la patente estadounidense N.º de serie 12/375.518 y/o la patente estadounidense N.º de serie 12/269.824. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden la SEQ ID NO: 20 y/o la SEQ ID NO: 22 y/o la SEQ ID NO: 24.

En algunas realizaciones, las vacunas comprenden una combinación de 1) la proteína U2 hemaglutinina consenso y/o una secuencia de ácido nucleicos que codifica la proteína U2 hemaglutinina consenso, 2) la proteína BHA hemaglutinina consenso y/o una secuencia de ácido nucleicos que codifica la proteína BHA hemaglutinina consenso, y 3) una proteína H3 hemaglutinina desvelada en la SEQ ID NO: 24.

En algunas realizaciones, las vacunas comprenden una combinación de 1) la proteína BHA hemaglutinina consenso y/o una secuencia de ácido nucleicos que codifica la proteína BHA hemaglutinina consenso, 2) una proteína H1 hemaglutinina que tiene la SEQ ID NO: 20 y/o SEQ ID NO: 22 y/o secuencias de ácido nucleico de una proteína H1 hemaglutinina SEQ ID NO: 19 y/o SEQ ID NO: 21, y 3) una proteína H3 hemaglutinina que tiene la SEQ ID NO: 24 y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína H3 hemaglutinina SEQ ID NO: 23 en su interior).

Las vacunas de ADN se desvelan en las patentes de Estados Unidos N.º 5.593.972, 5.739.118, 5.817.637, 5.830.876, 5.962.428, 5.981.505, 5.580.859, 5.703.055 y 5.676.594. La vacuna de ADN puede comprender además elementos o reactivos que inhiben que se integre en el cromosoma. La vacuna puede ser un ARN del antígeno de hemaglutinina. La vacuna de ARN puede introducirse en la célula.

La vacuna puede ser una vacuna recombinante que comprende la construcción genética o el antígeno descrito anteriormente. La vacuna también puede comprender uno o más antígenos de hemaglutinina consenso en forma de una o más subunidades de proteínas, una o más partículas de gripe inactivadas que comprenden uno o más antígenos de hemaglutinina consenso, o una o más partículas de gripe inactivadas que comprenden uno o más antígenos de hemaglutinina consenso. La vacuna atenuada pueden ser vacunas vivas atenuadas, vacunas inactivadas y vacunas que usan vectores recombinantes para suministrar genes extraños que codifican uno o más antígenos de hemaglutinina consenso, así como vacunas de subunidad y glucoproteína. Ejemplos de vacunas vivas atenuadas, aquellas que usan vectores recombinantes para suministrar antígenos extraños, vacunas de subunidad y

vacunas de glucoproteína se describen en las patentes de Estados Unidos N.º: 4.510.245; 4.797.368; 4.722.848; 4.790.987; 4.920.209; 5.017.487; 5.077.044; 5.110.587; 5.112.749; 5.174.993; 5.223.424; 5.225.336; 5.240.703; 5.242.829; 5.294.441; 5.294.548; 5.310.668; 5.387.744; 5.389.368; 5.424.065; 5.451.499; 5.453.3 64; 5.462.734; 5.470.734; 5.474.935; 5.482.713; 5.591.439; 5.643.579; 5.650.309; 5.698.202; 5.955.088; 6.034.298; 6.042.836; 6.156.319 y 6.589.529.

La vacuna puede comprender vectores y/o proteínas dirigidas a serotipos de gripe A de regiones particulares en el mundo, por ejemplo, Asia. La vacuna también puede estar dirigida contra serotipos de gripe A de origen porcino que ahora infectan a seres humanos. La vacuna puede comprender vectores y/o proteínas dirigidas a gripe B de regiones particulares en el mundo. La vacuna también puede estar dirigida contra gripe B que infecta a seres humanos. La vacuna puede comprender uno o más vectores y/o una o más proteínas dirigidas a una o más cepas de gripe A y/o B.

La vacuna proporcionada puede usarse para inducir respuestas inmunitarias que incluyen respuestas inmunitarias terapéuticas o profilácticas. Pueden generarse anticuerpos y/o células T citotóxicas que están dirigidos al antígeno de hemaglutinina consenso, y también ampliamente entre múltiples subtipos de virus de la gripe. Dichos anticuerpos y células pueden aislarse.

La vacuna puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. El excipiente farmacéuticamente aceptable pueden ser moléculas funcionales como vehículos, adyuvantes, portadores, o diluyentes. El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un agente que facilita la transfección, que puede incluir agentes tensioactivos, tales como complejos inmunoestimuladores (ISCOMS), adyuvante incompleto de Freund, análogo de LPS que incluye monofosforil lípido A, péptidos de muramilo, análogos de quinona, vesículas tales como escualeno y escualeno, ácido hialurónico, lípidos, liposomas, iones de calcio, proteínas virales, polianiones, policationes, o nanopartículas, u otros agentes que facilitan la transfección conocidos.

El agente que facilita la transfección es un polianión, policación, incluyendo poli-L-glutamato (LGS), o lípido. El agente que facilita la transfección es poli-L-glutamato, y más preferentemente, el poli-L-glutamato está presente en la vacuna a una concentración menor de 6 mg/ml. El agente que facilita la transfección también puede incluir agentes tensioactivos tales como complejos inmunoestimuladores (ISCOMS), adyuvante incompleto de Freund, análogo de LPS incluyendo monofosforil lípido A, péptidos de muramilo, análogos de quinona y vesículas tales como escualeno y escualeno, y ácido hialurónico también pueden usarse administradas junto con la construcción genética. En algunas realizaciones, las vacunas de vector de ADN también pueden incluir un agente que facilita la transfección tal como lípidos, liposomas, incluyendo liposomas de lecitina u otros liposomas conocidos en la técnica, como una mezcla de ADN-liposoma (véase por ejemplo el documento WO9324640), iones de calcio, proteínas virales, polianiones, policationes, o nanopartículas, u otros agentes que facilitan la transfección conocidos. Preferentemente, el agente que facilita la transfección es un polianión, policación, incluyendo poli-L-glutamato (LGS), o lípido. La concentración del agente de transfección en la vacuna es menor que 4 mg/ml, menor que 2 mg/ml, menor que 1 mg/ml, menor que 0,750 mg/ml, menor que 0,500 mg/ml, menor que 0,250 mg/ml, menor que 0,100 mg/ml, menor que 0,050 mg/ml, o menor que 0,010 mg/ml.

El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un adyuvante. El adyuvante puede ser otros genes que se expresan en un plásmido alternativo o se suministran como proteínas en combinación con el plásmido anterior en la vacuna. El adyuvante puede seleccionarse entre el grupo que consiste en: interferón α (IFN- α), interferón β (IFN- β), interferón γ , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), quimioquina que atrae de células T cutáneas (CTACK), quimioquina expresada en el timo epitelial (TECK), quimioquina epitelial asociada a las mucosas (MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80, CD86 incluyendo IL-15 que tiene la secuencia señal delecionada y que opcionalmente incluye el péptido señal de IgE. El adyuvante puede ser IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, o una combinación de los mismos.

Otros genes que pueden ser adyuvantes útiles incluyen aquellos que codifican: MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, L-selectina, P-selectina, E-selectina, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento de fibroblastos, IL-7, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento endotelial vascular, Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspasa ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, NIK inactiva, SAP K, SAP-1, JNK, genes de respuesta a interferón, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, LIGANDO DE RANK, 0x40, LIGANDO DE 0x40, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 y fragmentos funcionales de los mismos.

La vacuna puede comprender además un agente facilitador de vacuna genética tal como se describe en la patente estadounidense N.º de serie 021.579 presentada el 1 de abril de 1994.

5. Métodos de suministro

En el presente documento se proporciona el uso de las formulaciones farmacéuticas, preferentemente vacunas, en métodos de suministro para proporcionar construcciones genéticas y proteínas del antígeno de hemaglutinina que comprenden epítomos que les hacen inmunógenos particularmente eficaces contra los que puede inducirse una respuesta inmunitaria a infecciones víricas por gripe. El método de suministrar la vacuna, o vacunación, puede generarse para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica y/o profiláctica. El proceso de vacunación puede generarse en el mamífero una respuesta inmunitaria contra una pluralidad de subtipos de gripe, incluyendo un serotipo H1N1, tal como el H1N1 de origen porcino 2009, u otras variedades estacionales y/o pandémicas. La vacuna puede suministrarse a un individuo para modular la actividad del sistema inmunitario del mamífero y mejorar la respuesta inmunitaria. El suministro de la vacuna puede ser la transfección del antígeno de HA como una molécula de ácido nucleico que se expresa en la célula y se suministra a la superficie de la célula en la que el sistema inmunitario la reconoce e induce una respuesta celular, humoral, o celular y humoral. El suministro de la vacuna puede usarse para inducir o desencadenar una respuesta inmunitaria en mamíferos contra una pluralidad de virus de la gripe administrando a los mamíferos la vacuna tal como se describe en el presente documento.

En el momento del suministro de la vacuna al mamífero, e inmediatamente después, del vector en las células del mamífero, las células transfectadas expresarán y secretarán la proteína de gripe correspondiente, incluyendo al menos uno de los antígenos consenso, y preferentemente H1, H2, U2 y BHA. Estas proteínas secretadas, o antígenos sintéticos, serán reconocidos como extraños por el sistema inmunitario, que montará una respuesta inmunitaria que puede incluir: anticuerpos preparados contra los antígenos, y una respuesta de células T específicamente contra el antígeno. En algunos ejemplos, un mamífero vacunado con las vacunas descritas en el presente documento tendrá un sistema inmunitario sensibilizado y cuando es provocado con una cepa viral de gripe, el sistema inmunitario sensibilizado permitirá un rápido aclaramiento de posteriores virus de la gripe, ya sea por medio humoral, celular o ambos. La vacuna puede suministrarse a un individuo para modular la actividad del sistema inmunitario del individuo, mejorando de este modo la respuesta inmunitaria.

La vacuna puede suministrarse en forma de una vacuna de ADN y métodos de suministro de una vacuna de ADN se describen en las patentes de Estados Unidos N.º 4.945.050 y 5.036.006.

La vacuna puede administrarse a un mamífero para desencadenar una respuesta inmunitaria en un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano, primate no humano, vaca, cerdo, oveja, cabra, antilope, bisonte, búfalo de agua, bóvidos, ciervo, puercoespines, elefantes, llama, alpaca, ratones, ratas, o pollo, y preferentemente ser humano, vaca, cerdo o pollo.

a. Tratamientos de combinación

Las composiciones farmacéuticas, preferentemente vacunas, pueden administrarse en combinación con una o más otras proteínas de gripe o genes que codifican H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9 de gripe A, hemaglutinina y neuraminidasa de gripe B. La vacuna puede administrarse en combinación con proteínas o genes que codifican adyuvantes, que pueden incluir: interferón α (IFN- α), interferón β (IFN- β), interferón γ , IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, L-selectina, P-selectina, E-selectina, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento de fibroblastos, IL-7, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento endotelial vascular, Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspasa ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, NIK inactiva, SAP K, SAP-1, JNK, genes de respuesta a interferón, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, LIGANDO DE RANK, O \times 40, LIGANDO DE O \times 40, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, o TAP2, o fragmentos funcionales de los mismos.

b. Vías de administración

La vacuna puede administrarse mediante diferentes vías incluyendo por vía oral, por vía parenteral, por vía sublingual, por vía transdérmica, por vía rectal, por vía transmucosal, por vía tópica, por inhalación, por administración bucal, por vía intrapleural, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intranasal, intratecal e intraarticular o combinaciones de las mismas. Para uso veterinario, la composición puede administrarse como una formulación aceptable adecuadamente de acuerdo con la práctica veterinaria normal. El veterinario puede determinar fácilmente la pauta posológica y la vía de administración que es la más apropiada para un animal particular. La vacuna puede administrarse mediante jeringas tradicionales, dispositivos de inyección sin aguja, "pistolas de bombardeo de microproyectiles", u otros métodos físicos tales como electroporación ("EP"), "método hidrodinámico", o ultrasonidos.

El vector de la vacuna puede suministrarse al mamífero mediante varias tecnologías bien conocidas que incluyen inyección de ADN (también denominada vacunación con ADN) con y sin electroporación in vivo, mediada por liposomas, mediada por nanopartículas, vectores recombinantes tales como adenovirus recombinante, virus asociado a adenovirus recombinante y vaccinia recombinante. El antígeno de HA puede suministrarse mediante inyección de ADN y junto con electroporación in vivo.

c. Electroporación

La administración de la vacuna mediante electroporación de los plásmidos de la vacuna puede conseguirse usando dispositivos de electroporación que pueden estar configurados para suministro a un tejido deseado de un mamífero un pulso de energía eficaz para hacer que se formen poros reversibles en membranas celulares, y preferentemente el pulso de energía es una corriente constante similar a una corriente preestablecida introducida por un usuario. El dispositivo de electroporación puede comprender un componente de electroporación y un conjunto de electrodos o conjunto de mango. El componente de electroporación puede incluir e incorporar uno o más de los diversos elementos de los dispositivos de electroporación, incluyendo: controlador, generador de forma de onda de corriente, testador de impedancia, registrador de forma de onda, elemento de entrada, elemento notificador de estado, puerto de comunicación, componente de memoria, fuente de alimentación, y conmutador de alimentación. La electroporación pueden conseguirse usando un dispositivo de electroporación in vivo, por ejemplo sistema de EP CELLECTRA® (VGX Pharmaceuticals, Blue Bell, PA) o electroporador Elgen (Genetronics, San Diego, CA) para facilitar la transfección de células por el plásmido.

El componente de electroporación puede funcionar como un elemento de los dispositivos de electroporación, y los otros elementos son elementos (o componentes) independientes en comunicación con el componente de electroporación. El componente de electroporación puede funcionar como más de un elemento de los dispositivos de electroporación, que puede estar en comunicación con otros elementos más de los dispositivos de electroporación independientes del componente de electroporación. Los elementos de los dispositivos de electroporación que existen como partes de un dispositivo electromecánico o mecánico pueden no estar limitados, dado que los elementos pueden funcionar como un dispositivo o como elementos independientes en comunicación entre sí. El componente de electroporación puede ser capaz de suministrar el pulso de energía que produce la corriente constante en el tejido deseado, e incluye un mecanismo de retroalimentación. El conjunto de electrodos puede incluir una matriz de electrodos que tiene una pluralidad de electrodos en una disposición espacial, en la que el conjunto de electrodos recibe el pulso de energía del componente de electroporación y lo suministra al tejido deseado a través de los electrodos. Al menos uno de la pluralidad de electrodos es neutro durante el suministro del pulso de energía y mide la impedancia en el tejido deseado y comunica la impedancia al componente de electroporación. El mecanismo de retroalimentación puede recibir la impedancia medida y puede ajustar el pulso de energía suministrado por el componente de electroporación para mantener la corriente constante.

Una pluralidad de electrodos puede suministrar el pulso de energía en un patrón descentralizado. La pluralidad de electrodos puede suministrar el pulso de energía en el patrón descentralizado a través del control de los electrodos en una secuencia programada, y la secuencia programada es introducida por un usuario al componente de electroporación. La secuencia programada puede comprender una pluralidad de pulsos suministrados en secuencia, en la que cada pulso de la pluralidad de pulsos es suministrada por al menos dos electrodos activos con un electrodo neutro que mide la impedancia, y en la que un pulso posterior de la pluralidad de pulsos es suministrado por uno diferente de al menos dos electrodos activos con un electrodo neutro que mide la impedancia.

El mecanismo de retroalimentación puede realizarse mediante hardware o software. El mecanismo de retroalimentación puede realizarse mediante un circuito en bucle cerrado analógico. La retroalimentación se produce cada 50 μ s, 20 μ s, 10 μ s o 1 μ s, pero es preferentemente una retroalimentación en tiempo real o instantánea (es decir, sustancialmente instantánea según lo determinado mediante técnicas disponibles para determinar el tiempo de respuesta). El electrodo neutro puede medir la impedancia en el tejido deseado y comunica la impedancia al mecanismo de retroalimentación, y el mecanismo de retroalimentación responde a la impedancia y ajusta el pulso de energía para mantener la corriente constante a un valor similar a la corriente preestablecida. El mecanismo de retroalimentación puede mantener la corriente constante continua e instantáneamente durante el suministro del pulso de energía.

Los ejemplos de dispositivos de electroporación y métodos de electroporación que pueden facilitar el suministro de las vacunas de ADN de la presente invención, incluyen los descritos en la Patente de Estados Unidos N.º 7.245.963 de Draghia-Akli, et al., la publicación de patente de Estados Unidos 2005/0052630 presentada por Smith, et al. Otros dispositivos de electroporación y métodos de electroporación que pueden usarse para facilitar el suministro de las vacunas de ADN incluyen aquellas proporcionadas en la solicitud de patente de Estados Unidos pendiente de tramitación y de titularidad conjunta N.º de serie 11/874072, presentada el 17 de octubre de 2007, que reivindica el beneficio según 35 USC 119(e) de las solicitudes provisionales de Estados Unidos N.º de serie 60/852.149, presentada el 17 de octubre de 2006, y 60/978.982, presentada el 10 de octubre de 2007.

La patente de Estados Unidos N.º 7.245.963 de Draghia-Akli, et al., describe sistemas de electrodos modulares y su uso para facilitar la introducción de una biomolécula en células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Los

sistemas de electrodos modulares pueden comprender una pluralidad de electrodos de aguja; una aguja hipodérmica; un conector eléctrico que proporciona una unión conductora desde un controlador de pulsos de corriente constante programable a la pluralidad de electrodos de aguja; y una fuente de alimentación. Un operador puede agarrar la pluralidad de electrodos de aguja que están montados sobre una estructura de soporte e insertarlos firmemente en el tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Las biomoléculas son suministradas a continuación mediante el agua hipodérmica al interior del tejido seleccionado. El controlador de pulsos de corriente constante programable se activa y un pulso eléctrico de corriente constante se aplica a la pluralidad de electrodos de aguja. El pulso eléctrico de corriente constante aplicado facilita la introducción de la biomolécula en la célula entre la pluralidad de electrodos.

La publicación de patente de Estados Unidos 2005/0052630 presentada por Smith, et al., describe un dispositivo de electroporación que puede usarse para facilitar eficazmente la introducción de una biomolécula en células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. El dispositivo de electroporación comprende un dispositivo electrocinético ("dispositivo EKD") cuyo funcionamiento es especificado mediante software o firmware. El dispositivo EKD produce una serie de patrones de pulso de corriente constante programables entre electrodos en una matriz basándose en control y entrada por parte del usuario de los parámetros del pulso, y permite el almacenamiento y la adquisición de datos de forma de onda de corriente. El dispositivo de electroporación también comprende un disco de electrodo sustituible que tiene una matriz de electrodos de aguja, un canal de inyección central para una aguja de inyección, y un disco de guía amovible.

Las matrices de electrodos y los métodos descritos en la patente de Estados Unidos N.º 7.245.963 y la publicación de patente de Estados Unidos 2005/0052630 pueden adaptarse para penetración profunda en no solamente tejidos tales como músculos, sino también otros tejidos u órganos. Debido a la configuración de la matriz de electrodos, la aguja de inyección (para suministrar la biomolécula de elección) también es insertada completamente en el órgano diana, y la inyección se administra perpendicular al tejido diana, en la zona que es pre-delineada por los electrodos. Los electrodos descritos en la patente de Estados Unidos N.º 7.245.963 y la publicación de patente de Estados Unidos 2005/005263 son preferentemente de 20 mm de largo y de calibre 21.

Adicionalmente, contemplados en algunas realizaciones que incorporan dispositivos de electroporación y usos de los mismos, hay dispositivos de electroporación que son los descritos en las siguientes patentes: patente de Estados Unidos 5.273.525 presentada el 28 de diciembre de 1993, patentes de Estados Unidos 6.110.161 presentada el 29 de agosto de 2000, 6.261.281 presentada el 17 de julio de 2001, y 6.958.060 presentada el 25 de octubre de 2005, y la patente de Estados Unidos 6.939.862 presentada el 6 de septiembre de 2005. Además, patentes que abarcan el asunto proporcionado en la patente de Estados Unidos 6.697.669 presentada el 24 de febrero de 2004, que se refiere al suministro de ADN usando cualquiera de diversos dispositivos, y la patente de Estados Unidos 7.328.064 presentada el 5 de febrero de 2008, concebida como un método de inyección de ADN, están contemplados en el presente documento.

d. Método de preparación de una vacuna

En el presente documento se proporcionan métodos para preparar los plásmidos de ADN que comprenden las vacunas de ADN descritas en el presente documento. Los plásmidos de ADN, después de la etapa de subclonación final en el plásmido de expresión en mamíferos, pueden usarse para inocular un cultivo celular en un tanque de fermentación a gran escala, usando métodos conocidos en la técnica.

Los plásmidos de ADN para uso con los dispositivos de EP de la presente invención pueden formularse o fabricarse usando una combinación de dispositivos y técnicas conocidas, pero preferentemente se fabrican usando una técnica de fabricación de plásmidos optimizada que se describe en una solicitud provisional de Estados Unidos N.º de serie 60/939.792 cedida, pendiente de tramitación, que se presentó el 23 de mayo de 2007. En algunos ejemplos, los plásmidos de ADN usados en estos estudios pueden formularse a concentraciones mayores que o iguales a 10 mg/ml. Las técnicas de fabricación también incluyen o incorporan diversos dispositivos y protocolos que son conocidos comúnmente por los expertos en la materia, además de los descritos en la patente estadounidense N.º de serie 60/939792, incluyendo los descritos en una patente cedida, la patente de Estados Unidos No. 7.238.522, que se presentó el 3 de julio de 2007.

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan a modo de ilustración solamente. A partir de la descripción anterior y estos ejemplos, un experto en la materia puede valorar las características esenciales de esta invención y, sin alejarse del alcance de la misma, puede realizar diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones. Por lo tanto, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior. Dichas modificaciones también pretenden estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

pGX2009 (pH1HA09) - Plásmido que codifica antígeno de hemaglutinina de gripe H1N1 2009 (gripe porcina)

- 5 La estructura principal de pGX2009 (H1HA09) es el vector de expresión modificado pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) bajo el control del promotor inmediato-temprano de citomegalovirus (CMV). El pVAX1 original se adquirió de Invitrogen (Número de catálogo V260-20) y se mantuvo a -20 °C. Tal como se ha indicado anteriormente, el análisis de secuencias reveló diferencias entre la secuencia de pVAX1 usada como la estructura principal de pGX2009 y la secuencia de pVAX1 disponible de Invitrogen. Las diferencias se han mostrado anteriormente.
- 10 El plásmido pGX2009, también denominado pH1HA09, comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de hemaglutinina de gripe H1N1 2009 consenso (gripe porcina). Las 79 secuencias primarias usadas para generar la secuencia consenso se seleccionaron de la base de datos *The Influenza Sequence Database*.
- 15 Los números de entrada para secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos para las diversas proteínas H1 hemaglutinina de gripe A así como las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de nucleótidos son, en la base de datos GenBank, correspondientes a los siguientes números de entrada. Los números de entrada no entre paréntesis desvelan secuencias de nucleótidos y enumeran secuencias de aminoácidos adicionales codificadas por ellas. Los números de entrada entre paréntesis son para entradas de la secuencia de aminoácidos correspondientes en la base de datos de proteínas GenBank. Los números de entrada son los siguientes: GQ323579.1 (ACS72657.1), GQ323564.1 (ACS72654.1), GQ323551.1 (ACS72652.1), GQ323530.1 (ACS72651.1), GQ323520.1 (ACS72650.1), GQ323495.1 (ACS72648.1), GQ323489.1 (ACS72647.1), GQ323486.1 (ACS72646.1), GQ323483.1 (ACS72645.1), GQ323455.1 (ACS72641.1), GQ323451.1 (ACS72640.1), GQ323443.1 (ACS72638.1), GQ293077.1 (ACS68822.1), GQ288372.1 (ACS54301.1), GQ287625.1 (ACS54262.1), GQ287627.1 (ACS54263.1), GQ287623.1 (ACS54261.1), GQ287621.1 (ACS54260.1), GQ286175.1 (ACS54258.1), GQ283488.1 (ACS50088.1), GQ280797.1 (ACS45035.1), GQ280624.1 (ACS45017.1), GQ280121.1 (ACS45189.1), GQ261277.1 (ACS34968.1), GQ253498.1 (ACS27787.1), GQ323470.1 (ACS72643.1), GQ253492.1 (ACS27780.1), FJ981613.1 (ACQ55359.1), FJ971076.1 (ACP52565.1), FJ969540.1 (ACP44189.1), FJ969511.1 (ACP44150.1), FJ969509.1 (ACP44147.1), GQ255900.1 (ACS27774.1), GQ255901.1 (ACS27775.1), FJ966974.1 (ACP41953.1), GQ261275.1 (ACS34967.1), FJ966960.1 (ACP41935.1), FJ966952.1 (ACP41926.1), FJ966082.1 (ACP41105.1), GQ255897.1 (ACS27770.1), CY041645.1 (ACS27249.1), CY041637.1 (ACS27239.1), CY041629 (ACS27229.1), GQ323446.1 (ACS72639.1), CY041597.1 (ACS27189.1), CY041581.1 (ACS14726.1), CY040653.1 (ACS14666.1), CY041573.1 (ACS14716.1), CY041565.1 (ACS14706.1), CY041541.1 (ACS14676.1), GQ258462.1 (ACS34667.1), CY041557.1 (ACS14696.1), CY041549.1 (ACS14686.1), GQ283484.1 (ACS50084.1), GQ283493.1 (ACS50095.1), GQ303340.1 (ACS71656.1), GQ287619.1 (ACS54259.1), GQ267839.1 (ACS36632.1), GQ268003.1 (ACS36645.1), CY041621.1 (ACS27219.1), CY041613.1 (ACS27209.1), CY041605.1 (ACS27199.1), FJ966959.1 (ACP41934.1), FJ966982.1 (ACP41963.1), CY039527.2 (ACQ45338.1), FJ981612.1 (ACQ55358.1), FJ981615.1 (ACQ55361.1), FJ982430.1 (ACQ59195.1), FJ998208.1 (ACQ73386.1), GQ259909.1 (ACS34705.1), GQ261272.1 (ACS34966.1), GQ287621.1 (ACS54260.1), GQ290059.1 (ACS66821.1), GQ323464.1 (ACS72642.1), GQ323473.1 (ACS72644.1), GQ323509.1 (ACS72649.1), GQ323560.1 (ACS72653.1), GQ323574.1 (ACS72655.1) y GQ323576.1 (ACS72656.1). Las secuencias de aminoácidos se descargaron de la base de datos *NCBI Sequence Database*, y una secuencia de alineamiento y consenso se generó usando Clustal X. Una secuencia líder altamente eficiente, el líder de IgE, se fusionó en marco cadena arriba del codón de iniciación para facilitar la expresión. Con el fin de tener un nivel más elevado de expresión, el uso de codones de este gen de fusión se adaptó al sesgo de codones de genes de Homo Sapiens. Además, también se realizó optimización de ARN: regiones de muy alto (>80 %) o muy bajo (<30 %) contenido de GC y los motivos de secuencia que actúan en cis tales como cajas TATA internas, sitios chi y sitios de entrada ribosómicos se evitaron. Toda la secuencia se produjo de forma sintética en Geneart (Regensburg, Alemania). El gen H1HA09 genomanipulado sintético tenía 1818 pb de longitud (SEQ ID NO: 1) y fue clonado en pVAX1 en sitios de BamHI y XhoI por Geneart (figura 2).

Ejemplo 2

Provocación de hurones inmunizados con pGX2009 de gripe con A/Mexico/InDRE4487/2009

- 55 Se llevaron a cabo experimentos de provocación usando hurones, un modelo preferido para gripe. Los hurones se inmunizaron usando el plásmido pGX2009.

Animales: 4 grupos x 5 animales/grupo, más un grupo de control con 4 animales = 24 hurones en total (macho)

Duración: 18 semanas (incluyendo provocación)

- 60 Dosis: 0,2 mg de plásmido

- Resumen del protocolo: Se asignaron hurones aleatoriamente a grupos de vacuna de ADN. Los animales se inmunizaron el día 0, el día 28 y el día 56 del estudio. Los animales se anestesiaron con un cóctel de ketamina/midazolam, isoflurano o equivalente de acuerdo con protocolos de anestesia aprobados y se vacunaron IM con combinaciones de vacunas de ADN para gripe. Los grupos 1 y 2 fueron electroporados inmediatamente usando el dispositivo de electroporación (EP) a corriente constante CELLECTRA® a 0,5 Amp, pulsos de 52 milisegundos,

0,2 s entre pulsos, 4 s de plazo de disparo, 3 pulsos totales. Los animales de control fueron controles sin tratamiento previo (sin plásmido, sin EP). A los hurones se les permitió recuperarse de la anestesia en sus jaulas y fueron monitorizados estrechamente durante 24 horas para garantizar una completa recuperación.

5 Alimentos y agua estuvieron disponibles *ad libitum* durante toda la duración del estudio. El día 84, los animales fueron provocados mediante infección intranasal con 1 ml de MX10 (A/Mexico/InDRE4487/2009; 5 x 10⁵ UFP/ml). Los animales fueron monitorizados a diario para signos clínicos (peso, temperatura, etc.), usando una ficha de puntuación establecida y aprobada. El 1, 3, 6, 9 y 15 dpi se recogieron lavados nasales y frotis rectales. Los pulmones se recogieron a día 15. Las muestras se almacenaron en RNAlater para carga viral mediante PCR en tiempo real, medio para virus infeccioso (TCDI50) y formalina para histología cuando era apropiado.

15 La figura 4 muestra un ensayo de inhibición de hemaglutinina realizado con sueros de hurones inmunizados (3 inmunizaciones). Un valor cuantitativo de >1:40 se considera "protector". Una línea de puntos indica la marca 1:40. Todos los animales estaban por encima de la marca 1:40 después de 3 inmunizaciones. La figura 5 muestra resultados de una provocación de hurones inmunizados y no inmunizados con una novedosa cepa de H1N1, MX10 (A/Mexico/InDRE4487/2009). Todos los hurones inmunizados sobrevivieron, mientras que el 75 % de los hurones sin tratamiento previo murieron en el periodo de 15 días.

20 <110> Los administradores de la Universidad de Pensilvania
David, Weiner B.
Yan, Jian
Morrow, Matthew P.

25 <120> MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO DE GRIPE Y VACUNAS PREPARADAS A PARTIR DE ESTAS

<130> 133172.03002

30 <150> 12/694.238
<151> 26-01-2010

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

35 <210> 1
<211> 1695
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Secuencia de ADN de H1 de gripe

<400> 1

ES 2 600 890 T3

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| atgaaggcta | tcctcgtcgt | gctgctgtac | accttcgcca | ccgccaacgc | cgataccctg | 60 |
| tgcatcggct | accacgcaa | caacagcacc | gacaccgtgg | ataccgtgct | ggaaaagaac | 120 |
| gtgaccgtga | cccacagcgt | gaacctgctg | gaagataagc | acaacggcaa | gctgtgcaag | 180 |
| ctgagaggcg | tggcccctct | gcacctgggc | aagtgcaata | tcgccggctg | gattctgggc | 240 |
| aaccccgagt | gcgagagcct | gtctaccgct | agctcctggt | cctacatcgt | ggagacaagc | 300 |
| agcagcgaca | acggcacctg | ttaccccggc | gacttcatcg | actacgagga | actgcgggag | 360 |
| cagctgagca | gcgtgtccag | cttcgagcgg | ttcgagatct | tcccgaagac | cagctcctgg | 420 |
| cccaaccacg | acagcaacaa | gggcgtgacc | gccgcctgtc | ctcacgctgg | cgccaagagc | 480 |
| ttctacaaga | acctgatctg | gctggtcaag | aagggcaaca | gctaccccaa | gctgagcaag | 540 |
| agctacatca | acgacaaggg | caaagaggtc | ctcgtcctct | ggggcatcca | ccaccctagc | 600 |
| accagcggcg | accagcagag | cctgtaccag | aacgccgacg | cctacgtggt | cgtgggctca | 660 |
| tctcgggtaca | gcaagaagtt | caagcccggag | atcgccatca | gacccaaagt | gcgggaccag | 720 |
| gaaggccgga | tgaactacta | ctggaccctg | gtggagcccc | gcgacaagat | caccttcgag | 780 |
| gccaccggca | atctggtggt | gccagatac | gccttcgcca | tggaaagaaa | cgccggcagc | 840 |
| ggcatcatca | tcagcgacac | ccccgtgcac | gactgcaaca | ccacctgtca | gacccccaaag | 900 |
| ggcgccatca | acaccagcct | gcccttcag | aacatccacc | ccatcaccat | cggaagtgc | 960 |
| cctaagtacg | tgaagtccac | taagctcaga | ctggccaccg | gcctgagaaa | cgtgcccagc | 1020 |
| atccagagca | gaggcctggt | tggcgccatt | gccggcttta | tcgagggcgg | ctggaccgga | 1080 |
| atggtggacg | ggtggtacgg | ctaccaccac | cagaatgagc | agggcagcgg | ctacgccgcc | 1140 |
| | | | | | | |
| gacctgaagt | ccacacagaa | cgccatcgac | gagatcacca | acaaagtgaa | cagcgtgatc | 1200 |
| gagaagatga | acaccagtt | caccgccgtg | ggcaaagagt | tcaaccacct | ggaaaagcgg | 1260 |
| atcgagaacc | tgaacaagaa | ggtggacgac | ggcttcctgg | acatctggac | ctacaacgcc | 1320 |
| gagctgctgg | tgctgctgga | aaacgagcgg | accctggact | accacgactc | caacgtgaag | 1380 |
| aatctgtacg | agaaagtgcg | gagccagctg | aagaacaacg | ccaagagat | cggcaacggc | 1440 |
| tgcttcgagt | tctaccacaa | gtgcgacaac | acctgtatgg | aaagcgtgaa | gaacggcacc | 1500 |
| tacgactacc | ccaagtacag | cgaggaagcc | aagctgaacc | gggaagagat | cgacggcgtg | 1560 |
| aagctggaaa | gcacccggat | ctaccagatc | ctggccatct | actctactgt | ggccagctca | 1620 |
| ctggtgctgg | tggtgtccct | gggcgccatc | tccttttggg | tgtgctcaa | cggcagcctg | 1680 |
| cagtgccgga | tctgc | | | | | 1695 |

ES 2 600 890 T3

<210> 2
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de proteína H1 de gripe

<400> 2

```

Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn
 1          5          10          15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
          20          25          30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
          35          40          45

Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val
 50          55          60

Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65          70          75

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
          85          90          95

Val Glu Thr Ser Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
          100          105          110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
          115          120          125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp
          130          135          140
    
```

10

ES 2 600 890 T3

Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser
145 150 155 160

Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
165 170 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
180 185 190

Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Ala Asp Gln Gln Ser Leu
195 200 205

Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser
210 215 220

Lys Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
225 230 235 240

Glu Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys
245 250 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe
260 265 270

Ala Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro
275 280 285

Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn
290 295 300

Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys
305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg
325 330 335

Asn Val Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
340 345 350

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
355 360 365

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser
370 375 380

Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
385 390 395 400

ES 2 600 890 T3

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His
 405 410 415

Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 420 425 430

Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
 435 440 445

Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460

Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu
 500 505 510

Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Arg Ile Tyr
 515 520 525

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val
 530 535 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 3
 <211> 1818
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de ADN de antígeno IgE-H1-HAT

10

<400> 3

ES 2 600 890 T3

| | |
|--|------|
| ttaattaagg atccgccacc atggactgga cctggattct gttcctggtg gctgctgcca | 60 |
| ctagagtgca cagcatgaag gctatcctcg tctgtgctgct gtacaccttc gccaccgcca | 120 |
| acgccgatac cctgtgcatc ggctaccacg ccaacaacag caccgacacc gtggataccg | 180 |
| tgctggaaaa gaacgtgacc gtgaccaca gcgtgaacct gctggaagat aagcacaacg | 240 |
| gcaagctgtg caagctgaga ggctggccc ctctgcacct gggcaagtgc aatatcgccg | 300 |
| gctggattct gggcaacccc gagtgcgaga gcctgtctac cgctagctcc tggctctaca | 360 |
| tctgtggagac aagcagcagc gacaacggca cctgttacc cggcgacttc atcgactacg | 420 |
| aggaactgcg ggagcagctg agcagcgtgt ccagcttcga gctggttcgag atcttcccca | 480 |
| agaccagctc ctggcccaac cacgacagca acaagggcgt gaccgcccgc tgtcctcacg | 540 |
| ctggcgccaa gagcttctac aagaacctga tctggctggt caagaagggc aacagctacc | 600 |
| ccaagctgag caagagctac atcaacgaca agggcaaaga ggtcctcgtc ctctggggca | 660 |
| tccaccacc tagcaccagc gccgaccagc agagcctgta ccagaacgcc gacgcctacg | 720 |
| tgctcgtggg ctcatctcgg tacagcaaga agttcaagcc cgagatcgcc atcagaccca | 780 |
| aagtgcggga ccaggaaggc cggatgaact actactggac cctggtggag cccggcgaca | 840 |
| agatcacctt cgaggccacc ggcaatctgg tggtgcccag atacgccttc gccatggaaa | 900 |
| gaaacgccgg cagcggcatc atcatcagcg acacccccgt gcacgactgc aacaccacct | 960 |
| gtcagacccc caagggcgcc atcaacacca gcctgccctt ccagaacatc caccocatca | 1020 |
| ccatcggcaa gtgccctaag tacgtgaagt cactaagct cagactggcc accggcctga | 1080 |
| gaaacgtgcc cagcatccag agcagaggcc tgtttggcgc cattgccggc tttatcgagg | 1140 |
| gctgctggac cggaatggtg gacgggtggt acggctacca ccaccagaat gagcagggca | 1200 |
| gctgctacgc cgccgacctg aagtccacac agaacgccat cgacgagatc accaacaag | 1260 |
| tgaacagcgt gatcgagaag atgaacacc agttcaccgc cgtgggcaaa gagttcaacc | 1320 |
| acctggaaaa gcggatcgag aacctgaaca agaaggtgga cgacggcttc ctggacatct | 1380 |
| ggacctaaa cgccgagctg ctggtgctgc tggaaaacga gctgaccctg gactaccacg | 1440 |
| actccaacgt gaagaatctg tacgagaaag tgcggagcca gctgaagaac aacgccaaag | 1500 |
| agatcggcaa cggctgcttc gagttctacc acaagtgcga caacacctgt atggaaagcg | 1560 |
| tgaagaacgg cacctacgac taccccaagt acagcgagga agccaagctg aaccgggaag | 1620 |
| agatcgacgg cgtgaagctg gaaagcacc ggatctacca gatcctggcc atctacteta | 1680 |
| ctgtggccag ctactggtg ctggtggtgt ccctgggcgc catctccttt tggatgtgct | 1740 |
| ccaacggcag cctgcagtgc cggatctgca tctacccta cgacgtgcc gactacgct | 1800 |
| gatgactcga ggcgcgcc | 1818 |

ES 2 600 890 T3

<210> 4
<211> 593
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de antígeno IgE-H1-HAT

10

<400> 4

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Asp | Trp | Thr | Trp | Ile | Leu | Phe | Leu | Val | Ala | Ala | Ala | Thr | Arg | Val |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

ES 2 600 890 T3

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

ES 2 600 890 T3

Asp Lys Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr
 275 280 285
 Ala Phe Ala Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp
 290 295 300
 Thr Pro Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala
 305 310 315 320
 Ile Asn Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly
 325 330 335
 Lys Cys Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly
 340 345 350
 Leu Arg Asn Val Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
 355 360 365
 Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 370 375 380
 Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Leu
 385 390 395 400
 Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser
 405 410 415
 Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe
 420 425 430
 Asn His Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp
 435 440 445
 Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu
 450 455 460
 Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
 465 470 475 480
 Tyr Glu Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly
 485 490 495
 Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu
 500 505 510
 Ser Val Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala
 515 520 525
 Lys Leu Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Arg

ES 2 600 890 T3

530

535

540

Ile Tyr Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val
545 550 555 560

Leu Val Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly
565 570 575

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr
580 585 590

Ala

- 5 <210> 5
- <211> 4739
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- 10 <223> pGX2009

- <400> 5

ES 2 600 890 T3

| | |
|---|------|
| gctgcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta | 60 |
| atagtaatca attacggggg cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata | 120 |
| acttacggta aatggccccg ctggctgacc gcccaacgac ccccgccat tgacgtcaat | 180 |
| aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga | 240 |
| gtatttacgg taaactgcc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc | 300 |
| ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggc cgctggcat tatgcccagt acatgacctt | 360 |
| atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat | 420 |
| gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag | 480 |
| tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaatcaac gggactttcc | 540 |
| aaaatgtcgt aacaactccg ccccatgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtgga | 600 |
| ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaacct actgcttact ggcttatcga | 660 |
| aattaatacg actcactata gggagacctc agctggctag cgtttaaact taagcttgg | 720 |
| accgagctcg gatccgccac catggactgg acctggattc tgttcctggg ggctgctgcc | 780 |
| actagagtgc acagcatgaa ggctatcctc gtctgctgc tgtacacctt cgccaccgcc | 840 |
| aacgccgata ccctgtgcat cggctaccac gccacaaca gcaccgacac cgtggatacc | 900 |
| gtgctggaaa agaacgtgac cgtgaccac agcgtgaacc tgctggaaga taagcacaac | 960 |
| ggcaagctgt gcaagctgag aggcgtggcc cctctgcacc tgggcaagtg caatatcgcc | 1020 |
| ggctggattc tgggcaacct cgagtgcgag agcctgtcta ccgctagctc ctggctctac | 1080 |
| atcgtggaga caagcagcag cgacaacggc acctgttacc ccggcgactt catcgactac | 1140 |

ES 2 600 890 T3

gaggaactgc gggagcagct gagcagcgtg tccagcttcg agcggttcga gatcttcccc 1200
aagaccagct cctggcccaa ccacgacagc aacaagggcg tgaccgccgc ctgtcctcac 1260
gctggcgcca agagcttcta caagaacctg atctggctgg tcaagaaggg caacagctac 1320
cccaagctga gcaagagcta catcaacgac aagggcaaag aggtcctcgt cctctggggc 1380
atccaccacc ctagcaccag cgccgaccag cagagcctgt accagaacgc cgacgcctac 1440
gtgttcgtgg gctcatctcg gtacagcaag aagttcaagc ccgagatcgc catcagaacc 1500
aaagtgcggg accaggaagg ccggatgaac tactactgga ccctggtgga gcccggcgac 1560
aagatcacct tcgaggccac cggcaatctg gtggtgcccc gatacgcctt cgccatggaa 1620
agaaacgccg gcagcggcat catcatcagc gacacccccg tgcacgactg caacaccacc 1680
tgtcagaccc ccaagggcgc catcaacacc agcctgcctt tccagaacat ccacccccatc 1740
accatcggca agtgccttaa gtacgtgaag tccactaagc tcagactggc caccggcctg 1800
agaaacgtgc ccagcatcca gagcagaggc ctgtttgccg ccattgccgg ctttatcgag 1860
ggcggctgga ccggaatggt ggacgggtgg tacggctacc accaccagaa tgagcagggc 1920
agcggctacg ccgccgacct gaagtccaca cagaacgcca tcgacgagat caccaacaaa 1980
gtgaacagcg tgatcgagaa gatgaacacc cagttcaccg ccgtgggcaa agagttcaac 2040
cacctggaaa agcggatcga gaacctgaac aagaaggtgg acgacggctt cctggacatc 2100
tggacctaca acgccgagct gctggtgctg ctggaaaacg agcggacctt ggactaccac 2160
gactccaacg tgaagaatct gtacgagaaa gtgcccggagcc agctgaagaa caacgccaaa 2220
gagatcggca accgctgctt cgagttctac cacaagtgcg acaacacctg tatggaaaagc 2280
gtgaagaacg gcacctacga ctaccccaag tacagcggagg aagccaagct gaaccgggaa 2340
gagatcgacg gcgtgaagct ggaaagcacc cggatctacc agatcctggc catctactct 2400
actgtggcca gctcactggg gctggtggtg tccttggggc ccattctcct ttggatgtgc 2460
tccaaaggca gcctgcagtg ccggatctgc atctaccctt acgacgtgcc cgactacgcc 2520
tgatgactcg agtctagagg gcccgtttaa acccctgat cagcctcgac tgtgccttct 2580
agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgacctt ggaaggtgcc 2640
actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt 2700
cattctattc tgggggggtg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat 2760
agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggcttcta ctgggcggtt ttatggacag 2820
caagcgaacc ggaattgccg gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag ccctgcaaag 2880
taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca agctctgatc 2940
aagagacagg atgaggatcg tttcgcgatg ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 3000
cggccgcttg ggtggagagg ctattcgctt atgactgggc acaacagaca atcggctgct 3060

ES 2 600 890 T3

ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcccggc ggttcttttt gtcaagaccg 3120
acctgtccgg tgccctgaat gaactgcaag acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca 3180
cgacggggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc 3240
tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga 3300
aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 3360
cattcgacca ccaagcgaaa catcgcacgc agcgcagcac tactcggatg gaagccggtc 3420
ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 3480
ccaggctcaa ggcgagcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgaccat gccgatgcct 3540
gcttgccgaa tatcatgggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggcgggc 3600
tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc 3660
ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct cccgatccgc 3720
agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg aattattaac gcttacaatt 3780
tcctgatgcg gtattttctc cttacgcacg tgtgcgggat ttcacaccgc atcaggtggc 3840
acttttcggg gaaatgtgcg cggaaaccct atttgtttat ttttctaaat acattcaaat 3900
atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatagca cgtgctaaaa 3960
cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgacccaa 4020
atccctaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 4080
tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 4140
ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 4200
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac 4260
cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatacct gttaccagtg 4320
gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 4380
gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 4440
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc 4500
gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 4560
agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcggggt tcgccacctc 4620
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 4680
agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttctt 4739

<210> 6
<211> 1719
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

ES 2 600 890 T3

<220>

<223> Secuencia de ADN de antígeno H2 de gripe

<400> 6

5

```

ggtagcaaac ttgcccaccat ggccatcatc tacctgatcc tgctgttcac cgccgtgcgg      60
ggcgaccaga tctgcatcgg ctaccacgcc aacaacagca ccgagaaggt ggacaccatc      120
ctggaacgga acgtgaccgt gaccacgcc aaggacatcc tggaaaagac ccacaacggc      180
aagctgtgca agctgaacgg catccccccc ctggaactgg gcgactgcag cattgccggc      240
tggtgtctgg gcaacccccg gtgcgaccgg ctgctgtccg tgcccagatg gagctacatc      300
atggaaaaag agaacccccg ggacggcctg tgctaccccc gcagcttcaa cgactacgag      360
gaactgaagc acctgctgtc cagcgtgaag cacttcgaga aggtgaaaat cctgcccagg      420
gaccggtgga cccagcacac caccaccggc ggcagcagag cctgtgccgt gagcggcaac      480
cccagcttct tccggaacat ggtgtggctg accaagaagg gcagcaacta ccccgtaggc      540
aagggcagct acaacaacac ctccggagaa cagatgctga tcatctgggg cgtgcaccac      600
cccaacgacg agacagagca gcggaccctg taccagaacg tgggcaccta cgtgagcgtg      660
ggcaccagca ccctgaacaa gcggagcacc cccgagatcg ccaccgggcc caaggtgaac      720
ggcctgggca gccggatgga attcagctgg accctgctgg acatgtggga caccatcaac      780
ttcgagagca ccggcaacct gatcgccccg gactacggct tcaagatcag caagcggggc      840
agcagcggca tcatgaaaac cgagggcacc ctggaaaact gcgagacaaa gtgccagacc      900
cccctggggc ccatcaacac caccctgcc ttccacaacg tgcaccccct gaccatcggc      960
gagtgcccc agtacgtgaa gagcggagaag ctggtgctgg ccaccggcct gcggaacgtg     1020
cccagatcg agagcagggg cctgttcggc gccattgccg gattcatcga gggcggctgg     1080
cagggcatgg tggacgggtg gtacggctac caccacagca acgaccaggg cagcggctac     1140
gccgccgaca aagagagcac ccagaaggcc ttcgacggca tcaccaacaa ggtgaacagc     1200
gtgatcgaga agatgaacac ccagttcgag gccgtgggca aagagttcag caacctggaa     1260
cggcggctgg aaaacctgaa caagaaaatg gaagatggct tcctggacgt gtggacctac     1320
aacgccgagc tgctgggtgct gatggaaaac gagaggaccg tggacttcca cgacagcaac     1380
gtgaagaacc tgtacgacaa agtgccgatg cagctgcggg acaacgtgaa agagctgggc     1440
aacggctgct tcgagttcta ccacaagtgc gacgacgagt gcatgaactc cgtgaagaac     1500
ggcacctacg actaccctaa gtacgaggaa gactccaagc tgaaccggaa cgagatcaag     1560
ggcgtgaagc tgtccagcat gggcgtgtac cagatcctgg ccactacgc caccgtggcc     1620
ggcagcctga gcctggctat tatgatggct ggcacagcct tttggatgtg cagcaacggc     1680
agcctgcagt gccggatctg catctgatga ctcgagctc      1719

```

5
<210> 7
<211> 562
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de H2 de gripe

<400> 7

ES 2 600 890 T3

Met Ala Ile Ile Tyr Leu Ile Leu Leu Phe Thr Ala Val Arg Gly Asp
1 5 10 15

Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Lys Val Asp
20 25 30

Thr Ile Leu Glu Arg Asn Val Thr Val Thr His Ala Lys Asp Ile Leu
35 40 45

Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Asn Gly Ile Pro Pro
50 55 60

Leu Glu Leu Gly Asp Cys Ser Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro
65 70 75 80

Glu Cys Asp Arg Leu Leu Ser Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Met Glu
85 90 95

Lys Glu Asn Pro Arg Asp Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn Asp
100 105 110

Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Ser Val Lys His Phe Glu Lys
115 120 125

Val Lys Ile Leu Pro Lys Asp Arg Trp Thr Gln His Thr Thr Thr Gly
130 135 140

Gly Ser Arg Ala Cys Ala Val Ser Gly Asn Pro Ser Phe Phe Arg Asn
145 150 155 160

Met Val Trp Leu Thr Lys Lys Gly Ser Asn Tyr Pro Val Ala Lys Gly
165 170 175

Ser Tyr Asn Asn Thr Ser Gly Glu Gln Met Leu Ile Ile Trp Gly Val
180 185 190

His His Pro Asn Asp Glu Thr Glu Gln Arg Thr Leu Tyr Gln Asn Val
195 200 205

Gly Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Lys Arg Ser Thr
210 215 220

Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Leu Gly Ser Arg Met
225 230 235 240

ES 2 600 890 T3

Glu Phe Ser Trp Thr Leu Leu Asp Met Trp Asp Thr Ile Asn Phe Glu
 245 250 255
 Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Glu Tyr Gly Phe Lys Ile Ser Lys
 260 265 270
 Arg Gly Ser Ser Gly Ile Met Lys Thr Glu Gly Thr Leu Glu Asn Cys
 275 280 285
 Glu Thr Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Ala Ile Asn Thr Thr Leu Pro
 290 295 300
 Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val
 305 310 315 320
 Lys Ser Glu Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val Pro Gln
 325 330 335
 Ile Glu Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly
 340 345 350
 Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn
 355 360 365
 Asp Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala
 370 375 380
 Phe Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn
 385 390 395 400
 Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe Ser Asn Leu Glu Arg Arg
 405 410 415
 Leu Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp
 420 425 430
 Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu
 435 440 445
 Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Met
 450 455 460
 Gln Leu Arg Asp Asn Val Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe
 465 470 475 480
 Tyr His Lys Cys Asp Asp Glu Cys Met Asn Ser Val Lys Asn Gly Thr
 485 490 495
 Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Glu Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Asn Glu

ES 2 600 890 T3

500

505

510

Ile Lys Gly Val Lys Leu Ser Ser Met Gly Val Tyr Gln Ile Leu Ala
515 520 525

Ile Tyr Ala Thr Val Ala Gly Ser Leu Ser Leu Ala Ile Met Met Ala
530 535 540

Gly Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile
545 550 555 560

Cys Ile

<210> 8
<211> 4628
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Secuencia de ADN de pGX2006

10

<400> 8

ES 2 600 890 T3

| | |
|--|------|
| gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta | 60 |
| atagtaatca attacgggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata | 120 |
| acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat | 180 |
| aatgacgtat gtcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga | 240 |
| gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc | 300 |
| ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt | 360 |
| atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat | 420 |
| gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag | 480 |
| tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaatcaac gggactttcc | 540 |
| aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga | 600 |
| ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaacct actgcttact ggcttatcga | 660 |
| aattaatacg actcactata gggagaccca agctggctag cgtttaaact taagcttgcc | 720 |
| accatggcca tcatctacct gatcctgctg ttcaccgccg tgcggggcga ccagatctgc | 780 |
| atcggctacc acgccaacaa cagcaccgag aaggtggaca ccatcctgga acggaacgtg | 840 |
| accgtgaccc acgccaagga catcctggaa aagaccaca acggcaagct gtgcaagctg | 900 |
| aacggcatcc cccccctgga actgggcgac tgcagcattg ccggctggct gctgggcaac | 960 |
| cccagtgcg accggctgct gtccgtgccc gagtggagct acatcatgga aaaagagaac | 1020 |
| ccccgggacg gcctgtgcta ccccggcagc ttcaacgact acgaggaact gaagcacctg | 1080 |
| ctgtccagcg tgaagcactt cgagaagggtg aaaatcctgc ccaaggaccg gtggaccag | 1140 |

ES 2 600 890 T3

cacaccacca cccggcggcag cagagccctgt gccctgagcgg gcaacccccag cttcttccgg 1200
aacatggtgt ggctgaccaa gaagggcagc aactacccccg tggccaaggg cagctacaac 1260
aacacctcog gagaacagat gctgatcctc tggggcgtgc accaccccaa cgacgagaca 1320
gagcagcggg cctctgacca gaacgtgggc acctacgtga gcgtggggcac cagcacccctg 1380
aacaagcggg gcacccccga gatcgccacc cggcccaagg tgaacggcct gggcagccgg 1440
atggaattca gctggaccct gctggacatg tgggacacca tcaacttcga gagcaccggc 1500
aacctgatcg cccccgagta cggcttcaag atcagcaagc ggggcagcag cggcatcatg 1560
aaaaccgagg gcaccctgga aaactgcgag acaaagtgcc agacccccct gggcgccatc 1620
aacaccacc tgcccttcca caactgac ccctgacca tcggcgagtg cccaagtac 1680
gtgaagagcg agaagctggt gctggccacc ggctgcggg acgtgcccc gatcgagagc 1740
aggggcctgt tcggcgccat tgccggattc atcgagggcg gctggcaggg catggtggac 1800
gggtggtacg gctaccacca cagcaacgac cagggcagcg gctacgccc cgacaaagag 1860
agcaccaga aggccttoga cggcatcacc aacaaggtga acagcgtgat cgagaagatg 1920
aacaccagt tcgaggccgt gggcaaagag ttcagcaacc tggaacggcg gctggaaaac 1980
ctgaacaaga aaatggaaga tggcttcctg gacgtgtgga cctacaacgc cgagctgctg 2040
gtgctgatgg aaaacgagag gaccctggac tccacgaca gcaacgtgaa gaacctgtac 2100
gacaaagtgc ggatgcagct gcgggacaac gtgaaagagc tgggcaacgg ctgcttcgag 2160
ttctaccaca agtgcgacga cgagtgcctg aactccgtga agaacggcac ctacgactac 2220
cctaagtacg aggaagagtc caagctgaac cggaaacgaga tcaagggcgt gaagctgtcc 2280
agcatgggcg tgtaccagat cctggccatc tacgccaccg tggccggcag cctgagcctg 2340
gctattatga tggctggcat cagcttttgg atgtgcagca acggcagcct gcagtgccgg 2400
atctgcatct gatgactoga gtctagaggg cccgtttaa cccgctgatc agcctcgact 2460
gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgccctccc ccgtgccttc cttgaccctg 2520
gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcctc gcattgtctg 2580
agtaggtgtc attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg 2640
gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta tggcttctac tggcggttt 2700
tatggacagc aagcgaaccg gaattgccag ctggggcgcc ctctggtaag gttgggaagc 2760
cctgcaaagt aaactggatg gctttcttgc cgccaaggat ctgatggcgc aggggatcaa 2820
gctctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat ggattgcacg 2880
caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc tattcggcta tgactgggca caacagacaa 2940
tcggctgtc tgatgcgcc gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgccc gttctttttg 3000
tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcaaga cgaggcagcg cggctatcgt 3060

ES 2 600 890 T3

ggctggccac gacgggcggt ccttgccgag ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa 3120
 gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc 3180
 ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg 3240
 ctacctgcc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg 3300
 aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg 3360
 aactgttcgc caggctcaag gcgagcatgc ccgacggcga ggatctcgtc gtgacccatg 3420
 gcgatgcctg cttgccgaat atcatgggtg aaaatggccg cttttctgga ttcatcgact 3480
 gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg 3540
 ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggg atcgccgctc 3600
 ccgattcgca gcgcacgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga attattaacg 3660
 cttacaattt cctgatgcgg tattttctcc ttacgcactc gtgcgggtatt tcacaccgca 3720
 tcaggtggca cttttcgggg aatgtgccc ggaacccta tttgtttatt tttctaaata 3780
 cattcaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aatgcttca ataatagcac 3840
 gtgctaaaac ttcattttta atttaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc 3900
 atgaccaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagacc cgtagaaaag 3960
 atcaaaggat cttcttgaga tcctttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa 4020
 aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttcgg 4080
 aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaatactg ttcttctagt gtagccgtag 4140
 ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct gctaatoctg 4200
 ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttggga ctcaagacga 4260
 tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc 4320
 ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc 4380
 acgcttcccg aaggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggg cggaacagga 4440
 gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt 4500
 cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt cagggggggc gagcctatgg 4560
 aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttctggcct tttgctggcc ttttgcctac 4620
 atgttctt 4628

<210> 9
 <211> 1695
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN de U2 de gripe

ES 2 600 890 T3

<400> 9

aaggccaagc tgctggtgct gctgtgcacc ttcgccgcca ccaacgccga caccatctgc 60
atcggctacc acgccaacaa cagcaccgac accgtggata ccgtgctgga aaagaacgtg 120
accgtgacct acagcgtgaa cctgctggaa gataagcaca acggcaagct gtgcaagctg 180
aagggaatcg cccccctgca gctgggcaag tgcaatatcg ccggctggat tctgggcaac 240
cccgagtgcg agagcctgag cagcaagagc agctggtcct acatcgtgga acccccaac 300
agcgagaacg gcacctgtta ccccggcgac ttcgccgact acgaggaact gcgcgagcag 360
ctgagcagcg tgtccagctt cgagagattc gagatcttcc ccaagaccag cagctggccc 420
aaccacgacg tgaccaaggg cgtgaccgct agctgtagcc acgcaggcgc cagcagcttc 480
tacaagaacc tgctgtggct gaccaagaag aacggcagct accccaagct gagcaagagc 540
tacaatcaaca acaaagaaaa agaggtgctg gtccctctggg gcgtccacca cccagcaca 600
atcgccgacc agcagagcct gtaccagaac gagaacgcct acgtgtccgt gggcagcagc 660
cactacagcc ggaagtccac ccccagatc gccaaagcggc ccaaagtgcg ggaccaggaa 720
ggccggatca actactactg gaccctgctg gaaccggcg acaccatcat cttcgaggcc 780
aacggcaacc tgatcgcccc cagatacgcc ttcgccctga gcagaggctt cggcagcggc 840
atcatcatca gcaacgcccc catgcacgac tgcgacacca agtgccagac ccctcagggc 900
gccatcaaca gcagcctgcc cttccagaac atccaccccc tgaccatcgg cgagtgcccc 960
aaatacgtgc ggagcaccaa gctgcggtatg gccaccggcc tgcggaacat ccccagcatc 1020
cagagcagag gcctgttcgg cgccattgcc ggcttcatcg agggcggctg gaccggaatg 1080
gtggacgggt ggtacggcta ccaccaccag aatgagcagg gcagcggcta cggcccgac 1140
cagaagtcca cccagaacgc catcgacggc atcaccaaca aagtgaacag cgtgatcgag 1200
aagatgaaca cccagttcac cgccgtgggc aaagagttca acaagctgga aaagcggatg 1260
gaaaacctga acaagaaggt ggacgacggc ttcttggaaca tctggacctc caacgccgaa 1320
ctgctcgtgc tgctggaaaa cgagcggacc ctggacttcc acgacagcaa cgtgaagaac 1380
ctgtacgaga aagtgaagtc ccagctgaag aacaacgcca aagagatcgg caacggctgc 1440
ttcgagttct accacaagtg caacaacgag tgcattgaaa gcgtgaagaa cggaacctac 1500
gactaccca agtacagcga ggaaagcaag ctgaaccggg aagagatcga cggcgtgaag 1560
ctggaatcca tgggcgtgta ccagatcctg gccatctaca gcaccgtggc tagcagcctg 1620
gtgctgctgg tgtccctggg cgccatctcc ttttgatgt gctccaacgg cagcctgcag 1680
tgccggatct gcatc 1695

5
<210> 10
<211> 565
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de U2 de gripe

<400> 10

ES 2 600 890 T3

Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Ala Ala Thr Asn Ala
1 5 10 15

Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val
20 25 30

Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu
35 40 45

Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Lys Gly Ile Ala
50 55 60

Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn
65 70 75 80

Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Ser Lys Ser Ser Trp Ser Tyr Ile Val
85 90 95

Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Ala
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu
115 120 125

Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp Val
130 135 140

Thr Lys Gly Val Thr Ala Ser Cys Ser His Ala Gly Ala Ser Ser Phe
145 150 155 160

Tyr Lys Asn Leu Leu Trp Leu Thr Lys Lys Asn Gly Ser Tyr Pro Lys
165 170 175

Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
180 185 190

Trp Gly Val His His Pro Ser Thr Ile Ala Asp Gln Gln Ser Leu Tyr
195 200 205

Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser His Tyr Ser Arg
210 215 220

Lys Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu
225 230 235 240

Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile
245 250 255

ES 2 600 890 T3

Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Ala
 260 265 270

Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asn Ala Pro Met
 275 280 285

His Asp Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser
 290 295 300

Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro
 305 310 315 320

Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Ala Thr Gly Leu Arg Asn
 325 330 335

Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe
 340 345 350

Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His
 355 360 365

His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr
 370 375 380

Gln Asn Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu
 385 390 395 400

Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu
 405 410 415

Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu
 420 425 430

Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu
 435 440 445

Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys
 450 455 460

Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys
 465 470 475 480

Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Lys
 485 490 495

Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn
 500 505 510

ES 2 600 890 T3

Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Gln
 515 520 525

Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val
 530 535 540

Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln
 545 550 555 560

Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 11
 <211> 1809
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN de antígeno IgE-U2-HAT

<400> 11

```

    ggtaccggat cgcaccat ggactggacc tggattctgt tcctggtcgc cgctgctacc      60
    cgggtgcact ctaaggcaa gctgctggtg ctgctgtgca ccttcgccgc caccaacgcc      120
    gacaccatct gcatcggcta ccacgccaac aacagcaccg acaccgtgga taccgtgctg      180
    gaaaagaacg tgaccgtgac ccacagcgtg aacctgctgg aagataagca caacggcaag      240
    ctgtgcaagc tgaagggaat cgccccctg cagctgggca agtgcaatat cgccggctgg      300
    attctgggca accccgagtg cgagagcctg agcagcaaga gcagctggtc ctacatcgtg      360
    gaaacccccca acagcgagaa cggcacctgt taccocggcg acttcgccga ctacgaggaa      420
    ctgocgcgagc agctgagcag cgtgtccagc ttcgagagat tcgagatctt cccaagacc      480
    agcagctggc ccaaccacga cgtgaccaag ggcgtgaccg ctagctgtag ccacgcaggc      540
    gccagcagct tctacaagaa cctgctgtgg ctgaccaaga agaacggcag ctaccccaag      600
    ctgagcaaga gctacatcaa caacaagaa aaagaggtgc tggtcctctg gggcgtccac      660
    cccccagca caatcgccga ccagcagagc ctgtaccaga acgagaacgc ctacgtgtcc      720
    gtgggcagca gccactacag ccggaagttc acccccgaga tcgccaagcg gcccaaagtg      780
    cgggaccagg aaggccggat caactactac tggaccctgc tggaaaccgg cgacaccatc      840
    atcttcgagg ccaacggcaa cctgatcgcc ccagatacg ccttcgccct gagcagaggc      900
    ttccgagcag gcatcatcat cagcaacgcc cccatgcacg actgcgacac caagtgccag      960
    acccctcagg gcgccatcaa cagcagcctg cccttcocaga acatccacc cgtgaccatc     1020
    ggcgagtgcc ccaaatcgt gcggagcacc aagctgcgga tggccaccgg cctgcggaac     1080
    atccccagca tccagagcag aggcctgttc ggcgccattg ccggcttcat cgagggcggc     1140
    tggaccggaa tggtagcgg gtggtacggc taccaccacc agaatgagca gggcagcggc     1200
    
```

ES 2 600 890 T3

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| tacgccgccc | accagaagtc | cacccagaac | gccatcgacg | gcatcaccaa | caaagtgaac | 1260 |
| agcgtgatcg | agaagatgaa | cacccagttc | accgccgtgg | gcaaagagtt | caacaagctg | 1320 |
| gaaaagcggg | tggaaaacct | gaacaagaag | gtggacgacg | gcttcctgga | catctggacc | 1380 |
| tacaacgccg | aactgctcgt | gctgctggaa | aacgagcggg | ccctggactt | ccacgacagc | 1440 |
| aacgtgaaga | acctgtacga | gaaagtgaag | tcccagctga | agaacaacgc | caaagagatc | 1500 |
| ggcaacggct | gcttogagtt | ctaccacaag | tgcaacaacg | agtgcatgga | aagcgtgaag | 1560 |
| aacggaacct | acgactacct | caagtacagc | gaggaaagca | agctgaaccg | ggaagagatc | 1620 |
| gacggcgtga | agctggaatc | catgggcgtg | taccagatcc | tggccatcta | cagcaccgtg | 1680 |
| gctagcagcc | tgggtctgct | ggtgtccctg | ggcgccatct | ccttttgat | gtgctccaac | 1740 |
| ggcagcctgc | agtgccggat | ctgcatctac | ccctacgacg | tgcccgacta | cgctgatga | 1800 |
| ctcgagctc | | | | | | 1809 |

- 5 <210> 12
- <211> 592
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos de antígeno IgE-U2-HAT

- <400> 12

ES 2 600 890 T3

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15

His Ser Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Ala Ala Thr
 20 25 30

Asn Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp
 35 40 45

Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val
 50 55 60

Asn Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Lys Gly
 65 70 75 80

Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu
 85 90 95

Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Ser Lys Ser Ser Trp Ser Tyr
 100 105 110

Ile Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp
 115 120 125

ES 2 600 890 T3

Phe Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser
 130 135 140

Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His
 145 150 155 160

Asp Val Thr Lys Gly Val Thr Ala Ser Cys Ser His Ala Gly Ala Ser
 165 170 175

Ser Phe Tyr Lys Asn Leu Leu Trp Leu Thr Lys Lys Asn Gly Ser Tyr
 180 185 190

Pro Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu
 195 200 205

Val Leu Trp Gly Val His His Pro Ser Thr Ile Ala Asp Gln Gln Ser
 210 215 220

Leu Tyr Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser His Tyr
 225 230 235 240

Ser Arg Lys Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp
 245 250 255

Gln Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp
 260 265 270

Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala
 275 280 285

Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asn Ala
 290 295 300

Pro Met His Asp Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile
 305 310 315 320

Asn Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu
 325 330 335

Cys Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Ala Thr Gly Leu
 340 345 350

Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala
 355 360 365

Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly
 370 375 380

ES 2 600 890 T3

Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys
 385 390 395 400

Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val
 405 410 415

Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn
 420 425 430

Lys Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly
 435 440 445

Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu
 450 455 460

Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr
 465 470 475 480

Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn
 485 490 495

Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser
 500 505 510

Val Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys
 515 520 525

Leu Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val
 530 535 540

Tyr Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu
 545 550 555 560

Leu Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser
 565 570 575

Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 580 585 590

<210> 13
 <211> 1749
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN de BHA

<400> 13

ES 2 600 890 T3

aaggccatca tcgtgctgct gatggtggtc acaagcaacg ccgaccggat ctgcaccggc 60
atcaccagca gcaacagccc ccacgtggtc aaaaccgcca cccagggcga agtgaacgtg 120
accggcgtga tccccctgac caccaccccc accaagagcc acttcgcca cctgaagggc 180
accaagaccc ggggaaagct gtgccccaaag tgccctgaact gcaccgacct ggacgtggcc 240
ctgggcagac ctatgtgctg gggcaccacc cctagcgcca aggccagcat cctgcacgaa 300
gtgcgggccc tgaccagcgg ctgcttcccc atcatgcacg accggacca gatccggcag 360
ctccccaaacc tgctgcgggg ctacgagaac atccggctga gcaccagaa cgtgatcaac 420
gccgagaagg cccctggcgg cccttacaga ctgggcacaa gggctcttg cccaacgcc 480
accagcaaga gcggcttttt cgccacaatg gcctgggccc tgcccaagga caacaacaag 540
accgccacca accccctgac cgtggaagtg ccctacatct gcaccgaggg cgaggaccag 600
atcaccgtgt ggggcttcca cagcgataac aagaccaga tgaagaacct gtacggcgac 660
agcaaccccc agaagttcac cagctccgcc aacggcgtga ccaccacta cgtgtcccag 720
atcggcggct tccccgacca gacagaggat ggcggcctgc cccagagcgg cagaatcgtg 780
gtggactaca tgggtgcagaa gcccggcaag accggcacca tcgtgtacca gcggggcatc 840
ctgctgcccc agaaagtgtg gtgcgccagc ggccggcca aagtgatcaa ggcagcctg 900
cctctgatcg gcgaggccga ttgcctgcac gagaagtacg gcggcctgaa caagagcaag 960
ccctactaca ccggcgagca cgccaaagcc atcggcaact gcccctctg ggtcaaaacc 1020
cccctgaagc tggccaacgg caccaagtac cggcctccc ccaagctgct gaaagagcgg 1080
ggcttcttcg gcgctatcgc cggctttctg gaaggcggct gggagggcat gatcgccggc 1140
tggcacggct acacatctca cggcgtcat ggcgtggccg tggccgctga tctgaagtcc 1200
accaggaag ccatcaaaa gatcaccaag aacctgaaca gcctgagcga gctggaagtg 1260
aagaatctgc agcggctgag cggcgccatg gacgagctgc acaacgagat cctggaactg 1320
gacgagaagg tggacgacct gcgggcccag accatctcca gccagatcga gctggcctg 1380
ctgctgtcca acgagggcat catcaacagc gaggacgagc atctgctggc cctggaacgg 1440
aagctgaaga agatgctggg ccctagcggc gtggacatcg gcaacggctg cttcgagaca 1500
aagcacaagt gcaaccagac ctgcctggac cggatcgtg ccggcacctt caacgccggc 1560
gagttcagcc tgcccacctt cgacagcctg aacatcaccg ccgccagcct gaacgacgac 1620
ggcctggaca accacacat cctgctgtac tacagcaccg cagcctccag cctggcctg 1680
accctgatga tcgccatctt catcgtgtac atggtgtctc gggacaacgt gtccctgcagc 1740
atctgctg 1749

5

<210> 14
<211> 583
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de BHA

<400> 14

ES 2 600 890 T3

Lys Ala Ile Ile Val Leu Leu Met Val Val Thr Ser Asn Ala Asp Arg
 1 5 10 15
 Ile Cys Thr Gly Ile Thr Ser Ser Asn Ser Pro His Val Val Lys Thr
 20 25 30
 Ala Thr Gln Gly Glu Val Asn Val Thr Gly Val Ile Pro Leu Thr Thr
 35 40 45
 Thr Pro Thr Lys Ser His Phe Ala Asn Leu Lys Gly Thr Lys Thr Arg
 50 55 60
 Gly Lys Leu Cys Pro Lys Cys Leu Asn Cys Thr Asp Leu Asp Val Ala
 65 70 75 80
 Leu Gly Arg Pro Met Cys Val Gly Thr Thr Pro Ser Ala Lys Ala Ser
 85 90 95
 Ile Leu His Glu Val Arg Pro Val Thr Ser Gly Cys Phe Pro Ile Met
 100 105 110
 His Asp Arg Thr Lys Ile Arg Gln Leu Pro Asn Leu Leu Arg Gly Tyr
 115 120 125
 Glu Asn Ile Arg Leu Ser Thr Gln Asn Val Ile Asn Ala Glu Lys Ala
 130 135 140
 Pro Gly Gly Pro Tyr Arg Leu Gly Thr Ser Gly Ser Cys Pro Asn Ala
 145 150 155 160
 Thr Ser Lys Ser Gly Phe Phe Ala Thr Met Ala Trp Ala Val Pro Lys
 165 170 175
 Asp Asn Asn Lys Thr Ala Thr Asn Pro Leu Thr Val Glu Val Pro Tyr
 180 185 190
 Ile Cys Thr Glu Gly Glu Asp Gln Ile Thr Val Trp Gly Phe His Ser
 195 200 205
 Asp Asn Lys Thr Gln Met Lys Asn Leu Tyr Gly Asp Ser Asn Pro Gln
 210 215 220
 Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr Thr His Tyr Val Ser Gln
 225 230 235 240
 Ile Gly Gly Phe Pro Asp Gln Thr Glu Asp Gly Gly Leu Pro Gln Ser
 245 250 255

ES 2 600 890 T3

Gly Arg Ile Val Val Asp Tyr Met Val Gln Lys Pro Gly Lys Thr Gly
 260 265 270

Thr Ile Val Tyr Gln Arg Gly Ile Leu Leu Pro Gln Lys Val Trp Cys
 275 280 285

Ala Ser Gly Arg Ser Lys Val Ile Lys Gly Ser Leu Pro Leu Ile Gly
 290 295 300

Glu Ala Asp Cys Leu His Glu Lys Tyr Gly Gly Leu Asn Lys Ser Lys
 305 310 315 320

Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala Ile Gly Asn Cys Pro Ile
 325 330 335

Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys Leu Ala Asn Gly Thr Lys Tyr Arg Pro
 340 345 350

Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 355 360 365

Phe Leu Glu Gly Gly Trp Glu Gly Met Ile Ala Gly Trp His Gly Tyr
 370 375 380

Thr Ser His Gly Ala His Gly Val Ala Val Ala Ala Asp Leu Lys Ser
 385 390 395 400

Thr Gln Glu Ala Ile Asn Lys Ile Thr Lys Asn Leu Asn Ser Leu Ser
 405 410 415

Glu Leu Glu Val Lys Asn Leu Gln Arg Leu Ser Gly Ala Met Asp Glu
 420 425 430

Leu His Asn Glu Ile Leu Glu Leu Asp Glu Lys Val Asp Asp Leu Arg
 435 440 445

Ala Asp Thr Ile Ser Ser Gln Ile Glu Leu Ala Val Leu Leu Ser Asn
 450 455 460

Glu Gly Ile Ile Asn Ser Glu Asp Glu His Leu Leu Ala Leu Glu Arg
 465 470 475 480

Lys Leu Lys Lys Met Leu Gly Pro Ser Ala Val Asp Ile Gly Asn Gly
 485 490 495

Cys Phe Glu Thr Lys His Lys Cys Asn Gln Thr Cys Leu Asp Arg Ile
 500 505 510

ES 2 600 890 T3

Ala Ala Gly Thr Phe Asn Ala Gly Glu Phe Ser Leu Pro Thr Phe Asp
515 520 525

Ser Leu Asn Ile Thr Ala Ala Ser Leu Asn Asp Asp Gly Leu Asp Asn
530 535 540

His Thr Ile Leu Leu Tyr Tyr Ser Thr Ala Ala Ser Ser Leu Ala Val
545 550 555 560

Thr Leu Met Ile Ala Ile Phe Ile Val Tyr Met Val Ser Arg Asp Asn
565 570 575

Val Ser Cys Ser Ile Cys Leu
580

- 5 <210> 15
- <211> 1865
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia de ADN de antígeno IgE-BHA-HAT

- <400> 15

ES 2 600 890 T3

ggtaccggat ccgccacat ggactggacc tggattctgt tcctgggtggc cgctgccaca 60
 cgggtgcaca gcaaggccat catcgtgctg ctgatggtgg tcacaagcaa cgccgaccgg 120
 atctgcaccg gcatcaccag cagcaacagc ccccacgtgg tcaaaaccgc caccagggc 180
 gaagtgaacg tgaccggcgt gatccccctg accaccaccc ccaccaagag ccaacttcgcc 240
 aacctgaagc gcaccaagac ccggggaaag ctgtgccccca agtgcctgaa ctgcaccgac 300
 ctggacgtgg ccctgggcag acctatgtgc gtgggcacca cccctagcgc caaggccagc 360
 atcctgcacg aagtgcggcc cgtgaccagc ggctgcttcc ccatcatgca cgaccggacc 420
 aagatccggc agctcccaa cctgctgctg ggctacgaga acatccggct gagcaccag 480
 aacgtgatca acgccgagaa ggccccctggc ggcccttaca gactgggcac aagcggctct 540
 tgccccaacg ccaccagcaa gagcggcttt ttcgccaaa tggcctgggc cgtgcccaag 600
 gacaacaaca agaccgccac caacccccctg accgtggaag tgccctacat ctgcaccgag 660
 ggcgaggacc agatcacctg gtggggcttc cacagcgata acaagacca gatgaagaac 720
 ctgtacggcg acagcaaccc ccagaagttc accagctccg ccaacggcgt gaccaccac 780
 tacgtgtccc agatcggcgg cttccccgac cagacagagg atggcggcct gccccagagc 840
 ggcagaatcg tggtggaacta catggtgcag aagccccgca agaccggcac catcgtgtac 900
 cagcggggca tcctgctgcc ccagaaagtg tgggtgcgcca gcggccggtc caaagtgatc 960
 aagggcagcc tgcctctgat cggcgaggcc gattgcctgc acgagaagta cggcggcctg 1020
 aacaagagca agccctacta caccggcgag cacgccaaag ccatcggcaa ctgccccatc 1080

ES 2 600 890 T3

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| tgggtcaaaa | ccccctgaa | gctggccaac | ggcaccaagt | accggcctcc | cgccaagctg | 1140 |
| ctgaaagagc | ggggcttctt | cggcgctatc | gccggctttc | tggaaggcgg | ctgggagggc | 1200 |
| atgatgcgcg | gctggcacgg | ctacacatct | cacggcgctc | atggcgtggc | cgtggccgct | 1260 |
| gatctgaagt | ccacccagga | agccatcaac | aagatcacca | agaacctgaa | cagcctgagc | 1320 |
| gagctggaag | tgaagaatct | gcagcggctg | agcggcgcca | tggacgagct | gcacaacgag | 1380 |
| atcctggaac | tggacgagaa | ggtggacgac | ctgcgggccc | acaccatctc | cagccagatc | 1440 |
| gagctggccg | tgctgctgtc | caacgagggc | atcatcaaca | gcgaggacga | gcatctgctg | 1500 |
| gccctggaac | ggaagctgaa | gaagatgctg | ggccctagcg | ccgtggacat | cggcaacggc | 1560 |
| tgcttogaga | caaagcacia | gtgcaaccag | acctgcctgg | accggatcgc | tgccggcacc | 1620 |
| ttcaacgccg | gcgagttcag | cctgcccacc | ttcgacagcc | tgaacatcac | cgccgccagc | 1680 |
| ctgaacgacg | acggcctgga | caaccacacc | atcctgctgt | actacagcac | cgcagcctcc | 1740 |
| agcctggccg | tgaccctgat | gatcgccatc | ttcatcgtgt | acatggtgtc | tcgggacaac | 1800 |
| gtgtcctgca | gcatctgcct | gtaccacctac | gacgtgcccg | actacgctga | tgactcgagc | 1860 |
| tcttc | | | | | | 1865 |

<210> 16
 <211> 610
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de antígeno IgE-BHA-HAT

<400> 16

ES 2 600 890 T3

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15

His Ser Lys Ala Ile Ile Val Leu Leu Met Val Val Thr Ser Asn Ala
 20 25 30

Asp Arg Ile Cys Thr Gly Ile Thr Ser Ser Asn Ser Pro His Val Val
 35 40 45

Lys Thr Ala Thr Gln Gly Glu Val Asn Val Thr Gly Val Ile Pro Leu
 50 55 60

Thr Thr Thr Pro Thr Lys Ser His Phe Ala Asn Leu Lys Gly Thr Lys
 65 70 75 80

Thr Arg Gly Lys Leu Cys Pro Lys Cys Leu Asn Cys Thr Asp Leu Asp
 85 90 95

Val Ala Leu Gly Arg Pro Met Cys Val Gly Thr Thr Pro Ser Ala Lys
 100 105 110

ES 2 600 890 T3

Ala Ser Ile Leu His Glu Val Arg Pro Val Thr Ser Gly Cys Phe Pro
115 120 125

Ile Met His Asp Arg Thr Lys Ile Arg Gln Leu Pro Asn Leu Leu Arg
130 135 140

Gly Tyr Glu Asn Ile Arg Leu Ser Thr Gln Asn Val Ile Asn Ala Glu
145 150 155 160

Lys Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Arg Leu Gly Thr Ser Gly Ser Cys Pro
165 170 175

Asn Ala Thr Ser Lys Ser Gly Phe Phe Ala Thr Met Ala Trp Ala Val
180 185 190

Pro Lys Asp Asn Asn Lys Thr Ala Thr Asn Pro Leu Thr Val Glu Val
195 200 205

Pro Tyr Ile Cys Thr Glu Gly Glu Asp Gln Ile Thr Val Trp Gly Phe
210 215 220

His Ser Asp Asn Lys Thr Gln Met Lys Asn Leu Tyr Gly Asp Ser Asn
225 230 235 240

Pro Gln Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr Thr His Tyr Val
245 250 255

Ser Gln Ile Gly Gly Phe Pro Asp Gln Thr Glu Asp Gly Gly Leu Pro
260 265 270

Gln Ser Gly Arg Ile Val Val Asp Tyr Met Val Gln Lys Pro Gly Lys
275 280 285

Thr Gly Thr Ile Val Tyr Gln Arg Gly Ile Leu Leu Pro Gln Lys Val
290 295 300

Trp Cys Ala Ser Gly Arg Ser Lys Val Ile Lys Gly Ser Leu Pro Leu
305 310 315 320

Ile Gly Glu Ala Asp Cys Leu His Glu Lys Tyr Gly Gly Leu Asn Lys
325 330 335

Ser Lys Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala Ile Gly Asn Cys
340 345 350

Pro Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys Leu Ala Asn Gly Thr Lys Tyr
355 360 365

ES 2 600 890 T3

Arg Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile
 370 375 380
 Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Trp Glu Gly Met Ile Ala Gly Trp His
 385 390 395
 Gly Tyr Thr Ser His Gly Ala His Gly Val Ala Val Ala Ala Asp Leu
 405 410 415
 Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile Asn Lys Ile Thr Lys Asn Leu Asn Ser
 420 425 430
 Leu Ser Glu Leu Glu Val Lys Asn Leu Gln Arg Leu Ser Gly Ala Met
 435 440 445
 Asp Glu Leu His Asn Glu Ile Leu Glu Leu Asp Glu Lys Val Asp Asp
 450 455 460
 Leu Arg Ala Asp Thr Ile Ser Ser Gln Ile Glu Leu Ala Val Leu Leu
 465 470 475 480
 Ser Asn Glu Gly Ile Ile Asn Ser Glu Asp Glu His Leu Leu Ala Leu
 485 490 495
 Glu Arg Lys Leu Lys Lys Met Leu Gly Pro Ser Ala Val Asp Ile Gly
 500 505 510
 Asn Gly Cys Phe Glu Thr Lys His Lys Cys Asn Gln Thr Cys Leu Asp
 515 520 525
 Arg Ile Ala Ala Gly Thr Phe Asn Ala Gly Glu Phe Ser Leu Pro Thr
 530 535 540
 Phe Asp Ser Leu Asn Ile Thr Ala Ala Ser Leu Asn Asp Asp Gly Leu
 545 550 555 560
 Asp Asn His Thr Ile Leu Leu Tyr Tyr Ser Thr Ala Ala Ser Ser Leu
 565 570 575
 Ala Val Thr Leu Met Ile Ala Ile Phe Ile Val Tyr Met Val Ser Arg
 580 585 590
 Asp Asn Val Ser Cys Ser Ile Cys Leu Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp
 595 600 605
 Tyr Ala
 610

ES 2 600 890 T3

<210> 17
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de líder de IgE

10

<400> 17

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de marcador de HA

20

<400> 18

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

25

<210> 19
<211> 1707
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<223> Secuencia de ADN de H1 de gripe

<400> 19

ES 2 600 890 T3

atggaaaaga tcgtgctgct gttcgccatc gtgagcctgg tgaagagcga ccagatctgc 60
 atcggctacc acgccaacaa cagcaccgag caggtggaca ccatcatgga aaaaaacgtg 120
 accgtgaccc acgcccagga catcctggaa aagaccaca acggcaagct gtgcgacctg 180
 gacggcgtga agcccctgat cctgcgggac tgcagcgtgg cgggctggct gctgggcaac 240
 cccatgtgcg acgagttcat caacgtgccc gagtggagct acatcgtgga gaaggccaac 300
 cccgtgaacg acctgtgcta ccccgccgac ttcaacgact acgaggaact gaagcacctg 360
 ctgtcccgga tcaaccactt cgagaagatc cagatcatcc ccaagagcag ctggtccagc 420
 cacgaggcca gcctgggcgt gagcagcgc tgcataacc agggcaagtc cagcttcttc 480
 cggaacgtgg tgtggctgat caagaagaac agcacctacc ccaccatcaa gcggagctac 540
 aacaacacca accaggaaga tctgctggtc ctgtggggca tccaccacc caacgacgcc 600
 gccgagcaga ccaagctgta ccagaacccc accacctaca tcagcgtggg caccagcacc 660
 ctgaaccagc ggctggtgcc ccgatcgcc acccggcca aggtgaacgg ccagagcggc 720
 cggatggaat tcttctggac catcctgaag cccaacgatg ccatcaactt cgagagcaac 780
 ggcaacttca tcgccccgga gtacgcctac aagatcgtga agaagggcga cagcaccatc 840
 atgaagagcg agctggaata cggcaactgc aacaccaagt gccagacccc catgggcgcc 900
 atcaacagca gcatgccctt ccacaacatc caccacctga ccatcggcga gtgccccaa 960
 tacgtgaaga gcaacagget ggtgctggcc accggcctgc ggaacagccc ccagcgggag 1020
 cggcgggccc ccgcccggg cctgttcggc gccatcgccg gcttcatcga gggcggctgg 1080
 cagggcatgg tggacgggtg gtacggctac caccacagca atgagcaggg cagcggctac 1140
 gccgccgaca aagagagcac ccagaaggcc atcgacggcg tcaccaacaa ggtgaacagc 1200
 atcatcgaca agatgaacac ccagttcgag gccgtgggcc gggagttaa caacctggaa 1260
 cggcggatcg agaacctgaa caagaaaatg gaagatggct tcctggacgt gtggacctac 1320
 aacgccgagc tgctggtgct gatggaaaac gagcggacc tggacttcca cgacagcaac 1380
 gtgaagaacc tgtacgaaa agtgccgctg cagctgcggg acaacgcaa agagctgggc 1440
 aacggctgct tcgagttcta ccacaagtgc gacaacgagt gcatggaaag cgtgcggaac 1500
 ggcacctacg actaccccc gtacagcgag gaagcccggc tgaagcggga ggaaatcagc 1560
 ggcgtgaaac tggaaagcat cggcatctac cagatcctga gcatctacag caccgtggcc 1620
 agcagcctgg ccctggccat catggtggcc ggcctgagcc tgtggatgtg cagcaacggc 1680
 agcctgcagt gccggatctg catctag 1707

ES 2 600 890 T3

<210> 20
<211> 568
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Secuencia de proteína H1 de gripe

10

<400> 20

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val

ES 2 600 890 T3

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 355 360 365

Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
 370 375 380

Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
 385 390 395 400

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 405 410 415

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
 420 425 430

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
 435 440 445

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
 450 455 460

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
 465 470 475 480

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
 485 490 495

Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
 500 505 510

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
 515 520 525

Ile Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
 530 535 540

Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
 545 550 555 560

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 21
 <211> 1728
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 600 890 T3

<220>

<223> Secuencia de ADN de H1 de gripe

<400> 21

```

ggtaccaagc ttgccacccat gaaggtgaaa ctgctggtgc tgctgtgcac cttcaccgcc      60
acctacgccg acaccatctg catcggctac cacgccaaaca acagcaccga caccgtggat      120
accgtgctgg aaaagaacgt gaccgtgacc cacagcgtga acctgctgga agatagccac      180
aacggcaagc tgtgcctgct gaaaggcatc gccccctgc agctgggcaa ctgcagcgtg      240
gccggctgga tcctgggcaa ccccgagtgc gagctgctga tttccaaaga aagctggtcc      300
tacatcgtgg agaccccca ccccgagaac ggcacctgct accccggcta cttcgccgac      360
tacgaggaac tgcgggagca gctgtccagc gtgagcagct tcgagcggtt cgagatcttc      420
cccaaagaga gcagctggcc caaccacacc gtgaccggcg tgagcggcag ctgctcccac      480
aatggcaaga gcagcttcta ccggaacctg ctgtggctga ccggcaagaa cggcctgtac      540
cccaacctga gcaagagcta cggcaataac aaagaaaagg aagtgctggt gctgtggggc      600
gtgcaccacc ccccaacat cggcgaccag cgggccctgt accacaccga gaacgcctac      660
gtgagcgtgg tgtccagcca ctacagccgg cggttcacc ccgagatcgc caagcggccc      720
aaagtgcggg accaggaagg ccggatcaac tactactgga ccctgctgga acccggcgac      780
accatcatct tcgaggccaa cggcaacctg atcgccccca gatacgctt cgcctgagc      840
cggggcttcg gcagcggcat catcaccagc aacgccccca tggacgagtg cgacgccaaag      900
tgccagacc ctcagggagc tattaacagc agcctgcctt tccagaacgt gcaccccgctg      960
accatcggcg agtgcccca gtacgtgcgg agcgccaagc tgcggatggt gaccggcctg     1020
cggaacatcc ccagcatcca gagcaggggc ctgttcggcg ccatcgccgg cttcatcgag     1080
ggcggctgga ccggcatggt ggacgggtgg tacggctacc accaccagaa cgagcagggc     1140
agcggctacg ccgcccacca gaagagcacc cagaacgcca tcaacggcat caccaacaag     1200
gtgaacagcg tgatcgagaa gatgaacacc cagttcaccg ccgtgggcaa agagttcaac     1260
aagctggaac ggcggatgga aaacctgaac aagaaggtgg acgacggctt cctggacatc     1320
tggaacctaca acgcccagct gctggtgctg ctggaaaacg agcggaccct ggacttccac     1380
gacagcaacg tgaagaacct gtacgagaag gtgaaaagcc agctgaagaa caacgccaaa     1440
gagatcggca acggtgctt cgagttctac cacaagtgca acgacgagtg catggaaagc     1500
gtgaagaatg gcaacctaga ctacccaag tacagcagag aaagcaagct gaaccgggag     1560
aagatcgacg gcgtgaagct ggaaagcatg ggcgtgtacc agatcctggc catctacagc     1620
accgtcgtct ccagcctcgt cctgctcgtg tcctggggcg ccatctcctt ttggatgtgc     1680
agcaacggca gcctgcagtg ccggatctgc atctgatgac tcgagctc     1728

```

5

<210> 22
<211> 565
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteína H1 de gripe
<400> 22

ES 2 600 890 T3

Met Lys Val Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr
1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile
50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
100 105 110

Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
130 135 140

Val Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe
145 150 155 160

Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn
165 170 175

Leu Ser Lys Ser Tyr Ala Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
180 185 190

Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu Tyr
195 200 205

His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg
210 215 220

Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu
225 230 235 240

ES 2 600 890 T3

Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile
 245 250 255

Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Ala
 260 265 270

Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met
 275 280 285

Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser
 290 295 300

Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro
 305 310 315 320

Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn
 325 330 335

Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe
 340 345 350

Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His
 355 360 365

His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr
 370 375 380

Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu
 385 390 395 400

Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu
 405 410 415

Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu
 420 425 430

Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu
 435 440 445

Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys
 450 455 460

Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys
 465 470 475 480

Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asp Glu Cys Met Glu Ser Val Lys
 485 490 495

ES 2 600 890 T3

Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn
500 505 510

Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Gln
515 520 525

Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val
530 535 540

Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln
545 550 555 560

Cys Arg Ile Cys Ile
565

- <210> 23
- <211> 1731
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Secuencia de ADN de H3 de gripe

- <400> 23

ES 2 600 890 T3

ggtaccaagc ttgccacccat gaaaaccatc atcgccctga gctacatcct gtgcctgggtg 60
 ttcgcccaga agctgcccgg caacgacaac agcaccgcca ccctgtgtct gggccaccac 120
 gccgtgccc aacggcaccat cgtgaaaaca atcaccaacg accagatcga ggtgaccaac 180
 gccaccgagc tgggtgcagag cagcagcacc ggcggcatct gcgacagccc ccaccagatc 240
 ctggacggcg agaactgcac cctgatcgac gccctgctgg gcgaccctca gtgcgacggc 300
 ttccagaaca aaaagtggga cctgttcgtg gagcggagca aggcctacag caactgctac 360
 ccctacgagc tgcccgacta cggcagcctg cggagcctgg tggccagcag cggcaccctg 420
 gaattcaaca acgagagctt caactggacc ggcgtgacc agaacggcac cagcagcggc 480
 tgcaagcggc ggagcaacaa cagcttcttt tccagactga actggctgac ccacctgaag 540
 ttcaagtacc ccgccctgaa cgtgaccatg cccaacaatg agaagttcga caagctgtac 600
 atctggggcg tgcaccaccc cggcaccgac aatgaccaga tcagcctgta cggccaggcc 660
 agcggccgga tcaccgtgag caccaagcgg agccagcaga ccgtgatccc caacatcggc 720
 agccggccca gagtgagaga catccccagc cggatcagca tctactggac aatcgtgaag 780
 cccggcgaca tcctgctgat caactccacc ggcaacctga tcgccccag gggctacttc 840
 aagatcagaa gcggcaagag cagcatcatg cggagcagc ccccatcgg caagtgaac 900
 agcgagtgca tcacccccaa tggcagcatc cccaacgaca agcccttcca gaacgtgaac 960
 cggatcacct acggcgcctg cccagatac gtgaagcaga acaccctgaa gctggccacc 1020
 ggcattcgga acgtgcccga gaagcagacc cggggcatct tcggcgccat cggcggcttc 1080
 atcgagaacg gctgggaggg catggtggac ggggtggtacg gcttcgggca ccagaactcc 1140
 gagggcacg gccaggccgc cgacctgaag agcaccagc ccgccatcaa ccagatcaac 1200
 ggcaagctga accggctgat cggcaagacc aacgagaagt tccaccagat cgaaaaagaa 1260
 ttcagcgagg tggagggccg gatccaggac ctggaaaagt acgtggagga caccaagatc 1320
 gacctgtgga gctacaacgc cgagctgctg gtcgccctgg aaaaccagca caccatcgac 1380
 ctgaccgaca gcgagatgaa caagctgttc gagcggacca agaagcagct gcgggagaaac 1440
 gccgaggaca tgggcaacgg ctgctttaag atctaccaca agtgcgacaa cgcctgcac 1500
 ggcagcatcc ggaacggcac ctacgaccac gacgtgtacc gggacgaggc cctgaacaac 1560
 cggttccaga tcaagggcgt ggagctgaag agcggctaca aggactggat cctgtggatc 1620
 agcttcgcca tcagctgctt tctgctgtgc gtggccctgc tgggattcat catgtgggcc 1680
 tgccagaagg gcaacatccg ctgcaacatc tgcatctgat gactcgagct c 1731

ES 2 600 890 T3

<210> 24
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de proteína H3 de gripe

10

<400> 24

```

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Cys Leu Val Phe Ala
 1           5           10           15

Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly
      20           25           30

His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Ile Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp
      35           40           45

Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr
 50           55           60

Gly Gly Ile Cys Asp Ser Pro His Gln Ile Leu Asp Gly Glu Asn Cys
 65           70           75           80

Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro Gln Cys Asp Gly Phe Gln
      85           90           95

Asn Lys Lys Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys Ala Tyr Ser Asn
      100          105          110

Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val
      115          120          125
  
```

ES 2 600 890 T3

Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Asn Asn Glu Ser Phe Asn Trp Thr
130 135 140

Gly Val Thr Gln Asn Gly Thr Ser Ser Ala Cys Lys Arg Arg Ser Asn
145 150 155 160

Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr His Leu Lys Phe Lys
165 170 175

Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Glu Lys Phe Asp Lys
180 185 190

Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Gly Thr Asp Asn Asp Gln Ile
195 200 205

Ser Leu Tyr Ala Gln Ala Ser Gly Arg Ile Thr Val Ser Thr Lys Arg
210 215 220

Ser Gln Gln Thr Val Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Arg Val Arg
225 230 235 240

Asp Ile Pro Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly
245 250 255

Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Gly
260 265 270

Tyr Phe Lys Ile Arg Ser Gly Lys Ser Ser Ile Met Arg Ser Asp Ala
275 280 285

Pro Ile Gly Lys Cys Asn Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile
290 295 300

Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg Ile Thr Tyr Gly Ala
305 310 315 320

Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met
325 330 335

Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala
340 345 350

Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly
355 360 365

Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Ile Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys
370 375 380

Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asn Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Leu

ES 2 600 890 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|-----|
| 385 | | | | | 390 | | | | | | | | | | | | 400 |
| Ile | Gly | Lys | Thr | Asn | Glu | Lys | Phe | His | Gln | Ile | Glu | Lys | Glu | Phe | Ser | | |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | | |
| Glu | Val | Glu | Gly | Arg | Ile | Gln | Asp | Leu | Glu | Lys | Tyr | Val | Glu | Asp | Thr | | |
| | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | | |
| Lys | Ile | Asp | Leu | Trp | Ser | Tyr | Asn | Ala | Glu | Leu | Leu | Val | Ala | Leu | Glu | | |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | | 445 | | | | |
| Asn | Gln | His | Thr | Ile | Asp | Leu | Thr | Asp | Ser | Glu | Met | Asn | Lys | Leu | Phe | | |
| | | | | | | 450 | | 455 | | | | 460 | | | | | |
| Glu | Arg | Thr | Lys | Lys | Gln | Leu | Arg | Glu | Asn | Ala | Glu | Asp | Met | Gly | Asn | | |
| 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 | | |
| Gly | Cys | Phe | Lys | Ile | Tyr | His | Lys | Cys | Asp | Asn | Ala | Cys | Ile | Gly | Ser | | |
| | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | | | |
| Ile | Arg | Asn | Gly | Thr | Tyr | Asp | His | Asp | Val | Tyr | Arg | Asp | Glu | Ala | Leu | | |
| | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | | |
| Asn | Asn | Arg | Phe | Gln | Ile | Lys | Gly | Val | Glu | Leu | Lys | Ser | Gly | Tyr | Lys | | |
| | | 515 | | | | | 520 | | | | | | 525 | | | | |
| Asp | Trp | Ile | Leu | Trp | Ile | Ser | Phe | Ala | Ile | Ser | Cys | Phe | Leu | Leu | Cys | | |
| | | 530 | | | | 535 | | | | | 540 | | | | | | |
| Val | Ala | Leu | Leu | Gly | Phe | Ile | Met | Trp | Ala | Cys | Gln | Lys | Gly | Asn | Ile | | |
| 545 | | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 | | |
| Arg | Cys | Asn | Ile | Cys | Ile | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 565 | | | | | | | | | | | | | |

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican, cada una, un antígeno de hemaglutinina de gripe B (BHA) consenso adecuado para inducir una respuesta inmunitaria contra múltiples serotipos de gripe, en la que las una o más secuencias de ácido nucleico se seleccionan entre el grupo que consiste en:
- 5 a) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 13, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 13; un fragmento de la SEQ ID NO: 13 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 13 que comprende al menos 60 nucleótidos; y
- 10 b) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 15, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 15; un fragmento de la SEQ ID NO: 15 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 15 que comprende al menos 60 nucleótidos.
- 15
2. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, que comprende además una o más secuencias de ácido nucleico que codifican, cada una, un antígeno de hemaglutinina de gripe B (BHA) consenso adecuado para inducir una respuesta inmunitaria contra múltiples serotipos de gripe, en la que las una o más secuencias de ácido nucleico se seleccionan entre el grupo que consiste en:
- 20
- c) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 1, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1; un fragmento de la SEQ ID NO: 1 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 1 que comprende al menos 60 nucleótidos;
- 25
- d) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 3, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 3; un fragmento de la SEQ ID NO: 3 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 3 que comprende al menos 60 nucleótidos;
- 30
- e) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 6, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 6; un fragmento de la SEQ ID NO: 6 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 6 que comprende al menos 60 nucleótidos;
- 35
- f) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 9, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 9; un fragmento de la SEQ ID NO: 9 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 9 que comprende al menos 60 nucleótidos; y
- 40
- g) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 11, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 11; un fragmento de la SEQ ID NO: 11 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 11 que comprende al menos 60 nucleótidos.
- 45
- 50 3. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 15.
4. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 15, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia líder de IgE.
- 55
5. Una composición que comprende
- 60 a) una pluralidad de una o más moléculas de ácido nucleico que comprenden una o más secuencias de ácido nucleico que codifican, cada una, un antígeno de hemaglutinina de gripe B (BHA) consenso adecuado para inducir una respuesta inmunitaria contra múltiples serotipos de gripe, en la que las una o más secuencias de ácido nucleico se seleccionan entre el grupo que consiste en:
- 65 i) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 13, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 13; un fragmento de la SEQ ID NO: 13 que comprende al menos 60 nucleótidos, y

una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 13 que comprende al menos 60 nucleótidos; y

5 ii) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 15, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 15; un fragmento de la SEQ ID NO: 15 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 15 que comprende al menos 60 nucleótidos;

y

10 b) una o más secuencias de ácido nucleico adicionales que codifican una o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en una o más de: una hemaglutinina H1 de gripe A, una hemaglutinina H2 de gripe A, una hemaglutinina H3 de gripe A, una hemaglutinina H4 de gripe A, una hemaglutinina H5 de gripe A, una hemaglutinina H6 de gripe A, una hemaglutinina H7 de gripe A, una hemaglutinina H8 de gripe A, una hemaglutinina H9 de gripe A, una hemaglutinina H10 de gripe A, una hemaglutinina H11 de gripe A, una hemaglutinina H12 de gripe A, una hemaglutinina H13 de gripe A, una hemaglutinina H14 de gripe A, una hemaglutinina H15 de gripe A, una hemaglutinina H16 de gripe A, una neuraminidasa N1 de gripe A, una neuraminidasa N2 de gripe A, una neuraminidasa N3 de gripe A, una neuraminidasa N4 de gripe A, una neuraminidasa N5 de gripe A, una neuraminidasa N6 de gripe A, una neuraminidasa N7 de gripe A, una neuraminidasa N8 de gripe A, una neuraminidasa N9 de gripe A, una hemaglutinina de gripe B y una neuraminidasa de gripe B.

25 6. La composición de la reivindicación 5, en la que la pluralidad de una o más moléculas de ácido nucleico comprenden además una o más secuencias de ácido nucleico que codifican, cada una, un antígeno de hemaglutinina de gripe B (BHA) consenso adecuado para inducir una respuesta inmunitaria contra múltiples serotipos de gripe, en la que las una o más secuencias de ácido nucleico se seleccionan entre el grupo que consiste en:

30 iii) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 1, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1; un fragmento de la SEQ ID NO: 1 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 1 que comprende al menos 60 nucleótidos;

35 iv) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 3, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 3; un fragmento de la SEQ ID NO: 3 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 3 que comprende al menos 60 nucleótidos;

40 v) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 6, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 6; un fragmento de la SEQ ID NO: 6 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 6 que comprende al menos 60 nucleótidos;

45 vi) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 9, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 9; un fragmento de la SEQ ID NO: 9 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 9 que comprende al menos 60 nucleótidos; y

50 vii) una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 11, una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 11; un fragmento de la SEQ ID NO: 11 que comprende al menos 60 nucleótidos, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 95 % idéntica, al menos el 98 % idéntica o al menos el 99 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 11 que comprende al menos 60 nucleótidos.

55 7. La composición de la reivindicación 5, en la que dichas una o más secuencias de ácido nucleico adicionales están en una pluralidad de una o más moléculas de ácido nucleico diferentes, de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico presentadas en la sección a).

60 8. La composición de la reivindicación 5, en la que la pluralidad de moléculas de ácido nucleico presentadas en la sección a) comprende una o más secuencias de ácido nucleico seleccionadas entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 15.

65 9. Un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1, unida de forma operativa a elementos reguladores que son funcionales en una célula humana, o la composición de la reivindicación 5, en la que las secuencias de ácido nucleico presentadas en a) y b) están, cada una, unidas de forma operativa a elementos reguladores que son funcionales en una célula humana.

10. La composición de la reivindicación 5, en la que las secuencias de ácido nucleico presentadas en a) y b) son parte de uno o más vectores de expresión.
- 5 11. La composición de la reivindicación 10, en la que los uno o más vectores de expresión son plásmidos, o el vector de expresión de la reivindicación 9, en el que dicho vector de expresión es un plásmido.
12. El vector de expresión de la reivindicación 11, en el que dicho vector de expresión es pGX2009, o la composición de la reivindicación 5 que comprende pGX2009 y/o pGX2006.
- 10 13. La composición de la reivindicación 5, que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 13 y opcionalmente una o más de:
- 15 una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 1;
una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 6;
una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 9;
una secuencia de ácido nucleico que codifica una hemaglutinina H1 de gripe A; y
una secuencia de ácido nucleico que codifica una hemaglutinina H3 de gripe A, opcionalmente
- 20 en la que la secuencia de ácido nucleico que codifica una hemaglutinina H1 de gripe A comprende la SEQ ID NO: 21 y la secuencia de ácido nucleico que codifica una hemaglutinina H3 de gripe A comprende la SEQ ID NO: 23.
14. La composición de la reivindicación 13, que comprende:
- 25 una molécula de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 9;
una molécula de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 13; y
una molécula de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 23, opcionalmente en la que las moléculas de ácido nucleico que comprenden la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 23 son plásmidos.
- 30 15. Una secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1, una composición de la reivindicación 5 o una composición de la reivindicación 14 para uso en la inducción de una respuesta inmunitaria.
16. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico tal como se define en la reivindicación 1, para uso en la protección de un individuo contra infección por gripe, preferentemente por una cepa de gripe A humana de origen porcino o para uso en el tratamiento de la gripe, preferentemente infección por una cepa de gripe A humana de origen porcino.
- 35 17. Una composición que comprende
- 40 a) una primera secuencia de ácido nucleico tal como se define en la reivindicación 1;
b) una o más secuencias de ácido nucleico adicionales que codifican una o más proteínas seleccionadas entre el grupo que consiste en una o más de: una hemaglutinina H1 de gripe A, una hemaglutinina H2 de gripe A, una hemaglutinina H3 de gripe A, una hemaglutinina H4 de gripe A, una hemaglutinina H5 de gripe A, una hemaglutinina H6 de gripe A, una hemaglutinina H7 de gripe A, una hemaglutinina H8 de gripe A, una hemaglutinina H9 de gripe A, una hemaglutinina H10 de gripe A, una hemaglutinina H11 de gripe A, una hemaglutinina H12 de gripe A, una hemaglutinina H13 de gripe A, una hemaglutinina H14 de gripe A, una hemaglutinina H15 de gripe A, una hemaglutinina H16 de gripe A, una neuraminidasa N1 de gripe A, una neuraminidasa N2 de gripe A, una neuraminidasa N3 de gripe A, una neuraminidasa N4 de gripe A, una neuraminidasa N5 de gripe A, una neuraminidasa N6 de gripe A, una neuraminidasa N7 de gripe A, una neuraminidasa N8 de gripe A, una neuraminidasa N9 de gripe A, una hemaglutinina de gripe B y una neuraminidasa de gripe B;
- 45 50 para uso en la protección de un individuo contra infección por gripe, preferentemente por una cepa de gripe A humana de origen porcino o para uso en el tratamiento de la gripe, preferentemente infección por gripe A humana de origen porcino.
- 55 18. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 17, en la que la composición comprende una o más de:
- 60 una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 1;
una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 9;
una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 13;
una secuencia de ácido nucleico que codifica una hemaglutinina H1 de gripe A; y
una secuencia de ácido nucleico que codifica una hemaglutinina H3 de gripe A, opcionalmente
- 65 en la que la secuencia de ácido nucleico que codifica una hemaglutinina H1 de gripe A comprende la SEQ ID NO: 21 y la secuencia de ácido nucleico que codifica una hemaglutinina H3 de gripe A comprende la SEQ ID NO: 23.

19. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 17, en la que la composición comprende una o más de:

- 5 una molécula de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 9;
una molécula de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 13; y
una molécula de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 23, opcionalmente en la que las moléculas de ácido nucleico que comprenden la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 13; y la SEQ ID NO: 23 son plásmidos.

FIGURA 1

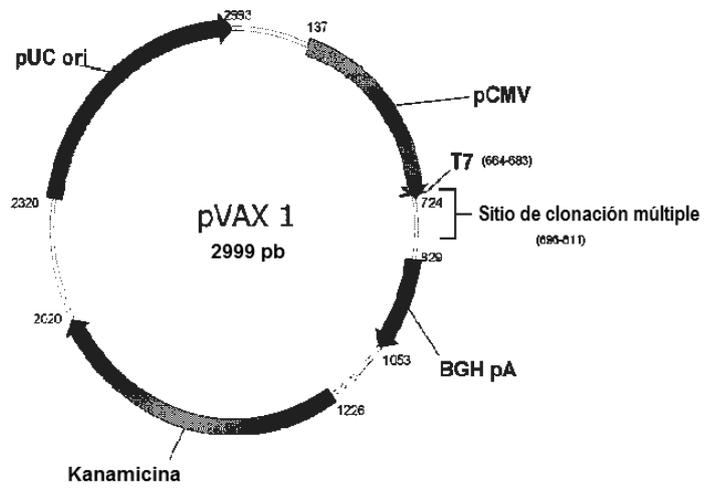


FIGURA 2

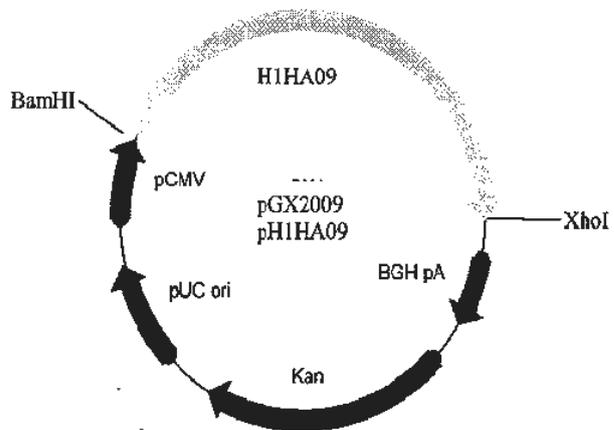
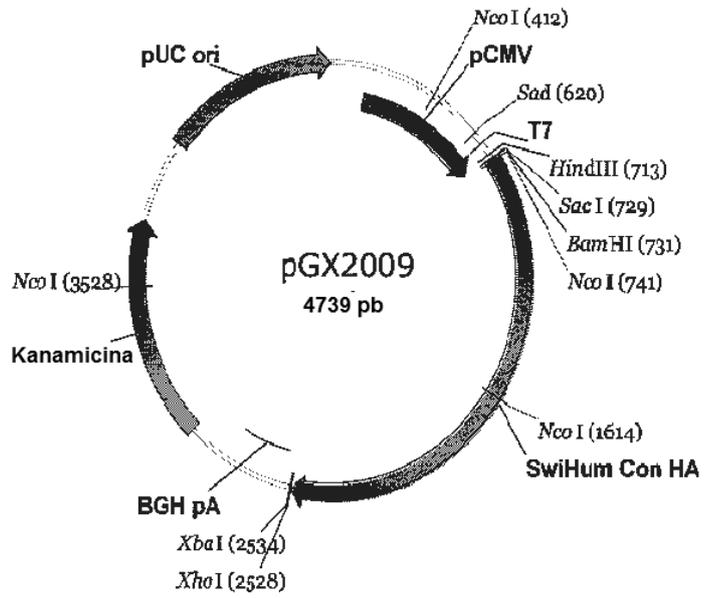


FIGURA 3

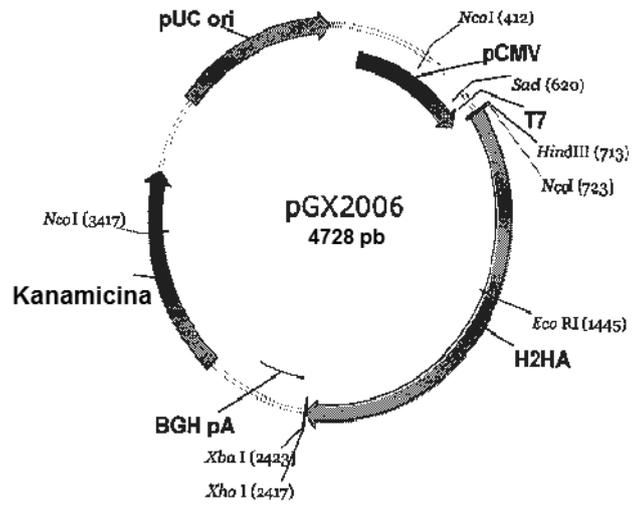


FIGURA 4

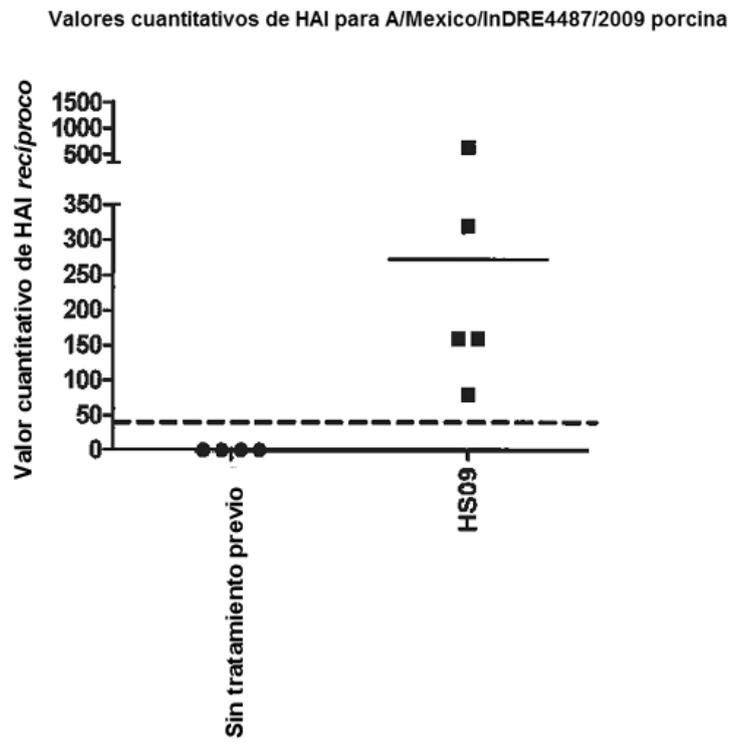


FIGURA 5

