

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 779**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2010 PCT/US2010/043951**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.02.2011 WO11014794**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2010 E 10805122 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2459716**

54 Título: **Vectores de base adenovírica**

30 Prioridad:

31.07.2009 US 230617 P

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

01.03.2017

73 Titular/es:

**PAXVAX, INC. (100.0%)
3985A Sorrento Valley Boulevard
San Diego, California 92121, US**

72 Inventor/es:

**MAYALL, TIMOTHY P. y
ALEXANDER, JEFF**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 603 779 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

Vectores de base adenovírica.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los adenovirus han sido ampliamente estudiados como agentes infecciosos, como objeto de investigaciones fundamentales, y por su uso potencial en terapias génicas y en vacunas. Se han identificado cuarenta y nueve serotipos adenovíricos humanos y se han clasificado en seis subgéneros (del A al F) en base a comparaciones de
10 ácidos nucleicos, características de las proteínas fibrosas y propiedades biológicas. Por ejemplo, el grupo A incluye los serotipos 12 y 31, el grupo B incluye los serotipos 3 y 7, el grupo C incluye los serotipos 2 y 5, el grupo D incluye los serotipos 8 y 30, el grupo E Incluye el serotipo 4, y el grupo F incluye los serotipos 40 y 41.

En cuanto a la estructura general, todos los adenovirus examinados hasta la fecha son icosaedros regulares sin
15 envoltura de aproximadamente 80 nanómetros de diámetro. Los adenovirus contienen ADN de doble cadena lineal que forma un complejo con proteínas centrales y cubierto por la cápside adenovírica. Los viriones individuales contienen aproximadamente 11 proteínas diferentes designadas con números romanos (II-XII) por orden de tamaño decreciente en geles SDS.

20 La cápside se compone de siete proteínas estructurales: II (hexón), III (pentón), IIIa, IV (fibra), VI, VII y IX. La cápside comprende 252 capsómeros, de los cuales 240 son capsómeros hexones y 12 son capsómeros pentones. Los capsómeros hexones, los cuales son trímeros de la proteína hexón, constituyen aproximadamente el 75 % de la proteína de la cápside. Los capsómeros pentones, los cuales son pentámeros de la proteína pentón, se ubican en cada uno de los 12 vértices del virión. Cada capsómero pentón está ligado a seis capsómeros hexones adyacentes y
25 una fibra. La fibra, la cual es normalmente un trímero de la proteína fibrosa, se proyecta desde el capsómero pentón. La proteína hexón y, en menor medida, la proteína fibrosa, componen los determinantes antigénicos principales de un adenovirus y también determinan la especificidad serotípica.

Los investigadores han analizado y comparado la estructura de las proteínas de la cápside en diferentes serotipos
30 adenovíricos, y en particular, en las proteínas hexón, en un esfuerzo por definir las regiones de las proteínas contra las que se producen por los anticuerpos neutralizantes. Las regiones predominantes en las proteínas hexón contra las cuales se dirigen los anticuerpos neutralizantes parecen estar en los bucles 1 y 2 (es decir, LI u 11 y LII o 12, respectivamente), que se proyectan hacia afuera desde la base del capsómero hexón. Un análisis de los bucles 1 y 2 en diferentes proteínas hexón de adenovirus ha revelado la presencia de siete regiones hipervariables discretas
35 (HVR1 a HVR7) correspondientes a ubicaciones donde las proteínas hexón difieren considerablemente de un serotipo al otro.

El núcleo de un virión adenovírico contiene genoma de ADN de doble cadena lineal y las proteínas asociadas V, VII, X (mu), IVa2 y la proteína terminal (TP). Se conserva la organización genómica de los diferentes adenovirus y se ha
40 propuesto que tiene una función temporizadora, donde los extremos del genoma se transcriben primero (los genes tempranos inmediatos E1 y E4 se ubican en los extremos opuestos del genoma lineal). La transcripción temprana de E1 y E4 conduce a la apertura de la región central del genoma, permitiendo la transcripción de la región central.

Los genomas adenovíricos comprenden típicamente ocho unidades transcripcionales de ARN polimerasa II: cinco
45 unidades tempranas, E1A, E1B, E2A-E2B, E3 y E4; dos unidades tempranas retardadas, IX e IVa2; y la unidad transcripcional tardía principal. La unidad transcripcional tardía principal se subdivide además en las regiones L1-L5 en base al uso de sitios de splicing alternativos. Con frecuencia, las unidades transcripcionales expresan proteínas de función similar. Por ejemplo, la unidad E1A codifica dos proteínas responsables de la activación de la transcripción y la inducción de la fase S ante la infección celular; la unidad de transcripción E1B codifica dos
50 proteínas que inhiben la apoptosis celular; la unidad transcripcional E3 está implicada en la evasión de la respuesta inmunitaria; y la unidad transcripcional tardía principal codifica las proteínas estructurales necesarias para el ensamblaje de la cápside.

Para la terapia génica y la vacunación, se han diseñado vectores adenovíricos recombinantes para codificar y
55 expresar genes y antígenos heterólogos. Los serotipos Ad2 y Ad5 se han utilizado extensamente en este contexto. Se han insertado las secuencias heterólogas en los genomas adenovíricos, incluyendo en las unidades transcripcionales tempranas y las regiones codificantes de varias proteínas estructurales, tales como hexón, pentón y fibra. En muchos casos, las eliminaciones en el genoma adenovírico (por ejemplo, en las regiones E1) se han utilizado para crear vectores adenovíricos incapaces de replicarse, que se han considerado generalmente más

seguros para su administración a sujetos humanos. A pesar de tal investigación y desarrollo exhaustivos, todavía existe en la técnica la necesidad de nuevos vectores adenovíricos recombinantes adecuados, por ejemplo, como vacunas contra enfermedades infecciosas.

5 RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se dirige a vectores adenovíricos recombinantes que encuentran su uso como vacunas eficaces. La invención se basa, en parte, en el desarrollo de vectores adenovíricos recombinantes novedosos que expresan secuencias heterólogas a altos niveles. La invención también se basa, en parte, en el desarrollo de
10 vectores adenovíricos recombinantes novedosos diseñados para mejorar la respuesta inmunitaria del huésped y evadir los anticuerpos neutralizantes preexistentes. La invención también se basa, en parte, en el desarrollo de vectores adenovíricos recombinantes novedosos que se van a usar como vacunas específicas de antígeno y/o contra la influenza universal.

15 Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona una vacuna que comprende un vector adenovírico, que comprende una primera secuencia heteróloga, donde el vector adenovírico es capaz de replicarse y tiene una eliminación parcial de E3, y donde la primera secuencia heteróloga se integra en la eliminación de E3 parcial y se une operativamente a un aceptor de splicing de adenovirus nativo bajo el control del promotor tardío principal endógeno.

20 En ciertas realizaciones, el vector adenovírico se obtiene a partir de un adenovirus Ad2, Ad3, Ad4, Ad5, Ad6, Ad7, Ad11, Ad20, Ad21, Ad22, Ad23, Ad24, Ad25, Ad26, Ad28, Ad34, Ad35, Ad40, Ad41, Ad48, Ad49 o Ad50. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga se encuentra bajo el control de o se encuentra unida operativamente a un promotor tardío principal (MLP) adenovírico y una secuencia líder tripartita (TLP) adenovírica, una secuencia
25 aceptora de splicing adenovírica, y/o una secuencia de señal de poliadenilación adenovírica. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga se modifica para aumentar la expresión. Por ejemplo, la primera secuencia heteróloga puede ser optimizada mediante codones y/o modificada para incluir una secuencia de consenso Kozak. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica un polipéptido inmunógeno de un patógeno infeccioso, tal como el virus de la influenza, el virus del papiloma humano (VPH), el virus de la
30 inmunodeficiencia humana (VIH), *Bacillus*, *Shigella*, *Mycobacterium*, *Plasmodium*, etc. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica al menos dos polipéptidos separados y/o un multímero de epítopos inmunógenos de un patógeno infeccioso.

La vacuna puede comprender una segunda secuencia heteróloga, donde la segunda secuencia heteróloga se encuentra integrada en una región del hexón adenovírica. En ciertas realizaciones, la segunda secuencia heteróloga
35 se integra en una o más regiones hipervariables de la región del exón. Por ejemplo, la segunda secuencia heteróloga puede integrarse en una secuencia HVR1, HVR2, HVR4, o HVR5 del hexón, o una combinación de las mismas. En ciertas realizaciones, la segunda secuencia heteróloga codifica una porción de la proteína de la membrana del virus (por ejemplo, una proteína integral de membrana o una proteína periférica de membrana). Por
40 ejemplo, la segunda secuencia heteróloga puede codificar una porción extracelular de una proteína de la membrana del virus conservada. En ciertas realizaciones, la segunda secuencia heteróloga codifica una porción de una proteína M2 de la influenza, una proteína matriz de la influenza, una proteína NP de la influenza, o una región hipervariable del hexón de un adenovirus que tenga un serotipo diferente. En ciertas realizaciones, la segunda secuencia heteróloga codifica dos o más copias de una proteína, tal como la proteína de la membrana del virus, o un fragmento
45 de la misma.

En ciertas realizaciones, el vector adenovírico comprende una o más secuencias heterólogas adicionales, donde cada secuencia heteróloga adicional se encuentra integrada en una región del hexón y es diferente de la segunda secuencia heteróloga. Por ejemplo, las secuencias heterólogas adicionales pueden ser todas de las regiones
50 hipervariables de un adenovirus que tenga un serotipo diferente.

La presente invención también se refiere a una unidad de dosificación de la vacuna de la invención donde una dosis individual comprende aproximadamente 10^3 - 10^{13} partículas adenovíricas.

55 La presente invención también se refiere a la vacuna de la invención para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria a un patógeno infeccioso en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar la vacuna al sujeto. En ciertas realizaciones, la vacuna es para la influenza, virus del papiloma humano (VPH), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), *Bacillus*, *Shigella*, *Mycobacterium* o *Plasmodium*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** es un diagrama de varias etapas de clonación implicadas en la producción del vector adenovirico recombinante pPV-Ad4vax.

- 5 La **figura 2** es un diagrama de la región E3 de Ad4 que ilustra la ubicación de varios marcos abiertos de lectura, los criterios de valoración de eliminaciones de E3 parciales y totales ejemplares, y las ubicaciones representativas de donde pueden ser insertadas las secuencias heterólogas en la región.

La **figura 3** es un diagrama que muestra la ubicación de varias unidades de transcripción en el genoma adenovirico.

- Figura 4.** Detección de la expresión de hemaglutinina mediante Western blot en células A549 infectadas con 4 virus Ad4 H5-HA diferentes. Se infectaron células A549, (confluencia del 50 %-70 % en una placa de 6 pocillos) con $2,5 \times 10^7$ vp/ml de cada virus y se incubaron a 37 °C en una incubadora de CO₂. Después de 24 o 48 horas se prepararon lisados celulares completos. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y las transferencias se sondaron con anticuerpos para detectar HA, β -actina y α -tubulina como se indicó. También se identificaron filas y controles marcadores tanto no infectados como virus recombinantes no relevantes. Todos los virus recombinantes expresan HA de manera vigorosa, salvo el virus CMV no optimizado, PXVX0113, que expresó un nivel sustancialmente más bajo de HA.
- 10
- 15

- La **figura 5** demuestra la expresión de una proteína HA de la influenza de dos vectores adenoviricos diferentes de la invención según se detectó mediante análisis de Western blot. El vector PXVX0101 contiene una eliminación parcial de E3 y una secuencia heteróloga que codifica HA, donde la secuencia heteróloga se inserta en la eliminación parcial de E3 y bajo el control del MLP endógeno. El vector PXVX0111 contiene una eliminación total de E3 y una secuencia heteróloga que codifica HA, donde la secuencia heteróloga se inserta cerca de la eliminación parcial de E3 y comprende un promotor de CMV.
- 20

La **figura 6** muestra una expresión de ARNm por análisis de PCR en tiempo real para el antígeno H3 HA y las proteínas adenoviricas de las células A549 infectadas con PXVX0101.

- 25 La **figura 7** demuestra la expresión superficial de HA en un ensayo FACS donde las células A549 se infectaron con PXVX0101 y PXVX0111.

Las **figuras 8A y 8B** muestran un diagrama de flujo que describe un ensayo de crecimiento en una etapa que puede ser utilizado para ensayar la producción de vectores adenoviricos de la invención y los resultados del ensayo para PXVX0101 y PXVX0111 en tres líneas celulares diferentes.

- 30 Las **figuras 9A y 9B** muestran la aglutinación de glóbulos rojos en células A549 infectadas con el virus de la influenza (A) o PVXV0101 (B).

La **figura 10** es un diagrama de varias etapas de clonación implicadas en la creación de una secuencia de hexón que puede ser utilizada para generar secuencias de codificación de hexones quiméricas.

- 35 La **figura 11** es un diagrama de la ubicación de las regiones 1 a 6 del hexón HVR en un fragmento de la secuencia de codificación del hexón que se esté utilizando para construir secuencias quiméricas.

La **figura 12** representa varias secuencias de epítomos de la influenza que pueden ser utilizadas para reemplazar las secuencias HVR del hexón. H5 M2e (SEQ ID NOs: 339-341), H7 M2e (SEQ ID NOs: 342-343); H9 M2e (SEQ ID NOs: 344-345); Human M2e (SEQ ID NOs: 346-347); NP (SEQ ID NOs: 348-349); CTL matriz 58-66 (SEQ ID NOs: 350-351).

- 40 La **figura 13** representa una serie de construcciones del hexón de Ad4 quiméricas e indica qué HVR puede reemplazarse con secuencias de M2 de la influenza, matrices, y/o NP, u otras secuencias HVR del hexón de Ad7.

La **figura 14** representa las respuestas de anticuerpos específicas para HA en ratones inducidos por los adenovirus recombinantes PXVX0103 y PXVX0116.

- Figura 15. Representación esquemática del diseño del vector Ad4-H5-Vtn (PXVX0103).** La secuencia codificante nativa de H5 HA, sin el dominio polibásico, se derivó del virus de la influenza A/VietNam/1194/2004 y se insertó en la región génica E3 del virus Ad4. Los genes E3 24,8 K, E3 6,8 K y E3 29,7 K del virus Ad4 se eliminaron para colocar el transgen HA y se retuvo el sitio aceptor de splicing de E3 24,8 K para dirigir la expresión del transgen HA. La secuencia de señal de poliadenilación de E3A, derivada de Ad5, se puso aguas abajo con respecto a la secuencia codificante de HA.
- 45

- 50 **Figura 16. (A)** Caracterización de PXVX0103 que demuestra la expresión en la superficie celular de H5 HA. Se confirmó la expresión superficial de HA (H5-Vtn) mediante la infección de 1×10^6 células A549 con niveles diferentes de PXVX0103 (como se indicó) durante 48 horas antes de la tinción superficial con un anticuerpo monoclonal H5 anti-aviar de ratón (clon 19C11, Advanced ImmunoChemical). La detección se realizó mediante un anticuerpo secundario IgG-PE de cabra anti-ratón. Se utilizó Ad4 de tipo silvestre como control (área sombreada) para la comparación con las (líneas de) células infectadas con Ad4-H5-Vtn. Con cantidades crecientes de Ad4-H5-Vtn, un desplazamiento significativo a la derecha indica que las células están expresando niveles fuertes de la proteína H5 en la superficie celular. **(B)** Análisis Western de las mismas muestras usadas para la citometría de flujo en **(A)**.
- 55

Figura 17. La HA recombinante (Vtn) expresada de PXVX0103 es funcional como se demuestra por la formación de rosetas de glóbulos rojos de las células A549 infectadas por virus. Imágenes representativas de

células A549 infectadas con **(A)** PXVX0103 o **(B)** Ad4-wt durante 24 horas, lavadas y después incubadas en presencia de glóbulos rojos (RBC) de un donante humano. Las rosetas se indican con flechas blancas como signo de la interacción entre la HA expresada por el virus en la superficie de las células A549 (células más grandes) y el ácido N-acetilneuramínico (el ácido siálico predominante en las células) encontrado en la superficie de los RBC (células más pequeñas). Esto ocurrirá únicamente si la HA está correctamente plegada.

Figura 18. El crecimiento del virus Ad4-H5-Vtn (PXVX0103) se atenúa en varias líneas celulares humanas frente al virus Ad4 de tipo silvestre. Se comparó el crecimiento del virus Ad4-H5-Vtn con el crecimiento del virus Ad4 WT en varias líneas celulares humanas; A549 (carcinoma de pulmón; **A**), H1299 (carcinoma de pulmón; **B**), HepG2 (carcinoma hepatocelular; **C**), HuTu 80 (adenocarcinoma de duodeno; **D**) y MRC-5 (fibroblasto de pulmón embrionario; **E**).

Figura 19. Títulos de anticuerpos neutralizantes específicos de Ad4 (A) e inmunidad celular específica de Ad4 tras la inmunización contra Ad4wt (B). Se inmunizaron ratones por vía intranasal con 1×10^9 vp del virus Ad4wt por ratón para establecer la inmunidad preexistente al vector. Cuatro semanas después de la inmunización, se desangraron diez ratones individuales y se determinaron los títulos de anticuerpos neutralizantes específicos de Ad4 **(A)**. Se sacrificaron dos ratones y se agruparon los esplenocitos para determinar la inmunidad celular específica del virus Ad4wt, como se ensayó mediante IFN- γ ELISPOT **(B)**.

Figura 20. Se reforzaron los títulos de anticuerpos HAI inducidos por la vacuna Ad4-H5-Vtn (A) y las respuestas inmunitarias celulares específicas de la HA (B) tras la inmunización con la vacuna Ad4-H5-Vtn y de la exposición al virus reagrupado H5N1. Se inmunizaron grupos de ratones (pretratados) con el virus Ad4 WT para establecer la inmunidad preexistente. Se inmunizaron por vía intranasal posteriormente ratones pretratados y sin tratar con una titulación de dosis de vacuna Ad4-H5-Vtn; 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 y 1×10^6 vp por ratón y se desangraron 6 semanas después de la inmunización con la vacuna y de nuevo 5 días después de la exposición al virus reagrupado H5N1 para determinar los títulos de anticuerpos HAI. Tres ratones del grupo se desangraron y el suero se agrupó para determinar los títulos de anticuerpos HAI **(A)**. También se sacrificaron dos ratones en los mismos puntos de tiempo, antes y después de la exposición a H5N1, y los esplenocitos se agruparon para determinar la inmunidad celular específica de HA H5 específica para cuatro péptidos de 15 mer derivados de H5 HA (Vtn) evaluados mediante IFN- γ ELISPOT **(B)**. Los ratones pretratados con el virus Ad4 WT y expuestos al virus reagrupado H5N1 no demostraron títulos detectables de anticuerpos HAI ni respuestas celulares específicas de H5HA 5 días después de la exposición al virus de la influenza.

Figura 21. Los ratones inmunizados con dosis más altas de la vacuna Ad4-H5-Vtn no perdieron peso (A), sobrevivieron a la exposición a un virus reagrupado H5N1 letal (B) y presentaron una reducción del virus reagrupado H5N1 en los pulmones (C). Se inmunizaron grupos de ratones (pretratados) con el virus Ad4 WT para establecer la inmunidad preexistente. Posteriormente, los ratones se inmunizaron por vía intranasal con una titulación de dosis de la vacuna Ad4-H5-Vtn. Seis semanas después de la inmunización con la vacuna Ad4-H5-Vtn, los ratones se expusieron a una dosis letal del virus H5N1 reagrupado. Se evaluó el peso de los ratones diariamente **(A)**, se evaluó la supervivencia de los ratones durante un período de 14 días **(B)** y 5 días después de la exposición al virus H5N1 reagrupado, se recuperaron los pulmones de un subconjunto de ratones para determinar los títulos víricos específicos de influenza como un porcentaje de reducción de títulos víricos en relación con los ratones no inmunizados **(C)**.

Figura 22. El Ad4-H5-Vtn (PXVX0103) indujo respuestas inmunitarias al transgen HA H5 en conejos cuando al administrarse mediante múltiples vías de administración. Se realizaron ensayos ELISA en muestras de sangre tomadas después de 14 días **(A)** tras la primera inmunización o 43 días **(B)**, lo que representa 14 días tras la segunda inmunización. Los datos ELISA se analizaron mediante la determinación de criterios de valoración y el análisis se representó en una tabla **(C)**.

Figura 23. La vacuna de la influenza Ad4-H5-Vtn (PXVX0103) induce respuestas significativas de anticuerpos específicas de HA H5 en ratones al administrarse por vía sublingual, vaginal y rectal. Se realizaron ensayos ELISA en muestras de sangre tomadas 2-4 semanas tras la segunda inmunización con partículas víricas de Ad4-H5-Vtn recombinante mediante las vías de administración sublingual **(A)**, vaginal **(B)**, o rectal **(C)**.

Figura 24. Demostración mediante análisis Western de (PA) soluble y PA recombinante asociado a las células (PA+GPI) de células A549 infectadas con vectores rAd4. Se analizó un lisado de células completo (panel izquierdo) o sobrenadante de cultivo de células (panel derecho) de células A549 infectadas con rAd4-PA mediante análisis de Western blot tras la separación en gel SDS-PAGE. Se sondaron membranas de nitrocelulosa con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-PA. Se realizó la confirmación de la expresión de la proteína recombinante mediante referencia a un PA recombinante (rPA) disponible en el mercado cargado en paralelo como un control positivo. Las A549 y A549 infectadas con el virus Ad4 de tipo silvestre (Ad4 WT) representan los controles negativos, demostrando la especificidad a rPA. Los niveles de proteína se muestran como cantidades relativas por niveles totales de proteínas.

Figura 25. Expresión de rPA en la superficie celular detectada en células A549 infectadas con Ad4-PA. Se infectaron células A549 con una MOI de 100 y se midió la expresión de PA en la superficie celular usando un

anticuerpo monoclonal específico de PA después de 24 horas del cultivo mediante un análisis FACS. La intensidad de fluorescencia media (MFI) para cada uno de los grupos se muestra a la derecha.

Figura 26. Los adenovirus Ad4-PA recombinantes PXVX0212 y PXVX0214 muestran un crecimiento atenuado en comparación con el Ad4 WT en dos líneas celulares humanas. Se midió la evolución temporal de los niveles

5 de rAd4 mediante TCID₅₀ tras la infección con el virus rAd4-PA de células A549 (carcinoma de pulmón) o MRC-5 (fibroblasto de pulmón embrionario, diploide). El tamaño de ráfaga de las células se calculó usando un nivel de infectividad mínimo (1 hora para A549 y 24 horas para MRC-5) como referencia, corrigiendo así las diferencias en la infección.

Figura 27. Los lisados celulares de A549 infectadas con rAd4 protegen a los ratones de la exposición a una

10 **toxina letal.** Se inmunizaron ratones (6/grupo) mediante una inyección intraperitoneal (IP) de lisados de células completos equivalentes a 5×10^6 células infectadas con 5×10^8 partículas víricas de Ad4 WT, Ad4-PA recombinante, o Ad4-PA-GPI recombinante. Se administraron 10 µg de rPA por vía subcutánea (S.C.) como control positivo. Cinco semanas después de la inmunización, los ratones se expusieron por vía intravenosa a una toxina letal de manera intravenosa (combinación de 120 µg de PA con 60 µg de LF) y se controlaron diariamente.

15 **Figura 28. Se detectaron respuestas de anticuerpos a rPA después de la administración IP de lisados de células A549 infectadas con rAd4-PA.** Se midieron las respuestas de anticuerpos en suero obtenidas de ratones

inmunizados por vía intraperitoneal con lisados de células completos de células A549 infectadas con adenovirus Ad4-PA recombinantes. Se analizaron las respuestas de anticuerpos 21 días posteriores a la inmunización tanto mediante ELISA (panel izquierdo) como mediante un ensayo de neutralización de toxinas basado en macrófagos *in*

20 *vitro*. Se calculó el CE₅₀ de 6 animales/grupo.

Figura 29. Representación esquemática de experimentos de exposición letales realizados tras la inmunización intranasal de ratones con virus rAd4 PA purificados. Se inmunizaron ratones con uno de los 5

25 antígenos diferentes indicados ($n = 25$ /grupo) el día 0. Se administraron los virus rAd4 por vía intranasal (I.N.) como 1×10^{10} vp en 50-62,5 µl de PBS por animal, con el virus Ad4 de tipo silvestre como control negativo. Los controles positivos, inyectados por vía subcutánea, en un volumen final de 100 µl de PBS contenían 10 µg de antígeno protector recombinante (rPA) en solitario o 10 µg de rPA adsorbido a 1 mg de gel de hidróxido de aluminio (Rehydragel HPA). Se midió la inmunidad celular (IFN-γ ELISPOT e IL-4 ELISPOT) 27 días posteriores a la inmunización en esplenocitos agrupados de 2 ratones/grupo. Se analizó la inmunidad celular de los ratones que sobrevivieron a la exposición a la toxina #1 (20 días posteriores a la inmunización, $n = 10$ /grupo) el día 54. Se

30 desangraron los mismos 9 animales/grupo (5 grupos) tanto para ELISA como ensayos de neutralización de toxinas después de 14 y 40 días de la inmunización. Un total de 10 ratones por grupo también se expuso a una toxina letal (con una combinación de 120 µg de PA y 60 µg de factor letal) después de 46 días de la inmunización. La supervivencia se controló durante los 30 días posteriores a la exposición.

Figura 30. Se midieron las respuestas de anticuerpos en suero a los 14 y 40 días posteriores a la inmunización

35 intranasal con los virus Ad4-PA y Ad4-PA-GPI purificados. Las respuestas IgG anti-PA analizadas mediante ELISA se muestran en los paneles de la izquierda, y los anticuerpos neutralizantes de las toxinas (TNA) medidos mediante un ensayo de neutralización de toxinas basado en macrófagos murinos *in vitro* se muestran en los paneles de la derecha. Se calculó el CE₅₀ usando una curva de dosis-respuesta sigmoideal ajustada para los datos de la dilución en serie de las muestras.

40 **Figura 31. Las curvas de supervivencia muestran la protección de los ratones contra la exposición a la toxina letal cuando son inmunizados con los virus rAd4-PA.** Los ratones ($n = 10$ /grupo) se inmunizaron con uno

de los cinco inmunógenos diferentes (rPA, rPA + alumbre, Ad4 de tipo silvestre, Ad4-PA y Ad4-PA-GPI) el día 0 y se expusieron a una toxina letal (60 µg de PA y 30 µg de LF en un volumen total de 100 µl de PBS) en los días 20 y 46 posteriores a la inmunización. La supervivencia se controló durante 30 días. El panel de la izquierda muestra la supervivencia después de la exposición 20 días posteriores a la inmunización. El panel de la derecha muestra la supervivencia después de la exposición 46 días posteriores a la inmunización.

Figura 32. La inmunización de los ratones con virus rAd4-PA induce respuestas inmunitarias mediadas por las células que se detectan después de la exposición a la toxina letal. Se midieron las respuestas inmunitarias

50 mediadas por las células (IFN-γ ELISPOT e IL-4 ELISPOT) 27 días posteriores a la inmunización en esplenocitos agrupados de ratones (2 ratones/grupo) inmunizados con uno de los cinco inmunógenos diferentes (rPA, rPA + alumbre, Ad4 de tipo silvestre, Ad4-PA, y Ad4-PA-GPI) el día 0. Se ensayaron los ratones que sobrevivieron a la exposición a la toxina #1 (20 días posteriores a la inmunización, $n = 10$ /grupo) para determinar la respuesta inmunitaria celular el día 54 (34 días posteriores a la exposición). Panel de la izquierda: Respuestas Th1 medidas por IFN-γ ELISPOT. Panel de la derecha: Respuestas Th2 medidas por IL-4 ELISPOT.

55 **Figura 33. Expresión de Ad4-CMV-HTL24 (PXVX0109) del polipéptido 52,5 K.** (A) Una representación esquemática del gene polipéptido HTL24 que contiene 24 epítomos auxiliares de la influenza, cada uno separado por una secuencia espaciadora GPGPG (SEQ ID NO: 353). (B) Análisis de Western blot de lisados celulares de células A549 infectadas con un virus Ad4 recombinante con una eliminación total de la región E3 y con una expresión de

HTL24 dirigida por el promotor de CMV (PXVX0109). Como control positivo, las células A549 se infectaron con influenza A/Uruguay/716/2007 (tipo A/Brisbane/10/2007) (NYMC X-175C reagrupado, NIBSC). El adenovirus recombinante PVXV0109 expresa de manera eficiente el polipéptido HTL24 como se muestra en las bandas que migran a 52,5 kDa.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Como se usan en el presente documento, los siguientes términos tendrán los siguientes significados.

10 El término "vector adenovirico" se refiere a un genoma adenovirico de tipo silvestre, mutante y/o recombinante, así como adenovirus que comprenden dicho genoma. Un vector adenovirico puede comprender todo o parte del genoma de cualquier serotipo adenovirico, así como combinaciones de los mismos (es decir, genomas híbridos).

El término "patógeno infeccioso" se refiere a cualquier agente capaz de infectar humanos y de causar el deterioro de la salud y/o desencadenar una respuesta inmunitaria. En ciertas realizaciones, el patógeno infeccioso es un virus, tal como el virus de la influenza, un retrovirus (es decir, VIH, virus del sarcoma de Rous (VSR), retrovirus endógeno humano K (HERV-K)), un retrovirus endógeno humano K (HERV-K)), virus del papiloma (por ejemplo, virus del papiloma humano), picornavirus (por ejemplo, Hepatitis A, Poliovirus), hepadnavirus (por ejemplo, Hepatitis B), flavivirus (por ejemplo, Hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus de la fiebre del dengue, virus de la encefalitis japonesa, Virus del Nilo Occidental), togavirus (por ejemplo, virus de chikungunya, virus de la encefalitis equina del este (EEE), virus de la encefalitis equina occidental (WEE), virus de la encefalitis equina venezolana (VEE)), virus del herpes (por ejemplo, citomegalovirus), paramixovirus (virus parainfluenza, virus de la neumonía, virus de la bronquiolitis, virus del resfriado común, virus del sarampión, virus de las paperas), rhabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia), filovirus (por ejemplo, virus ébola), bunyavirus (por ejemplo, Hantavirus, virus de la fiebre del valle de Rift), calicivirus (por ejemplo, Norovirus), o reovirus (por ejemplo, Rotavirus, virus de Epstein-Barr, virus del herpes simple tipos 1 y 2).

En otras realizaciones, el patógeno infeccioso es un organismo procariota tal como una bacteria gram negativa, una bacteria gram positiva u otro tipo de bacteria. Tales organismos procariotas incluyen, pero sin limitación, *Bacillus* (por ejemplo, *Bacillus anthracis*), *Mycobacterium* (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium Leprae*), *Shigella* (por ejemplo, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*), *Helicobacter* (por ejemplo, *Helicobacter pylori*), *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*), *Neisseria* (por ejemplo, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*), *Moraxella* (por ejemplo, *Moraxella catarrhalis*), *Haemophilus* (por ejemplo, *Haemophilus influenzae*), *Klebsiella* (por ejemplo, *Klebsiella pneumoniae*), *Legionella* (por ejemplo, *Legionella pneumophila*), *Pseudomonas* (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*), *Acinetobacter* (por ejemplo, *Acinetobacter baumannii*), *Listeria* (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*), *Staphylococcus* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, resistentes a múltiples fármacos, o resistentes a la oxacilina), *Streptococcus* (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus galactiae*), *Corynebacterium* (por ejemplo, *Corynebacterium diphtheria*), *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile*), *Chlamydia* (por ejemplo, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*), *Camphylobacter* (por ejemplo, *Camphylobacter jejuni*), *Bordetella* (por ejemplo, *Bordetella pertussis*), *Enterococcus* (por ejemplo, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, enterococos resistentes a la vancomicina (ERV)), *Vibrio* (por ejemplo, *Vibrio cholerae*), *Yersinia* (por ejemplo, *Yersinia pestis*), *Burkholderia* (por ejemplo, *Burkholderia cepacia complex*), *Coxiella* (por ejemplo, *Coxiella burnetti*), *Francisella* (por ejemplo, *Francisella tularensis*), y *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli* enterotoxigénico, enterohemorrágico o productor de toxinas Shiga, tal como ETEC, EHEC, EPEC, EIEC y EAEC).

Aún en otras realizaciones, el patógeno infeccioso es un organismo eucariota. Los ejemplos de organismos eucariotas incluyen, pero sin limitación, protistas tales como *Plasmodium* (por ejemplo, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium diarrhea*), y hongos, tales como *Candida* (por ejemplo, *Candida albicans*), *Aspergillus* (por ejemplo, *Aspergillus fumigatus*), *Cryptococcus* (por ejemplo, *Cryptococcus neoformans*), *Histoplasma* (por ejemplo, *Histoplasma capsulatum*), *Pneumocystis* (por ejemplo, *Pneumocystis jirovecii*), y *Coccidioides* (por ejemplo, *Coccidioides immitis*).

55 El término "cáncer" se refiere a una afección médica caracterizada por un incremento anormal en la proliferación de una población de células en particular. Las células cancerosas pueden derivar de cualquier tejido u órgano, incluyendo, por ejemplo, la piel, los músculos, los pulmones, el corazón, el hígado, el riñón, tejido neural, etc. En ciertas realizaciones, el cáncer es benigno (por ejemplo, un tumor benigno). En otras realizaciones, el cáncer es maligno (por ejemplo, un tumor maligno). En ciertas realizaciones, el cáncer es metastásico (es decir, las células

cancerosas son capaces de migrar desde su lugar de origen a otro órgano o tejido).

Se definirán otros términos, según sea necesario, a lo largo de toda la memoria descriptiva.

- 5 La presente invención se dirige a vacunas adenovíricas recombinantes. La invención se basa, en parte, en el desarrollo de vectores adenovíricos recombinantes novedosos que expresan secuencias heterólogas a altos niveles. La invención también se basa, en parte, en el desarrollo de vectores adenovíricos recombinantes novedosos diseñados para mejorar la respuesta inmunitaria del huésped y evadir los anticuerpos neutralizantes preexistentes. La invención también se basa, en parte, en el desarrollo de vectores adenovíricos recombinantes novedosos que se van a usar como vacunas específicas de antígeno y/o contra la influenza universal.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un vector adenovírico que comprende una primera secuencia heteróloga. Como se usa en el presente documento, una "secuencia heteróloga" es una secuencia de ácido nucleico que, cuando se integra a un vector adenovírico, crea una yuxtaposición que no ocurre naturalmente de secuencias adenovíricas con la secuencia de ácido nucleico. Típicamente, una secuencia heteróloga comprenderá una secuencia de ácido nucleico cuyo origen no es adenovírico. Por ejemplo, la secuencia heteróloga puede ser de origen no adenoviral en su totalidad, en su mayoría o en parte (por ejemplo, un mosaico de secuencias adenovíricas y no adenovíricas). Sin embargo, en algunos casos, la secuencia heteróloga puede ser de origen adenoviral en su totalidad, por ejemplo, una secuencia adenovírica de un tipo de adenovirus puede integrarse en un vector adenovírico generado de un tipo diferente de adenovirus. Por ejemplo, una secuencia adenovírica que codifica una proteína hexón o fibrosa de un tipo de adenovirus puede integrarse en un vector adenovírico generado de un tipo diferente de adenovirus para producir un adenovirus recombinante con proteínas fibrosas de diferentes serotipos y/o un adenovirus con proteínas hexones y fibrosas quiméricas. Los vectores adenovíricos que comprenden una primera secuencia heteróloga pueden ser útiles, por ejemplo, como vacunas contra patógenos infecciosos o células cancerosas. Por lo tanto, la primera secuencia heteróloga puede codificar un antígeno de un patógeno infeccioso. Como alternativa, la primera secuencia heteróloga puede codificar un antígeno asociado a células cancerosas.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica toda o parte de una proteína producida por un patógeno infeccioso. La proteína, o un fragmento de la misma (por ejemplo, producto de escisión, dominio estructural, unidad(es) de estructura secundaria, epítopos de linfocitos B, epítopos de linfocitos T citotóxicos (CTL), epítopos de los linfocitos T auxiliares (HTL)), etc., pueden estar ubicadas en la superficie del patógeno infeccioso. Por ejemplo, la proteína, o un fragmento de la misma, puede ser altamente antigénica, estar implicada en el direccionamiento celular y/o estar implicada en el ingreso en la célula. Como alternativa, la proteína, o un fragmento de la misma (por ejemplo, producto de escisión, dominio estructural, unidad(es) de estructura secundaria, epítopos HTL o CTL, etc.), puede estar ubicada en el interior del patógeno infeccioso. Por ejemplo, la proteína, o fragmento de la misma, puede ser una proteína intracelular, una cápside o una proteína central de un virus con envoltura, una proteína central de un virus sin envoltura, etc.

En ciertas realizaciones, el epítipo, dominio estructural, o la unidad de estructura secundaria se conserva de forma evolutiva. Como se usa en el presente documento, la expresión "conservada de forma evolutiva" significa que una secuencia se conserva al menos aproximadamente en un 50 % entre un conjunto variado de cepas de un patógeno infeccioso en particular. Para los virus, un conjunto variado de cepas incluye al menos una forma aislada de cada subclase identificada (por ejemplo, serotipo) capaz de infectar y, por lo tanto, causar una enfermedad o afección en la población diana de la vacuna, o un número representativo de formas aisladas infecciosas que abarque la diversidad conocida de dichas cepas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un conjunto variado de cepas de la influenza incluye cepas representativas que están asociadas a enfermedades en seres humanos, cerdos y/o aves, incluyendo cepas de H1N1 (por ejemplo, A/Wilson-Smith/33, A/New Caledonia/20/99, A/Swine Korea/S10/2004, A/Brevig Mission/1/1918, A/Pureto Rico/8/34/Mount Sinai, A/California/7/2009, A/California/05/2009, A/California/08/2009, A/Texas/04/2009, A/swine/Saskatchewan/18789/02, A/mallard/Alberta/130/2003, A/mallard/Alberta/2001, A/swine/Cotes d'Armor/1482/99, A/swine/Betzig/2/2001, y/o A/turkey/Germany/3/91), cepas de H3N2 (por ejemplo, A/Perth/16/2009), cepas de H2N2 (por ejemplo, A/Japan/305/57, A/Ann Arbor/6/60, A/Canada/720/05, A/mallard/NY/6750/78, A/mallard/Potsdam/177-4/83, y/o A/duck/Hokkaido/95/2001), cepas de N3N2 (por ejemplo, A/Hong Kong/1/66, A/Charlottesville/03/2004, A/Canterbury/129/2005, A/Fujian/411/01-like, A/duck/Korea/S9/2003, A/swine/Texas/4199-2/98, A/turkey/Ohio/313053/2004, y/o A/turkey/North Carolina/12344/03), cepas de H5N1 (por ejemplo, A/swine/Shandong/2/03, A/goose/Guangdong/1/96, A/duck/Hunan/114/05, A/Viet Nam/1203/2004, A/Viet Nam/DT-036/2005, A/Vietnam/1194/2004, A/Vietnam/1203/2004, A/Anhui/1/2005, A/Egypt/2321/2007, A/Egypt/3300-NAMRU3/2008, A/grebe/Novosibirsk/29/2005, A/Bar-headed goose/Mondolia/1/05, A/cat/Thailand/KU-02/04, A/Hong Kong/213/03,

A/chicken/Guangdong/174/04, y/o A/HK/159/97), cepas de H6N1 (por ejemplo, A/teal/Hong Kong/1073/99), cepas de H6N2 (por ejemplo, A/chicken/California/0139/2001, y/o A/guillemot/Sweden/3/2000), cepas de H6N9 (por ejemplo, A/goose/Hong Kong/W217/97), cepas de H7N1 (por ejemplo, A/FPV/Rostock/34), cepas de H7N3 (por ejemplo, A/chicken/British Columbia/04, y/o A/turkey/Italy/220158/2002), cepas de H7N7 (por ejemplo, 5 A/chicken/Netherlands/1/2003, A/Netherlands/219/03, A/FPV/Dobson/27, y/o A/chicken/FPV/Weybridge), cepas de H9N2 (por ejemplo, A/shorebird/Delaware/9/96, A/swine/Korea/S452/2004, A/duck/Hong Kong/Y439/97, A/Hong Kong/1073/99, A/HK/2108/2003, A/quail/Hong Kong/G1/97, A/duck/Hong Kong/Y280/97, A/chicken HK/FY23/03, y/o A/chicken HK/G9/97), y cepas de influenza B (por ejemplo, B/Brisbane/60/2008). En ciertas realizaciones, un conjunto variado de cepas de influenza incluye todas las cepas anteriores, así como otras cepas de influenza que 10 están asociadas a enfermedades en seres humanos, cerdos o aves. Para los patógenos celulares, tales como las bacterias, los protistas y los hongos, etc., un conjunto variado de cepas incluye al menos una forma aislada de cada especie capaz de infectar y, por lo tanto, causar una enfermedad o afección en la población diana para la vacuna, o un número representativo de formas aisladas infecciosas que abarque la diversidad conocida de dichas cepas. En ciertas realizaciones, el epítipo o el motivo estructural se conserva en al menos un 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 15 90 %, 95 % o más.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una pluralidad de epítipos (por ejemplo, linfocitos B, epítipos CTL o HTL) y/o motivos estructurales (por ejemplo, dominios proteicos o unidades de estructura secundaria) presentes en proteínas producidas por el patógeno infeccioso. En ciertas realizaciones, uno o más de la pluralidad de epítipos y/o motivos estructurales se conservan de manera evolutiva. En ciertas realizaciones, la 20 primera secuencia heteróloga codifica al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más epítipos y/o motivos estructurales. La pluralidad de epítipos y/o motivos estructurales pueden ser de una sola proteína o de múltiples proteínas. En ciertas realizaciones, la pluralidad de epítipos y/o los motivos estructurales consisten en o comprenden un multímero de epítipo o motivo estructural únicos. En otras realizaciones, la pluralidad de epítipos 25 y/o los motivos estructurales comprenden un multímero de epítipos y/o motivos estructurales diferentes. Por ejemplo, el multímero puede incluir dos o más epítipos y/o motivos estructurales de una proteína sola o uno o más epítipos y/o motivos estructurales de cada una de dos o más proteínas. Como se usa en el presente documento, un "multímero" es una secuencia de proteínas que comprende una serie de polipéptidos discretos que han sido unidos para formar un único polipéptido más grande. En ciertas realizaciones, se utiliza una secuencia enlazadora para 30 conectar los polipéptidos discretos adyacentes en un multímero. Los expertos en la técnica pueden identificar fácilmente secuencias de péptidos cortas capaces de actuar como un enlazador en un multímero.

En ciertas realizaciones, la pluralidad de epítipos comprende una pluralidad de epítipos HTL, donde cada epítipo HTL comprende un péptido de unión a HLA clase II. Como se usa en el presente documento, un "péptido de unión a 35 HLA clase II" es un péptido que se une a una molécula HLA clase II con un $CI_{50} < 1000$ nM. En general, un péptido de unión a HLA clase II tiene de aproximadamente 6 a aproximadamente 25 aminoácidos, o de aproximadamente 13 a aproximadamente 21 aminoácidos de longitud. En ciertas realizaciones, uno o más de dicha pluralidad de epítipos HTL comprenden péptidos de unión a HLA clase II que se unen a una molécula HLA clase II seleccionada del grupo que consiste en HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0402, HLA-DRB1*0404, HLA- 40 DRB1*0405, HLA-DRB1*0701, HLA-DRB1*0801, HLA-DRB1*0802, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1001, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB1*1107, HLA-DRB1*1201, HLA-DRB1*1301, HLA-DRB1*1302, HLA-DRB1*1333, HLA-DRB1*1401, HLA-DRB1*1403, HLA-DRB1*1447, HLA-DRB1*1501, HLA-DRB1*1601, HLA-DRB3*0101, HLA-DRB3*0201, HLA-DRB3*0215, HLA-DRB3*0301, HLA-DRB4*0101 y HLA-DRB5*0101, HLA-DRB5-0202. En ciertas realizaciones, uno o más de dicha pluralidad de epítipos HTL comprenden un péptido de unión a HLA clase II que 45 se une a una molécula HLA clase II seleccionada del grupo que consiste en variantes de supertipo HLA-DR1, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5, HLA-DR9 como se describe, por ejemplo, en Doytchinova y Flower (2005) J Immunol 174: 7085 y/o Southwood y col. (1998) J Immunol 160: 3363. En ciertas realizaciones, uno o más de dicha pluralidad de epítipos HTL comprenden un péptido de unión a HLA clase II que se une a una pluralidad de moléculas HLA clase II (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). La pluralidad de moléculas HLA clase II pueden 50 seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0402, HLA-DRB1*0404, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0701, HLA-DRB1*0801, HLA-DRB1*0802, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1001, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB1*1107, HLA-DRB1*1201, HLA-DRB1*1301, HLA-DRB1*1302, HLA-DRB1*1333, HLA-DRB1*1401, HLA-DRB1*1403, HLA-DRB1*1447, HLA-DRB1*1501, HLA-DRB1*1601, HLA-DRB3*0101, HLA-DRB3*0201, HLA-DRB3*0215, HLA-DRB3*0301, HLA-DRB4*0101 y HLA- 55 DRB5*0101, HLA-DRB5-0202. En ciertas realizaciones, uno o más de dicha pluralidad de epítipos HTL comprenden un péptido de unión a HLA clase II que se une a una molécula HLA clase II seleccionada del grupo que consiste en variantes de supertipo HLA-DR1, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5, HLA-DR9 como se describe, por ejemplo, en Doytchinova y Flower (2005) J Immunol 174: 7085 y/o Southwood y col. (1998) J Immunol 160: 3363. En ciertas realizaciones, la pluralidad de epítipos HTL comprende péptidos que se unen a la clase II que se unen

colectivamente a cada molécula HLA clase II en el grupo que consiste en HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0402, HLA-DRB1*0404, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0701, HLA-DRB1*0801, HLA-DRB1*0802, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1001, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB1*1107, HLA-DRB1*1201, HLA-DRB1*1301, HLA-DRB1*1302, HLA-DRB1*1333, HLA-DRB1*1401, HLA-DRB1*1403, HLA-DRB1*1447, HLA-DRB1*1501, HLA-DRB1*1601, HLA-DRB3*0101, HLA-DRB3*0201, HLA-DRB3*0215, HLA-DRB3*0301, HLA-DRB4*0101 y HLA-DRB5*0101, HLA-DRB5*0202. En ciertas realizaciones, uno o más de dicha pluralidad de epítomos HTL comprenden un péptido de unión a HLA clase II que se une a una molécula HLA clase II seleccionada del grupo que consiste en variantes de supertipo HLA-DR1, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5, HLA-DR9, como se describe, por ejemplo, en Doytchinova y Flower (2005) *J Immunol* 174: 7085 y/o Southwood y col. (1998) *J Immunol* 160: 3363.

En ciertas realizaciones, la pluralidad de epítomos comprende una pluralidad de epítomos CTL, donde cada epítomo CTL comprende un péptido de unión a HLA clase I. Como se usa en el presente documento, un "péptido de unión a HLA clase I" es un péptido que se une a una molécula HLA clase I con un $CI_{50} < 500$ nM. En general, un péptido de unión a HLA clase I tiene un largo de aproximadamente 8 a aproximadamente 13 aminoácidos, o de aproximadamente 8, 9, 10 u 11 aminoácidos. En ciertas realizaciones, uno o más de dicha pluralidad de epítomos CTL comprende un péptido de unión a HLA clase I que se une a una molécula HLA clase I seleccionada del grupo que consiste en variantes de supertipo HLA-A01, HLA-A02, HLA-A03, HLA-A24, HLA-B07, HLA-B08, HLA-B27, HLA-B58, HLA-B62 y HLA-B44, como se describe, por ejemplo, en Sidney y col. (2008) *J Immunol* 9: 1. En ciertas realizaciones, uno o más de dicha pluralidad de epítomos CTL comprenden un péptido de unión a HLA clase I que se une a una pluralidad de moléculas HLA clase I (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5 o 6). Por ejemplo, el epítomo CTL puede unirse a una pluralidad de variantes de supertipo HLA-A01 (por ejemplo, seleccionadas de un grupo que consiste en A*0101, A*2601, A*2602, A*2603, A*2902, A*3001, A*3002, A*3003, A*3004 y A*3201); una pluralidad de variantes de supertipo HLA-A02 (por ejemplo, seleccionadas del grupo que consiste en A*0201, A*0202, A*0203, A*0204, A*0205, A*0206, A*0207, A*0214, A*0217, A*6802, y A*6901); una pluralidad de variantes de supertipo HLA-A03 (por ejemplo, seleccionadas del grupo que consiste en A*0301, A*1101, A*3101, A*3301, A*6601, A*6801, y A*7401); una pluralidad de variantes de supertipo HLA-A24 (por ejemplo, seleccionadas del grupo que consiste en A*2301, A*2402, y A*2902); una pluralidad de variantes de supertipo HLA-B07 (por ejemplo, seleccionadas del grupo que consiste en B*0702, B*0703, B*0705, B*1508, B*3501, B*3503, B*4201, B*5101, B*5102, B*5103, B*5301, B*5401, B*5501, B*5502, B*5601, B*6701, y B*7801); una pluralidad de variantes de supertipo HLA-B08 (por ejemplo, seleccionadas del grupo que consiste en B*0801 y B*0802); una pluralidad de variantes de subtipo HLA-B27 (por ejemplo, seleccionadas del grupo que consiste en B*1402, B*1503, B*1509, B*1510, B*1518, B*2702, B*2703, B*2704, B*2705, B*2706, B*2707, B*2709, B*3801, B*3901, B*3902, B*3909, B*4801, y B*7301); una pluralidad de variantes de subtipo HLA-B44 (por ejemplo, seleccionadas del grupo que consiste en B*1801, B*3701, B*4001, B*4002, B*4006, B*4402, B*4403, y B*4501); una pluralidad de variantes de subtipo HLA-B58 (por ejemplo, seleccionadas del grupo que consiste en B*1516, B*1517, B*5701, B*5702, B*5801, y B*5802); o una pluralidad de variantes de subtipo HLA-B62 (por ejemplo, seleccionadas del grupo que consiste en B*1501, B*1502, B*1512, B*1513, B*4601, y B*5201). En ciertas realizaciones, la pluralidad de los epítomos CTL comprende péptidos de unión a HLA clase I que se unen colectivamente al menos a una molécula HLA clase I de cada uno de los supertipos HLA-A01, HLA-A02, HLA-A03, HLA-A24, HLA-B07, HLA-B08, HLA-B58, HLA-B62 y HLA-B44.

Estudios en seres humanos han indicado que las respuestas inmunitarias de las células cumplen una función en el control de la infección por influenza. Véase, por ejemplo, McMichael y col. (1983) *New England J. Med.* 309(1): 13; Sonoguchi y col. (1985), *J Infect. Disease* 151(1): 81. El efecto protector de las respuestas inmunitarias de las células puede ser de particular importancia en los ancianos (véase, por ejemplo, Almanzar y col. (2007), *Wien. Med. Wochenschr* 157/5-6: 116, McElhaney y col. (2006), *J Immunol.* 176: 6333) y también en los infantes (véase, por ejemplo, Forest y col. (2008) *Clin. Vaccine Immunol.* 15(7): 1042). Con el fin de evaluar la inmunogenicidad específica para los epítomos identificados, las respuestas de memoria pueden realizarse mediante la utilización de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y péptidos de un donante humano. Puede asumirse que las respuestas de memoria específicas de los epítomos son el resultado de una infección previa con el virus de la influenza y la presencia de tales linfocitos T indica que los epítomos se generan naturalmente y que, por lo tanto, son una excelente opción para incluirlos en la vacuna. En ciertas realizaciones, un epítomo CTL o HTL codificado por la primera secuencia heteróloga tiene la capacidad de generar una respuesta interferón gamma humana (IFN- γ) (específicamente, células formadoras de manchas (SFC) por 1×10^6 células) de al menos dos veces por encima de las respuestas iniciales, por ejemplo, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2000, 2500, 3000, o más tras un análisis de ensayo ELISPOT. Los péptidos CTL o HTL seleccionados pueden ensayarse de dos maneras: (1) directamente *ex vivo*, donde las PBMC se descongelan, se dejan reposar 5 días en medios de cultivo, y las respuestas se miden con ensayo IFN- γ ELISPOT, y (2) siguiendo una etapa de cultivo con péptidos para aumentar la sensibilidad. Las respuestas significativas de los epítomos indicados pueden definirse como

respuestas mayores a las respuestas iniciales medias más (2,0 x Desv. Est.). Es importante determinar las respuestas iniciales para este método. Las respuestas iniciales pueden determinarse mediante el uso de los péptidos de unión a CTL y HTL de patógenos cuyos donantes no fueron expuestos, tales como VIH, VHB, VHC y *Plasmodium falciparum*. En ciertas realizaciones, un epítipo CTL o HTL codificado por la primera secuencia heteróloga se conserva de manera evolutiva y tiene la capacidad de generar una respuesta IFN- γ humana de al menos dos veces por encima de las respuestas iniciales, por ejemplo, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2000, 2500, 3000, o más tras un análisis de ensayo ELISPOT. En ciertas realizaciones, un epítipo CTL o HTL codificado por la primera secuencia heteróloga se conserva de manera evolutiva y tiene la capacidad de generar una respuesta IFN- γ humana de al menos dos veces por encima de las respuestas iniciales, por ejemplo, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2000, 2500, 3000, o más tras un análisis de ensayo ELISPOT, y muestra una unión redundante a (es decir, se une a más de una) moléculas HLA clase I o clase II, respectivamente. Los métodos para ensayar la habilidad de los epítopos CTL o HTL para unirse a moléculas HLA clase I y clase II y para generar una respuesta IFN- γ humana se conocen en la técnica y se han descrito, por ejemplo, en el documento WO 2008/054540 (Alexander y col.), presentado el 18 de mayo de 2007, el documento WO 2008/039267 (Alexander y col.), presentado el 23 de julio de 2007, y Assarsson y col. (2008), J Virol 82: 12241.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno de un virus de influenza. Un antígeno de la influenza adecuado puede ser un antígeno de superficie, tal como la hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), M2, o un fragmento de los mismos (por ejemplo, uno o más epítopos HTL o CTL). Otros antígenos de la influenza adecuados incluyen M1, NP, NS1, NS2, PA, PB1 y PB2, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, uno o más epítopos HTL o CTL).

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína HA de la influenza de longitud completa, o una porción de la misma, tal como una porción externa (es decir, una porción ubicada en la superficie externa del virus de la influenza), un fragmento HA1, un fragmento HA2, o uno o más epítopos (por ejemplo, epítopos de linfocitos B, HTL o CTL). En ciertas realizaciones, la porción, fragmento o epítipo es de una secuencia conservada de manera evolutiva. En ciertas realizaciones, el epítipo es un epítipo HTL o CTL que muestra una unión redundante a moléculas HLA clase I o clase II, respectivamente, y/o tiene la capacidad de generar respuestas interferón gamma humanas (IFN- γ) tras el análisis del ensayo ELISPOT usando PBMC de un donante humano. Como se ha analizado anteriormente, los epítopos HTL o CTL pueden formar un concatémero donde un único epítipo HTL o CTL se repite y/o donde una pluralidad de epítopos HTL y/o CTL se unen entre sí. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítopos HA HTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 1 (es decir, SEQ ID NOs; 1-12). En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítopos HA CTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 2 (es decir, SEQ ID NOs: 62-67).

Tabla 1

Proteína Influenza	Péptido HTL	SEQ ID NO.	Cons. (%) ^a	N.º de alelos unidos ^b	Memoria ^c
HA	MEKIVLLFAIVSLVKSD	SEQ ID NO: 1	n/a	6	n/a
HA	KSSFFRNWWLIKKN	SEQ ID NO: 2	n/a	12	n/a
HA	WWLIKKNSTYPTIKR	SEQ ID NO: 3	n/a	9	n/a
HA	PTTYISVGTSTLNQRL	SEQ ID NO: 4	n/a	9	n/a
HA	RMEFFWTILKPNDAI	SEQ ID NO: 5	n/a	10	n/a
HA	WTILKPNDAINFESN	SEQ ID NO: 6	n/a	8	n/a
HA	CPKYVKS NRLVLATGL	SEQ ID NO: 7	n/a	12	n/a
HA	NRLVLATGLRNSPQR	SEQ ID NO: 8	n/a	10	n/a
HA	ELLVLMENERTLDFHDS	SEQ ID NO: 9	n/a	8	n/a
HA	ISGVKLESIGIYQILSI	SEQ ID NO: 10	n/a	10	n/a
HA	IYQILSIYSTVASSLA	SEQ ID NO: 11	n/a	13	n/a
HA	ILSIYSTVASSLALAI	SEQ ID NO: 12	n/a	12	n/a
M1	KGILGFVFTLTPVSE	SEQ ID NO: 13	94	11	6
M1	YRKLKREITFHGAKE	SEQ ID NO: 14	61	11	10
M1	MGTVTTEVALGLVCA	SEQ ID NO: 15	22	7	5
M1	NPLIRHENRMVLAST	SEQ ID NO: 16	98	11	5
M1	AMEVASQARQMVQAM	SEQ ID NO: 17	75	8	3
M2	DPLWAASIIGILHL	SEQ ID NO: 18	47	6	2
NA	SLMLQIGNMISIVVSHS	SEQ ID NO: 19	n/a	13	1

NP	IGRFYIQMCTELKLSYEG	SEQ ID NO: 20	67	12	4
NP	QNSITIERMVLSAFD	SEQ ID NO: 21	69	8	5
NP	VGTMVMELIRMIKRG	SEQ ID NO: 22	73	10	8
NP	DLIFLARSALILRGS	SEQ ID NO: 23	92	12	4
NP	RSALILRGSVAHKSC	SEQ ID NO: 24	100	12	2
NP	KSQLVWMACHSAAFE	SEQ ID NO: 25	71	11	2
NP	AGQISVQPTFSVQRN	SEQ ID NO: 26	61	10	5
NS1	SLCIRMDQAIMDKDI	SEQ ID NO: 27	n/a	7	1
NS1	EGAIVGEISPLPSLPGHTD	SEQ ID NO: 28	27	8	5
NS1	VGEISPLPSLPGHTD	SEQ ID NO: 29	n/a	9	3
NS2	SLKLYRDSLGEAVMR	SEQ ID NO: 30	46	8	3
NS2	IRWLIIEVRHRLRIT	SEQ ID NO: 31	8	7	4
NS2	FEQITFMQALQLLLE	SEQ ID NO: 32	58	10	1
NS2	ITFMQALQLLLEVEQ	SEQ ID NO: 33	58	10	1
PA	RREVHIYYLEKANKI	SEQ ID NO: 34	76	11	4
PA	LFTIRQEMASRGLWD	SEQ ID NO: 35	71	11	3
PA	EPFLKTTTPRPLRPD	SEQ ID NO: 36	35	10	2
PA	RSKFLMDALKLSIED	SEQ ID NO: 37	90	13	2
PA	VAPIEHASMRNYF	SEQ ID NO: 38	75	11	4
PA	EYIMKGVYINTALLN	SEQ ID NO: 39	98	7	4
PA	RPMFLYVRTNGTSKI	SEQ ID NO: 40	90	12	3
PB1	PTLLFLKVPQAQNAIST	SEQ ID NO: 41	71	11	2
PB1	SYLIRALTLNTMTKD	SEQ ID NO: 42	88	12	2
PB1	FLAMITYITRNQPEW	SEQ ID NO: 43	76	11	3
PB1	QPEWFRNVLSIAPIMF	SEQ ID NO: 44	76	12	2
PB1	FRNVLSIAPIMFSNKM	SEQ ID NO: 45	76	12	1
PB1	IAPIMFSNKMARLKG	SEQ ID NO: 46	84	10	1
PB1	KGYMFESKSMKLRTOI	SEQ ID NO: 47	76	13	2
PB1	IRPLLVEGTASLSPG	SEQ ID NO: 48	n/a	10	1
PB1	MMGMFNMLSTVLGVS	SEQ ID NO: 49	100	12	10
PB1	DFALIVNAPNHEGIQ	SEQ ID NO: 50	84	11	3
PB1	YGFVANFSMELPSFG	SEQ ID NO: 51	90	9	3
PB1	GVTVIKNNMINNDLGP	SEQ ID NO: 52	92	8	2
PB1	PNLYNIRNLHIPEVC	SEQ ID NO: 53	80	9	2
PB1	ISSMVEAMVSRARID	SEQ ID NO: 54	78	8	1
PB2	KWMMAMKYPITADKR	SEQ ID NO: 55	82	8	1
PB2	GARILTSESQLTITK	SEQ ID NO: 56	82	8	2
PB2	KAAMGLRISSFSFG	SEQ ID NO: 57	78	13	3
PB2	IKAVRGDLNFVNRAN	SEQ ID NO: 58	90	9	4
PB2	LRHFQKDAKVLQFNW	SEQ ID NO: 59	88	8	1
PB2	QWIIRNWETVKIQWS	SEQ ID NO: 60	76	11	3
PB2	RMQFSSSLTVNVRGSG	SEQ ID NO: 61	96	11	2

a) El % de conservación se basa en el análisis de la secuencia de 51 cepas de la influenza (H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H9N2, etc.)

b) El n.º de alelos unidos se refiere al número de moléculas HLA de clase II del grupo que consiste en HLA-DRB1*101, HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0404, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0701, HLA-DRB1*0802, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB1*1302, HLA-DRB1*1501, HLA-DRB4*0101 y HLA-DRB5*0101 unidas por el péptido.

c) Memoria se refiere al número de donantes humanos que exhiben respuestas IFN- γ dos veces mayores a las respuestas iniciales en análisis de ensayo ELISPOT.

Tabla 2

Proteína de Influenza	Péptido CTL	SEQ ID NO.	Supertipo HLA	N.º de alelos unidos ^a
HA	LTIGECPKY	SEQ ID NO: 62	HLA-A1	3
HA	GMDGWYGY	SEQ ID NO: 63	HLA-A1	2
HA	GLFGAIAGFI	SEQ ID NO: 64	HLA-A2	3

HA	FLDIWTYNA	SEQ ID NO: 65	HLA-A2	4
HA	TIGCEPKYVK	SEQ ID NO: 66	HLA-A3	1
HA	LPFHNVHPL	SEQ ID NO: 67	HLA-B7	5

a) N.º de alelos unidos se refiere al número de moléculas HLA clase I de un supertipo HLA particular unidas por el péptido. Para HLA-A1, se ensayaron A*101, A*2601, A*2902 y A*3002; para HLA-A2, se ensayaron A*0201, A*0202, A*0203, A*0206 y A*6802; para HLA-A3, se ensayaron A*0301, A*1101, A*3101, A*3301 y A*6801; para HLA-A24, se ensayaron A*2301, A*2402, A*2902 y A*3002; para HLA-B7, se ensayaron B*0702, B*3501, B*5101, B*5301 y B*5401; y para HLA-B44, se ensayaron B*1801, B*4001, B*4002, B*4403 y B*4501.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína NA de la influenza de longitud completa, o una porción de la misma, tal como una porción externa (es decir, una porción ubicada en la superficie externa del virus de la influenza), un fragmento o un epítipo (por ejemplo, uno o más epítipos de linfocitos B, HTL o CTL). En ciertas realizaciones, la porción, fragmento o epítipo es de una secuencia conservada de manera evolutiva. En ciertas realizaciones, el epítipo es un epítipo HTL o CTL que muestra una unión redundante a moléculas HLA clase I o clase II, respectivamente, y/o tiene la capacidad de generar respuestas interferón gamma humanas (IFN- γ) en el análisis del ensayo ELISPOT mediante el uso del PBMC humanas. Como se ha analizado anteriormente, los epítipos HTL o CTL pueden formar un concatémero donde un único epítipo HTL o CTL se repite y/o donde una pluralidad de epítipos HTL y/o CTL se unen. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una o más copias de la SEQ ID NO: 19 (véase la Tabla 1). En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítipos NA CTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 3 (es decir, SEQ ID NOs: 86-109).

15

Tabla 3

Proteína	Péptido CTL	SEQ ID NO.	Supertipo HLA	N.º de alelos unidos ^a
NA	GTVKDRSPY	SEQ ID NO: 86	HLA-A1	2
NA	VSFDQNLDY	SEQ ID NO: 87	HLA-A1	2
NA	IVAITDWSGY	SEQ ID NO: 88	HLA-A1	1
NA	KSCINRCFY	SEQ ID NO: 89	HLA-A1	1
NA	ALSTLCLLI	SEQ ID NO: 90	HLA-A2	4
NA	HLECRFFFL	SEQ ID NO: 91	HLA-A2	4
NA	CINGSCFTV	SEQ ID NO: 92	HLA-A2	4
NA	ITGFAPFSK	SEQ ID NO: 93	HLA-A3	3
NA	ITGWAIFSK	SEQ ID NO: 94	HLA-A3	3
NA	ASYKIFKIEK	SEQ ID NO: 95	HLA-A3	2
NA	WFCGTSGTY	SEQ ID NO: 96	HLA-A3	2
NA	VFVIREPFI	SEQ ID NO: 97	HLA-A24	2
NA	FFLTQGALL	SEQ ID NO: 98	HLA-A24	3
NA	WWTNSNIIVF	SEQ ID NO: 99	HLA-A24	2
NA	SWPDGANIPF	SEQ ID NO: 100	HLA-A24	2
NA	SWPDGANINF	SEQ ID NO: 101	HLA-A24	2
NA	APFSKDNSI	SEQ ID NO: 102	HLA-B7	1
NA	APSPYNSRF	SEQ ID NO: 103	HLA-B7	2
NA	SPYNSRFESV	SEQ ID NO: 104	HLA-B7	3
NA	RPWVSFNQNL	SEQ ID NO: 105	HLA-B7	1
NA	RPCFWVELI	SEQ ID NO: 106	HLA-B7	1
NA	EECSCYPDY	SEQ ID NO: 107	HLA-B44	3
NA	EECSCYPRY	SEQ ID NO: 108	HLA-B44	4
NA	FEMIWDPNG	SEQ ID NO: 109	HLA-B44	3

a) Véase nota al pie (a) de la Tabla 2.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína M2 de la influenza de longitud completa, o una porción de la misma, tal como una porción externa (es decir, M2e, una porción ubicada en la superficie externa de un virus de la influenza), un fragmento o un epítipo (por ejemplo, uno o más epítipos de linfocitos B, HTL o CTL). En ciertas realizaciones, la porción, fragmento o epítipo es de una secuencia conservada de manera evolutiva. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la porción M2 externa tiene una secuencia que se muestra en la Tabla 4. La primera secuencia heteróloga puede codificar un concatémero de dos o más fragmentos o porciones de M2 (por ejemplo, dos o más repeticiones de una secuencia individual M2e mostrada en la Tabla 4 o

20

dos o más secuencias M2e mostradas en la Tabla 4). En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una secuencia que se repite que incluye la SEQ ID NO: 312, SEQ ID NO: 318, SEQ ID NO: 321, SEQ ID NO: 327 o cualquier combinación de las mismas (por ejemplo, al menos una copia de las cuatro secuencias). En ciertas realizaciones, el epítipo M2 es un epítipo HTL o CTL que muestra una unión redundante a moléculas HLA clase I o clase II, respectivamente, y/o tiene la capacidad de generar respuestas interferón gamma humanas (IFN- γ) ante la reestimulación con péptidos en el análisis del ensayo ELISPOT usando PBMC humanas. Como se ha analizado anteriormente, los epítipos HTL o CTL pueden formar un concatémero donde un único epítipo HTL o CTL se repite y/o donde una pluralidad de epítipos HTL y/o CTL se unen. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una o más copias de la SEQ ID NO: 18 (véase la Tabla 1). En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítipos M2 CTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 5 (es decir, las SEQ ID NOs: 80-85).

Tabla 4

Proteína de Influenza	Cepa Influenza	Secuencia Peptídica	SEQ ID NO.
M2	A/New Caledonia/20/1999(H1N1))	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	SEQ ID NO:312
M2	A/Brevig Mission/1/1918 (H1N1)	SLLTEVETPTRNEWGCRCNDSSD	SEQ ID NO:313
M2	A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai (H1N1)	SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD	SEQ ID NO:314
M2	A/Fort Monmouth/1/47 (H1N1)	SLLTEVETPTKNEWECRCNDSSD	SEQ ID NO:315
M2	A/Albany/1/76 (H3N2)	SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD	SEQ ID NO:316
M2	A/Hong Kong/1774/99 (H3N2)	SLLTEVETPTRNGWECRCSGSSD	SEQ ID NO:317
M2	A/Viet Nam/1203/2004 (H5N1) subtipo 1	SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD	SEQ ID NO:318
M2	A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1)	SLLTEVETPTKNEWECRCSDSSD	SEQ ID NO:319
M2	A/HK/156/97 (H5N1)	SLLTEVETLTRNGWGCRCSDSSD	SEQ ID NO:320
M2	A/chicken/Italy/2335/2000 (H7N1)	SLLTEVETPTRNGWECRCSDSSD	SEQ ID NO:321
M2	A/turkey/Italy/3675/99 (H7N1)	SLLTEVETPTRNGWVCKCSDSSD	SEQ ID NO:322
M2	A/chicken/New York/21211-2/05 (H7N2)	SLLTEVETPIRKWECNCSDSSD	SEQ ID NO:323
M2	A/equine/San Paulo/4/76 (H7N7)	SLLTEVETPTKSEWECRCNDSSD	SEQ ID NO:324
M2	A/seal/Mass/1/1980 (H7N7)	SLLTEVETPIRNGWECRCSDSSD	SEQ ID NO:325
M2	A/chicken/Netherlands/2586/2003(H7N7)	SLLTEVETPTRNGWECRCNDSSD	SEQ ID NO:326
M2	A/Hong Kong/2108/2003 (H9N2)	SLLTEVETLTRNGWECRCSGSSD	SEQ ID NO:327
M2	A/chicken/Beijing/1/94 (H9N2)	SLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD	SEQ ID NO:328
M2	A/quail/Hong Kong/G1/1997 (H9N2)	SLLTEVETLTRNGWGCRCSDSSD	SEQ ID NO:329
M2	A/Korea/KBNP-0028/2000 (H9N2)	SLLTEVETPTRDGWECRCNDSND	SEQ ID NO:330
M2	A/chicken/Hong Kong/G9/97 (H9N2)	SLLTEVETPTRNGWGCRCSGSSD	SEQ ID NO:331
M2	A/chicken/Hong Kong/CSW153/2003 (H9N2)	SLLTEVETHTRNGWGCRCSDSSD	SEQ ID NO:332
M2	A/chicken/Shantou/6781 /2005 (H9N2)	SLLTEVETPTRNGWECRCSDSSD	SEQ ID NO:333
M2	A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)	SLLTEVETLTRNGWECRCRSDSSD	SEQ ID NO:334
M2	A/chicken/Zibo/L2/2008 (H9N2)	SLLTEVETLTRNGWECNCSDSSD	SEQ ID NO:335

15

Tabla 5

Proteína	Péptido CTL	SEQ ID NO.	Supertipo HLA	N.º de alelos unidos ^a
M2	SIIGILHLI	SEQ ID NO: 80	HLA-A2	5
M2	RLFFKCIYR	SEQ ID NO: 81	HLA-A3	5
M2	RLFFKCIYRR	SEQ ID NO: 82	HLA-A3	5
M2	LFFKCIYRR	SEQ ID NO: 83	HLA-A3	4
M2	LWILDRLFF	SEQ ID NO: 84	HLA-A24	3
M2	IYRRFKYGL	SEQ ID NO: 85	HLA-A24	2

a) Véase nota al pie (a) de la Tabla 2.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína M1 de la influenza de longitud completa, o una porción de la misma, tal como un epítipo (por ejemplo, uno o más epítipos HTL o CTL). En ciertas realizaciones, la porción o epítipo es de una secuencia conservada de manera evolutiva. En ciertas realizaciones, el epítipo es un epítipo HTL o CTL que muestra una unión redundante a moléculas HLA clase I o clase II, respectivamente, y/o tiene la capacidad de generar respuestas interferón gamma humanas (IFN- γ) en el análisis del

20

ensayo ELISPOT usando PBMC humanas. Como se ha analizado anteriormente, los epítomos HTL o CTL pueden formar un concatémero donde un único epítomo HTL o CTL se repite y/o donde una pluralidad de epítomos HTL y/o CTL se unen. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítomos M1 HTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 1 (es decir, las SEQ ID NOs; 13-17). En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítomos M1 CTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 6 (es decir, las SEQ ID NOs: 68-79).

Tabla 6

Proteína	Péptido CTL	SEQ ID NO.	Supertipo HLA	N.º de alelos unidos ^a
M1	NMDRAVKLY	SEQ ID NO: 68	HLA-A1	3
M1	LLTEVETYV	SEQ ID NO: 69	HLA-A2	5
M1	GILGFVFTL	SEQ ID NO: 70	HLA-A2	4
M1	ILGFVFTLV	SEQ ID NO: 71	HLA-A2	4
M1	RMGTVTTEV	SEQ ID NO: 72	HLA-A2	4
M1	ALMEWLKTR	SEQ ID NO: 73	HLA-A3	5
M1	ASCMGLIYNR	SEQ ID NO: 74	HLA-A3	4
M1	EWLKTRPIL	SEQ ID NO: 75	HLA-A24	2
M1	TEVETYVLSI	SEQ ID NO: 76	HLA-B44	4
M1	HENRMVLAST	SEQ ID NO: 77	HLA-B44	4
M1	SEQAAEAMEV	SEQ ID NO: 78	HLA-B44	6
M1	MEVASQARQM	SEQ ID NO: 79	HLA-B44	5

a) Véase nota al pie (a) de la Tabla 2.

- 10 En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína NP de la influenza de longitud completa, o una porción de la misma, tal como un epítomo (por ejemplo, uno o más epítomos HTL o CTL). En ciertas realizaciones, la porción o epítomo es de una secuencia conservada de manera evolutiva. En ciertas realizaciones, el epítomo es un epítomo HTL o CTL que muestra una unión redundante a moléculas HLA clase I o clase II, respectivamente, y/o tiene la capacidad de generar respuestas interferón gamma humanas (IFN- γ) en el análisis del ensayo ELISPOT usando PBMC humanas. Como se ha analizado anteriormente, los epítomos HTL o CTL pueden formar un concatémero donde un único epítomo HTL o CTL se repite y/o donde una pluralidad de epítomos HTL y/o CTL se unen. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítomos NP HTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 1 (es decir, las SEQ ID NOs; 20-26). En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítomos NP CTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 7 (es decir, las SEQ ID NOs: 110-139). Aún en otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una o más copias de la secuencia NP de la SEQ ID NO: 337 (es decir, LELRSRYWAIRTRSGGNTNQQRAS).

Tabla 7

Proteína	Péptido CTL	SEQ ID NO.	Supertipo HLA	N.º de alelos unidos ^a
NP	ASQGTKRSY	SEQ ID NO: 110	HLA-A1	1
NP	CTELKLSDY	SEQ ID NO: 111	HLA-A1	1
NP	HSNLNDATY	SEQ ID NO: 112	HLA-A1	2
NP	KSCLPACVY	SEQ ID NO: 113	HLA-A1	2
NP	CLPACVYGL	SEQ ID NO: 114	HLA-A2	4
NP	LQNSQVFSL	SEQ ID NO: 115	HLA-A2	4
NP	FQGRGVFEL	SEQ ID NO: 116	HLA-A2	4
NP	IQNSITIER	SEQ ID NO: 117	HLA-A3	2
NP	MVLSAFDER	SEQ ID NO: 118	HLA-A3	4
NP	SLMQGSTLPR	SEQ ID NO: 119	HLA-A3	4
NP	MQGSTLPRR	SEQ ID NO: 120	HLA-A3	2
NP	GTMVMELIR	SEQ ID NO: 121	HLA-A3	3
NP	MVMELIRMIK	SEQ ID NO: 122	HLA-A3	4
NP	AVASGYDFER	SEQ ID NO: 123	HLA-A3	3
NP	SVQPTFSVQR	SEQ ID NO: 124	HLA-A3	4
NP	VQPTFSVQR	SEQ ID NO: 125	HLA-A3	3
NP	SVQRNLPFER	SEQ ID NO: 126	HLA-A3	4
NP	GVFELSDEK	SEQ ID NO: 127	HLA-A3	2
NP	FYIQMCTEL	SEQ ID NO: 128	HLA-A24	2

NP	HMMIWHSNL	SEQ ID NO: 129	HLA-A24	3
NP	IFLARSALI	SEQ ID NO: 130	HLA-A24	2
NP	WMACHSAAF	SEQ ID NO: 131	HLA-A24	2
NP	LPRRSGAAGA	SEQ ID NO: 132	HLA-B7	2
NP	LPACVYGLAV	SEQ ID NO: 133	HLA-B7	4
NP	LPFERATIM	SEQ ID NO: 134	HLA-B7	5
NP	GERQNATEI	SEQ ID NO: 135	HLA-B44	4
NP	RESRNPANA	SEQ ID NO: 136	HLA-B44	4
NP	FEDLRVSSF	SEQ ID NO: 137	HLA-B44	5
NP	FERATIMAA	SEQ ID NO: 138	HLA-B44	4
NP	FERATIMAAF	SEQ ID NO: 139	HLA-B44	5

a) Véase nota al pie (a) de la Tabla 2.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína de influenza NS1 de longitud completa, o una porción de la misma, tal como un epítipo (por ejemplo, uno o más epítipos HTL o CTL). En ciertas realizaciones, la porción o epítipo es de una secuencia conservada de manera evolutiva. En ciertas realizaciones, el epítipo es un epítipo HTL o CTL que muestra una unión redundante a moléculas HLA clase I o clase II, respectivamente, y/o tiene la capacidad de generar respuestas interferón gamma humanas (IFN- γ) en el análisis del ensayo ELISPOT usando PBMC humanas. Como se ha analizado anteriormente, los epítipos HTL o CTL pueden formar un concatémero donde un único epítipo HTL o CTL se repite y/o donde una pluralidad de epítipos HTL y/o CTL se unen. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítipos NS1 HTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 1 (es decir, las SEQ ID NOs: 27-29). En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítipos NS1 CTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 8 (es decir, la SEQ ID NOs: 140-152).

Tabla 8

Proteína	Péptido CTL	SEQ ID NO.	Supertipo HLA	N.º de alelos unidos ^a
NS1	TIASVPAPRY	SEQ ID NO: 140	HLA-A1	2
NS1	FQVDCFLWHV	SEQ ID NO: 141	HLA-A2	5
NS1	QVDCFLWHV	SEQ ID NO: 142	HLA-A2	5
NS1	FLWHVRKQV	SEQ ID NO: 143	HLA-A2	5
NS1	IILKANFSV	SEQ ID NO: 144	HLA-A2	3
NS1	KQIVERILK	SEQ ID NO: 145	HLA-A3	2
NS1	AIMDKNIILK	SEQ ID NO: 146	HLA-A3	3
NS1	VPASRYLTDM	SEQ ID NO: 147	HLA-B7	2
NS1	DEALKMTIA	SEQ ID NO: 148	HLA-B44	4
NS1	LEEMSRDWLM	SEQ ID NO: 149	HLA-B44	4
NS1	LETLLILRAF	SEQ ID NO: 150	HLA-B44	4
NS1	GEISPLPSL	SEQ ID NO: 151	HLA-B44	6
NS1	SETLQRFAW	SEQ ID NO: 152	HLA-B44	3

a) Véase nota al pie (a) de la Tabla 2.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína de influenza NS2 de longitud completa, o una porción de la misma, tal como un epítipo (por ejemplo, uno o más epítipos HTL o CTL). En ciertas realizaciones, la porción o epítipo es de una secuencia conservada de manera evolutiva. En ciertas realizaciones, el epítipo es un epítipo HTL o CTL que muestra una unión redundante a moléculas HLA clase I o clase II, respectivamente, y/o tiene la capacidad de generar respuestas interferón gamma humanas (IFN- γ) en el análisis del ensayo ELISPOT usando PBMC humanas. Como se ha analizado anteriormente, los epítipos HTL o CTL pueden formar un concatémero donde un único epítipo HTL o CTL se repite y/o donde una pluralidad de epítipos HTL y/o CTL se unen. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítipos NS2 HTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 1 (es decir, las SEQ ID NOs: 30-33). En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítipos NS2 CTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 9 (es decir, las SEQ ID NOs: 153-163).

Tabla 9

Proteína	Péptido CTL	SEQ ID NO.	Supertipo HLA	N.º de alelos unidos ^a
NS2	ITQFESLKLY	SEQ ID NO: 153	HLA-A1	1
NS2	FMQALQLLL	SEQ ID NO: 154	HLA-A2	4
NS2	MQALQLLLEV	SEQ ID NO: 155	HLA-A2	5
NS2	MITQFESLK	SEQ ID NO: 156	HLA-A3	3
NS2	TQFESLKLYR	SEQ ID NO: 157	HLA-A3	3
NS2	KFEEIRWLI	SEQ ID NO: 158	HLA-A24	2
NS2	FMQALQLLF	SEQ ID NO: 159	HLA-A24	3
NS2	EEVRHRLKI	SEQ ID NO: 160	HLA-B44	5
NS2	FEQITFMQA	SEQ ID NO: 161	HLA-B44	5
NS2	LEVEQEIRT	SEQ ID NO: 162	HLA-B44	4
NS2	QEIRTFSFQL	SEQ ID NO: 163	HLA-B44	4

a) Véase nota al pie (a) de la Tabla 2.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína de influenza PA de longitud completa, o una porción de la misma, tal como un epítipo (por ejemplo, uno o más epítipos HTL o CTL). En ciertas realizaciones, la porción o epítipo es de una secuencia conservada de manera evolutiva. En ciertas realizaciones, el epítipo es un epítipo HTL o CTL que muestra una unión redundante a moléculas HLA clase I o clase II, respectivamente, y/o tiene la capacidad de generar respuestas interferón gamma humanas (IFN- γ) en el análisis del ensayo ELISPOT usando PBMC humanas. Como se ha analizado anteriormente, los epítipos HTL o CTL pueden formar un concatémero donde un único epítipo HTL o CTL se repite y/o donde una pluralidad de epítipos HTL y/o CTL se unen. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítipos PA HTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 1 (es decir, las SEQ ID NOs: 34-40). En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítipos PA CTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 10 (es decir, las SEQ ID NOs: 164-205).

15

Tabla 10

Proteína	Péptido CTL	SEQ ID NO.	Supertipo HLA	N.º de alelos unidos ^a
PA	CTHLEVCIFY	SEQ ID NO: 164	HLA-A1	2
PA	VTRREVHIY	SEQ ID NO: 165	HLA-A1	1
PA	SLENFRAY	SEQ ID NO: 166	HLA-A1	1
PA	YVDGFEPNGY	SEQ ID NO: 167	HLA-A1	2
PA	HIASMRRNY	SEQ ID NO: 168	HLA-A1	1
PA	VSHCRATEY	SEQ ID NO: 169	HLA-A1	1
PA	FMYSDFHFI	SEQ ID NO: 170	HLA-A2	5
PA	ALLKHFIEI	SEQ ID NO: 171	HLA-A2	4
PA	MAWTVVNSI	SEQ ID NO: 172	HLA-A2	5
PA	LLMDALKLSI	SEQ ID NO: 173	HLA-A2	5
PA	LLAWKQVLA	SEQ ID NO: 174	HLA-A2	3
PA	YINTALLNA	SEQ ID NO: 175	HLA-A2	5
PA	SICNTTGVEK	SEQ ID NO: 176	HLA-A3	4
PA	KFLPDLYDYK	SEQ ID NO: 177	HLA-A3	2
PA	HIYYLEKANK	SEQ ID NO: 178	HLA-A3	4
PA	KFLLMDALK	SEQ ID NO: 179	HLA-A3	2
PA	RTFFGWKEPY	SEQ ID NO: 180	HLA-A3	3
PA	KIPKTKNMKK	SEQ ID NO: 181	HLA-A3	2
PA	FQLIPMISK	SEQ ID NO: 182	HLA-A3	2
PA	KTNLYGFIK	SEQ ID NO: 183	HLA-A3	4
PA	NLYGFIKGR	SEQ ID NO: 184	HLA-A3	4
PA	SVKEKDMTK	SEQ ID NO: 185	HLA-A3	2
PA	MTKEFFENK	SEQ ID NO: 186	HLA-A3	5
PA	KVCRTLLAK	SEQ ID NO: 187	HLA-A3	3
PA	KLLLVQALR	SEQ ID NO: 188	HLA-A3	3
PA	KFAAICTHL	SEQ ID NO: 189	HLA-A24	2
PA	CFMYSDFHF	SEQ ID NO: 190	HLA-A24	3
PA	YYLEKANKI	SEQ ID NO: 191	HLA-A24	2

PA	EYIMKGVYI	SEQ ID NO: 192	HLA-A24	2
PA	FFENKSETW	SEQ ID NO: 193	HLA-A24	2
PA	LYASPQLEGF	SEQ ID NO: 194	HLA-A24	2
PA	APIEHASM	SEQ ID NO: 195	HLA-B7	4
PA	SPQLEGFSA	SEQ ID NO: 196	HLA-B7	2
PA	SEKTHIHIF	SEQ ID NO: 197	HLA-B44	4
PA	GEETIEERF	SEQ ID NO: 198	HLA-B44	5
PA	PELRSLSSWI	SEQ ID NO: 199	HLA-B44	4
PA	SEFNKACELT	SEQ ID NO: 200	HLA-B44	5
PA	MEFSLTDPRL	SEQ ID NO: 201	HLA-B44	6
PA	WEKYCVLEI	SEQ ID NO: 202	HLA-B44	5
PA	AESRKLIII	SEQ ID NO: 203	HLA-B44	4
PA	AESRKLIIIV	SEQ ID NO: 204	HLA-B44	3
PA	YEAIEECLI	SEQ ID NO: 205	HLA-B44	4

a) Véase nota al pie (a) de la Tabla 2.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína PB1 de la influenza de longitud completa, o una porción de la misma, tal como un epítipo (por ejemplo, uno o más epítipos HTL o CTL). En ciertas realizaciones, la porción o epítipo es de una secuencia conservada de manera evolutiva. En ciertas realizaciones, el epítipo es un epítipo HTL o CTL que muestra una unión redundante a moléculas HLA clase I o clase II, respectivamente, y/o tiene la capacidad de generar respuestas interferón gamma humanas (IFN- γ) en el análisis del ensayo ELISPOT usando PBMC humanas. Como se ha analizado anteriormente, los epítipos HTL o CTL pueden formar un concatémero donde un único epítipo HTL o CTL se repite y/o donde una pluralidad de epítipos HTL y/o CTL se unen. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítipos PB1 HTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 1 (es decir, las SEQ ID NOs: 41-54). En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítipos PB1 CTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 11 (es decir, las SEQ ID NOs: 206-264).

Tabla 11

Proteína	Péptido CTL	SEQ ID NO.	Supertipo HLA	N.º de alelos unidos ^a
PB1	YSHGTGTGY	SEQ ID NO: 206	HLA-A1	4
PB1	GMQIRGFVY	SEQ ID NO: 207	HLA-A1	2
PB1	RMFLAMITY	SEQ ID NO: 208	HLA-A1	2
PB1	KMARLGKGY	SEQ ID NO: 209	HLA-A1	1
PB1	MLASIDLKY	SEQ ID NO: 210	HLA-A1	3
PB1	MLASIDLKY	SEQ ID NO: 211	HLA-A1	4
PB1	TFEFTSFFY	SEQ ID NO: 212	HLA-A1	3
PB1	LVSDGGPNLY	SEQ ID NO: 213	HLA-A1	3
PB1	AQTDCVLEA	SEQ ID NO: 214	HLA-A2	4
PB1	CVLEAMAFL	SEQ ID NO: 215	HLA-A2	4
PB1	RLIDFLKDV	SEQ ID NO: 216	HLA-A2	4
PB1	QIRGFVYFV	SEQ ID NO: 217	HLA-A2	4
PB1	FVYFVETLA	SEQ ID NO: 218	HLA-A2	5
PB1	RMFLAMITYI	SEQ ID NO: 219	HLA-A2	4
PB1	LLIDGTASL	SEQ ID NO: 220	HLA-A2	5
PB1	NMLSTVLGV	SEQ ID NO: 221	HLA-A2	4
PB1	FVANFSMEL	SEQ ID NO: 222	HLA-A2	5
PB1	AQMALQLFI	SEQ ID NO: 223	HLA-A2	4
PB1	RLCNPLNPFV	SEQ ID NO: 224	HLA-A2	4
PB1	QTYDWTLNR	SEQ ID NO: 225	HLA-A3	4
PB1	ALANTIEVFR	SEQ ID NO: 226	HLA-A3	3
PB1	MVTQRTIGK	SEQ ID NO: 227	HLA-A3	4
PB1	MVTQRTIGKK	SEQ ID NO: 228	HLA-A3	3
PB1	ALTLNMTK	SEQ ID NO: 229	HLA-A3	2
PB1	TLARSICEK	SEQ ID NO: 230	HLA-A3	3
PB1	SIAPIMFSNK	SEQ ID NO: 231	HLA-A3	4
PB1	IQAGVDRFYR	SEQ ID NO: 232	HLA-A3	4

PB1	KLVGINMSK	SEQ ID NO: 233	HLA-A3	2
PB1	KLVGINMSKK	SEQ ID NO: 234	HLA-A3	2
PB1	GTFEFTSFFY	SEQ ID NO: 235	HLA-A3	4
PB1	TFEFTSFFYR	SEQ ID NO: 236	HLA-A3	4
PB1	AQMALQLFIK	SEQ ID NO: 237	HLA-A3	2
PB1	LQLFIKDYR	SEQ ID NO: 238	HLA-A3	3
PB1	ATTHSWIPK	SEQ ID NO: 239	HLA-A3	4
PB1	ATTHSWIPKR	SEQ ID NO: 240	HLA-A3	2
PB1	YQKCCCTFEK	SEQ ID NO: 241	HLA-A3	2
PB1	YQKCCNLFEK	SEQ ID NO: 242	HLA-A3	2
PB1	KFFPSSSYR	SEQ ID NO: 243	HLA-A3	4
PB1	SYLIRALTL	SEQ ID NO: 244	HLA-A24	2
PB1	MFLAMITYI	SEQ ID NO: 245	HLA-A24	2
PB1	RYTKTTYWW	SEQ ID NO: 246	HLA-A24	2
PB1	SYINRTGTF	SEQ ID NO: 247	HLA-A24	3
PB1	FYRYGFVANF	SEQ ID NO: 248	HLA-A24	2
PB1	LYNIRNLHI	SEQ ID NO: 249	HLA-A24	2
PB1	MYQKCCNLF	SEQ ID NO: 250	HLA-A24	2
PB1	MYQKCCCTLF	SEQ ID NO: 251	HLA-A24	3
PB1	NPRMFLAMI	SEQ ID NO: 252	HLA-B7	1
PB1	QPEWFRNVL	SEQ ID NO: 253	HLA-B7	1
PB1	APIMFSNKM	SEQ ID NO: 254	HLA-B7	2
PB1	IPAEMLASI	SEQ ID NO: 255	HLA-B7	4
PB1	SPGMMMGMF	SEQ ID NO: 256	HLA-B7	1
PB1	GPATAQMAL	SEQ ID NO: 257	HLA-B7	2
PB1	MPAHGPAKSM	SEQ ID NO: 258	HLA-B7	4
PB1	IPKRNRSL	SEQ ID NO: 259	HLA-B7	1
PB1	FPSSSYRRPV	SEQ ID NO: 260	HLA-B7	4
PB1	RPVGISSMV	SEQ ID NO: 261	HLA-B7	1
PB1	CEKLEQSGL	SEQ ID NO: 262	HLA-B44	4
PB1	IEKIRPLLI	SEQ ID NO: 263	HLA-B44	5
PB1	IIESVNNAVV	SEQ ID NO: 264	HLA-B44	6

a) Véase nota al pie (a) de la Tabla 2.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína PB2 de la influenza de longitud completa, o una porción de la misma, tal como un epítipo (por ejemplo, uno o más epítipos HTL o CTL). En ciertas realizaciones, la porción o epítipo es de una secuencia conservada de manera evolutiva. En ciertas realizaciones, el epítipo es un epítipo HTL o CTL que muestra una unión redundante a moléculas HLA clase I o clase II, respectivamente, y/o tiene la capacidad de generar respuestas interferón gamma humanas (IFN- γ) en el análisis del ensayo ELISPOT usando PBMC humanas. Como se ha analizado anteriormente, los epítipos HTL o CTL pueden formar un concatémero donde un único epítipo HTL o CTL se repite y/o donde una pluralidad de epítipos HTL y/o CTL se unen. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítipos PB2 HTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 1 (es decir, las SEQ ID NOs: 55-61). En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítipos PB2 CTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 12 (es decir, las SEQ ID NOs: 265-309).

Tabla 12

Proteína	Péptido CTL	SEQ ID NO.	Supertipo HLA	N.º de alelos unidos ^a
PB2	STVHYPKVY	SEQ ID NO: 265	HLA-A1	2
PB2	KISPLMVAY	SEQ ID NO: 266	HLA-A1	2
PB2	RVSKMGVDEY	SEQ ID NO: 267	HLA-A1	1
PB2	GTEKLITY	SEQ ID NO: 268	HLA-A1	1
PB2	QWSQEPTMLY	SEQ ID NO: 269	HLA-A1	2
PB2	WSQDPTMLY	SEQ ID NO: 270	HLA-A1	4
PB2	LQDCKIAPL	SEQ ID NO: 271	HLA-A2	4
PB2	FQNWGIEHI	SEQ ID NO: 272	HLA-A2	4
PB2	FQNWGIEPI	SEQ ID NO: 273	HLA-A2	4

PB2	RMQFSSLTV	SEQ ID NO: 274	HLA-A2	4
PB2	TTVDHMAIIK	SEQ ID NO: 275	HLA-A3	2
PB2	TVDHMAIIK	SEQ ID NO: 276	HLA-A3	2
PB2	RIMEMIPER	SEQ ID NO: 277	HLA-A3	4
PB2	TTSTVHYPK	SEQ ID NO: 278	HLA-A3	5
PB2	STVHYPKVYK	SEQ ID NO: 279	HLA-A3	4
PB2	TVHYPKVYK	SEQ ID NO: 280	HLA-A3	5
PB2	KVYKTYFEK	SEQ ID NO: 281	HLA-A3	3
PB2	GTFGPVHFR	SEQ ID NO: 282	HLA-A3	5
PB2	SFSFGGFTFK	SEQ ID NO: 283	HLA-A3	5
PB2	FSFGGFTFK	SEQ ID NO: 284	HLA-A3	5
PB2	FSFGGFTFKR	SEQ ID NO: 285	HLA-A3	5
PB2	SFGGFTFKR	SEQ ID NO: 286	HLA-A3	4
PB2	VLGTNLQTLK	SEQ ID NO: 287	HLA-A3	2
PB2	HQLLRHFQK	SEQ ID NO: 288	HLA-A3	3
PB2	WSIDRFLR	SEQ ID NO: 289	HLA-A3	4
PB2	SQDPTMLYNK	SEQ ID NO: 290	HLA-A3	2
PB2	GTFDTVQIIK	SEQ ID NO: 291	HLA-A3	3
PB2	LLPFAAAPPK	SEQ ID NO: 292	HLA-A3	4
PB2	VLRGFLILGK	SEQ ID NO: 293	HLA-A3	3
PB2	SINELSNLAK	SEQ ID NO: 294	HLA-A3	3
PB2	WMMAMKYPI	SEQ ID NO: 295	HLA-A24	2
PB2	HYPKVYKTYF	SEQ ID NO: 296	HLA-A24	2
PB2	LYNKMEFEPF	SEQ ID NO: 297	HLA-A24	2
PB2	QYSGFVRTLF	SEQ ID NO: 298	HLA-A24	2
PB2	NPALRMKWM	SEQ ID NO: 299	HLA-B7	1
PB2	YPKVYKTYF	SEQ ID NO: 300	HLA-B7	2
PB2	GPVHFRNQV	SEQ ID NO: 301	HLA-B7	1
PB2	FPNEVGARIL	SEQ ID NO: 302	HLA-B7	5
PB2	SPLMVAYML	SEQ ID NO: 303	HLA-B7	4
PB2	APPKQSRMQF	SEQ ID NO: 304	HLA-B7	1
PB2	APPEQSRMQF	SEQ ID NO: 305	HLA-B7	1
PB2	GPALSINEL	SEQ ID NO: 306	HLA-B7	1
PB2	RELVRKTRFL	SEQ ID NO: 307	HLA-B44	4
PB2	MEFEPFQSL	SEQ ID NO: 308	HLA-B44	5
PB2	KEDKRYGPAL	SEQ ID NO: 309	HLA-B44	6

a) Véase nota al pie (a) de la Tabla 2.

- En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una pluralidad de epítomos HTL enumerados en la Tabla 1 (es decir, las SEQ ID NOs: 1-61), donde la pluralidad de epítomos HTL incluye epítomos de una pluralidad de epítomos de la influenza. La secuencia codificada puede, por ejemplo, codificar un multímero de epítomos HTL de diferentes proteínas de la influenza. En ciertas realizaciones, la pluralidad de epítomos HTL se selecciona, en parte, en función de su porcentaje de conservación de la secuencia, número y tipo de alelos unidos HLA clase II (es decir, para asegurar la unión a un amplio espectro de alelos HLA clase II), respuesta IFN- γ en análisis del ensayo ELISPOT usando PBMC humanas, o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítomos HTL seleccionados del grupo que se muestra en la Tabla 13. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica un multímero de todos los epítomos HTL mostrados en la Tabla 13.

Tabla 13

Proteína de Influenza	Péptido HTL	SEQ ID NO.	Cons. (%) ^a	N.º de alelos unidos ^b	Memoria ^c
M1	KGILGFVFTLTPSE	SEQ ID NO: 13	94	11	6
M1	YRKLKREITFHGAKE	SEQ ID NO: 14	61	11	10
M1	MGTVTTEVALGLVCA	SEQ ID NO: 15	22	7	5
M1	NPLIRHENRMVLAST	SEQ ID NO: 16	98	11	5
M1	AMEVASQARQMVQAM	SEQ ID NO: 17	75	8	3

NP	IGRFYIQMCTELKLSDYEG	SEQ ID NO: 20	67	12	4
NP	QNSITIERMVLSAFD	SEQ ID NO: 21	69	8	5
NP	VGTMVMELIRMIKRG	SEQ ID NO: 22	73	10	8
NP	DLIFLARSALILRGS	SEQ ID NO: 23	92	12	4
NP	RSALILRGSVAHKSC	SEQ ID NO: 24	100	12	2
NP	KSQLVWMACHSAAFE	SEQ ID NO: 25	71	11	2
NP	AGQISVQPTFSVQRN	SEQ ID NO: 26	61	10	5
NS1	EGAIVGEISPLPSLPGHTD	SEQ ID NO: 28	27	8	5
NS2	SLKLYRDSLGEAVMR	SEQ ID NO: 30	46	8	3
NS2	IRWLIEEVRHRLRIT	SEQ ID NO: 31	8	7	4
NS2	FEQITFMQALQLLLE	SEQ ID NO: 32	58	10	1
NS2	ITFMQALQLLLEVEQ	SEQ ID NO: 33	58	10	1
PA	RREVHIYYLEKANKI	SEQ ID NO: 34	76	11	4
PA	LFTIRQEMASRGLWD	SEQ ID NO: 35	71	11	3
PA	EPFLKTTTPRPLRLPD	SEQ ID NO: 36	35	10	2
PA	RSKFLMDALKLSIED	SEQ ID NO: 37	90	13	2
PA	VAPIEHIASMRRYNF	SEQ ID NO: 38	75	11	4
PA	EYIMKGVYINTALLN	SEQ ID NO: 39	98	7	4
PA	RPMFLYVRTNGTSKI	SEQ ID NO: 40	90	12	3
PB1	PTLLFLKVPQAQNAIST	SEQ ID NO: 41	71	11	2
PB1	SYLIRALTLNTMTKD	SEQ ID NO: 42	88	12	2
PB1	FLAMITYITRNQPEW	SEQ ID NO: 43	76	11	3
PB1	QPEWFRNVLSIAPIMF	SEQ ID NO: 44	76	12	2
PB1	FRNVLSIAPIMFSNKM	SEQ ID NO: 45	76	12	1
PB1	IAPIMFSNKMARLGK	SEQ ID NO: 46	84	10	1
PB1	KGVMFESKSMKLRTQI	SEQ ID NO: 47	76	13	2
PB1	MMGMFNMLSTVLGVS	SEQ ID NO: 49	100	12	10
PB1	DFALIVNAPNHEGIQ	SEQ ID NO: 50	84	11	3
PB1	YGFVANFSMELPSFG	SEQ ID NO: 51	90	9	3
PB1	GVTVIKNMINNDLGP	SEQ ID NO: 52	92	8	2
PB1	PNLYNIRNLHIPEVC	SEQ ID NO: 53	80	9	2
PB1	ISSMVEAMVSRARID	SEQ ID NO: 54	78	8	1
PB2	KWMMAMKYPIADKR	SEQ ID NO: 55	82	8	1
PB2	GARILTSESQLTITK	SEQ ID NO: 56	82	8	2
PB2	KAAMGLRISSFSFG	SEQ ID NO: 57	78	13	3
PB2	IKAVRGDLNFNVRAN	SEQ ID NO: 58	90	9	4
PB2	LRHFQKDAKVLQNW	SEQ ID NO: 59	88	8	1
PB2	QWIIRNWETVKIQWS	SEQ ID NO: 60	76	11	3
PB2	RMQFSSLTVNVRGSG	SEQ ID NO: 61	96	11	2

a) Véase nota al pie (a) de la Tabla 1.

b) Véase nota al pie (b) de la Tabla 1.

c) Véase nota al pie (c) de la Tabla 1.

En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una pluralidad de epítomos CTL enumerados en las Tablas 2-3 y 5-12 (es decir, las SEQ ID NOs: 62-309), donde la pluralidad de epítomos CTL incluye epítomos de una pluralidad de proteínas de Influenza. La secuencia codificada puede, por ejemplo, codificar un multímero de epítomos CTL de diferentes proteínas de la influenza. En ciertas realizaciones, la pluralidad de epítomos CTL se selecciona, en parte, en base a su porcentaje de conservación de la secuencia, número y tipo de alelos unidos HLA clase I (es decir, para asegurar la unión a un amplio espectro de alelos HLA clase I), respuesta IFN- γ en el análisis de ensayo ELISPOT usando PBMC humanas, o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica uno o más epítomos CTL seleccionados del grupo enumerado en la Tabla 14. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica un multímero de todos los epítomos CTL enumerados en la Tabla 14.

Tabla 14

Proteína	Péptido CTL	SEQ ID NO.	Supertipo HLA	N.º de alelos unidos ^a
NP	CTELKLSDY	SEQ ID NO: 111	HLA-A1	1
NP	HSNLNDATY	SEQ ID NO: 112	HLA-A1	2
NP	KSCLPACVY	SEQ ID NO: 113	HLA-A1	2
PB1	YSHGTGTGY	SEQ ID NO: 206	HLA-A1	4
PB1	LVSDGGPNLY	SEQ ID NO: 213	HLA-A1	3
PB2	KISPLMVAY	SEQ ID NO: 266	HLA-A1	2
PB2	GTEKLTITY	SEQ ID NO: 268	HLA-A1	1
M1	GILGFVFTL	SEQ ID NO: 70	HLA-A2	4
M1	RMGTVTTEV	SEQ ID NO: 72	HLA-A2	4
NS1	FQVDCFLWHV	SEQ ID NO: 141	HLA-A2	5
NS2	MQALQLLLEV	SEQ ID NO: 155	HLA-A2	5
NP	CLPACVYGL	SEQ ID NO: 114	HLA-A2	4
NP	FQGRGVFEL	SEQ ID NO: 116	HLA-A2	4
PA	FMYSDFHFI	SEQ ID NO: 170	HLA-A2	5
PB1	RLIDFLKDV	SEQ ID NO: 216	HLA-A2	4
PB1	QIRGFVYFV	SEQ ID NO: 217	HLA-A2	4
PB1	NMLSTVLGV	SEQ ID NO: 221	HLA-A2	4
PB1	FVANFSMEL	SEQ ID NO: 222	HLA-A2	5
M1	ASCMGLIYNR	SEQ ID NO: 74	HLA-A3	4
M2	RLFFKCIYRR	SEQ ID NO: 82	HLA-A3	5
NP	SVQPTFSVQR	SEQ ID NO: 124	HLA-A3	4
NP	SVQRNLPFER	SEQ ID NO: 126	HLA-A3	4
NS1	AIMDKNIILK	SEQ ID NO: 146	HLA-A3	3
NS2	TQFESLKLYR	SEQ ID NO: 157	HLA-A3	3
PA	KFLPDLYDYK	SEQ ID NO: 177	HLA-A3	2
PB1	KLVGINMSKK	SEQ ID NO: 234	HLA-A3	2
PB1	GTFEFTSFFY	SEQ ID NO: 235	HLA-A3	4
PB2	SFSFGGFTFK	SEQ ID NO: 283	HLA-A3	5
PB2	VLRGFLILGK	SEQ ID NO: 293	HLA-A3	3
NP	FYIQMCTEL	SEQ ID NO: 128	HLA-A24	2
PA	YYLEKANKI	SEQ ID NO: 191	HLA-A24	2
PB1	FYRYGFVANF	SEQ ID NO: 248	HLA-A24	2
NS1	VPASRYLTDM	SEQ ID NO: 147	HLA-B7	2
NP	LPRRSGAAGA	SEQ ID NO: 132	HLA-B7	2
NP	LPFERATIM	SEQ ID NO: 134	HLA-B7	5
PB1	QPEWFRNVL	SEQ ID NO: 253	HLA-B7	1
PB1	IPKRNRSIL	SEQ ID NO: 259	HLA-B7	1
M1	TEVETYVLSI	SEQ ID NO: 76	HLA-B44	4
M1	SEQAAEAMEV	SEQ ID NO: 78	HLA-B44	6
NP	GERQNATEI	SEQ ID NO: 135	HLA-B44	4
NS1	LETLLLRAF	SEQ ID NO: 150	HLA-B44	4
NS1	GEISPLPSL	SEQ ID NO: 151	HLA-B44	6
NS2	QEIRTFSFQL	SEQ ID NO: 163	HLA-B44	4
PA	CELTDSSWI ^b	SEQ ID NO: 310	HLA-B44	n/a
NP	YERMCNILKG ^b	SEQ ID NO: 311	HLA-B44	n/a

a) Véase nota al pie (a) de la Tabla 2.
b) Assarsson y col. (2008), J Virol 82: 12241.

La primera secuencia heteróloga puede codificar una proteína o antígeno inmunógeno de cualquier patógeno infeccioso descrito en la presente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína inmunógena de un virus, una bacteria, un protista y/o un hongo. En una realización, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína inmunógena de un virus de la influenza, poliovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma humano (VPH), virus de chikungunya, y/o virus de la fiebre del Dengue. En otra realización, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína inmunógena de *Bacillus* (por ejemplo, *Bacillus anthracis*), *Mycobacterium* (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium Leprae*),

Shigella (por ejemplo, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*), *Streptococcus*, y/o *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli* enterotoxigénico, enterohemorrágico o productor de toxinas Shiga). En otra realización, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína inmunógena de *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteropatogénico (EPEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), y/o *E. coli* enteroagregativo (EAEC). Aún en otra realización, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína inmunógena de *Burkholderia* (por ejemplo, *Burkholderia cepacia complex*), *Pseudomonas* (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*), *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile*), *Staphylococcus* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, resistente a múltiples fármacos, o resistente a oxacilina), *Enterococcus* (por ejemplo, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, enterococos resistentes a la vancomicina (ERV)), *Streptococcus* (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*), y/o *Vibrio* (por ejemplo, *Vibrio cholerae*). En otra realización, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína inmunógena de *Camphylobacter* (por ejemplo, *Camphylobacter jejuni*), *Bordetella* (por ejemplo, *Bordetella pertussis*), *Chlamydia* (por ejemplo, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*), *Corynebacterium* (por ejemplo, *Corynebacterium diphtheria*), *Legionella* (por ejemplo, *Legionella pneumophila*), *Listeria* (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*), *Neisseria* (por ejemplo, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*), *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*), *Yersinia* (por ejemplo, *Yersinia pestis*), *Haemophilus* (por ejemplo, *Haemophilus influenzae*), *Helicobacter* (por ejemplo, *Helicobacter pylori*), *Coxiella* (por ejemplo, *Coxiella burnetii*), y/o *Francisella* (por ejemplo, *Francisella tularensis*). En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína inmunógena de influenza, VIH, VPH, *Bacillus anthracis*, *Plasmodium* y/o *Shigella*. Aún en otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína inmunógena de influenza, VIH, y/o *Bacillus anthracis*.

Los antígenos de la influenza codificados por la primera secuencia heteróloga pueden ser de cualquier cepa de la influenza, que existan actualmente o que se aislen posteriormente, incluyendo, por ejemplo, una cepa asociada a la gripe española de 1918 (H1N1), la gripe asiática de 1957 (H2N2), la gripe de Hong Kong de 1968 (H3N2), la gripe de Hong Kong de 1997 (H5N1), la gripe de Vietnam de 2004 (H5N1), la gripe porcina de 2009 (H1N1), etc. Por lo tanto, por ejemplo, el antígeno de HA puede ser un antígeno de HA H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16 o B, mientras que el antígeno NA puede, por ejemplo, ser un antígeno NA N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9. En algunas realizaciones, el antígeno de HA es un antígeno de HA H1, H3, H5 o B. Los ejemplos no limitantes de cepas de influenza que pueden ser la base para una secuencia heteróloga de la invención incluyen: A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1); A/Brevig Mission/1/1918 (H1N1); A/Wilson-Smith/33 (H1N1); A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai (H1N1); A/Fort Monmouth/1/47 (H1N1); A/USSR/90/1977 (H1N1); A/New Caledonia/20/1999(H1N1); A/Solomon Islands/3/2006(H1N1); A/Brisbane/59/2007(H1N1); A/California/7/2009 (H1N1); A/California/14/2009 (H1N1); A/California/08/2009 (H1N1); A/California/05/2009 (H1N1); A/Texas/04/2009 (H1N1); A/Mexico/InDRE4114/2009 (H1N1); A/New York/1669/2009 (H1N1); A/Canada-AB/RV1532/2009 (H1N1); A/Leningrad/134/47/57 (H2N2); A/Ann Arbor/6/60 (H2N2); A/Berlin/3/64 (H2N2); A/Tokyo/3/67 (H2N2); A/Singapore/1/57 (H2N2); A/Hong Kong/1/68 (H3N2); A/Albany/1/76 (H3N2); A/Panama/2007/99 (H3N2); A/Wisconsin/67/05(H3N2); A/Hong Kong/1774/99 (H3N2); A/Moscow/10/99 (H3N2); A/Hiroshima/52/2005(H3N2); A/California/7/2004(H3N2); A/New York/55/2004(H3N2); A/Brisbane/10/2007(H3N2); A/Perth/16/2009 (H3N2); A/goose/Guiyang/337/2006 (H5N1) subtipo 4; A/HK/156/97 (H5N1); A/HK/483/97 (H5N1); A/Viet Nam/1194/2004 (H5N1) subtipo 1; A/Viet Nam/1203/2004 (H5N1) subtipo 1; A/duck/NCVD1/07 (H5N1); A/chicken/VietNam/NCVD-21/07 (H5N1); A/Indonesia/5/05 (H5N1) subtipo 2.1; A/Turkey/65-596/06 (H5N1) subtipo 2.2; A/chicken/India/NIV33487/2006 (H5N1) subtipo 2.2; A/turkey/Turkey/1/2005 (H5N1) subtipo 2.2; A/Egypt/902782/2006 (H5N1); A/Egypt/2321/2007 (H5N1); A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 (H5N1); A/Anhui/1/2005 (H5N1); A/China/GD01/2006 (H5N1); A/common magpie/Hong Kong/50525/07 (H5N1) subtipo 2.3.2; A/Japanese white-eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1) subtipo 2.3.4; A/chicken/Viet Nam/NCVD-15/2007 (H5N1); A/chicken/Italy/2335/2000 (H7N1); A/turkey/Italy/3675/99 (H7N1); A/chicken/New York/21211-2/05 (H7N2); A/New York/107/03 (H7N2); A/chicken/British Columbia/GSC human B/04 (H7N3); A/Canada/ rv504/04 (H7N3); A/chicken/British Columbia/CN-6/04 (H7N3); A/equine/San Paulo/4/76 (H7N7); A/seal/Mass/1/1980 (H7N7); A/chicken/Victoria/1/1985 (H7N7); A/chicken/Netherlands/2586/2003 (H7N7); A/mallard/California/HKWF1971/2007 (H7N7); A/chicken/Beijing/1/94 (H9N2); A/quail/Hong Kong/G1/1997 (H9N2); A/Korea/KBNP-0028/2000 (H9N2); A/chicken/Hong Kong/G9/97 (H9N2); A/chicken/Hong Kong/CSW153/ 2003 (H9N2); A/chicken/Shantou/6781/2005 (H9N2); A/chicken/Jiangsu/L1/2004 (H9N2); A/Hong Kong/1073/99 (H9N2); A/Hong Kong/2108/2003 (H9N2); A/chicken/Shiraz/AIV-IR004/2007 (H9N2); A/chicken/Zibo/L2/2008 (H9N2); A/chicken/Henan/L1/2008 (H9N2); A/avian/Israel/313/2008 (H9N2) y B/Brisbane/60/2008. Pueden identificarse fácilmente cepas de influenza adicionales por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la Tabla 1 del documento WO 2008/054540 proporciona una lista extensa de las diferentes cepas de la influenza que se han aislado hasta la fecha, como se muestra en el sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno de HA de la influenza seleccionado de los virus de la influenza H1, H3, H5 o B. El antígeno de HA puede derivarse, en algunas realizaciones, de una o más de las cepas seleccionadas del grupo que consiste en A/Vietnam/1194/2004, A/Vietnam/1203/2004, A/Anhui/1/2005, A/Egypt/2321/2007, A/Egypt/3300-NAMRU3/2008, A/Perth/16/2009, A/California/05/2009, o B/Brisbane/60/2008. En algunas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno NP o M1 de la influenza. En una realización, el antígeno NP o M1 deriva de las cepas de influenza A/Texas/04/2009 o A/California/08/2009.

En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno de un virus de papiloma humano (VPH). El VPH puede ser de cualquier cepa descubierta a la fecha o posteriormente (por ejemplo, VPH-1, VPH-2, VPH-6, VPH-11, VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-45, etc.). En una realización, la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno de una cepa VPH-16 o VPH-18. En ciertas realizaciones, el antígeno del VPH es un antígeno de superficie, tal como una proteína L1 de longitud completa o un fragmento de la misma (por ejemplo, un epítipo conservado de manera evolutiva y/o un epítipo HTL o CTL). En una realización, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína L1 de longitud completa que se encuentra total o parcialmente optimizada por codones. En otras realizaciones, el antígeno del VPH es una L2 de longitud completa o un fragmento de la misma (por ejemplo, un epítipo conservado de manera evolutiva y/o un epítipo HTL o CTL). En otras realizaciones, el antígeno del VPH es un polipéptido híbrido L2 o un polipéptido híbrido L1/L2. Por ejemplo, en una realización particular, el antígeno del VPH es un polipéptido L1 que comprende un fragmento de un polipéptido L2 (por ejemplo, un fragmento L2 se puede insertar en un bucle del polipéptido L1). Aún en otras realizaciones, el antígeno del VPH es una proteína E6 o E7 de longitud completa, o un fragmento de la misma (por ejemplo, un epítipo conservado de manera evolutiva y/o un epítipo HTL o CTL). Aún en otras realizaciones, el antígeno del VPH es una proteína de fusión que comprende proteínas L1, L2 y/o E6 y E7. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el antígeno del VPH es una proteína de fusión que comprende un polipéptido híbrido L1/L2 fusionado a una proteína E7. En otras realizaciones, el antígeno del VPH es una proteína de fusión que comprende un polipéptido híbrido L1/L2 fusionado a una proteína E6.

En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). El VIH puede ser de cualquier cepa conocida o que se descubra posteriormente (por ejemplo, VIH-1, VIH-2, etc.). En ciertas realizaciones, el antígeno de VIH es un antígeno de superficie, tal como una proteína env. de longitud completa (por ejemplo, gp160) o un fragmento u oligómero de la misma (por ejemplo, gp140, gp120, gp41, un epítipo conservado de manera evolutiva y/o un epítipo HTL o CTL). En otras realizaciones, el antígeno de VIH es una proteína cápside de longitud completa (p24), una proteína matriz (p17) o un fragmento de la misma (por ejemplo, un epítipo conservado de manera evolutiva y/o un epítipo HTL o CTL). En otras realizaciones, el antígeno de VIH es una proteína Tat (por ejemplo, p16 o p14), Rev (p19), Vif (p23), Vpr (p14), Nef (p27), Vpu (p16) o Gag. El antígeno de VIH puede ser cualquier proteína VIH, de longitud completa o no, tal como un epítipo HTL o CTL, y puede ser una secuencia conservada de manera evolutiva. En algunas realizaciones, la secuencia de antígenos VIH puede ser modificada genéticamente para contener dominios de trimerización heterólogos (por ejemplo, GCN de levadura, tal como GCN4 y motivos de fibrina FT de bacteriófagos T4) o determinadas secuencias de señalización para modificaciones postraduccionales, tal como los sitios de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Por ejemplo, en una realización, una proteína de envoltorio VIH, tal como gp140 o gp120, puede ser modificada para contener un sitio de anclaje de GPI. En otra realización, una secuencia gp140 VIH puede ser modificada para contener un dominio de trimerización GCN heterólogo y/o un sitio de anclaje GPI. En algunas realizaciones, el dominio de trimerización GCN o el sitio de anclaje GPI está fusionado a el extremo carboxilo de una secuencia de proteínas de envoltorio VIH (por ejemplo, la secuencia gp 140 VIH).

En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno de una bacteria *Bacillus*. El *Bacillus* puede ser cualquiera de varias especies patógenas (por ejemplo, *B. anthracis*, *B. cereus*, etc.) y puede ser de cualquier aislado de tal especie conocido o descubierto posteriormente. En ciertas realizaciones, el antígeno de *Bacillus* es un antígeno de superficie, tal como una proteína residente en la membrana celular, o un fragmento de la misma (por ejemplo, un epítipo conservado de manera evolutiva y/o un epítipo HTL o CTL). En otras realizaciones, el antígeno de *Bacillus* es una proteína intracelular o un fragmento de la misma (por ejemplo, un epítipo conservado de manera evolutiva y/o un epítipo HTL o CTL). En ciertas realizaciones, el antígeno de *Bacillus* está asociado a la entrada de la célula huésped. Por ejemplo, el antígeno puede ser una proteína de unión a la célula diana (por ejemplo, un antígeno protector (PrAg o PA)), una metalopeptidasa (por ejemplo, un factor letal (LF)), una adenilato ciclasa (por ejemplo, un factor edema (EF)), o un fragmento de los mismos (por ejemplo, un epítipo conservado de manera evolutiva, y/o un epítipo HTL o CTL). En algunas realizaciones, el antígeno *Bacillus* puede modificarse para eliminar un sitio de escisión de termolisina o contener un anclaje GPI. En una realización, la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno protector o un antígeno protector modificado que ha sido modificado para eliminar un sitio de escisión de termosilina o contener un anclaje GPI.

En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno de una bacteria *Shigella*. El *Shigella* puede ser cualquiera de varias especies patógenas (por ejemplo, *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, etc.) y puede ser cualquier aislado de dicha especie conocido o descubierto posteriormente. En ciertas realizaciones, el antígeno de *Shigella* es un antígeno de superficie, tal como una proteína residente en la membrana celular o asociada a la membrana celular, tal como una proteína integral de membrana o una proteína periférica de membrana, o un fragmento de la misma (por ejemplo, un epítipo conservado de manera evolutiva y/o un epítipo HTL o CTL). Por ejemplo, el antígeno puede ser una proteína de la membrana externa, tal como la cepa de Karp p56. En otras realizaciones, el antígeno de *Shigella* es una proteína intracelular o un fragmento de la misma (por ejemplo, un epítipo conservado de manera evolutiva y/o un epítipo HTL o CTL). En ciertas realizaciones, el antígeno de *Shigella* está asociado a la entrada de la célula huésped, tales como las proteínas invasivas IpaB, IpaC, o IpaD. En otra realización, los antígenos de *Shigella* son antígenos universales que comprenden polipéptidos IcsP y/o SigA.

En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno de *Mycobacterium*. La *Mycobacterium* puede ser cualquiera de varias especies patógenas (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. lepromatosis*, etc.) y puede ser cualquier aislado de dicha especie conocido o descubierto posteriormente. En ciertas realizaciones, el antígeno de *Mycobacterium* es un antígeno de superficie, tal como una proteína residente en la membrana celular o asociada a la membrana celular, tal como una proteína integral de membrana o una proteína periférica de membrana, o un fragmento de la misma (por ejemplo, un epítipo conservado de manera evolutiva y/o un epítipo HTL o CTL). En otras realizaciones, el antígeno de *Mycobacterium* es una proteína intracelular o un fragmento de la misma (por ejemplo, un epítipo conservado de manera evolutiva y/o un epítipo HTL o CTL). En ciertas realizaciones, el antígeno de *Mycobacterium* se selecciona del grupo que consiste en Ag85A, Ag85B, Ag85C, ESAT-6, CFP-10, HspX, y combinaciones de los mismos.

En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno de *Plasmodium*. El *plasmodium* puede ser cualquiera de varias especies patógenas (por ejemplo, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, etc.) y puede ser cualquier aislado de dicha especie conocido o descubierto posteriormente. En ciertas realizaciones, el antígeno de *Plasmodium* es un antígeno de superficie, tal como una proteína residente en la membrana celular o asociada a la membrana celular, tal como una proteína integral de membrana o una proteína periférica de membrana, o un fragmento de la misma (por ejemplo, un epítipo conservado de manera evolutiva y/o un epítipo HTL o CTL). En otras realizaciones, el antígeno de *Plasmodium* es una proteína intracelular o un fragmento de la misma (por ejemplo, un epítipo conservado de manera evolutiva y/o un epítipo HTL o CTL). En ciertas realizaciones, el antígeno de *Plasmodium* se selecciona del grupo que consiste en CS, CSP (no escindido), MSP1, MSP2 (p-42 c-terminal), LSA1, EBA-175, AMA1, FMP1, Pfs48/45, y MSP3.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno de *Streptococcus pneumoniae* (por ejemplo, *Pneumococcus*). En ciertas realizaciones, el antígeno de *Streptococcus pneumoniae* es un antígeno de superficie, tal como una proteína residente en la membrana celular o asociada a la membrana celular, tal como una proteína integral de membrana o una proteína periférica de membrana, o un fragmento de la misma (por ejemplo, un epítipo conservado de manera evolutiva y/o un epítipo HTL o CTL). En otras realizaciones, el antígeno de *Streptococcus pneumoniae* es una proteína intracelular o un fragmento de la misma (por ejemplo, un epítipo conservado de manera evolutiva y/o un epítipo HTL o CTL). En ciertas realizaciones, el antígeno de *Streptococcus pneumoniae* es seleccionado del grupo que consiste en proteínas de la superficie de neumococo (por ejemplo, PspA, PspC), neumolisina (Ply), enzimas de nauraminidasa (por ejemplo, NanA, NanB), autolisina A (LytA), proteínas de tríada de histidina neumocócicas, PiaA, PiuA, fructosa bisfosfato aldolasa (FBA), adhesina A, y neumolisidoide.

Aún en otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno de superficie, una proteína interna, una toxina, una proteína asociada a la invasión, proteasa u otras enzimas, proteína de choque térmico u otro antígeno de cualquier otro patógeno infeccioso. Por ejemplo, el antígeno de superficie puede ser de un patógeno infeccioso seleccionado del grupo que consiste en *Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumonia* (por ejemplo, proteína D de membrana, proteína de la membrana externa), *Chlamydia trachomatis* (por ejemplo, proteína D de la membrana, proteína de la membrana externa), *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, incluyendo cepas resistentes a la meticilina, resistentes multifármacos y resistentes a la oxacilina (por ejemplo, IsdA, IsdB, SdrD, SdrE), *Streptococcus pneumoniae* (por ejemplo, PsPA), *Streptococcus aeruginosa* (por ejemplo, Ag flagelar, porinas), *Streptococcus pyogenes* (por ejemplo, proteína M, proteína de unión a la fibronectina Sfb1), *Streptococcus agalactiae*, *E. coli enterohemorrágico* (por ejemplo, intimina, adhesina FimH), *Haemophilis influenzae* (por ejemplo, Pili, P1, P2, P4, P6), *Candida* (por ejemplo, Als1p, Als3p), *Coccidioides immitis* (por ejemplo, Ag2), *Pseudomonas aeruginosa* (por ejemplo, antígeno flagelar, porinas), virus del sarcoma de Rous (por ejemplo, proteína F, proteína G), retrovirus endógeno humano K (por ejemplo, antígeno HERV-K-MEL de melanoma) virus del herpes (por

ejemplo, glucoproteína D2), virus de la fiebre del dengue (por ejemplo, proteínas de envoltura DEN1, DEN2, DEN3, DEN4, proteína de dominio 4xEDIII tetravalente), etc. La toxina puede seleccionarse del grupo que consiste en toxina inestable de *Camphylobacter jejuni*, toxinas A y B de *Clostridium difficile*, exotoxinas y endotoxinas pirogénicas de *Streptococcus pyogenes*, toxina B de *Vibrio cholerae*, toxina Shiga (por ejemplo, Stx-1, Stx-2) de *E. coli* enterohemorrágico, la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, etc. La proteasa u otras enzimas pueden seleccionarse del grupo que consiste en factor de proteasa secretado de *Chlamydia*, neumolisina, autolisina o neuraminidasa de *Streptococcus pneumoniae*, proteasa de cisteína o peptidasa C5a de *Streptococcus pyogenes*, ureasa de *Helicobacter pylori*, ureasa de *Coccidioides immitis*, His-62, antígeno H, y hsp70 de *Histoplasma capsulatum*, etc.

10

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica, en su totalidad o en parte, una proteína producida por una célula cancerosa. La proteína o un fragmento de la misma (por ejemplo, producto de escisión, dominio estructural, unidad(es) de estructura secundaria, epítopos de linfocitos B, epítopos de linfocitos T citotóxicos (CTL), epítopos de los linfocitos T auxiliares (HTL)), etc., pueden estar en la superficie de la célula cancerosa. Por ejemplo,

15

la proteína o fragmento de la misma puede ser altamente antigénica y/o un marcador para la célula cancerosa (por ejemplo, un marcador específico de células cancerosas o un antígeno altamente enriquecido en las células cancerosas). Como alternativa, la proteína o un fragmento de la misma (por ejemplo, producto de escisión, dominio estructural, unidad(es) de estructura secundaria, epítopos HTL o CTL, etc.), pueden estar en el interior de la célula cancerosa. Por ejemplo, la proteína o el fragmento de la misma puede ser una proteína citosólica, una proteína

20

nuclear, etc.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga comprende al menos un marco abierto de lectura completo (ORF), donde el al menos un ORF completo codifica un polipéptido discreto capaz de ser expresado en una célula huésped infectada con el vector adenovírico. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga comprende al menos dos o más ORF completos, cada uno de los cuales codifica un polipéptido discreto capaz de ser expresado en una célula huésped infectada con el vector adenovírico. Uno o más de los polipéptidos discretos pueden ser una proteína de longitud completa o un fragmento de la misma, como se ha descrito anteriormente. Asimismo, uno o más de los polipéptidos discretos pueden ser un multímero de dominios proteicos, motivos estructurales, o epítopos (por ejemplo, epítopos de linfocitos B, HTL o CTL), como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga comprende un primer ORF que codifica una proteína de longitud completa (por ejemplo, HA de la influenza) y un segundo ORF que codifica un multímero de dominios proteicos, motivos estructurales, o epítopos (por ejemplo, un multímero de una o más secuencias M2 de la influenza seleccionadas de la Tabla 4, un multímero de uno o más epítopos de linfocitos B de la influenza, un multímero de uno o más epítopos HTL de la influenza seleccionados de la Tabla 1 o de la Tabla 13, o un multímero de uno o más epítopos CTL de la influenza seleccionados de las Tablas 2-3 y 5-12 o de la Tabla 14, etc.).

35

Por lo tanto, en algunas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína de fusión. La proteína de fusión puede comprender uno o más epítopos o fragmentos de proteínas antigénicas o proteínas de longitud completa del mismo patógeno infeccioso o de un patógeno infeccioso diferente. Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión comprende un polipéptido híbrido L1/L2 de VPH como se describe en el presente documento, fusionado a las proteínas E6 y E7 del VPH. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende un polipéptido híbrido L1/L2 derivado de VPH-16 (por ejemplo, una proteína L1 VPH-16 de longitud completa con un fragmento de L2 VPH-16 insertado en un bucle L1) fusionado a una proteína E7. En otras realizaciones, la proteína de fusión comprende un polipéptido híbrido L1/L2 derivado de VPH-18 (por ejemplo, una proteína L1 VPH-18 de longitud completa con un fragmento de L2 VPH-18 insertado en un bucle L1) fusionado a una proteína E6. En otra realización, la proteína de fusión comprende fragmentos inmunógenos de proteínas de HA y NA de la influenza fusionados (por ejemplo, epítopos de neutralización de HA de la influenza o proteínas NA como se describe en el presente documento). En otra realización, la proteína de fusión comprende uno o más epítopos de neutralización de proteínas de HA de la influenza como se describe en el presente documento, fusionados a proteínas NA de la influenza de longitud completa. Aún en otra realización, la proteína de fusión puede ser un multímero de varios epítopos como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la proteína de fusión puede ser un multímero de epítopos HTL, donde cada epítopo se conecta por medio de una secuencia enlazadora (véase el Ejemplo 13 para un multímero representativo). En algunas realizaciones, la proteína de fusión codificada por la primera secuencia heteróloga comprende un antígeno de dos o más especies o serotipos de un patógeno infeccioso. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender dominios EDIII de las proteínas de envoltura de cada uno de los cuatro serotipos del virus de la fiebre del dengue 1-4.

50

55

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga comprende dos ORF completos, donde el primer y segundo ORF se orientan en paralelo (por ejemplo, de la cabeza a la cola). En ciertas realizaciones relacionadas, la

primera secuencia heteróloga comprende adicionalmente una secuencia de entrada ribosómica interna (IRES) ubicada 3' del codón de terminación del primer ORF y 5' del codón de inicio del segundo ORF, permitiendo de esta manera que los polipéptidos codificados por el primer y segundo ORF sean traducidos desde una única transcripción de ARNm. Los expertos en la técnica pueden identificar fácilmente las secuencias IRES adecuadas que son
5 funcionales en células de mamíferos (por ejemplo, seres humanos) y cómo tales secuencias deberían posicionarse para asegurar una traducción suficiente del segundo ORF.

En ciertas realizaciones relacionadas, la primera secuencia heteróloga comprende dos ORF completos, donde el primer y segundo ORF se orientan en paralelo (por ejemplo, de la cabeza a la cola), y comprenden adicionalmente
10 un aceptor de splicing ubicado a 3' del codón de terminación del primer ORF y 5' del codón de inicio del segundo ORF, permitiendo de esta manera que los polipéptidos codificados por el primer y segundo ORF sean traducidos desde una única transcripción de ARNm o como dos transcripciones separadas de ARNm. Los expertos en la técnica pueden identificar elementos de splicing e incorporarlos de manera correcta. Los aceptores de splicing pueden ser secuencias consenso (tal como sitios de splicing SV40) o secuencias no consenso (tal como el aceptor
15 de splicing ADP de Ad5) dependiendo del resultado que se desee. Por ejemplo, en la unidad de transcripción tardía principal del adenovirus, los sitios de splicing 3' que tengan polipirimidina atípica se prefieren tardíos en la infección vírica. Véase, por ejemplo, Muhlemann y col. (1995), J. Virology 69(11): 7324.

En ciertas realizaciones relacionadas, la primera secuencia heteróloga comprende dos ORF completos, donde el
20 primer y segundo ORF se orientan en paralelo (por ejemplo, de la cabeza a la cola), y comprenden adicionalmente un elemento de salto de 2A (autoprocesamiento intraribosómico) ubicado en el marco entre el extremo 3' del primer ORF (codón de terminación eliminado) y 5' en el marco del codón de inicio del segundo ORF, permitiendo de esta manera que los polipéptidos codificados por el primer y segundo ORF sean traducidos desde una única transcripción de ARNm, como un péptido único que se "salta" un enlace peptídico en la ubicación del elemento A2 y genera de
25 esta manera dos polipéptidos. Los expertos en la técnica pueden identificar los elementos de salto de 2A, tales como los derivados del virus de la glosopeda (FMDV) y picornavirus, y organizarlos de manera de tal forma que los dos ORF formen un péptido continuo único.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga comprende dos ORF completos, donde el primer y
30 segundo ORF se orientan de punta a punta. Por ejemplo, el extremo 3' del primer ORF puede ser adyacente al extremo 3' del segundo ORF. Como alternativa, el extremo 5' del primer ORF puede ser adyacente al extremo 5' del segundo ORF.

En general, la primera secuencia heteróloga es parte de una unidad de transcripción que contiene mínimamente un
35 potenciador y/o promotor de transcripción y una secuencia de poliadenilación. En ciertas realizaciones, la unidad de transcripción comprende adicionalmente uno o más intrones, uno o más potenciadores de splicing, una secuencia líder, una secuencia consenso de Kozak, uno o más elementos que aumentan la estabilidad y/o el procesamiento del ARN, o cualquier combinación de los mismos.

40 En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga se encuentra bajo el control del promotor tardío principal endógeno (MLP). La primera secuencia heteróloga puede unirse operativamente a una secuencia de control adenovírica traducional y/o transcripcional. Como se usa en el presente documento en este contexto, "bajo el control de" y "unida operativamente a" significan que la transcripción y/o traducción de un ORF contenido en una secuencia heteróloga se encuentra afectada por la secuencia de control. Por lo tanto, por ejemplo, la transcripción
45 y/o traducción del ORF puede aumentarse como resultado de una secuencia de control adenovírica transcripcional y/o traducional. En ciertas realizaciones, "unida de manera operativa a" indica que la secuencia de control y la secuencia heteróloga se encuentran cercanas entre sí. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una secuencia de control adenovírica que está unida de manera operativa a una secuencia heteróloga se ubica dentro de aproximadamente 100 pb, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 pb, entre aproximadamente 200 y
50 aproximadamente 300 pb, entre aproximadamente 300 y aproximadamente 400 pb, o entre aproximadamente 400 y aproximadamente 500 pb de un extremo de la secuencia heteróloga.

Como se usa en el presente documento, una "secuencia de control adenovírica transcripcional y/o traducional" es una secuencia de ácido nucleico implicada en la regulación transcripcional y/o traducional que se deriva de un
55 adenovirus. Tales secuencias incluyen, pero sin limitación, promotores adenovíricos (por ejemplo, el promotor tardío principal (MLP) o el promotor dentro de la unidad de transcripción tardía principal (MLTU), potenciadores de la transcripción adenovíricos, sitios aceptores de splicing adenovíricos (por ejemplo, el sitio aceptor de splicing nativo para la transcripción dirigida por MLP del ORF de Ad4 E3 24,8 k o la secuencia aceptora de splicing de ADP de Ad5), potenciadores de splicing adenovíricos, secuencias líderes adenovíricas (por ejemplo, secuencias líderes

- tripartitas (TPL)), elementos adenovíricos que aumentan la estabilidad y/o el procesamiento del ARN (por ejemplo, elementos de exportación de ARN que actúan en cis), y secuencias señal de poli A adenovíricas (por ejemplo, secuencia señal de poliadenilación Ad5 E3A). La secuencia de control adenovírica transcripcional y/o traduccional puede ser de cualquier cepa de adenovirus. Por lo tanto, un vector adenovírico (por ejemplo, un vector Ad4) de la
- 5 invención puede comprender una secuencia de control transcripcional y/o traduccional adenovírica derivada de una cepa de adenovirus diferente (es decir, una cepa no Ad4). La secuencia de control adenovírica transcripcional y/o traduccional puede tener una secuencia de tipo silvestre (es decir, una secuencia que se encuentra en un adenovirus de origen natural) o una secuencia variante de la misma. Las secuencias de control adenovíricas transcripcionales y/o traduccionales se han descrito en la técnica. Por ejemplo, las secuencias TPL adenovíricas se
- 10 describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2006/0115456; se describen potenciadores en Massie y col. (1995), *Biotechnology* 13(6): 602; y se analizan secuencias de poliadenilación en Bhat y Wold (1986), *J. Virology* 57(3): 1155. Pueden identificarse por los expertos en la técnica secuencias de control adenovíricas transcripcionales y/o traduccionales.
- 15 La primera secuencia heteróloga se encuentra en (es decir, bajo el control de) un MLP adenovírico. Como se usa en el presente documento, "promotor tardío principal (MLP)" se usa de manera intercambiable con promotor de unidad transcripcional tardía principal (MLTU). En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga se encuentra bajo el control de un MLP adenovírico y TPL adenovírico. En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga se encuentra bajo el control de un MLP adenovírico y unida operativamente a una secuencia aceptora de splicing adenovírica. Aún en otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga se encuentra bajo el control de un MLP adenovírico y un TLP adenovírico, y unida operativamente a una secuencia aceptora de splicing adenovírica. En ciertas realizaciones, la secuencia aceptora de splicing adenovírica es una secuencia no consenso. Sin intención de limitarse por la teoría, se cree que los aceptores de splicing no consenso rinden mejor que los aceptores de splicing de consenso cuando se usan junto con el MLP adenovírico. En cualquiera de las realizaciones anteriores, la primera
- 20 secuencia heteróloga puede, además, estar unida operativamente a una secuencia señal de poli A adenovírica.
- 25

La primera secuencia heteróloga se encuentra en (es decir, bajo el control de) un promotor tardío principal (MLP). En ciertas realizaciones, otra secuencia de control adenovírica transcripcional y/o traduccional puede ser una secuencia endógena. Como se usa en el presente documento, una secuencia de control adenovírica transcripcional y/o

30 traduccional "endógena" es una secuencia de ácido nucleico involucrada en la regulación traduccional y/o transcripcional que es natural de un vector adenovírico y no ha sido introducida o movida a una nueva ubicación por medio de tecnologías recombinantes. Por ejemplo, cualquier secuencia de control transcripcional y/o traduccional de Ad4 presente en un vector adenovírico Ad4 es endógena con respecto al vector adenovírico Ad4, con la condición de que la ubicación de la secuencia no haya sido modificada mediante tecnologías recombinantes.

35

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga comprende una secuencia de control transcripcional y/o traduccional exógena. Como se usa en el presente documento, una secuencia de control transcripcional y/o traduccional "exógena" se refiere a una secuencia de control transcripcional y/o traduccional no adenovírica o a una secuencia de control transcripcional y/o traduccional adenovírica sacada de su contexto de tipo silvestre y colocada

40 en un nuevo contexto dentro de la secuencia heteróloga. Los ejemplos de secuencias de control transcripcionales y/o traduccionales exógenas incluyen, pero sin limitación, promotores funcionales en células de mamíferos (por ejemplo, promotores constitutivos, tal como un promotor de CMV, el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (VSR), el promotor SV40, el promotor de la dihidrofolato reductasa (DHFR), el promotor de β -actina, el promotor de la fosfoglicerol cinasa (PGK), el promotor EF1 α (Invitrogen), etc.), secuencias potenciadoras funcionales en células

45 mamíferas (por ejemplo, secuencias potenciadoras de CMV o VSR), señales de splicing, potenciadores de splicing, secuencias líder, secuencias Kozak, secuencias que aumentan la estabilidad y/o procesamiento del ARN (por ejemplo, elementos de exportación de ARN que actúan en cis, elemento de regulación postraduccional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE)), secuencias señal de poli A (por ejemplo, hormona del crecimiento bovino (BGH) o secuencia señal de poli A SV40), etc. Se han descrito diversas secuencias de control transcripcionales y/o

50 traduccionales en la técnica anterior. Se ha descrito un promotor de CMV adecuado, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2006/0115456. Los elementos de WPRE se han descrito, por ejemplo, en Donello y col. (1998), *J. Virology* 72(6): 5085. Los elementos de WPRE deben ubicarse dentro del mensaje del ORF, típicamente entre el extremo 3' del gene y la secuencia de poliadenilación 5'. Sin intención de limitarse por la teoría, se cree que los WPRE funcionan aumentando la eficacia de la traslocación del ARNm del núcleo, así como aumentando la

55 traducción y la estabilidad del ARN. Las secuencias Kozak también se han descrito, por ejemplo, en Kozak, *Nucleic Acid Res* 15(20), 8125-48 (1987).

Las secuencias de control transcripcionales y/o traduccionales adecuadas, ya sean adenovíricas o de otra forma, incluyen secuencias de origen natural, así como formas modificadas de dichas secuencias. Dichas formas

modificadas pueden incluir uno o más cambios de base (por ejemplo, eliminaciones, inserciones, sustituciones) diseñados para potenciar una actividad deseable asociada a la secuencia de control transcripcional y/o traduccional o reducir o eliminar una actividad no deseada asociada a la secuencia de control transcripcional y/o traduccional adenovírica endógena.

5

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga comprende múltiples secuencias de control transcripcionales y/o traduccionales. Por ejemplo, la primera secuencia heteróloga puede comprender suficientes secuencias de control transcripcionales y/o traduccionales para asegurar la expresión de un ORF en la primera secuencia heteróloga tras la infección de una célula apropiada (por ejemplo, una célula humana) por parte del vector adenovírico. En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga comprende un promotor (por ejemplo, un promotor de CMV) y una secuencia TPL adenoviral. En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga comprende un promotor (por ejemplo, un promotor de CMV), un TPL adenoviral y una secuencia señal de poli A adenovírica (por ejemplo, una secuencia señal de poli A del Ad5 E3A). En relación con cualquiera de las realizaciones anteriores, la primera secuencia heteróloga puede comprender además una secuencia Kozak.

10

15

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga comprende una o más secuencias de control transcripcionales o traduccionales para cada uno de dos o más ORF. Por ejemplo, la primera secuencia heteróloga puede comprender suficientes secuencias de control transcripcionales o traduccionales para asegurar la expresión de cada uno de dos o más ORF. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga comprende un promotor y una secuencia señal de poli A para cada uno de dos ORF. La primera secuencia heteróloga puede comprender además un TPL adenoviral y/o una secuencia Kozak para cada uno de los ORF. Como alternativa, en ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga puede comprender suficientes secuencias de control transcripcionales o traduccionales para asegurar la expresión de un ORF (por ejemplo, un promotor y/o potenciador y una secuencia señal de poli A) mientras que comprende un segundo ORF que se encuentra bajo el control de o unido operativamente a secuencias de control transcripcionales o traduccionales adenovíricas endógenas.

20

25

En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga se ha optimizado para aumentar o maximizar la expresión y/o traducción de al menos un ORF. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se optimizó un ORF en la primera secuencia heteróloga mediante codones (por ejemplo, para su expresión en células de mamíferos, tales como células humanas). En una realización, la primera secuencia heteróloga se ha optimizado por codones y se encuentra bajo el control de un promotor no adenovírico, tal como un promotor de CMV. En otras realizaciones, una secuencia Kozak unida operativamente a un ORF es la primera secuencia heteróloga optimizada para crear, por ejemplo, una secuencia Kozak consenso. Aún en otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga se ha optimizado para quitar posibles secuencias inhibitoras, tales como silenciadores de splicing exónicos o secuencias aisladoras (por ejemplo, secuencias que funcionan para organizar la cromatina y bloquear los efectos de largo alcance de promotores y/o potenciadores). La optimización mediante codones y otros tipos de optimización de secuencias son habituales en la técnica y los expertos entenderán fácilmente cómo realizar tales optimizaciones.

30

35

En algunas realizaciones, en las que la primera secuencia heteróloga se encuentra bajo el control de un promotor MLP, la primera secuencia heteróloga no está optimizada mediante codones, es decir, la primera secuencia heteróloga es la secuencia natural del patógeno infeccioso. Por ejemplo, en una realización, el vector adenovírico comprende una primera secuencia heteróloga no optimizada mediante codones bajo el control de un promotor MLP adenovírico, donde el vector adenovírico tiene capacidad de replicarse y tiene una eliminación parcial de E3. En otra realización, el vector adenovírico se deriva de Ad4.

40

45

La primera secuencia heteróloga se inserta en una eliminación parcial de E3. La presente solicitud también desvela la inserción de la primera secuencia heteróloga en una diversidad de ubicaciones diferentes en el vector adenovírico, incluyendo las regiones E1, E2, E3, E4, L3 y L5 o el límite E4-ITR, una región E1, E2B, E3, L3, o L5, o un límite E4-ITR. En otras realizaciones, un sitio de inserción de la región E3 adecuado está ubicado aguas abajo de la secuencia señal de poli A E3B. Un sitio de inserción de región L3 adecuado está ubicado aguas abajo del gene de la proteasa L3 23k (por ejemplo, el gene de la proteasa 23k de un vector Ad5, o la secuencia equivalente en cualquier otro vector adenovírico). El sitio preciso de inserción dentro de las regiones o límites adenovíricos puede seleccionarse de tal forma que la primera secuencia heteróloga se encuentre bajo el control de o unida operativamente a una o más secuencias de control transcripcionales y/o traduccionales adenovíricas endógenas. Como alternativa, o adicionalmente, el sitio preciso de inserción puede seleccionarse para minimizar cualquier impacto sobre la capacidad del vector adenovírico recombinante resultante de replicarse en células mamíferas (por ejemplo, humanas).

50

55

Los vectores adenovíricos de la invención pueden comprender eliminaciones en el genoma adenovírico. Dichas eliminaciones pueden, por ejemplo, proporcionar espacio para la inserción de secuencias heterólogas (por ejemplo, una primera secuencia heteróloga) y ayudar a minimizar cualquier impacto de la inserción sobre la capacidad del vector adenovírico recombinante resultante de replicarse en células mamíferas (por ejemplo, humanas). El vector

5 adenovírico puede eliminarse en una cantidad de ubicaciones diferentes, incluyendo las regiones E1, E2, E3, E4, L3 y L5 o el límite E4-ITR. En ciertas realizaciones, el vector adenovírico se elimina en una región E1, E2B, E3, L3 o L5 o un límite E4-ITR. En otras realizaciones, el vector adenovírico se elimina en una región E3, una región L3 o un límite E4-ITR. El vector adenovírico se elimina en una región E3. La primera secuencia heteróloga se inserta en una eliminación parcial de E3.

10

En ciertas realizaciones, una eliminación en el vector adenovírico elimina uno o más marcos abiertos de lectura. Por ejemplo, pueden eliminarse uno, dos, tres o más marcos abiertos de lectura. Los marcos abiertos de lectura tienen una función conocida o desconocida. En ciertas realizaciones, la eliminación se encuentra en la región E3 y comprende la eliminación de uno, dos, tres o más ORF en la región E3 (por ejemplo, ORF de E3 con función

15 desconocida). La eliminación en una región E3 puede ser una eliminación parcial. Como alternativa, la eliminación en una región E3 puede ser una eliminación total. La figura 2 muestra eliminaciones parciales y totales ejemplares en la región E3 de Ad4. La eliminación de ejemplo parcial de E3 de Ad4 quita los ORF 24,8 k, 6,3 k y 29,7 k, todos los cuales actualmente no tienen función conocida, mientras que la eliminación total de E3 de Ad4 quita los ORF 23,3 k, 19 k, 24,8 k, 6,3 k, 29,7 k, 10,4 k, 14,5 k y 14,7 k. Una eliminación parcial de E3 alternativa quita los ORF

20 24,8 k, 6,3 k, 29,7 k, 10,4 k, 14,5 k y 14,7 k.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el vector adenovírico de la invención es un vector Ad4 que comprende una eliminación de uno o más (por ejemplo, todos) los ORF 24,8 k, 6,3 k y 29,7 k de E3. En realizaciones relacionadas, el vector adenovírico es un vector Ad4 que comprende una eliminación que corresponde a nucleótidos de

25 aproximadamente 28.446 a aproximadamente 30.226 de la secuencia de GenBank AY594254. En otras realizaciones, el vector adenovírico de la invención es un vector Ad4 que comprende una eliminación en la región E3 pero conserva uno o más ORF de E3 seleccionado del grupo que consiste en 23,3 k, 19 k, 24,8 k, 6,3 k, 29,7 k, 10,4 k, 14,5 k y 14,7 k (por ejemplo, pueden conservarse los ORF 23,3 k y 19 k, pueden retenerse los ORF 10,4 k, 14,5 k y 14,7 k o pueden conservarse los ORF 23,3 k, 19 k, 10,4 k, 14,5 k y 14,7 k). En realizaciones relacionadas, el vector

30 adenovírico es un vector Ad4 que comprende una eliminación que corresponde a nucleótidos de aproximadamente 28.446 a aproximadamente 31.282 o de aproximadamente 17.356 a aproximadamente 30.226 de la secuencia de GenBank AY594254. Aún en otras realizaciones, el vector adenovírico de la invención es un vector Ad4 que no conserva ninguno de los ORF de E3 del grupo que consiste en 23,3 k, 19 k, 24,8 k, 6,3 k, 29,7 k, 10,4 k, 14,5 k y 14,7 k. En ciertas realizaciones relacionadas, el vector adenovírico es un vector Ad4 que comprende una eliminación

35 que corresponde a nucleótidos de aproximadamente 27.356 a aproximadamente 31.282 de la secuencia de GenBank AY594254.

En ciertas realizaciones, un ORF se considera como eliminado incluso si una parte de las secuencias de ácido nucleico que comprenden el ORF permanece presente en el vector adenovírico (es decir, incluso si el ORF se

40 elimina sólo parcialmente). En ciertas realizaciones, la expresión de un ORF parcialmente eliminado puede eliminarse mediante manipulación adicional de la secuencia del ORF. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, puede eliminarse el codón de inicio del ORF. En ciertas realizaciones, una eliminación parcial o total de la región E3 de Ad4 da como resultado una eliminación parcial del ORF 23,3 k de E3. En ciertas realizaciones, un vector Ad4 que tiene un ORF 23,3 k de E3 parcialmente eliminado comprende además una mutación que quita el codón de inicio del ORF

45 23,3 k de E3 (por ejemplo, una mutación en el codón ATG presente en la posición 27279 de la secuencia GenBank AY594254).

Aún en otras realizaciones, los vectores adenovíricos de la invención pueden comprender una eliminación parcial en la región E3 que corresponde a la región ADP del genoma Ad5 (por ejemplo, la región entre el ORF pg19k de Ad5

50 E3 y el ORF RID-alfa de Ad5 E3). Por ejemplo, la eliminación parcial de E3 de Ad4 mostrada en la figura 2 corresponde a una eliminación de la región ADP de la región E3 de Ad5. De manera similar, la región que se encuentra entre el ORF 18,3 k de Ad7 E3 (es decir, la región que comprende los ORF 20,1 k, 20,6 k y 7,7 k de Ad7 E3) corresponde a la región ADP de la región E3 de Ad5. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente qué regiones en un vector adenovírico, de un serotipo que no sea Ad4 o Ad7, corresponden a la región ADP de Ad5.

55

Una primera secuencia heteróloga puede insertarse en una eliminación en el vector adenovírico (por ejemplo, una eliminación como se ha descrito anteriormente). Como alternativa, la primera secuencia heteróloga puede insertarse en el vector adenovírico en una ubicación próxima a la eliminación (por ejemplo una eliminación como se ha descrito anteriormente). La primera secuencia heteróloga se inserta en una eliminación parcial de E3 (por ejemplo, una

eliminación parcial de E3 en un vector Ad4). También se desvelan vectores adenovíricos donde la primera secuencia heteróloga se inserta en una eliminación total de E3 (por ejemplo, una eliminación total de E3 en un vector Ad4) o en una región próxima a una eliminación parcial o total de E3 (por ejemplo, entre la secuencia señal de poli A de E3B una secuencia aguas abajo, tal como el gene de fibra L5 o el exón U). En ciertas realizaciones, la primera secuencia heteróloga se inserta en una eliminación parcial de E3 de tal forma que se encuentre bajo el control de un promotor endógeno (por ejemplo, un LTP). Se desvela en el presente documento, una primera secuencia heteróloga que comprende un promotor exógeno y, opcionalmente, otras secuencias de control transcripcionales o traduccionales y se inserta en una eliminación parcial o total de E3. También se desvela una primera secuencia heteróloga que no está integrada a un ORF que codifica una proteína adenovírica. Como se usa en el presente documento en este contexto, el término "integrado" significa que una secuencia heteróloga se inserta en un ORF adenoviral de tal forma que la secuencia resultante codifica una proteína quimérica, donde parte de la proteína quimérica está codificada por el ORF adenovírico y parte de la proteína quimérica está codificada por la secuencia heteróloga.

Un vector adenovírico de la invención comprende una primera secuencia heteróloga que se encuentra bajo el control de un promotor adenovírico, es decir, el promotor tardío principal, donde la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno de la influenza, *Bacillus*, VIH, VPH, togavirus (por ejemplo, virus de la fiebre del dengue), *Shigella*, *Mycobacterium*, *Streptococcus* o *Plasmodium*. En una realización, la primera secuencia heteróloga codifica el antígeno H1 HA, H3 HA, H5 HA o B HA de la influenza. En otra realización, la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno protector o un antígeno protector modificado de *Bacillus anthracis*. En otra realización, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína de envoltura (por ejemplo gp160, gp140, gp120), proteína de envoltura modificada o proteína gag del VIH. Aún en otra realización, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína L1, proteína L2, proteína E6, proteína E7 o fusiones de las mismas del VPH incluyendo VPH16 y VPH18. Aún en otra realización, la primera secuencia heteróloga codifica CSP, Pfs48/45, MSP1, MSP (C-terminal, p42) o LSA1 de *Plasmodium*. En algunas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica Ag85, ESAT, HspX o combinaciones de los mismos de *Mycobacterium*. En otras realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica PSSP, proteína r56Karp o una proteína de invasión (por ejemplo, una proteína IpaB, IpaC o IpaD) de *Shigella*. En realizaciones adicionales, el vector adenovírico puede comprender además una secuencia líder tripartita adenovírica. Por ejemplo, la primera secuencia heteróloga puede encontrarse bajo el control de un MLP adenovírico y líder tripartito, donde la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno de la influenza, *Bacillus*, VIH, VPH, togavirus (por ejemplo, virus de la fiebre del dengue), *Shigella*, *Mycobacterium*, *Streptococcus* o *Plasmodium*.

Un vector adenovírico desvelado en el presente documento puede comprender una primera secuencia heteróloga que se encuentra bajo el control de un promotor no adenovírico (por ejemplo, un promotor de CMV, promotor RSV LTR, promotor SV40, promotor DHFR, promotor de β -actina, promotor PGK, el promotor EF1 α), donde la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno de la influenza, *Bacillus*, VIH, VPH, togavirus (por ejemplo, virus de la fiebre del dengue), *Shigella*, *Mycobacterium*, *Streptococcus* o *Plasmodium*. Por ejemplo, en una realización, la primera secuencia heteróloga se encuentra bajo el control de un promotor de CMV y codifica un antígeno de la influenza, *Bacillus* o VIH. En una realización particular, la primera secuencia heteróloga es una secuencia optimizada mediante codones de la influenza, *Bacillus* o VIH. En otra realización, la primera secuencia heteróloga es una secuencia nativa de influenza, *Bacillus* o VIH. En otra realización, la primera secuencia heteróloga codifica el antígeno H1 HA, H3 HA, H5 HA B HA, NP o M1 de influenza. En otra realización, la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno protector o un antígeno protector modificado de *Bacillus anthracis*. Aún en otra realización, la primera secuencia heteróloga codifica una proteína de envoltura (por ejemplo, gp160, gp140, gp120), proteína de envoltura modificada o proteína gag del VIH. En algunas realizaciones, el vector adenovírico puede comprender además una secuencia líder tripartita. Por ejemplo, la primera secuencia heteróloga puede encontrarse bajo el control de un promotor de CMV y líder tripartito adenoviral, donde la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno de influenza, *Bacillus*, VIH, VPH, togavirus (por ejemplo, virus de la fiebre del dengue), *Shigella*, *Mycobacterium*, *Streptococcus* o *Plasmodium*.

En ciertas realizaciones, un vector adenovírico de la invención comprende una segunda secuencia heteróloga. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el vector adenovírico de la invención comprende tanto una primera secuencia heteróloga como una segunda secuencia heteróloga. Como alternativa, el vector adenovírico de la invención puede comprender una segunda secuencia heteróloga en vez de la primera secuencia heteróloga.

La segunda secuencia heteróloga puede tener una estructura como se ha descrito anteriormente para la primera secuencia heteróloga y puede insertarse en el genoma adenovírico de cualquiera de cualquier manera que se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la segunda secuencia heteróloga puede codificar un antígeno de longitud completa o un fragmento del mismo (por ejemplo, un dominio, unidad(es) de estructura secundaria, un epítipo conservado, epítipos de linfocitos B, HTL o CTL o combinaciones de los mismos). En

algunas realizaciones, la segunda secuencia heteróloga codifica una proteína terapéutica, tal como una citocina o factor de crecimiento u otra proteína que estimule el sistema inmune. Por ejemplo, en una realización, la segunda secuencia heteróloga codifica una proteína que estimula a los leucocitos, tal como un factor de estimulación de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF). En algunas realizaciones, la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno de un patógeno infeccioso y la segunda secuencia heteróloga codifica una proteína terapéutica. En una realización particular, la primera secuencia heteróloga codifica un antígeno de la influenza (por ejemplo, el antígeno H1 HA, H3 HA, H5 HA o B HA) y la segunda secuencia heteróloga codifica una proteína que estimula a los leucocitos (por ejemplo, GM-CSF). En ciertas realizaciones, la segunda secuencia heteróloga se inserta en la misma región del vector adenovírico que la primera secuencia heteróloga (por ejemplo, de tal forma que la primera y segunda secuencias heterólogas se ubiquen próximas entre sí). En otras realizaciones, la primera y segunda secuencias heterólogas se insertan en diferentes regiones del vector adenovírico.

La segunda secuencia heteróloga también puede integrarse en un ORF adenoviral. En ciertas realizaciones el ORF adenoviral codifica una proteína estructural adenovírica (por ejemplo, una proteína de la cápside, tal como una proteína hexón o proteína fibrosa). Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la segunda secuencia heteróloga se integra en un ORF del hexón adenovírico, donde la fusión resultante del ORF del hexón y las secuencias heterólogas codifican una proteína hexón quimérica. En otras realizaciones, la segunda secuencia heteróloga se integra en un ORF de fibra adenoviral, donde la fusión resultante del ORF de fibra y las secuencias heterólogas codifican una proteína fibrosa quimérica. En general, una proteína fibrosa o hexón quimérica conservará la función de fibra o hexón (por ejemplo, de los capsómeros hexones o fibras y contribuirá a la formación de cápsides) mientras que presenta nuevos antígenos de la superficie de los adenovirus resultantes. La presentación de nuevos antígenos de la superficie de adenovirus recombinantes de la invención es ventajosa porque ayuda a evitar problemas con la inmunidad preexistente del adenovirus en la población en general, lo cual puede reducir la eficacia de las vacunas basadas en adenovirus. Además, la presentación de antígenos de patógenos infecciosos en la superficie de los adenovirus recombinantes puede ampliar la respuesta inmunitaria estimulada por las vacunas basadas en adenovirus de la invención presentando una mayor variedad de antígenos de patógenos infecciosos al sistema inmune de un sujeto que toma la vacuna.

En algunas realizaciones, la segunda secuencia heteróloga codifica una proteína fibrosa de un serotipo adenovírico diferente y la segunda secuencia heteróloga reemplaza la secuencia que codifica la proteína fibrosa natural del adenovirus. Por lo tanto, el adenovirus recombinante resultante expresa fibras de otro serotipo adenovírico. Por ejemplo, en una realización, un adenovirus Ad5 expresa proteínas de fibra de un adenovirus Ad4, Ad7, Ad2, etc.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la segunda secuencia heteróloga se integra al ORF de una proteína estructural adenovírica (por ejemplo, una proteína de la cápside, tal como un hexón o proteína), donde la segunda secuencia heteróloga codifica un antígeno de un patógeno infeccioso. El patógeno infeccioso y el antígeno del mismo pueden ser como se ha descrito anteriormente. En ciertas realizaciones, el antígeno es de una proteína de superficie de influenza, tal como M2 (por ejemplo, un dominio, fragmento o epítipo externo de M2). En ciertas realizaciones, el antígeno M2 se selecciona del conjunto de secuencias de péptidos enumerados en la Tabla 4 (por ejemplo, la SEQ ID NO. 312, 318, 321 o 327). En ciertas realizaciones, la segunda secuencia heteróloga codifica más de una de las secuencias de péptidos M2 enumeradas en la Tabla 4. Por ejemplo, la segunda secuencia heteróloga puede codificar al menos dos secuencias M2 de cepas de la influenza H1, H2 y/o H3 (por ejemplo, al menos dos secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 312-317), cepas de la influenza H5 (por ejemplo, al menos dos secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 318-320), cepas de la influenza H7 (por ejemplo, al menos dos secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 321-326) o cepas de la influenza H9 (por ejemplo, al menos dos secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 327-335). Como alternativa, la segunda secuencia heteróloga puede codificar secuencias M2 de una pluralidad de diferentes serotipos de influenza (por ejemplo, al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 312-317, en combinación con al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 318-320, al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 321-326, al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 327-335, o cualquier combinación de las mismas). En otras realizaciones, la segunda secuencia heteróloga puede codificar una o más copias de una secuencia matriz de la influenza (por ejemplo, GAAAGILGFVFTLNAA - SEQ ID NO: 336) o secuencia NP de la influenza (por ejemplo, LELRSRYWAIRTRSGGNTNQQRAS - SEQ ID NO: 337). Aún en otras realizaciones, el antígeno de la influenza es un epítipo HTL o CTL. Por ejemplo, la segunda secuencia heteróloga puede codificar uno o más epítipos HTL seleccionados de las Tablas 1 o 13 o uno o más epítipos CTL seleccionados de las Tablas 2-3 y 5-12 o de la Tabla 14.

En otras realizaciones, la segunda secuencia heteróloga codifica una o más porciones de una proteína hexón

- adenoviral de un serotipo adenovirico para el cual la inmunidad preexistente (por ejemplo, en la poblaci3n humana) no es significativa. Por ejemplo, existe una inmunidad preexistente m3nima contra el serotipo adenovirico Ad35 en la poblaci3n humana. V3ase, por ejemplo, Vogels y col. (2003), J. Virology 77(15): 8263. Otros serotipos adenoviricos para los cuales existe una inmunidad preexistente m3nima, incluyen, por ejemplo, Ad11, Ad34, Ad43, Ad48, Ad50, Ad26, Ad28, Ad45 y Ad49. Los serotipos adenoviricos que tienen niveles levemente m3s altos, pero a3n bajos, de inmunidad preexistente incluyen, por ejemplo Ad22, Ad24, Ad36, Ad37, Ad38, Ad46, Ad47 y Ad10. Por lo tanto, una vacuna basada en adenovirus de la invenci3n puede derivarse, por ejemplo, de un serotipo Ad4, y puede comprender una segunda secuencia heter3loga que codifica uno o m3s fragmentos de una prote3na hex3n Ad35, de tal forma que el adenovirus recombinante codifica una prote3na hex3n que es quim3rica para las secuencias Ad4 y Ad35. Como alternativa, una vacuna basada en adenovirus de la invenci3n puede derivarse, por ejemplo, de un serotipo Ad25, y puede comprender una segunda secuencia heter3loga que codifica uno o m3s fragmentos de una prote3na hex3n Ad68, de tal forma que el adenovirus recombinante codifica una prote3na hex3n que es quim3rica para las secuencias Ad25 y Ad68. Por supuesto que la preocupaci3n sobre la inmunidad preexistente depende de la poblaci3n diana para la enfermedad - si un serotipo adenovirico particular est3 asociado o no a la inmunidad preexistente en la poblaci3n diana depender3 de la poblaci3n diana. Los expertos en la t3cnica pueden evaluar r3pidamente este problema y seleccionar en consecuencia secuencias de hexones apropiadas para la segunda secuencia heter3loga. La integraci3n de las secuencias heter3logas en prote3nas estructurales adenoviricos tales como hex3n ha sido descrita, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 6.127.525.
- 20 En ciertas realizaciones, la segunda secuencia heter3loga se integra en una porci3n de un ORF del hex3n que codifica una regi3n hipervariable (HVR). Por ejemplo, la segunda secuencia heter3loga puede integrarse como una inserci3n o de tal forma que reemplace todo el ORF que codifica la HVR del hex3n o una porci3n del mismo. Cualquier HVR del hex3n puede alterarse o reemplazarse de esta manera. En ciertas realizaciones, la segunda secuencia heter3loga se integra en (y, opcionalmente, reemplaza) la regi3n codificante de HVR5 del hex3n. En otras realizaciones, la segunda secuencia heter3loga se integra en (y, opcionalmente, reemplaza) la regi3n codificante de HVR1, HVR2 o HVR4 del hex3n. La selecci3n de cu3l HVR alterar puede basarse en la diversidad relativa de las diferentes HVR. Por ejemplo, la HVR5 de Ad5 tiene la mayor diversidad para las HVR del hex3n de Ad5. A3n en otras realizaciones, m3s de una HVR del hex3n puede tener una inserci3n o sustituci3n. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la segunda secuencia heter3loga codifica un fragmento quim3rico de la regi3n codificante del hex3n donde al menos dos de las regiones codificantes de HVR tienen inserciones o se han reemplazado. Como se ha analizado anteriormente, la segunda secuencia heter3loga puede codificar ant3genos de pat3genos infecciosos y/u otros serotipos de adenovirus. Por consiguiente, una o m3s de las HVR del hex3n pueden contener una inserci3n de un ant3geno de un pat3geno infeccioso o puede reemplazarse por tal ant3geno o una HVR de otro serotipo de adenovirus. En ciertas realizaciones, una o m3s de las HVR del hex3n pueden contener una inserci3n o un ant3geno o pueden reemplazarse por tal ant3geno, mientras que una o m3s de las otras HVR del hex3n puede reemplazarse por una HVR de otro serotipo de adenovirus (por ejemplo, un serotipo para el cual existe una inmunidad preexistente m3nima en la poblaci3n diana). Un diagrama esquem3tico de construcciones de hex3n quim3ricas que pueden usarse en los vectores adenoviricos de la invenci3n se muestra en la figura 13.
- 40 Los expertos en la t3cnica pueden identificar f3cilmente los l3mites de las HVR del hex3n. Las HVR del hex3n han sido identificadas, por ejemplo, para el hex3n de Ad5. V3ase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 6.127.525. Por consiguiente, la alineaci3n de las prote3nas hex3n de otros serotipos con el hex3n de Ad5 puede usarse para identificar las HVR del hex3n en dichos otros serotipos. Como alternativa, la alineaci3n de las prote3nas hex3n de un conjunto diverso de serotipos de adenovirus puede usarse para identificar l3mites de HVR. Por ejemplo, para Ad4 los l3mites de HVR corresponden a los residuos amino3cidos 136-172 (HVR1), 192-208 (HVR2), 227-235 (HVR3), 268-278 (HVR4), 300-305 (HVR5), 329-334 (HVR6) y 442-480 (HVR7-9) de la secuencia del hex3n L5 de la secuencia GenBank AY594254.
- 50 La cantidad de secuencia que puede insertarse en una 3nica HVR del hex3n depende de la HVR particular (por ejemplo, HVR1, HVR2, etc.) y de la longitud de la HVR. En general, la inserci3n puede codificar una secuencia de polip3ptidos que corresponde a la longitud de la secuencia de polip3ptidos de HVR (si se est3 reemplazando la secuencia de HVR) adem3s de 0 a 75, 1 a 70, 2 a 65, 3 a 60, 4 a 55 o 5 a 50 amino3cidos adicionales. Las inserciones de HVR del hex3n se han descrito, por ejemplo, para Ad5 en Matthews y col. (2008), Virology Journal 5: 98.
- 55 Las secuencias que codifican ant3genos de pat3genos infecciosos pueden reemplazar las HVR del hex3n de tal forma que las secuencias del hex3n y las secuencias del ant3geno est3n adyacentes entre s3. Como se usa en el presente documento en este contexto, el t3rmino "adyacente" se refiere a una fusi3n dentro del marco entre las secuencias codificadoras del hex3n y las secuencias codificadoras del ant3geno donde no existe una secuencia

enlazadora que conecte las secuencias del hexón y del antígeno. Como alternativa, una secuencia enlazadora puede usarse para conectar las secuencias del hexón y del antígeno. En ciertas realizaciones, la secuencia enlazadora es una secuencia que codificada el tripéptido "LGS". La secuencia enlazadora puede incluirse, por ejemplo, al principio y al final de la secuencia del antígeno, como se muestra en la figura 12. Sin intención de limitarse por la teoría, se cree que las secuencias enlazadoras LGS proporcionan flexibilidad estructural, mejoran la estabilidad de la proteína de fusión hexón resultante y/o reducen la inmunogenicidad de las uniones entre las secuencias de la proteína hexón y las secuencias de proteína codificadas por la secuencia heteróloga. En otras realizaciones, la secuencia enlazadora codifica la secuencia peptídica "GAAA" (SEQ ID NO: 352) o "NAA". Dichas secuencias enlazadoras pueden usarse en combinación, por ejemplo, con la secuencia GAAA en el extremo N-terminal y la secuencia "NAA" en el extremo C-terminal de la proteína codificada por la secuencia heteróloga. Otras secuencias enlazadoras apropiadas pueden identificarse por los expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, un vector adenovírico de la invención comprende una tercera secuencia heteróloga. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el vector adenovírico de la invención comprende una primera, segunda y tercera secuencia heteróloga. Como alternativa, el vector adenovírico de la invención puede comprender una segunda y una tercera secuencia heteróloga. La tercera secuencia heteróloga puede tener una estructura como se ha descrito anteriormente para la primera secuencia heteróloga o la segunda secuencia heteróloga y puede insertarse en el genoma adenovírico de cualquier manera que se ha descrito anteriormente.

Los vectores adenovíricos de la invención pueden derivarse de cualquier serotipo adenovírico o aislado conocido en la actualidad o descubierto posteriormente. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el vector adenovírico se deriva de un serotipo Ad4. En otras realizaciones, el vector adenovírico se deriva de un serotipo Ad7. Aún en otras realizaciones, el vector adenovírico se deriva de un serotipo Ad2, Ad3, Ad4, Ad5, Ad6, Ad7, Ad11, Ad20, Ad21, Ad22, Ad23, Ad24, Ad25, Ad26, Ad28, Ad34, Ad35, Ad40, Ad41, Ad48, Ad49 o Ad50. En ciertas realizaciones, el vector adenovírico se deriva de un adenovirus de chimpancé. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el vector adenovírico deriva de un Ad C1, Ad C3, Ad C6, Ad C7 o Ad68.

Los vectores adenovíricos de la invención pueden variar en tamaño del tamaño correspondiente (es decir, tamaño del genoma) del adenovirus de tipo silvestre del cual se deriva el vector. Sin embargo, en general, las variaciones de tamaño se asocian a replicas de adenovirus defectuosas. Por ejemplo, la eliminación de grandes porciones del genoma del adenovirus puede conducir a la eliminación de las regiones genómicas necesarias para la replicación y función virales apropiadas. Como alternativa, añadir grandes inserciones puede dar como resultado un genoma que es muy grande para envasarlo eficazmente en la cápside del adenovirus, también interrumpiendo, por lo tanto, la replicación y función virales apropiadas. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los vectores adenovíricos de la invención tienen una longitud de aproximadamente el 95 % a aproximadamente el 110 %, de aproximadamente el 97 % a aproximadamente el 105 %, de aproximadamente el 99 % a aproximadamente el 103 %, de aproximadamente el 99,5 % a aproximadamente el 102 %, o de aproximadamente el 100 % a aproximadamente el 101 % del largo del genoma del adenovirus de tipo silvestre del cual se derivó el vector. En otras realizaciones, los vectores adenovíricos de la invención tienen una longitud de aproximadamente 34.000 pb a aproximadamente 38.000 pb, de aproximadamente 34.500 pb a aproximadamente 37.500 pb, de aproximadamente 35.000 pb a aproximadamente 37.000 pb, de aproximadamente 35.500 pb a aproximadamente 36.500 pb, de aproximadamente 35.750 pb a aproximadamente 36.250 pb o de aproximadamente 36.000 pb.

Independientemente de las alteraciones específicas que se hayan introducido (por ejemplo, la cantidad y tipo de las secuencias heterólogas, la cantidad y tipo de las eliminaciones, etc.), típicamente, los vectores adenovíricos de la invención son capaces de replicarse. La expresión "capaz de replicarse" se refiere a la capacidad que tiene un vector adenovírico de replicarse dentro de un sujeto. En ciertas realizaciones, los vectores adenovíricos capaces de replicarse de la invención son capaces de replicarse dentro de un sujeto humano. En otras realizaciones, los vectores adenovíricos capaces de replicarse de la invención son capaces de replicarse dentro de un sujeto mamífero (por ejemplo, un animal de granja, tal como un cerdo, res, caballo, oveja, cabra, etc.; un animal de zoológico, tal como un león, tigre, elefante, rinoceronte, hipopótamo, jirafa, cebra, mono, simio, etc.; o un animal doméstico, tal como un perro, gato, conejo, cobaya, hámster, gerbo, rata, ratón, etc.). En ciertas realizaciones, el tamaño de ráfaga *in vitro* (por ejemplo, como se mide en un cultivo celular) de un vector adenovírico capaz de replicarse de la invención es al menos 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 7500, 10k, 15k, 20k, 25k, 30k, 35k, 40k, 45k, 50k, 75k, 100k, 150k, 200k, 300k, 400k o más. En otras realizaciones, el tamaño de ráfaga *in vivo* (por ejemplo, en un sujeto) de un vector adenovírico de la invención capaz de replicarse es al menos 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 7500, 10k, 15k, 20k, 25k, 30k, 35k, 40k, 45k, 50k, 75k, 100k, 150k, 200k, 300k, 400k o más. En ciertas realizaciones, los vectores adenovíricos de la invención capaces de replicarse son capaces de estimular una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta inmunitaria celular o ambas) en un sujeto. En ciertas

realizaciones, la respuesta inmunitaria incluye una respuesta mensurable (por ejemplo, una respuesta inmunitaria humoral o celular mensurable, o una combinación de las mismas) a un epítipo codificado por una secuencia heteróloga insertada o integrada al vector adenovírico. Los vectores adenovíricos de la invención capaces de replicarse son particularmente útiles para superar los problemas asociados a la inmunidad preexistente al adenovirus en sujetos diana. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una respuesta inmunitaria eficaz a un antígeno heterólogo puede inducirse en un sujeto con inmunidad preexistente al adenovirus con una dosis más baja de un vector adenovírico capaz de replicarse que expresa el antígeno heterólogo como se describe en la presente en comparación con una dosis de un vector adenovírico que es no capaz de replicarse que expresa el mismo antígeno. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una dosis eficaz de un vector adenovírico de la invención capaz de replicarse es dos, tres, cuatro, cinco o diez veces menor que una dosis eficaz de un vector adenovírico que no es capaz de replicarse.

Las técnicas para construir, manipular genéticamente y propagar vectores adenovíricos recombinantes se desvelan en los Ejemplos expuestos a continuación. Véase también, por ejemplo., el documento WO 2008/010864, la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2006/0115456 y la Patente de Estados Unidos n.º 6.127.525.

La presente invención proporciona vacunas que comprenden uno o más vectores adenovíricos de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "vacuna" se refiere a una composición que comprende un vector adenovírico de la invención y un vehículo. En ciertas realizaciones, el vector adenovírico es un virus. En otras realizaciones, el vector adenovírico es el genoma en solitario y no incluye la cápside adenovírica. En ciertas realizaciones, el vehículo es un adyuvante. Los ejemplos de dichos adyuvantes incluyen, pero sin limitación, sales, tales como fosfato de calcio, fosfato de aluminio, hidróxido de calcio e hidróxido de aluminio; polímeros naturales tales como glucanos algáceos (por ejemplo, beta glucanos), quitosán o inulina cristalizada; polímeros sintéticos, tales como poliálctidas, poliglicólidos, poliálctida-co-glicólidos o polímeros de metilacrilato; copolímeros de bloque catiónicos o no iónicos formadores de micelas o tensioactivos tales como Pluronic, L121, 122 o 123, Tween 80 o NP-40; ácido graso, vesículas basadas en lípidos o lípidos y proteínas tales como liposomas, proteoliposomas, ISCOM y estructuras acaracoladas; emulsiones estabilizadas mediante tensioactivos compuestas por aceites sintéticos o naturales y soluciones acuosas. En ciertas realizaciones, una vacuna de la invención, después de administrarse a un sujeto, es capaz de estimular una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta inmunitaria celular o ambas) en un sujeto. En ciertas realizaciones, la respuesta inmunitaria incluye una respuesta medible (por ejemplo, una respuesta inmunitaria humoral o celular mensurable, o una combinación de las mismas) a un epítipo codificado por una secuencia heteróloga insertada o integrada a un vector adenovírico de la vacuna. En ciertas realizaciones, una vacuna de la invención es capaz de proporcionar protección contra un patógeno infeccioso o contra cáncer. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la vacuna es capaz de estimular una respuesta inmunitaria contra uno o más antígenos (por ejemplo, codificados por una secuencia heteróloga) de tal forma que, al encontrar después dicho antígeno, el sujeto que recibe la vacuna tiene una respuesta inmunitaria que es más fuerte de lo que hubiese sido si la vacuna no se hubiese administrado previamente. En algunas realizaciones, una vacuna de la invención es capaz que proporcionar protección contra un patógeno infeccioso o cáncer en un sujeto con inmunidad preexistente al adenovirus. En otras realizaciones, una vacuna de la invención es capaz mejorar una infección patógena o cáncer y/o reducir al menos un síntoma de una infección patógena o cáncer. Por ejemplo, en una realización, la vacuna de la invención induce una respuesta inmunitaria terapéutica contra uno o más antígenos codificados por una secuencia heteróloga de tal forma que los síntomas y/o complicaciones de una infección patógena o cáncer sean aliviados, reducidos o mejorados en un sujeto que padece dicha infección o cáncer.

Los vectores adenovíricos usados para las vacunas pueden prepararse y formularse para su administración a un mamífero de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica. Las formulaciones para administración oral pueden consistir en cápsulas o comprimidos que contienen una cantidad predeterminada de un vector adenovírico recombinante de la invención; soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del fármaco disuelto en diluyentes ingeribles, tales como agua, solución salina, zumo de naranja y similares; suspensiones en un líquido apropiado; y emulsiones adecuadas.

Los vectores adenovíricos de la invención pueden, por ejemplo, formularse como cápsulas recubiertas entéricamente para administración oral, como se ha descrito anteriormente, para poder desviarse del tracto respiratorio superior y permitir la replicación viral en los intestinos. Véase, por ejemplo, Tacket y col., Vaccine 10: 673-676, 1992; Horwitz, en Fields y col., eds., Fields Virology, tercera edición, vol. 2, págs. 2149-2171, 1996; Takafuji y col., J. Infec. Dis. 140: 48-53, 1979; y Top y col., J. Infec. Dis. 124: 155-160, 1971. Como alternativa, los vectores adenovíricos pueden formularse en soluciones convencionales, tales como solución salina estéril y pueden incorporarse uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica puede

comprender adicionalmente otros agentes activos.

En ciertas realizaciones, las formulaciones de la invención comprenden una solución tamponada que comprende vectores adenovíricos (por ejemplo, virus) en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Puede usarse una variedad de vehículos, tales como solución salina tamponada, agua y similares. Dichas soluciones son generalmente estériles y libres de materia no deseable. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas o pueden filtrarse en condiciones estériles. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes tamponantes y ajustadores del pH, agentes para ajustar la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden contener un componente fisiológicamente aceptable que actúa, por ejemplo, para estabilizar la composición o para aumentar o disminuir la absorción del virus y/o composición farmacéutica. Los compuestos fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas con bajo peso molecular, composiciones que reducen la depuración o hidrólisis de cualquier agente co-administrado o excipiente u otros estabilizantes y/o tampones. Los detergentes también pueden utilizarse para estabilizar la composición o para aumentar o disminuir la absorción. El experto en la técnica apreciará que la elección de un vehículo farmacéuticamente aceptable, incluyendo un compuesto fisiológicamente aceptable, depende por ejemplo, de la vía de administración de la preparación adenoviral y de las características físico-químicas particulares de cualquier agente co-administrado.

Los vectores adenovíricos también pueden administrarse en una formulación lipídica, más particularmente formando un complejo con liposomas o a complejos de lípidos/ácido nucleico o encapsulados en liposomas. Los vectores de la invención actual, en solitario o en combinación con otros componentes adecuados, también pueden hacerse en formulaciones en aerosol para administrarse a través de inhalación. Las vacunas también pueden formularse para su administración a través de las fosas nasales. Las formulaciones adecuadas para administración nasal, donde el vehículo es un sólido, incluyen un polvo grueso con un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 micrómetros que se administra de la manera en que se inhala el rapé, es decir, mediante inhalación rápida a través de la fosa nasal desde un recipiente del polvo ubicado cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas donde el vehículo es un líquido para la administración como, por ejemplo, un atomizador nasal, gotas nasales o por administración por aerosol mediante nebulizador, incluyen soluciones acuosas u oleosas del principio activo. En algunas realizaciones, los vectores adenovíricos de la invención pueden formularse como supositorios, por ejemplo, para administración rectal o vaginal.

Las vacunas pueden tener una dosificación unitaria que comprende entre aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^{13} (por ejemplo, de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^4 , de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^5 , de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^6 , de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 , de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^8 , de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^9 , de aproximadamente 10^9 a aproximadamente 10^{10} , de aproximadamente 10^{10} a aproximadamente 10^{11} , de aproximadamente 10^{11} a aproximadamente 10^{12} , de aproximadamente 10^{12} a aproximadamente 10^{13}) adenovirus recombinantes en una dosis individual. Las dosificaciones pueden variar según la vía de administración. Por ejemplo, las vacunas formuladas para administración sublingual o intranasal pueden contener una dosificación menor de adenovirus por dosis individual que las vacunas formuladas para administración oral. Un experto en la técnica puede determinar la dosificación apropiada para un paciente particular dependiendo del tipo de infección o cáncer, y la vía de administración a usar sin experimentación indebida.

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para inducir una respuesta inmunitaria a cualquier patógeno infeccioso descrito en el presente documento en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una vacuna de la invención. En una realización, la divulgación proporciona un método de vacunación de un sujeto contra un patógeno infeccioso que comprende administrar una cantidad suficiente de una vacuna de la invención a un sujeto en riesgo de ser infectado por un patógeno infeccioso. En otra realización, el sujeto tiene una infección inducida por el patógeno infeccioso. Por lo tanto, por ejemplo, en una realización, la presente divulgación proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica en un sujeto que experimenta una infección inducida por un patógeno infeccioso. En algunas realizaciones, uno o más síntomas o complicaciones de la infección se reducen o alivian en el sujeto tras la administración de la vacuna. Las vacunas de la invención pueden usarse para vacunar sujetos humanos o animales.

Las vacunas de la invención pueden administrarse en solitario, o pueden co-administrarse o administrarse

secuencialmente con otras composiciones inmunológicas, antigénicas, de vacuna o terapéuticas. Dichas composiciones pueden incluir otros agentes para potenciar o ampliar la respuesta inmunitaria, por ejemplo, IL-2 u otras citocinas que pueden administrarse a intervalos de tiempo específicos o administrarse de manera continua (véase, por ejemplo, Smith y col., N Engl J Med 1997 Apr. 24; 336(17): 1260-1; y Smith, Cancer J Sci Am. 1997

- 5 Diciembre; 3 Suppl 1:S 137-40). Las vacunas o vectores también pueden administrarse conjuntamente con otras vacunas o vectores. Por ejemplo, un adenovirus de la invención puede administrarse ya sea antes o después de la administración de un adenovirus de un serotipo diferente. También puede usarse una preparación de adenovirus, por ejemplo, para el cebado en un régimen de vacunación usando un agente de vacuna adicional.
- 10 Las formulaciones adenovíricas pueden administrarse de forma sistémica, regional o local. La administración regional se refiere a la administración en un espacio anatómico específico, tal como intraperitoneal, intratecal, subdural, o a un órgano específico y similares. La administración local se refiere a la administración de una composición en un espacio anatómico limitado o circunscrito, tal como una inyección intratumoral en una masa tumoral, inyecciones subcutáneas, inyecciones intramusculares y similares. El experto en la técnica aprecia que la
- 15 administración local o regional también puede dar como resultado la entrada de la preparación viral en el sistema circulatorio. Las vías típicas de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, vía intradérmica, intramuscular o subcutánea. Otras vías incluyen la administración oral, incluyendo la administración a la mucosa oral (por ejemplo, amígdalas), vía intranasal, sublingual, intravesical (por ejemplo, dentro de la vejiga), rectal e intravaginal. Para la administración de adenovirus, frecuentemente la administración puede realizarse a través de inhalación. Las formulaciones en aerosol pueden, por ejemplo, colocarse en propulsores presurizados
- 20 farmacéuticamente aceptables, tales como diclorodifluoro-metano, nitrógeno y similares. También se pueden formular como fármacos para preparaciones no presurizadas, tal como en un nebulizador o un atomizador. Típicamente, dicha administración se encuentra en un tampón acuoso farmacéuticamente aceptable como se ha descrito anteriormente. También puede realizarse la administración al pulmón, por ejemplo, usando un broncoscopio.

- 25 Las vacunas de la invención pueden administrarse en una diversidad de formas de dosificación unitarias, dependiendo del uso deseado, por ejemplo, vacuna profiláctica o régimen terapéutico, y la vía de administración. En cuanto al uso terapéutico, la afección o enfermedad particular y la afección médica general de cada paciente influenciará el régimen de dosificación. La concentración del adenovirus en el excipiente farmacéuticamente
- 30 aceptable puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^{13} partículas de virus por dosis, entre aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{11} partículas de virus por dosis, entre aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{10} partículas de virus por dosis, entre aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^9 partículas de virus por dosis o entre aproximadamente 10^9 a aproximadamente 10^{11} partículas de virus por dosis. En otras realizaciones, la concentración del adenovirus en el excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo,
- 35 de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^9 , de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^8 , o de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^7 unidades infecciosas por dosis.

- Los vectores adenovíricos de la invención capaces de replicarse se administran típicamente en dosis mucho menores que las necesarias para lograr los niveles de expresión equivalentes del transgen codificado por un
- 40 adenovirus recombinante que no es capaz de replicarse administrado *in vivo*. Los vectores adenovíricos capaces de replicarse pueden administrarse en un intervalo de dosificaciones (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 4.920.209; Smith y col., J. Infec. Dis. 122: 239-248, 1970; Top y col., J. Infect. Dis. 124: 155-160, 1971; Takafuji y col., J. Infec. Dis. 140: 48-53, 1979; Tacket y col., Vaccine 10: 673-676, 1992). Por ejemplo, pueden administrarse de
- 45 10^4 a 10^9 dosis infecciosas de cultivo tisular al 50 % (o unidades formadoras de placas). Típicamente una dosificación oral para un adenovirus capaz de replicarse es de aproximadamente 10^7 de dosis infecciosas de cultivo de tejido al 50 % o 10^7 unidades formadoras de placas. En algunas realizaciones, una dosificación oral para un adenovirus capaz de replicarse es de aproximadamente 10^{11} unidades formadoras de placas. La administración intranasal típica de recombinantes de adenovirus se encuentra frecuentemente en dosificaciones de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^5 unidades formadoras de placas. La concentración exacta del virus, la
- 50 cantidad de la formulación y la frecuencia de administración también pueden ajustarse dependiendo de los niveles de, por ejemplo, expresión del transgen y retención del vector *in situ* después de una administración inicial *in vivo*.

- La cantidad y concentración del virus y la formulación de una dosis determinada, o una dosis "terapéuticamente eficaz" pueden determinarse por el médico. Una dosis terapéuticamente eficaz de una vacuna es una cantidad de
- 55 adenovirus que estimulará una respuesta inmunitaria en la proteína o proteínas codificadas por el ácido nucleico heterólogo incluido en el vector vírico. El programa de dosificación, es decir, el régimen de dosificación, dependerá de una diversidad de factores, por ejemplo, el estado general de salud del paciente, el estado físico, edad y similares. El estado de la técnica permite que el médico determine el régimen de dosificación para cada paciente individual. Los adenovirus han sido utilizados de manera segura durante muchos años para vacunas en humanos.

Véase, por ejemplo, Franklin y col., anteriormente; Jag-Ahmade y col., J. Virol., 57: 267, 1986; Ballay y col., EMBO J. 4: 3861, 1985; publicación PCT WO 94/17832. Estos ejemplos ilustrativos también pueden usarse como guía para determinar el régimen de dosificación cuando se pongan en práctica los métodos de la divulgación.

- 5 Las administraciones individuales o múltiples de las formulaciones adenovíricas pueden administrarse como vacunas profilácticas o terapéuticas. En una realización se administran múltiples dosis (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más o cinco o más dosis) a un sujeto para inducir o reforzar una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica. Las dos o más dosis pueden separarse en intervalos periódicos, por ejemplo, intervalos de una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses o seis meses.
- 10 En aún otro aspecto, la divulgación también proporciona kits que contienen los vectores, sistemas de vectores o vacunas de la invención. Los kits pueden, por ejemplo, contener también células para cultivar los adenovirus de la invención. Los kits también pueden incluir material instructivo que enseña las metodologías para generar adenovirus usando los kits y, para vacunas, pueden incluir instrucciones para la indicación de dosificaciones, vías y métodos de
- 15 administración, y similares.

Los siguientes ejemplos ilustran diversos aspectos de la presente invención. Por supuesto, los ejemplos deben considerarse como meramente ilustrativos de únicamente algunas realizaciones de la invención y no constituyen limitaciones para el alcance de la invención que se define por las reivindicaciones que se adjuntan al final de esta descripción.

20

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de vectores adenovíricos recombinantes

- 25 Se utilizó la recombinación homóloga en *E. coli* para producir de forma rápida y fiable vectores adenovíricos recombinantes. Como ejemplo, se aisló ADN vírico de Ad4 de tipo silvestre de un comprimido de Ad4 militar (del Lote n.º 4958221, Wyeth Labs, Licencia del Gobierno de Estados Unidos n.º 3) y se clonó mediante recombinación homóloga en un plásmido bacteriano capaz de replicarse en *E. coli*. El vector resultante se designó pPV-Ad4vax.
- 30 La construcción de inicio para el vector pPV-Ad4vax se creó mediante síntesis de genes sintéticos del brazo izquierdo de Ad4 de tipo silvestre e inserción del fragmento sintético en un plásmido bacteriano. El plásmido resultante se designó pPV-Ad4 Left Arm TM. Se proporcionó un polienlazador XbaI/EcoRI añadido en el extremo 3' del fragmento del gene sintético de Ad4 para permitir la inserción posterior del fragmento del brazo derecho de Ad4.
- 35 Véase la figura 1. El fragmento del brazo derecho de Ad4 se generó con PCR de alta fidelidad del ADN genómico de Ad4 aislado del comprimido militar de Ad4 y después se clonó en los sitios de polienlazador XbaI/EcoRI. El plásmido resultante, designado pPV-Ad4 RHT y LFT Arm TM, incluye los fragmentos de brazo izquierdo y derecho de Ad4 separados por sitios de restricción XbaI, ClaI y SpeI únicos. Véase la figura 1. Tras la linealización con XbaI y SpeI y la desfosforilación, el vector pPV-Ad4 RHT & LFT arm TM linealizado se co-transfectó con el ADN genómico de Ad4
- 40 de tipo silvestre en bacterias BJ1583 capaces de recombinación. Los clones se analizaron mediante digestión de enzimas de restricción antes de volver a transformarlos en células TOP10. La validación final de pPV-Ad4pax se realizó mediante secuenciación.

Las secuencias heterólogas y modificaciones del genoma Ad4 se introdujeron en el vector pPV-Ad4pax utilizando

45 plásmidos lanzadera. Los plásmidos lanzadera se diseñaron para contener una secuencia heteróloga flanqueada por suficiente ADN de Ad4 de tipo silvestre para permitir la recombinación homóloga entre el vector lanzadera y el pPV-Ad4vax. Las secuencias heterólogas incluían genes que codificaban la proteína verde fluorescente (GFP) y hemaglutinina de influenza (HA). Los genes de HA de longitud completa separados se sintetizaron artificialmente a partir de HA Bbn (secuencia GenBank EU199366 - "gen de hemaglutinina del segmento 4 del virus de Influenza A (A/Brisbane/10/2007 (H3N2), cds. completo"), HA VT/1203 (secuencia GenBank EF541403 - A/Vietnam/1203/2004(H5N1)), y HA VT/1194 (secuencia GenBank EF541402 - A/Vietnam/1194/2004(H5N1)). La recombinación homóloga entre el plásmido lanzadera y el pPV-Ad4pax dio como resultado la producción de vectores adenovíricos recombinantes que contenían las modificaciones deseadas. La identidad de los vectores adenovíricos recombinantes se confirmó mediante múltiples análisis de restricción de enzimas y secuenciación de ADN.

50

Ejemplo 2: Vectores adenovíricos recombinantes que expresan secuencias heterólogas bajo el control de una MLTU adenoviral

Para acomodar las secuencias heterólogas y soportar su expresión mediante una unidad de transcripción tardía

principal (MLTU) adenovírica, se generó una eliminación parcial en la región E3 del genoma Ad4. La eliminación parcial consistió en 1780 pares de base y se ubicó en las posiciones de nucleótidos 28446-30226 de la secuencia GenBank AY594254. La eliminación parcial se diseñó para conservar la función conocida de la región E3 mientras se quitaban tres marcos abiertos de lectura con función desconocida (E3 24,8 k, E3 6,3 k y E3 29,7 k). Véase la figura 2. La región eliminada es análoga a la región ADP de Ad5, aunque Ad4 no codifica un gene tipo ADP.

La expresión de varias secuencias heterólogas (por ejemplo, HA Bbn, HA VT/1194 o GFP) se unió a la MLTU adenovírica endógena clonando la secuencia heteróloga en la eliminación parcial de E3 de tal forma que la secuencia heteróloga se unió operativamente al aceptor de splicing nativo de E3 24,8 k para la expresión dirigida por MLP. El aceptor de splicing nativo de E3 24,8 k se encuentra cerca del consenso, por lo que la secuencia no requirió modificación. Para promover el inicio más fuerte de la traducción, la secuencia inmediatamente anterior al codón de inicio ATG de la secuencia heteróloga se optimizó a una secuencia Kozak de consenso. En los vectores víricos recombinantes resultantes puede producirse alguna expresión temprana de bajo nivel a través del promotor E3 endógeno en fases tempranas de la replicación vírica, pero la expresión se refuerza enormemente cuando el MLP se torna activo tras el inicio de la replicación del ADN en células infectadas. Para definir mejor el límite entre los productos génicos E3 tempranos y tardíos, se incorporó una pequeña pieza de ADN que comprendía 29 pb de la secuencia señal de poli A de E3A Ad5 aguas abajo de las secuencias heterólogas. Una secuencia potencialmente similar a la secuencia poli A de E3A Ad5 puede encontrarse más aguas abajo en Ad4 y puede ayudar a controlar la transcripción en las etapas tempranas y maximizar la expresión de las secuencias heterólogas.

Se enumeran diferentes vectores adenovíricos recombinantes que presentan expresión de secuencias heterólogas dirigida por MTLU en la Tabla 15. Para el vector Ad4-HA-Bbn, el tamaño del genoma es 22 pares de base más pequeño que la cepa militar de Ad4 de tipo silvestre, como se indica a continuación:

- a) -1780 pb Eliminación parcial con la región E3 (nucleótidos 28446-30226 de AY594254);
- b) +10 pb 5' adición de secuencias Kozak de consenso;
- c) +1701 pb gen HA de longitud completa (A/Brisbane/10/2007(H3N2))
- d) +18 pb polienlazador restante
- e) +29 pb secuencia señal de poli A de E3A Ad5

Tabla 15: Vectores adenovíricos recombinantes que expresan antígenos de influenza

Antígeno	Nombre del Virus	Cepa	Promotor	Gen ¹
H5HA	PXVX0116	A/Vietnam/1194/2004	CMV	Opt.
	PXVX0103	A/Vietnam/1194/2004	MLTU	Nativo
	PXVX0113	A/Vietnam/1194/2004	CMV	Nativo
	PXVX0117	A/Vietnam/1203/2004	CMV	Opt.
	PXVX0107	A/Vietnam/1203/2004	MLTU	Nativo
	PXVX0252	A/Anhui/1/2005	MLTU	Nativo
	PXVX0250	A/Egypt/2321/2007	MLTU	Nativo
	PXVX0251	A/Egypt/3300-NAMRU3/2008	MLTU	Nativo
	H3HA	PXVX0101	A/Brisbane/10/2007	MLTU
PXVX0102		A/Brisbane/10/2007	CMV	Opt.
PXVX0253		A/Perth/16/2009	MLTU	Nativo
BHA	PXVX0254	B/Brisbane/60/2008	MLTU	Nativo
H1HA	PXVX0201	A/California/05/2009	MLTU	Nativo
	PXVX0204	A/California/05/2009	CMV	Opt.
H1NP	PXVX0205	A/Texas/04/2009	MLTU	Nativo
	PXVX0206	A/Texas/04/2009	CMV	Nativo
H1M1	PXVX0207	A/California/08/2009	MLTU	Nativo
	PXVX0208	A/California/08/2009	CMV	Nativo

¹ Descripción del gen de secuencia nativa u optimizada por codón.

Ejemplo 3: Vectores adenovíricos recombinantes que expresan secuencias heterólogas bajo el control de un promotor exógeno

Se generó otro conjunto de vectores adenovíricos recombinantes donde las secuencias heterólogas de interés se integraron en el polienlazador de un casete de expresión que consistía en un promotor de CMV, una secuencia líder tripartita de Ad4, un polienlazador y una secuencia señal de poli A de la hormona de crecimiento bovino (BGH). Los

casetes de expresión resultantes se integraron en vectores Ad4 que contenían eliminación parcial o total de E3. La eliminación parcial de E3 fue como se ha descrito en el Ejemplo 2. La eliminación de E3 total consistió en 3926 pares de base, se ubicó en las posiciones de nucleótidos 27.356 a 31.282 de la secuencia GenBank AY594254, y comprendió adicionalmente una mutación en el codón de inicio ATG del ORF 23,3 k, que se eliminó únicamente de forma parcial. Véase la figura 2. Independientemente del tipo de eliminación de E3, los casetes de expresión se insertaron en el vector Ad4 entre la secuencia señal de poli A de E3 y el gen de fibra de L5. Véase la figura 2.

Se enumeran diferentes vectores adenovíricos recombinantes que presentan expresión de secuencias heterólogas dirigida por CMV en la Tabla 15. "Opt." se refiere a la optimización por codones de la secuencia del antígeno.

10

Ejemplo 4: Producción de adenovirus recombinantes

Los adenovirus recombinantes se crearon transfectando células A549 (MCB) con un fragmento de ADN lineal correspondiente a un genoma adenovírico recombinante. Los fragmentos de ADN lineal se escindieron para quitar todas las secuencias de plásmidos bacterianos extraños. Una vez se observó un efecto citopático en las células A549 (típicamente después de 7-10 días), los virus se cosecharon y se pasaron en serie para obtener un rendimiento más alto. Para asegurarse que la identidad del virus fuera correcta, el ADN vírico se aisló usando un protocolo Hirt modificado y se analizó mediante PCR, restricción digestiva y secuenciación de los insertos heterólogos y regiones flanqueantes. La secuencia confirmó que los insertos heterólogos y regiones flanqueantes eran correctas a nivel de nucleótidos.

20

Ejemplo 5: Expresión de secuencias heterólogas de adenovirus recombinantes

Las células A549 infectadas con adenovirus recombinantes se analizaron para determinar la expresión de secuencias heterólogas. La figura 4 muestra la expresión de la HA de cuatro adenovirus Ad4H5HA recombinantes diferentes: H5HA de A/Vietnam/1194/2004 bajo el control del promotor MLP endógeno (PVXV0103); H5HA de A/Vietnam/1194/2004 bajo el control del promotor de CMV (PVXV0113); H5HA de A/Vietnam/1203/2004 bajo el control del promotor de CMV, eliminación total de E3 (PVXV0114); y H5HA de A/Vietnam/1203/2004 bajo el control del promotor de CMV, eliminación parcial de E3 (PVXV0124). La figura 5 muestra la expresión de la HA del MLP endógeno del vector adenovírico PXVX0101 y de un promotor de CMV en el vector adenovírico PXVX0111. El análisis de PCR en tiempo real confirmó que los niveles de expresión de H3 HA del vector adenovírico PXVX0101 fueron similares a la fibra de proteína adenovírica distal. Véase la figura 6. Dos días después de la infección con estas construcciones, el antígeno de HA se encuentra presente en la superficie de las células A549 como se muestra en los resultados del FACS de la figura 7. De forma coherente con estos resultados, se mostró que las células A549 infectadas con PVXV0101 se aglutinaron con los glóbulos rojos. Véanse las figuras 9A y 9B. Al usar un ensayo de crecimiento de una etapa (figura 8A), PXVX0101 y PXVX0111 mostraron crecimiento de tipo casi silvestre en las células A549, HepG2 y HuTu80 (figura 8B).

35

Ejemplo 6: Integración de antígenos de influenza en las HVR del hexón de Ad4

40

La figura 10 representa una estrategia para generar vectores modificados a través del hexón. La estrategia depende de la incorporación de mutaciones silenciosas a la secuencia del hexón de Ad4 de tal forma que un fragmento de ADN que contiene las regiones HVR 1-6 puede reemplazarse en una única etapa. La estrategia incorpora sitios de clonación tanto XbaI como XhoI en la región codificante del hexón de Ad4. Después, cada fragmento XbaI/XhoI se genera mediante síntesis génica sintética. La figura 11 muestra la ubicación de los sitios de restricción en relación con las regiones HVR. Además, pueden usarse el sitio XhoI y un sitio BstXI endógeno para reemplazar HVR7 o HVR7-9, según sea necesario. Se diseñaron una serie de epítopos alrededor de la secuencia M2e de distintos virus de la influenza (véase la figura 12). Las secuencias proporcionan un consenso para las proteínas M2 de las cepas H5, H7 y H9 de la influenza. La M2E humana representa una secuencia de consenso para H1 y H3 M2e. Las secuencias espaciadoras se incluyen para posicionar las secuencias integradas de una manera inmunorreactiva óptima. Las secuencias están diseñadas para prevenir que los anticuerpos se eleven a los límites entre los epítopos. La figura 13 describe una serie de modificación de 17 hexones que puede generarse.

50

Ejemplo 7: El virus purificado Ad4-H5-Vtn de células A549 induce anticuerpos específicos de HA en ratones

55

La inmunogenicidad de los virus Ad4-H5-Vtn PXVX0103 y PXVX0116 purificados en ratones se ensayó como se muestra en la Tabla 16. Los controles fueron el virus Ad4 wt (control negativo) y la proteína H5 HA (control positivo).

Las células A549 se infectaron con los virus Ad4-H5-Vtn PXVX0103 (promotor MLTU) y PXVX0116 (promotor de

CMV). Los virus se aislaron posteriormente y se purificaron mediante cromatografía de intercambio iónico. Para cada grupo en los estudios de inmunogenicidad se usaron seis ratones hembra C57B1/6 x Balb/c F1 de entre 6 y 8 semanas de edad. Los ratones se inmunizaron una vez el Día 0 (cebado), después de nuevo el Día 14 (refuerzo) usando las titulaciones de dosis de 1×10^{10} , 1×10^9 , 1×10^8 vp/ratón y una vía de administración intramuscular (i.m.). Después de 10 y 27 días, se recogieron 0,2 ml de sangre por sangrado retro-orbital y los títulos de anticuerpo en suero se determinaron mediante ELISA con criterio de valoración de HA e inhibición de hemaglutinación (HAI).

En resumen, para el ensayo ELISA, se cubrieron placas ELISA de 96 pocillos con alta capacidad de unión con 1,5 ug/ml (5×10^9 partículas/ml) de adenovirus o 5 ug/ml de proteína HA purificada (Immune Technologies) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después, las placas ELISA se lavaron y se bloquearon con PBS + BSA al 3 % durante 2 horas. Se añadieron diluciones en serie de suero a las placas y se incubaron durante 2 horas. Después de un lavado riguroso, se detectaron anticuerpos en suero específicos de antígeno usando anticuerpo secundario acoplado a HRP. Las placas se desarrollaron con un reactivo de sustrato de HRP, se detuvieron con ácido y se midió la absorbancia en un lector de placas PolarStar a 450 nm. Las titulaciones de ELISA con criterio de valoración se expresan como el valor recíproco de la mayor dilución que proporciona una lectura de tres desviaciones estándar por encima del promedio inicial. En caso de titulaciones HAI, se permiten reaccionar diluciones en serie de suero con una dosis fija (4HAU) del virus de la influenza o una proteína HA seguido de la adición de RBC de pollo. En la presencia de un anticuerpo neutralizante, se inhibe la capacidad del virus de aglutinar los RBC. El título de HAI del anticuerpo es el recíproco de la última dilución de suero capaz de inhibir la aglutinación.

20

Tabla 16: Inmunógenos, dosis, vía

Grupos	Descripción	Partículas/Dosis	Volumen	Vía
1	Virus Ad4-H5-Vtn PXVX0103 ^{a,b}	1×10^{10}	0,1 ml	IM
2	Virus Ad4-H5-Vtn PXVX0103	1×10^9	0,1 ml	IM
3	Virus Ad4-H5-Vtn PXVX0103	1×10^8	0,1 ml	IM
4	Virus Ad4-H5-Vtn PXVX0116 ^c	1×10^{10}	0,1 ml	IM
5	Virus Ad4-H5-Vtn PXVX0116	1×10^9	0,1 ml	IM
6	Virus Ad4-H5-Vtn PXVX0116	1×10^8	0,1 ml	IM
7	Virus Ad4 wt	1×10^{10}	0,1 ml	IM
8	Proteína recombinante H5	5 µg	0,2 ml	SC

a) H5-Vtn (hemaglutinina (HA) de la cepa A/VietNam/1194/2004)
b) PXVX0103 - Ad4 con transgen HA dirigido por el promotor MLTU
c) PXVX0116 - Vector Ad4 con transgen HA dirigido por el promotor CMV

Como se muestra en la figura 14, A, B y C, los ratones inmunizados con una dosis alta (1×10^{10} vp) de virus Ad4-H5-Vtn (PXVX0103) purificado produjeron un título de anticuerpo específico de HA fuerte cuando se midió mediante ELISA de aproximadamente $2,5 \times 10^4$ y 7×10^4 después de una y dos inmunizaciones, respectivamente. Las respuestas específicas de HA inferiores pero significativas de aproximadamente $2,5 \times 10^3$ y 2×10^4 también se indujeron usando una dosis inferior del virus (1×10^9 vp) después de una y dos inmunizaciones, respectivamente. En la dosis viral más baja (1×10^8 vp) se observó una respuesta significativa de 8×10^3 título con criterio de valoración de anticuerpo después de dos inmunizaciones. Cuando el transgen H5 fue dirigido por CMV (PXVX0116) se indujeron respuestas de anticuerpo aproximadamente 3 veces mayores. Como es de esperarse, los ratones inmunizados con virus purificado wt Ad4 (1×10^{10} vp), que no contiene un transgen HA, no indujeron una respuesta de anticuerpo específica de HA detectable. Después de dos inmunizaciones, la proteína H5 indujo respuestas de criterio de valoración del anticuerpo HA de aproximadamente 7×10^4 . En cuanto a los títulos de HAI, los ratones inmunizados con 1×10^{10} vp de virus Ad4-H5-Vtn (PXVX0103) purificado produjeron un título de anticuerpo de HAI significativo de 1:20 y 1:40 tras una y dos inmunizaciones respectivamente. Tras la segunda inmunización, el Ad4-H5-Vtn (PXVX0103) en la dosis menor de 1×10^9 vp indujo una respuesta de HAI significativa de 1:20. Las respuestas específicas de HA no se detectaron para el virus wt Ad4. De nuevo, el Ad4-H5-Vtn (PXVX0116) indujo títulos de HAI aproximadamente 4 veces más grandes. La proteína H5 purificada indujo una respuesta significativa de 1:40 después de la segunda inmunización. Este resultado es coherente con el estudio usando células infectadas donde se demostró que se necesitaron dos inmunizaciones de proteína H5 purificada para inducir un título de anticuerpo HAI medible.

Estos estudios de inmunogenicidad usando virus Ad4-H5-Vtn purificados muestran que, a pesar de la falta de replicación viral en ratones, los virus entraron en células *in vivo* y el transgen se expresó de manera suficiente para inducir una respuesta de anticuerpos específica de H5.

Ejemplo 8: Evaluación de una vacuna de hemaglutinina H5 contra la influenza de adenovirus del serotipo 4 en ratones

Diseño de una vacuna contra H5HA de adenovirus del serotipo 4

5 El adenovirus recombinante Ad4-H5-Vtn (PXVX0103) descrito en el Ejemplo 7 se evaluó para determinar la seguridad, inmunogenicidad y eficacia como una vacuna en un modelo murino. Como se muestra en la figura 15, la vacuna Ad4H5HA se construyó con los genes de E3 24,8 K, 6,8 K y 29,7 K del virus Ad4 eliminados para alojar el gen HA del virus de la influenza A/VietNam/1194/2004 H5N1. El sitio del aceptor de splicing del gen de E3 24,8 K se
10 retuvo para dirigir la expresión del transgen HA. La secuencia codificante nativa de HA se utilizó sin el sitio de escisión polibásico. La secuencia señal de poliadenilación de E3A, derivada de Ad5, se puso aguas debajo de la secuencia codificante de HA. La secuenciación directa del ADN confirmó la integridad del transgen HA y las secuencias del vector flanqueantes. Una vez que se identificó y aisló el recombinante correcto, se dirigió con las enzimas de restricción apropiadas para quitar secuencias de plásmidos bacterianos extrañas, pero conservar el ADN
15 genómico de Ad4 recombinante completo que codifica el transgen HA.

Para producir el virus para su caracterización, se realizó una transfección de esta secuencia de ADN Ad4H5HA lineal en las células A549 de mamífero (ATCC, Manassas, VA). Un día antes de la transfección, se pusieron en placas 3 x 10⁵ de células A549 en cada pocillo de una placa de 6 pocillos (BD Biosciences San Jose, CA) en DMEM (Hyclone,
20 Logan, UT/suero fetal de ternero al 10 % (FBS) (Hyclone) y las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. El día siguiente las células tenían una confluencia del 50-90 % y se transfectaron posteriormente con 2 µg de ADN Ad4H5HA linealizado por pocillo usando el reactivo de transfección Fugene HD a 8 µl por pocillo según las instrucciones del fabricante (Roche, Indianápolis, IN). Una vez que se observó un efecto citopático (CPE), generalmente 7 a 10 días después de la transfección, el virus se cosechó de al menos 3 de los 6
25 pocillos desalojando las células infectadas usando raspadores de células de 16 cm (VWR, West Chester, PA) seguido de 3 ciclos de alteración celular mediante congelación-descongelación (nitrógeno líquido y un baño de agua a 37 °C). El lisado se aclaró mediante centrifugación a 4 °C a 1.800 g durante 10 minutos y se recogieron aproximadamente 6 ml de sobrenadante para un procedimiento de expansión vírica de dos etapas. Se usaron tres ml de sobrenadante para infectar 1,5 x 10⁶ de células A549 en suspensión en un matraz de 75 cm² (BD Biosciences)
30 con un volumen final de 15 ml de DMEM/FCS al 10 %. De 3 a 7 días después de la observación del CPE, se quitaron las células utilizando raspadores de células de 16 cm y se sometieron al procedimiento de congelación-descongelación y depuración para obtener el sobrenadante del virus.

Para evaluar la expresión de HA del virus recombinante Ad4H5HA se evaluó la expresión de la proteína HA
35 mediante citometría de flujo *in vitro*. Las células A549 se infectaron con una titulación de dosis de las partículas víricas (vp) de Ad4H5HA y se analizaron 48 h después usando un anticuerpo primario específico de H5 y uno secundario marcado con PE. Como se muestra en la figura 16A, las células A549 infectadas con la vacuna Ad4H5HA expresaron proteína HA de forma dependiente de la dosis. La intensidad de fluorescencia media (MFI) de la proteína HA detectada correspondiente a la dosis más alta de vacuna utilizada fue de aproximadamente 34,0 en
40 comparación con las células infectadas con Ad4wt utilizadas como control negativo donde se detectó una MFI de aproximadamente 2,0.

Para confirmar la inducción del virus recombinante Ad4H5HA de la proteína HA *in vitro* y para asegurar la expresión estable después de 15 pases en serie en células A549, se usó el análisis de Western blot. Se cosecharon las células
45 A549 infectadas con el virus recombinante Ad4H5HA y se prepararon extractos celulares completos. Se separaron cantidades variables de extractos celulares infectados mediante geles SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa. Se usó antisuero específico de H5HA para detectar la proteína HA mientras que el anticuerpo anti-β-actina se usó como un control de carga de proteína. Como se muestra en la figura 16B, la proteína HA derivada de lisados celulares infectados con el virus recombinante Ad4H5HA (2,5 y 5 %) se detectó en el tamaño apropiado, 80 kDa, con
50 respecto a los controles positivos de proteína (r)H5 recombinante purificada (100 y 200 ng). La proteína específica de HA no se detectó usando proteínas de células A549 no infectadas (2,5 y 5 %), control negativo. También se observaron bandas menores de fragmentos de HA1 y HA2 correspondientes a HA0 escindida en lisados de células A549 infectadas con Ad4H5HA. El análisis Western también confirmó que el virus recombinante Ad4H5HA expresó de manera estable H5HA incluso después de 15 pases en células A549. De forma coherente con estos resultados,
55 se mostró que las células A549 infectadas con PVXV0103 se aglutinaron con los glóbulos rojos. Véase la figura 17.

Eficacia del adenovirus recombinante Ad4H5HA como una vacuna

Para abordar la seguridad del virus recombinante, el crecimiento del virus Ad4H5HA con respecto al virus Ad4wt se

comparó en varias líneas celulares humanas; A549, H1299, HepG2, HuTu 80 y MRC-5. Aunque los virus Ad5 se pueden evaluar mediante metodología de ensayo de propagación, Ad4 no se comporta de forma similar y no lisa las células *in vitro* de forma rápida. Por lo tanto, se usó un ensayo de crecimiento tradicional de una etapa para evaluar la cinética del crecimiento (véase la figura 8A). El crecimiento del virus Ad4H5HA fue similar o atenuado en comparación con el virus Ad4wt. Véase la figura 18. Específicamente, al evaluar los puntos de tiempo de 48 y 72 horas después de la infección, las partículas infecciosas que se midieron después de la lisis celular fueron de 1,1 a 2,3 veces más altas para el virus Ad4wt frente al virus Ad4H5HA en 4 de las 5 líneas celulares ensayadas, figura 18. Para la quinta línea celular, H1299, las partículas infecciosas medidas para Ad4wt con respecto a Ad4H5HA fueron de 7 a 6,5 veces mayor para los puntos de tiempo de 48 y 72 horas, respectivamente. En ningún caso, el crecimiento del vector Ad4H5HA fue mayor que el virus Ad4wt.

La fase inicial del proceso de evaluación de inmunogenicidad y eficacia consistió en establecer la inmunidad preexistente al virus Ad4wt para evaluar el efecto en la potencia de la vacuna. Por lo tanto, se inmunizaron i.n. ratones con 1×10^9 vp de virus Ad4wt y un mes después se determinaron los títulos de anticuerpo neutralizante específicos de Ad4 y la inmunidad celular. Se recogió suero inmune de 10 ratones inmunizados y los títulos de anticuerpo neutralizante específico de Ad4 medidos variaron de 133 a 3140 con medias aritméticas y geométricas de 866 y 569, respectivamente, figura 19A. También se indujo inmunidad celular específica de Ad4 significativa. Se agruparon los esplenocitos no purificados de dos ratones y se usaron en un ensayo ELISPOT. Tras la incubación con el virus Ad4wt inactivado mediante calor se detectaron 140 células formadoras de manchas (SFC) IFN- γ por 1×10^6 esplenocitos de ratones inmunizados con Ad4wt frente a 18 SFC IFN- γ usando esplenocitos de ratones no inmunizados, figura 19B. Estos ratones y los ratones sin tratamiento previo sin inmunidad preexistente a Ad4wt se usaron posteriormente para inmunizaciones con la vacuna Ad4H5HA.

Se midieron títulos de anticuerpo de inhibición de hemaglutinina (HAI) significativos 6 semanas después de una única inmunización con la vacuna Ad4H5HA. Como se muestra en la figura 20A, se observó una respuesta a la dosis; 10^9 vp (40 HAI), 10^8 vp (20 HAI) y 10^7 vp (10 HAI). La menor dosis de vacuna, 10^6 vp, no fue inmunógena. Existió un efecto de la inmunidad preexistente a Ad4wt en la potencia de la vacuna por el cual se midió un título de anticuerpo de HAI de 20 en la dosis de 10^9 vp, pero las dosis menores no fueron inmunógenas. Tras la exposición al virus reagrupado H5N1, las respuestas de HA1 fueron típicamente más altas por una dilución, por ejemplo, 40 a 80 y 20 a 40 en la dosis de vacuna de 10^9 vp. De nuevo, la menor dosis de vacuna, 10^6 vp, no fue inmunógena. Para controles negativos y positivos de comparación, se inmunizaron ratones con 1×10^{10} vp de virus Ad4wt y 15 μ g de proteína H5HA recombinante, respectivamente. Como se esperaba, el virus Ad4wt no indujo una respuesta de título de anticuerpo HAI detectable. La proteína recombinante indujo respuestas de título de anticuerpo HAI antes y después de la exposición a la influenza de 10 y 20 títulos de anticuerpo HAI, respectivamente.

La inducción de inmunidad celular específica de H5HA de la vacuna se evaluó específicamente para un grupo de cuatro péptidos de 15 mer derivados de la proteína HA A/Vietnam/1194/2004, figura 20B. Los péptidos del grupo consistían en: HA.156, seq KSSFFRNVVWLIKKN (SEQ ID NO: 2); HA.241 seq RMEFFWTILKPNDAL (SEQ ID NO: 5); HA.325 seq NRLVLATGLRNSPQR (SEQ ID NO: 8); y HA.529 seq IYQILSIYSTVASSLALAI (SEQ ID NO: 338). Las respuestas de IFN- γ medidas fueron mayores de 80 SFC cuando los ratones se inmunizaron con dosis de 10^7 , 10^8 y 10^9 vp de la vacuna Ad4H5HA. La inmunidad preexistente a Ad4wt también afectó la inducción de inmunidad celular de la vacuna en que sólo la dosis de 10^9 vp de la vacuna Ad4H5HA fue inmunógena induciendo aproximadamente 100 SFC IFN- γ . Las respuestas celulares se aumentaron a los 5 días después de la exposición al virus reagrupado H5N1. En presencia o ausencia de la inmunidad preexistente a Ad4wt, las dosis de 10^7 , 10^8 y 10^9 vp de la vacuna Ad4H5HA indujeron entre 300 y 600 SFC IFN- γ . Cabe destacar que en el caso de inmunidad preexistente a Ad4wt y dosis de vacuna de 10^7 y 10^8 vp, las respuestas de IFN- γ mínimas de menos de 50 SFC se reforzaron a más de 500 SFC, sugiriendo que incluso las dosis de vacunas más bajas se cebaron para respuestas celulares. La dosis de 10^6 vp no fue inmunógena en ningún caso. Como controles de comparación, los ratones inmunizados con 15 μ g de proteína H5HA recombinante indujeron 80 y 680 SFC IFN- γ antes y después de la exposición al virus reagrupado H5N1. No se detectaron respuestas celulares específicas de HA significativas 5 días después de la exposición al virus en ratones inmunizados únicamente con el virus Ad4wt y expuestos posteriormente al virus reagrupado H5N1.

La pérdida de peso, la supervivencia y la reducción de los títulos del virus de la influenza pulmonar fueron dependientes de la dosis de la vacuna después de la exposición al virus reagrupado H5N1 letal. El peso de los animales se midió durante 14 días después de la exposición al H5N1 reagrupado, figura 21A. Si se registró que los animales habían perdido un 20 % o más de su peso original durante dos días seguidos, entonces se sometían a eutanasia. Típicamente, era necesario sacrificar a los animales los días 6-12 tras la exposición. En los animales sin

pre-tratamiento con virus Ad4wt se observó poca a ninguna pérdida de peso en las dosis de vacuna de 10^7 , 10^8 y 10^9 vp. En el caso del pre-tratamiento con Ad4wt, únicamente la dosis de vacuna alta de 10^9 vp impidió cualquier pérdida de peso. Se registró una pérdida de peso más grave en dosis de vacuna más bajas cuando los animales fueron pre-tratados con Ad4wt, dosis de vacuna de 10^8 vp (promedio máximo del 6 % de pérdida de peso) y dosis de 5 vacuna de 10^7 vp (promedio máximo del 17 % de pérdida de peso). Los animales que recibieron una dosis de vacuna de 10^6 vp no evitaron una pérdida de peso grave. Los ratones inmunizados con la proteína H5HA recombinante no perdieron peso, mientras que los ratones inmunizados con Ad4wt sucumbieron a la enfermedad.

La supervivencia de los ratones después de la exposición al virus reagrupado H4N1 letal se muestra en la figura 10 21B. Los grupos de ratones que recibieron 10^8 y 10^9 vp de la vacuna se encontraban totalmente protegidos, sobrevivieron 10 de los 10 ratones. El pre-tratamiento de los ratones con Ad4wt para establecer la inmunidad preexistente al vector no afectó a la supervivencia de los animales a estas dosis. Sin embargo, a dosis de vacuna más bajas de 10^7 y 10^6 vp, la vacuna no fue tan eficaz. La inmunidad preexistente al virus Ad4wt afectó a la dosis de vacuna de 10^7 vp en que sólo 3 de 10 ratones sobrevivieron en presencia de inmunidad específica de Ad4wt frente a 15 10 de 10 animales que sobrevivieron cuando los ratones no fueron pre-tratados con el virus Ad4wt. La menor dosis de vacuna de 10^6 vp no fue protectora. La inmunización con el virus Ad4wt no protegió a los animales, sobrevivieron 0 de 10. La inmunización de los ratones con la proteína H5HA recombinante protegió completamente a los ratones, sobrevivieron 10 de 10.

20 Por último, como medida de eficacia, se obtuvieron los pulmones de dos ratones que representaban a cada grupo 5 días después de la exposición al virus reagrupado H5N1 para evaluar la titulación del virus de la influenza, figura 21C. Se observó una reducción mayor del 85 % de la titulación del virus de la influenza en las dosis de vacuna Ad4H5HA más altas de 10^7 , 10^8 y 10^9 vp. Siendo la excepción la dosis de vacuna de 10^7 vp donde el grupo de animales se pretrató con Ad4wt lo que dio como resultado una reducción de la titulación del virus de la influenza de 25 aproximadamente 40 %, indicando de esta manera un efecto de inmunidad preexistente a Ad4wt en la potencia de la vacuna. No se observó ninguna reducción de la titulación del virus de la influenza cuando se inmunizó con una dosis de vacuna de 10^6 vp o con el control negativo de 10^{10} vp de Ad4wt. Los ratones inmunizados con la proteína H5HA recombinante también mostraron una reducción en el virus de exposición en los pulmones mayor a un 85 %.

30 En resumen, la inducción de la vacuna Ad4H5HA de inmunidad humoral y celular específica de H5HA generalmente predijo la eficacia de la vacuna. La inmunidad preexistente al vector Ad4wt tuvo un efecto tanto en la inmunogenicidad como la eficacia pero el efecto fue más pronunciado en las dosis de vacuna menores sugiriendo que la inmunidad preexistente al vector Ad puede superarse usando dosis de vacuna más altas.

35 **Ejemplo 9: El Ad4-H5-Vtn (PXVX0103) indujo respuestas inmunitarias al transgen HA H5 en mamíferos cuando se administró mediante múltiples vías**

Para evaluar la eficacia del adenovirus Ad4-H5 recombinante para inducir respuestas inmunitarias al administrarse mediante diversas vías de administración, se inmunizaron conejos con diferentes formulaciones que comprendían 40 partículas víricas de Ad4-H5-Vtn (PXVX0103) mediante una de cuatro vías de administración diferentes. La vacuna del virus Ad4-H5-Vtn se amplificó en células MRC-5 y se purificó para su uso en estudios en animales mediante cromatografía de intercambio de aniones y ultrafiltración. La sustancia del fármaco a granel (BDS) y cápsulas recubiertas entéricamente se produjeron en PaxVax, usando BDS adicional para la producción de polvos secados por pulverización en Niro (Copenhagen, Dinamarca). A continuación se describen los componentes de las diversas 45 formulaciones:

BDS en forma líquida:	5×10^{10} partículas víricas de Ad4-H5-Vtn, sacarosa, cloruro de magnesio hexahidrato, fosfato de potasio, glicerina
Polvo secado por aerosol:	5×10^{10} partículas víricas de Ad4-H5-Vtn, maltodextrina, beta ciclodextrina, sacarosa, cloruro de magnesio hexahidrato, fosfato de potasio, glicerina, tween 80
Polvo secado por pulverización, recubierto entéricamente:	5×10^{10} partículas víricas de Ad4-H5-Vtn, Eudragit L30D55, maltodextrina, beta ciclodextrina, sacarosa, cloruro de magnesio hexahidrato, fosfato de potasio, glicerina, tween 80
Cápsulas recubiertas entéricamente:	1×10^{10} partículas víricas de Ad4-H5-Vtn (por cápsula), Acry/EZE white, cápsulas de HPMC, maltodextrina, beta ciclodextrina, sacarosa, cloruro de magnesio hexahidrato, fosfato de potasio, glicerina, tween 80

Se inmunizaron conejos adultos machos blancos de Nueva Zelanda (3 por grupo) con 5×10^{10} vp usando una de las diferentes formulaciones de vacuna Ad4-H5-Vtn que se han descrito anteriormente; sustancia de fármaco a granel

(BDS), polvos recubiertos entéricamente (E.C.) y no recubiertos entéricamente (no E.C.) y cápsulas recubiertas entéricamente (5 cápsulas de 1×10^{10} vp/cápsula). Los animales se inmunizaron dos veces, con 30 días de diferencia. Se usaron múltiples vías de administración como se indica; intramuscular (I.M.), intranasal (I.N.), sublingual (S.L.) o alimentación forzada oral (O.G.). Los conejos se desangraron para los ensayos inmunes ELISA dos semanas después de la segunda inmunización. Siendo la excepción que los datos mostrados para la BDS administrada I.N. fueron de suero inmune tomado dos semanas tras únicamente una inmunización.

Las placas de ELISA se recubrieron con $2 \mu\text{g/ml}$ de proteína rHA purificada (eEnzyme) y se incubaron durante la noche a 4°C antes de lavarse y bloquearse con PBS con suero de cabra al 10 % durante 2 horas. Se generó una serie de dilución en serie de 3 veces de cada suero agrupado y se añadió a las placas antes de una incubación de dos horas. Después de un lavado riguroso, se detectaron anticuerpos de suero específicos del antígeno usando un anticuerpo secundario acoplado a HRP. Las placas se desarrollaron con un reactivo sustrato de HRP, se detuvieron con ácido y se midió la absorbancia a 450 nm. Los títulos del criterio de valoración se expresan como el valor recíproco de la dilución más alta que proporciona una lectura de tres desviaciones estándar por encima del promedio inicial. Los resultados muestran que la vacuna Ad4-H5-Vtn fue inmunógena en conejos al administrarse mediante diversas vías. Véase la figura 22.

En otra serie de experimentos, se examinó la eficacia de un adenovirus Ad4-H5 recombinante en la inducción de respuestas inmunitarias al administrarse mediante las vías de administración sublingual, vaginal y rectal. Los ratones se inmunizaron con partículas víricas de Ad4-H5-Vtn (PXVX0103) mediante administración sublingual, vaginal o rectal. Para la administración sublingual, los ratones anestesiados se inmunizaron el día 0 (cebado) y se reforzaron el día 43 (refuerzo) con 1×10^{10} de partículas víricas de Ad4-H5-Vtn en $7 \mu\text{l}$ de tampón de formulación de sustancia de fármaco a granel (BDS) colocados bajo la lengua y el volumen se dejó reposar, típicamente 1 minuto de tiempo de recuperación. Para la administración vaginal, cinco días antes de la inmunización, se administraron 2,5 mg de Depo-Provera S.C. para adelgazar la pared vaginal. Los ratones anestesiados se inmunizaron vaginalmente el día 0 (cebado) y se reforzaron el día 14 (refuerzo), quitando primero la mucosa con un hisopo y después administrando 1×10^{10} vp de Ad4-H5-Vtn en $20 \mu\text{l}$ de volumen de tampón de formulación de BDS a la vagina. Los ratones se mantuvieron mirando hacia arriba durante 10 minutos bajo anestesia. Para la administración rectal, los ratones anestesiados se inmunizaron por vía rectal el día 0 (cebado) y se reforzaron el día 14 (refuerzo) administrando 1×10^{10} vp de Ad4-H5-Vtn en $20 \mu\text{l}$ de tampón de formulación de BDS en el recto. Los ratones se mantuvieron mirando hacia arriba durante 10 minutos bajo anestesia. Todos los ratones se anestesiaron usando isoflurano y se les hizo ayunar quitándoles la comida la noche anterior a la inmunización.

Los ratones se desangraron 2-4 semanas tras la segunda inmunización (por ejemplo, inmunización de refuerzo) y se realizó el ensayo ELISA como se ha descrito anteriormente usando H5 recombinante (A/VN/1203/04). Los resultados muestran que la vacuna de la influenza Ad4-H5-Vtn (PXVX0103) induce respuestas específicas de H5HA significativas en los ratones al administrarse mediante las vías de administración sublingual, vaginal y rectal. Véase la figura 23.

40 **Ejemplo 10: Estudio de seguridad clínica de fase 1 para la vacuna Ad4-H5-Vtn**

Se inició un estudio de dosis ascendente controlado por placebo de doble ciego de fase uno. Se incluyeron secuencialmente cuatro cohortes de dosificación, 10^7 , 10^8 , 10^9 y 10^{10} partículas víricas (vp). Cada cohorte consiste en aproximadamente 24 receptores de vacunas y 8 de placebo y todos sus contactos familiares (HHC). En cada cohorte de dosificación, los receptores de vacuna o placebo reciben tres vacunas, con 56 días de diferencia (días 0, 56 y 112). Las mediciones de la función inmune incluyen anticuerpo con respecto a H5 HA mediante HAI y microneutralización; anticuerpo neutralizante Ad4; evaluación de IgG e IgA con respecto a HA y Ad4 en secreciones nasales, rectales y cervicales; y respuesta de Civil a HA y a Ad4. La replicación y la excreción del virus de la vacuna Ad4-H5-Vtn se evalúan mediante PCR y cultivo de hisopos rectales y de garganta y de sangre. Los parámetros inmunológicos y virológicos se analizan con estratificación mediante titulación de anticuerpo neutralizante Ad4 inicial. Actualmente se han incluido 132 receptores de vacuna/placebo y 67 HHC. Las cohortes 1-3 han recibido las tres dosis, la Cohorte 4 ha recibido su primera dosis. Actualmente, el Cohorte 4 está recibiendo la dosis 2 y la Cohorte 5 (10^{11} vp) se somete a inclusión.

Los parámetros de seguridad primarios son la reactogenicidad, eventos adversos graves o severos, y anomalías de laboratorio de seguridad clínica. Estos se han evaluado formalmente antes de cada una de las 5 revisiones del DMC, y se evalúan en "tiempo real" de forma continua. En la revisión más reciente del DMC, se revisaron los datos de seguridad posteriores a las tres administraciones de dosis de las Cohortes 1, 2 y 3, y posteriores a la primera dosis de la Cohorte 4. No se identificó ninguna preocupación por la seguridad o toxicidad limitante de la dosis. No hubo

anomalías de laboratorio significativas ni eventos adversos graves o severos. Generalmente la reactogenicidad se mantuvo de leve a moderada. Se detectó la pérdida del virus de la vacuna, controlado por PCR, en hisopos rectales en los días 7 y/o 14 tras la vacunación. No hubo evidencia de propagación sistémica o respiratoria del virus de la vacuna. Todos los hisopos de garganta y especímenes de sangre fueron negativos para el virus Ad4-H5-Vtn, excepto un único caso de un hisopo de garganta positivo para PCR de una vacuna (cuyos hisopos rectales y la sangre fueron negativos para PCR). La vacuna se mantuvo completamente asintomática. Basándose en estos datos, el DMC aprobó la administración de la dosis 2 a la Cohorte 4 y la inclusión de la Cohorte 5. El estado del anticuerpo Ad4 inicial para cada una de las cohortes en diferentes puntos de tiempo durante el estudio se muestran en la Tabla 17.

10

Tabla 17. Estudio de seguridad clínica de fase 1 de la vacuna Ad4-H5-Vtn

	Dosificación								
	10 ⁷ vp			10 ⁸ vp			10 ⁹ vp		
Estado del anticuerpo inicial de Ad4	Ad4 neg	Ad4 pos*	Todos	Ad4 neg	Ad4 pos	Todos	Ad4 neg	Ad4 pos	Todos
Posterior a la dosis 1	6/21 (29 %)	0/3 (0 %)	6/24 (25 %)	8/15 (53 %)	1/10 (10 %)	9/25 (36 %)	12/17 (71 %)	3/10 (30 %)	15/27 (56 %)
Posterior a la dosis 2	11/21 (52 %)	0/3 (0 %)	11/24 (46 %)	12/15 (80 %)	2/10 (20 %)	14/25 (56 %)	15/17 (88 %)	6/10 (60 %)	21/27 (78 %)
Posterior a la dosis 3	11/21 (52 %)	1/3 (33 %)	12/24 (50 %)	12/15 (80 %)	2/10 (20 %)	14/25 (56 %)	15/17 (88 %)	6/10 (60 %)	21/27 (78 %)

* La Cohorte 1 tuvo una anomalía estadística que dio como resultado un número inferior de pacientes positivos a Ad4.

Ejemplo 11: Construcción y evaluación de adenovirus recombinantes que expresan antígenos del ántrax

15 Se generaron virus Ad4 recombinantes con eliminaciones totales o parciales de la región E3 que expresaban un antígeno protector (PA) de *Bacillus anthracis* con métodos similares a los descritos en los Ejemplos 1-3. Las modificaciones del transgen del PA incluyeron modificación mediante codones para la expresión optimizada en células humanas, adición de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) para la expresión de la superficie celular y dos eliminaciones de fenilalanina para eliminar el sitio de escisión de termolisina. La expresión del transgen se dirigió por un promotor de CMV humano o MLTU nativo. En la Tabla 18 se enumeran diferentes vectores adenovíricos recombinantes que presentan expresión de secuencias heterólogas dirigida por CMV o por MTLU.

Tabla 18. Vectores adenovíricos recombinantes que expresan antígenos del ántrax

	Construcción	Transgen	Promotor
1	Ad4-FDE3-CMV-PA (PXVX0212)	PA optimizado por codones	CMV
2	Ad4-FDE3-CMV-PA-GPI (PXVX0214)	PA optimizado por codones con anclaje GPI	CMV
3	Ad4-PDE3-MLTU-PA-GPI	PA nativo con anclaje GPI	MLTU
4	Ad4-FDE3-CMV-PA-GPI	PA nativo con anclaje GPI	CMV
5	Ad4-FDE3-CMV-PAAFF	Sitio de escisión termolisina eliminado	CMV
6	Ad4-FDE3-CMV-PA-GPIAFF	Sitio de escisión termolisina eliminado	CMV

FDE3 = eliminación completa de la región E3 excepto para E3 12,1 k; PDE = eliminación parcial de la región E3.

25 Se analizaron células A549 (5×10^5) infectadas con $2,5 \times 10^7$ de adenovirus Ad4-PA recombinantes para detectar la expresión de antígeno protector. Las células se incubaron a 37 °C durante 48 horas antes de la recogida. Se analizó un lisado celular completo (figura 24, panel izquierdo) o sobrenadante de cultivo de células (figura 24, panel derecho) de cada muestra mediante análisis de Western blot tras la separación en gel SDS-PAGE. Se sondaron membranas de nitrocelulosa con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-PA. Se realizó la confirmación de la expresión de la proteína recombinante mediante referencia a un PA recombinante disponible en el mercado cargado en paralelo como un control positivo. Las A549 y A549 infectadas con Ad4 WT representan controles negativos, demostrando la especificidad a rPA. Los niveles de proteína se muestran como cantidades relativas por nivel total de proteínas. Véase la figura 24.

35 Un día después de la infección con estas construcciones, el antígeno PA se encontraba presente en la superficie de

las células A549 como muestra el análisis FACS presentado en la figura 25. La intensidad de fluorescencia media (MFI), que representa una medida de intensidad de fluorescencia que es una indicación del nivel de expresión por célula, se muestra para cada uno de los grupos. Se utilizó un ensayo de crecimiento de una etapa para evaluar la cinética del crecimiento de los adenovirus recombinantes PXVX0212 y PXVX0214 en células A549 (carcinoma de pulmón) y MRC-5 (fibroblasto de pulmón embrionario, diploide) (véase la figura 8A). Se midió la evolución temporal de los niveles de rAd4 mediante TCID₅₀ tras la infección con el virus rAd4-PA de células A549 o MRC-5. El tamaño de ráfaga de células se calculó mediante el uso del nivel mínimo de infectividad (1 hora para A549 y 24 horas para MRC-5) como referencia, corrigiendo así las diferencias en la infección. El tamaño de ráfaga confirma que tanto PXVX0212 como PXVX0214 muestran tasas reducidas de crecimiento en comparación con Ad4 Wt y también dan como resultado rendimientos por célula menores. Véase la figura 26.

Ejemplo 12: Eficacia del adenovirus recombinante Ad4-PA como una vacuna protectora contra la exposición al ántrax

15 Para determinar si el adenovirus recombinante que expresa antígeno protector (PA) de *B. anthracis* podría inducir una respuesta inmunitaria protectora contra la exposición al ántrax, se inmunizaron ratones con lisados celulares completos de células infectadas con uno de los vectores adenovíricos recombinantes descritos en el Ejemplo 11. Específicamente, se inmunizaron ratones (6 animales/grupo) mediante una inyección intraperitoneal (IP) de lisados celulares completos equivalentes a 5×10^6 células infectadas con 5×10^8 partículas víricas de Ad4 de tipo silvestre (Ad4 WT), Ad4-PA (PXVX0212) o Ad4-PA-GPI (PXVX0214). Se administraron 10 µg de antígeno protector recombinante (rPA) por vía subcutánea (S.C.) como control positivo. Cinco semanas después de la inmunización, los ratones se expusieron a una toxina letal por vía intravenosa (combinación de 120 µg de PA con 60 µg de factor letal (LF)) y se controlaron diariamente. Los resultados de los experimentos se muestran en la figura 27. Un lisado celular de Ad4-PA-GPI protegió completamente a los ratones contra la exposición a la toxina letal.

25 Las respuestas de los anticuerpos se midieron en los ratones inmunizados a partir de suero obtenido 21 días posteriores a la inmunización IP. Las respuestas de los anticuerpos se analizaron tanto con ELISA (figura 28, panel izquierdo) y ensayo de neutralización de toxina basado en macrófagos *in vitro* (figura 28, panel derecho). Se calculó un CE₅₀ de 6 animales/grupo. Las respuestas de IgG específicas para PA pudieron detectarse tres semanas después de la inmunización con lisado celular completo de células A549 infectadas con adenovirus recombinante.

En otra serie de experimentos, se examinó la eficacia del adenovirus recombinante purificado para inducir respuestas inmunitarias protectoras. Se inmunizaron ratones (n = 25/grupo) con uno de cinco antígenos diferentes (Ad4 de tipo silvestre, Ad4-CMV-PA (PXVX0212), Ad4-CMV-PA-GPI (PXVX0214), rPA y rPA + alumbre) el día 0 como se indica en el esquema de la figura 29. Los virus rAd4 se administraron por vía intranasal (I.N.) como 1×10^{10} de partículas víricas (vp) en 50-62,5 µl de PBS por animal. El virus Ad4 de tipo silvestre sirvió como control negativo. Los controles positivos, inyectados por vía subcutánea, en un volumen final de 100 µl de PBS contenían 10 µg de antígeno protector recombinante (rPA) en solitario o 10 µg de rPA adsorbido a 1 mg de gel de hidróxido de aluminio (Rehydragel HPA). Se midieron las respuestas inmunitarias mediadas por células (IFN-γ ELISPOT e IL-4 ELISPOT) 27 días posteriores a la inmunización en esplenocitos agrupados de 2 ratones/grupo. Se analizaron las respuestas inmunitarias celulares de los ratones que sobrevivieron a la exposición a la toxina #1 (20 días posteriores a la inmunización, n = 10/grupo) el día 54. Se desangraron los mismos 9 animales/grupo (5 grupos) tanto para los ensayos ELISA como de neutralización de toxinas después de 14 y 40 días de la inmunización. También se expusieron un total de 10 ratones por grupo, incluyendo 7 ratones de los 9 ratones que se desangraron, a una toxina letal (con una combinación de 120 µg de PA y 60 µg de factor letal) después de 46 días de la inmunización. La supervivencia se controló durante los 30 días posteriores a la exposición.

Se midieron las respuestas de los anticuerpos en suero a los 14 y 40 días posteriores a la inmunización intranasal con los virus Ad4-PA y Ad4-PA-GPI purificados (véase la figura 29). Las respuestas de IgG anti-PA se analizaron mediante ELISA (figura 30, paneles izquierdos), mientras que los anticuerpos neutralizantes de las toxinas (TNA) se midieron mediante un ensayo de neutralización de toxinas basado en macrófagos murinos *in vitro* (figura 30, paneles derechos). Se calculó el CE₅₀ mediante el uso de una curva de dosis-respuesta sigmoidal ajustada para los datos de la dilución en serie de las muestras. Se observó únicamente una respuesta mínima de IgG anti-PA y no se observaron respuestas medibles de TNA después de 14 días posteriores a la inmunización (figura 30). Después de 40 días posteriores a la inmunización, se observaron respuestas significativas de IgG anti-PA y TNA tanto con Ad4-PA (PXVX0212) como Ad4-PA-GPI (PXVX0214) en comparación con rPA o rPA con alumbre (figura 30). Ambos adenovirus PA recombinantes (virus Ad4-PA y Ad4-PA-GPI) indujeron respuestas inmunitarias comparables.

Se inmunizaron los ratones con uno de los cinco inmunógenos diferentes (n = 10/grupo) como se indica en la figura

29 el día 0 y se expusieron a una toxina letal (60 µg de PA y 30 µg de LF en un volumen total de 100 µl de PBS) los días 20 y 46 posteriores a la inmunización. La supervivencia se controló durante 30 días. Los resultados se muestran en la figura 31. Tras la exposición después de 20 días de la inmunización se observó un 80 % de supervivencia con ratones inmunizados con rPA-alumbre, mientras que los grupos inmunizados con Ad4-PA y Ad4-PA-GPI tuvieron un 50 % y un 20 % de supervivencia, respectivamente (figura 31, panel izquierdo). Un ratón del grupo inmunizado con Ad4 de tipo silvestre sobrevivió y en el grupo inmunizado con rPA no sobrevivió ninguno. Tras la exposición 46 días posteriores a la inmunización, se observó un 100 % de supervivencia en los grupos inmunizados con rPA + alumbre y Ad4PA, mientras que se observó un 90 % y un 30 % de supervivencia en los grupos inmunizados con Ad4-PA-GPI y rPA, respectivamente (figura 31, panel derecho). Del grupo tratado con Ad4 de tipo silvestre no sobrevivió ninguno.

10 Los resultados indican que en una exposición con toxina letal, los dos virus del vector Ad4-PA confieren protección parcial 20 días posteriores a la inmunización y protección total 46 días posteriores a la inmunización. No hubo diferencia estadística en la protección proporcionada por los adenovirus recombinantes Ad4-PA o Ad4-PA-GPI.

Se midieron las respuestas inmunitarias mediadas por las células (IFN-γ ELISPOT e IL-4 ELISPOT) 27 días posteriores a la inmunización en esplenocitos agrupados de ratones inmunizados con uno de los cinco antígenos diferentes (2 ratones/grupo) como se indica en la figura 29. Se analizaron ensayaron las respuestas inmunitarias celulares de los ratones que sobrevivieron a la exposición a la toxina #1 (20 días posteriores a la inmunización, n = 10/grupo) el día 54 (34 días después de la exposición). Ambos adenovirus Ad4-PA y Ad4-PA-GPI recombinantes indujeron respuestas de Th1 y Th2 al PA indicado por las respuestas a IFN-γ e IL-4 (figura 32).

20 En resumen, los resultados de los experimentos descritos en este Ejemplo demuestran que los adenovirus recombinantes que expresan antígeno protector inducen tanto inmunidad humoral como mediada por células en ratones y proporcionan protección contra la exposición a ántrax letal.

25 **Ejemplo 13: Expresión de un polipéptido de epítipo HTL múltiple de adenovirus recombinante**

Se diseñó una secuencia de antígenos sintéticos de la influenza que contenía 24 epítomos de linfocitos T auxiliares (HTL) de influenza, cada uno separado por una secuencia espaciadora GPGPG (SEQ ID NO: 353). Véase la figura 33A. Se generó un virus Ad4 recombinante con una eliminación total de la región E3 que expresaba este polipéptido HTL24 bajo el control de un promotor de CMV (PXVX0109) con métodos similares a los descritos en el Ejemplo 3. Las células A549 se infectaron con PXVX0109 después de la transfección para generar virus de dos clones plásmidos idénticos (15-4 y 19-1). Las células infectadas se cosecharon a >90 % de efecto citopático (CPE) y los lisados celulares se prepararon a 1 x 10⁶ células por 100 µl de tampón RIPA que contenía inhibidores de la proteasa. Como control positivo, se infectaron células A549 con influenza A/Uruguay/716/2007 (tipo A/Brisbane/10/2007) (NYMC X-175C reagrupado, NIBSC). Tras la separación en un gel SDS-PAGE y la transferencia posterior a una membrana de transferencia, se detectaron proteínas con un anticuerpo monoclonal marcador anti-HA y un anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón HRP. Para el control de carga, se sondó una membrana paralela con un anticuerpo policlonal de conejo anti-beta-actina y un anticuerpo secundario IgG de cabra anti-conejo HRP. Las bandas de proteína se visualizaron mediante quimioluminiscencia (Supersignal West Femto, ThermoScientific).

40 Como muestra por los resultados del análisis de Western blot en la figura 33B, el adenovirus Ad4 recombinante expresó altos niveles del polipéptido HTL24.

LISTA DE SECUENCIAS

45 <110> PaxVax, Inc.
Mayall, Timothy P.
Alexander, Jeff

<120> VECTORES DE BASE ADENOVÍRICA

50 <130> PAXV-004/01WO

<150> US 61/230.617
<151> 31-07-2009

55 <160> 353
<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

ES 2 603 779 T3

<211> 17
<212> PRT
<213> Virus Influenza

5 <400> 1

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

Asp

<210> 2
10 <211> 15
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 2
15

Lys Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn
1 5 10 15

<210> 3
<211> 16
20 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 3

Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile Lys Arg
25 1 5 10 15

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
30 <213> Virus Influenza

<400> 4

Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg Leu
35 1 5 10 15

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> Virus Influenza

40 <400> 5

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile
1 5 10 15

45 <210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Virus Influenza

50 <400> 6

ES 2 603 779 T3

Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn Phe Glu Ser Asn
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 7

Cys Pro Lys Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu
 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Virus Influenza

<400> 8

Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser Pro Gln Arg
 1 5 10 15

20 <210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

25 <400> 9

Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp
 1 5 10 15

Ser

30 <210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

35 <400> 10

Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Ile Tyr Gln Ile Leu Ser
 1 5 10 15

Ile

<210> 11
 40 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 11

45 Ile Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
 1 5 10 15

<210> 12

ES 2 603 779 T3

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 12

Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile
 1 5 10 15

<210> 13
 10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 13

15

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

<210> 14
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 14

25 Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala Lys Glu
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Virus Influenza

<400> 15

35 Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Leu Gly Leu Val Cys Ala
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

40

<400> 16

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

45 <210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

50 <400> 17

Ala Met Glu Val Ala Ser Gln Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met
 1 5 10 15

<210> 18

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 18

Asp Pro Leu Val Val Ala Ala Ser Ile Ile Gly Ile Leu His Leu
 1 5 10 15

<210> 19
 10 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 19

15

Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Met Ile Ser Ile Trp Val Ser His
 1 5 10 15

Ser

<210> 20
 <211> 19
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 20

Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys Leu Ser Asp
 1 5 10 15

25

Tyr Glu Gly

<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Virus Influenza

<400> 21

Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp
 1 5 10 15

35

<210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

40

<400> 22

Val Gly Thr Met Val Met Glu Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly
 1 5 10 15

45

<210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

ES 2 603 779 T3

<400> 23

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

5 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

10 <400> 24

Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys Ser Cys
 1 5 10 15

<210> 25
 15 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 25

20

Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala Ala Phe Glu
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 26

30

Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg Asn
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> Virus Influenza

<400> 27

40

Ser Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Met Asp Lys Asp Ile
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

45

<400> 28

Glu Gly Ala Ile Val Gly Glu Ile Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly
 1 5 10 15

His Thr Asp

50 <210> 29
 <211> 15

ES 2 603 779 T3

<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 29

5
Val Gly Glu Ile Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly His Thr Asp
1 5 10 15

<210> 30

<211> 15

10 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 30

15 Ser Leu Lys Leu Tyr Arg Asp Ser Leu Gly Glu Ala Val Met Arg
1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

20 <213> Virus Influenza

<400> 31

25 Ile Arg Trp Leu Ile Glu Glu Val Arg His Arg Leu Arg Ile Thr
1 5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

30 <213> Virus Influenza

<400> 32

35 Phe Glu Gln Ile Thr Phe Met Gln Ala Leu Gln Leu Leu Leu Glu
1 5 10 15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

40 <213> Virus Influenza

<400> 33

45 Ile Thr Phe Met Gln Ala Leu Gln Leu Leu Leu Glu Val Glu Gln
1 5 10 15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

50 <213> Virus Influenza

<400> 34

55 Arg Arg Glu Val His Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile
1 5 10 15

<210> 35

ES 2 603 779 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 35

Leu Phe Thr Ile Arg Gln Glu Met Ala Ser Arg Gly Leu Trp Asp
 1 5 10 15

<210> 36
 10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 36

15

Glu Pro Phe Leu Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Arg Leu Pro Asp
 1 5 10 15

<210> 37
 <211> 16
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 37

25

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

<210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Virus Influenza

<400> 38

35

Val Ala Pro Ile Glu His Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn Tyr Phe
 1 5 10 15

<210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

40

<400> 39

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

45 <210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

50 <400> 40

Arg Pro Met Phe Leu Tyr Val Arg Thr Asn Gly Thr Ser Lys Ile
 1 5 10 15

<210> 41

ES 2 603 779 T3

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 41

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

<210> 42

10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 42

15

Ser Tyr Leu Ile Arg Ala Leu Thr Leu Asn Thr Met Thr Lys Asp
 1 5 10 15

<210> 43

<211> 15

20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 43

25

Phe Leu Ala Met Ile Thr Tyr Ile Thr Arg Asn Gln Pro Glu Trp
 1 5 10 15

<210> 44

<211> 16

<212> PRT

30 <213> Virus Influenza

<400> 44

35

Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe
 1 5 10 15

<210> 45

<211> 16

<212> PRT

<213> Virus Influenza

40

<400> 45

Phe Arg Asn Val Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met
 1 5 10 15

45

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus Influenza

50 <400> 46

Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys
 1 5 10 15

<210> 47

ES 2 603 779 T3

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 47

Lys Gly Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile
 1 5 10 15

<210> 48

10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 48

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

<210> 49

<211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 49

25 Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser Thr Val Leu Gly Val Ser
 1 5 10 15

<210> 50

<211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Virus Influenza

<400> 50

35 Asp Phe Ala Leu Ile Val Asn Ala Pro Asn His Glu Gly Ile Gln
 1 5 10 15

<210> 51

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

40 <400> 51

Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe Gly
 1 5 10 15

<210> 52

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

50 <400> 52

Gly Val Thr Val Ile Lys Asn Asn Met Ile Asn Asn Asp Leu Gly Pro
 1 5 10 15

<210> 53

ES 2 603 779 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 53

Pro	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ile	Arg	Asn	Leu	His	Ile	Pro	Glu	Val	Cys
1				5					10					15

<210> 54
 10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 54

15

Ile	Ser	Ser	Met	Val	Glu	Ala	Met	Val	Ser	Arg	Ala	Arg	Ile	Asp
1				5					10					15

<210> 55
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 55

25

Lys	Trp	Met	Met	Ala	Met	Lys	Tyr	Pro	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Arg
1				5					10					15

<210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Virus Influenza

<400> 56

35

Gly	Ala	Arg	Ile	Leu	Thr	Ser	Glu	Ser	Gln	Leu	Thr	Ile	Thr	Lys
1				5					10					15

<210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

40

<400> 57

Lys	Ala	Ala	Met	Gly	Leu	Arg	Ile	Ser	Ser	Ser	Phe	Ser	Phe	Gly
1				5					10					15

<210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

50 <400> 58

Ile	Lys	Ala	Val	Arg	Gly	Asp	Leu	Asn	Phe	Val	Asn	Arg	Ala	Asn
1				5					10					15

<210> 59

ES 2 603 779 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 59

Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn Trp
 1 5 10 15

<210> 60

10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 60

15

Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Thr Val Lys Ile Gln Trp Ser
 1 5 10 15

<210> 61

<211> 15

20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 61

25

Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly Ser Gly
 1 5 10 15

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Virus Influenza

<400> 62

Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr
 1 5

35

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus Influenza

40

<400> 63

Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
 1 5

45

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Virus Influenza

50

<400> 64

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
 1 5 10

<210> 65

ES 2 603 779 T3

<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

5 <400> 65

Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala
1 5

<210> 66
10 <211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 66

15

Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Lys
1 5 10

<210> 67
<211> 9
20 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 67

25

Leu Pro Phe His Asn Val His Pro Leu
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Virus Influenza

<400> 68

35

Asn Met Asp Arg Ala Val Lys Leu Tyr
1 5

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

40

<400> 69

Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val
1 5

45 <210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

50 <400> 70

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 71

ES 2 603 779 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 71

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

<210> 72
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 72

15

Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val
 1 5

<210> 73
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 73

25

Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg
 1 5

<210> 74
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Virus Influenza

<400> 74

35

Ala Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg
 1 5 10

<210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

40

<400> 75

Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile Leu
 1 5

45 <210> 76
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

50 <400> 76

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

<210> 77

ES 2 603 779 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 77

His Glu Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr
 1 5 10

<210> 78
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 78

15

Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val
 1 5 10

<210> 79
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 79

25

Met Glu Val Ala Ser Gln Ala Arg Gln Met
 1 5 10

<210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Virus Influenza

<400> 80

35

Ser Ile Ile Gly Ile Leu His Leu Ile
 1 5

<210> 81
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

40

<400> 81

Arg Leu Phe Phe Lys Cys Ile Tyr Arg
 1 5

45 <210> 82
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

50 <400> 82

Arg Leu Phe Phe Lys Cys Ile Tyr Arg Arg
 1 5 10

<210> 83

ES 2 603 779 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 83

Leu Phe Phe Lys Cys Ile Tyr Arg Arg
 1 5

<210> 84

10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 84

15

Leu Trp Ile Leu Asp Arg Leu Phe Phe
 1 5

<210> 85

<211> 9

20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 85

25

Ile Tyr Arg Arg Phe Lys Tyr Gly Leu
 1 5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Virus Influenza

<400> 86

Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr
 1 5

35

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus Influenza

40

<400> 87

Val Ser Phe Asp Gln Asn Leu Asp Tyr
 1 5

45

<210> 88

<211> 10

<212> PRT

<213> Virus Influenza

50

<400> 88

Ile Val Ala Ile Thr Asp Trp Ser Gly Tyr
 1 5 10

<210> 89

ES 2 603 779 T3

<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

5 <400> 89

Lys Ser Cys Ile Asn Arg Cys Phe Tyr
1 5

<210> 90
10 <211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 90

15

Ala Leu Ser Thr Leu Cys Leu Leu Ile
1 5

<210> 91
<211> 9
20 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 91

25

His Leu Glu Cys Arg Thr Phe Phe Leu
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Virus Influenza

<400> 92

35

Cys Ile Asn Gly Ser Cys Phe Thr Val
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

40

<400> 93

Ile Thr Gly Phe Ala Pro Phe Ser Lys
1 5

<210> 94
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

50 <400> 94

Ile Thr Gly Trp Ala Ile Phe Ser Lys
1 5

<210> 95

ES 2 603 779 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 95

Ala Ser Tyr Lys Ile Phe Lys Ile Glu Lys
 1 5 10

<210> 96
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 96

15

Val Val Phe Cys Gly Thr Ser Gly Thr Tyr
 1 5 10

<210> 97
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 97

25

Val Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile
 1 5

<210> 98
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 98

35

Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu
 1 5

<210> 99
 <211> 10
 <212> PRT
 40 <213> Virus Influenza

<400> 99

45

Trp Trp Thr Ser Asn Ser Ile Ile Val Phe
 1 5 10

<210> 100
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

50

<400> 100

Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asn Ile Pro Phe
 1 5 10

55 <210> 101

ES 2 603 779 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 101

Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asn Ile Asn Phe
 1 5 10

<210> 102
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 102

15

Ala Pro Phe Ser Lys Asp Asn Ser Ile
 1 5

<210> 103
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 103

25

Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe
 1 5

<210> 104
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Virus Influenza

<400> 104

35

Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser Val
 1 5 10

<210> 105
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

40

<400> 105

Arg Pro Trp Val Ser Phe Asn Gln Asn Leu
 1 5 10

45 <210> 106
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

50 <400> 106

Arg Pro Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile
 1 5

<210> 107

ES 2 603 779 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 107

Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Tyr
 1 5

<210> 108
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 108

15

Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Tyr
 1 5

<210> 109
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 109

25

Phe Glu Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly
 1 5

<210> 110
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Virus Influenza

<400> 110

35

Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr
 1 5

<210> 111
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

40

<400> 111

Cys Thr Glu Leu Lys Leu Ser Asp Tyr
 1 5

45 <210> 112
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

50 <400> 112

His Ser Asn Leu Asn Asp Ala Thr Tyr
 1 5

<210> 113

ES 2 603 779 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 113

Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr
 1 5

<210> 114
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 114

15

Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu
 1 5

<210> 115
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 115

25

Leu Gln Asn Ser Gln Val Phe Ser Leu
 1 5

<210> 116
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Virus Influenza

<400> 116

35

Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe Glu Leu
 1 5

<210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

40

<400> 117

Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu Arg
 1 5

<210> 118
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

50 <400> 118

Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg
 1 5

<210> 119

ES 2 603 779 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 119

Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg
 1 5 10

<210> 120
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 120

15

Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg
 1 5

<210> 121
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 121

25

Gly Thr Met Val Met Glu Leu Ile Arg
 1 5

<210> 122
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Virus Influenza

<400> 122

35

Met Val Met Glu Leu Ile Arg Met Ile Lys
 1 5 10

<210> 123
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

40

<400> 123

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

45 <210> 124
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

50 <400> 124

Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg
 1 5 10

<210> 125

ES 2 603 779 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 125

Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg
 1 5

<210> 126
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 126

15

Ser Val Gln Arg Asn Leu Pro Phe Glu Arg
 1 5 10

<210> 127
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 127

25

Gly Val Phe Glu Leu Ser Asp Glu Lys
 1 5

<210> 128
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Virus Influenza

<400> 128

35

Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu
 1 5

<210> 129
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

40

<400> 129

His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu
 1 5

45 <210> 130
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

50 <400> 130

Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile
 1 5

<210> 131

ES 2 603 779 T3

<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

5 <400> 131

Trp Met Ala Cys His Ser Ala Ala Phe
1 5

<210> 132
10 <211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 132

15

Leu Pro Arg Arg Ser Gly Ala Ala Gly Ala
1 5 10

<210> 133
<211> 10
20 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 133

25

Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Val
1 5 10

<210> 134
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Virus Influenza

<400> 134

35

Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met
1 5

<210> 135
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

40

<400> 135

Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile
1 5

<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

50 <400> 136

Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala
1 5

<210> 137

ES 2 603 779 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 137

Phe Glu Asp Leu Arg Val Ser Ser Phe
 1 5

<210> 138
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 138

15

Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala
 1 5

<210> 139
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 139

25

Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe
 1 5 10

<210> 140
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Virus Influenza

<400> 140

35

Thr Ile Ala Ser Val Pro Ala Pro Arg Tyr
 1 5 10

<210> 141
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

40

<400> 141

Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp His Val
 1 5 10

45 <210> 142
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

50 <400> 142

Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp His Val
 1 5

<210> 143

ES 2 603 779 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 143

Phe Leu Trp His Val Arg Lys Gln Val
 1 5

<210> 144
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 144

15

Ile Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val
 1 5

<210> 145
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 145

25

Lys Gln Ile Val Glu Arg Ile Leu Lys
 1 5

<210> 146
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Virus Influenza

<400> 146

35

Ala Ile Met Asp Lys Asn Ile Ile Leu Lys
 1 5 10

<210> 147
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

40

<400> 147

Val Pro Ala Ser Arg Tyr Leu Thr Asp Met
 1 5 10

45 <210> 148
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

50 <400> 148

Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr Ile Ala
 1 5

<210> 149

ES 2 603 779 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 149

Leu Glu Glu Met Ser Arg Asp Trp Leu Met
 1 5 10

<210> 150
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 150

15

Leu Glu Thr Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe
 1 5 10

<210> 151
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 151

25

Gly Glu Ile Ser Pro Leu Pro Ser Leu
 1 5

<210> 152
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Virus Influenza

<400> 152

35

Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp
 1 5

<210> 153
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

40

<400> 153

Ile Thr Gln Phe Glu Ser Leu Lys Leu Tyr
 1 5 10

<210> 154
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

50 <400> 154

Phe Met Gln Ala Leu Gln Leu Leu Leu
 1 5

<210> 155

ES 2 603 779 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 155

Met Gln Ala Leu Gln Leu Leu Leu Glu Val
 1 5 10

<210> 156
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 156

15

Met Ile Thr Gln Phe Glu Ser Leu Lys
 1 5

<210> 157
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 157

25

Thr Gln Phe Glu Ser Leu Lys Leu Tyr Arg
 1 5 10

<210> 158
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Virus Influenza

<400> 158

35

Lys Phe Glu Glu Ile Arg Trp Leu Ile
 1 5

<210> 159
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

40

<400> 159

Phe Met Gln Ala Leu Gln Leu Leu Phe
 1 5

45 <210> 160
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

50 <400> 160

Glu Glu Val Arg His Arg Leu Lys Ile
 1 5

<210> 161

ES 2 603 779 T3

<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

5 <400> 161

Phe Glu Gln Ile Thr Phe Met Gln Ala
1 5

<210> 162
10 <211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 162
15

Leu Glu Val Glu Gln Glu Ile Arg Thr
1 5

<210> 163
<211> 10
20 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 163

Gln Glu Ile Arg Thr Phe Ser Phe Gln Leu
25 1 5 10

<210> 164
<211> 10
<212> PRT
30 <213> Virus Influenza

<400> 164

Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr
35 1 5 10

<210> 165
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

40 <400> 165

Val Thr Arg Arg Glu Val His Ile Tyr
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

50 <400> 166

ES 2 603 779 T3

Ser Ser Leu Glu Asn Phe Arg Ala Tyr
1 5

<210> 167
<211> 10
5 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 167

Tyr Val Asp Gly Phe Glu Pro Asn Gly Tyr
1 5 10

10

<210> 168
<211> 9
<212> PRT
15 <213> Virus Influenza

<400> 168

His Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn Tyr
1 5

20

<210> 169
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza
25

<400> 169

Val Ser His Cys Arg Ala Thr Glu Tyr
1 5

30 <210> 170
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza
35 <400> 170

Phe Met Tyr Ser Asp Phe His Phe Ile
1 5

<210> 171
40 <211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 171
45

Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile
1 5

<210> 172
<211> 9
50 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 172

ES 2 603 779 T3

Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile
1 5

<210> 173
<211> 10
5 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 173

Leu Leu Met Asp Ala Leu Lys Leu Ser Ile
1 5 10

10

<210> 174
<211> 9
<212> PRT
15 <213> Virus Influenza

<400> 174

Leu Leu Ala Trp Lys Gln Val Leu Ala
1 5

20

<210> 175
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza
25

<400> 175

Tyr Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala
1 5

30 <210> 176
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

35 <400> 176

Ser Ile Cys Asn Thr Thr Gly Val Glu Lys
1 5 10

<210> 177
40 <211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 177

45

Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr Lys
1 5 10

<210> 178
<211> 10
50 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 178

ES 2 603 779 T3

His Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys
1 5 10

<210> 179
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 179

Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu Lys
10 1 5

<210> 180
<211> 10
<212> PRT
15 <213> Virus Influenza

<400> 180

Arg Thr Phe Phe Gly Trp Lys Glu Pro Tyr
20 1 5 10

<210> 181
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

25 <400> 181

Lys Ile Pro Lys Thr Lys Asn Met Lys Lys
1 5 10

30 <210> 182
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

35 <400> 182

Phe Gln Leu Ile Pro Met Ile Ser Lys
1 5

<210> 183
40 <211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 183

45 Lys Thr Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys
1 5 10

<210> 184
<211> 10
50 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 184

ES 2 603 779 T3

Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys Gly Arg
1 5 10

<210> 185
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 185

Ser Val Lys Glu Lys Asp Met Thr Lys
10 1 5

<210> 186
<211> 9
<212> PRT
15 <213> Virus Influenza

<400> 186

Met Thr Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys
20 1 5

<210> 187
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

25 <400> 187

Lys Val Cys Arg Thr Leu Leu Ala Lys
1 5

30 <210> 188
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

35 <400> 188

Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu Arg
1 5 10

<210> 189
40 <211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 189

45 Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu
1 5

<210> 190
<211> 9
50 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 190

ES 2 603 779 T3

Cys Phe Met Tyr Ser Asp Phe His Phe
1 5

<210> 191
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 191

Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile
1 5

10
<210> 192
<211> 9
<212> PRT
15 <213> Virus Influenza

<400> 192

Glu Tyr Ile Met Lys Gly Val Tyr Ile
1 5

20
<210> 193
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

25
<400> 193

Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp
1 5

30 <210> 194
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

35 <400> 194

Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu Gly Phe
1 5 10

<210> 195
40 <211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 195

45

Ala Pro Ile Glu His Ile Ala Ser Met
1 5

<210> 196
<211> 9
50 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 196

ES 2 603 779 T3

Ser Pro Gln Leu Glu Gly Phe Ser Ala
1 5

<210> 197
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 197

Ser Glu Lys Thr His Ile His Ile Phe
1 5

10
<210> 198
<211> 9
<212> PRT
15 <213> Virus Influenza

<400> 198

Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe
1 5

20
<210> 199
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

25
<400> 199

Pro Glu Leu Arg Ser Leu Ser Ser Trp Ile
1 5 10

30 <210> 200
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

35 <400> 200

Ser Glu Phe Asn Lys Ala Cys Glu Leu Thr
1 5 10

40 <210> 201
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 201

45

Met Glu Phe Ser Leu Thr Asp Pro Arg Leu
1 5 10

<210> 202
<211> 9
50 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 202

ES 2 603 779 T3

Trp Glu Lys Tyr Cys Val Leu Glu Ile
1 5

<210> 203
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 203

Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile
1 5

10
<210> 204
<211> 10
<212> PRT
15 <213> Virus Influenza

<400> 204

Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val
1 5 10

20
<210> 205
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

25
<400> 205

Tyr Glu Ala Ile Glu Glu Cys Leu Ile
1 5

30 <210> 206
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

35 <400> 206

Tyr Ser His Gly Thr Gly Thr Gly Tyr
1 5

40 <210> 207
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 207

45
Gly Met Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr
1 5

<210> 208
<211> 9
50 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 208

ES 2 603 779 T3

Arg Met Phe Leu Ala Met Ile Thr Tyr
1 5

<210> 209
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 209

Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly Tyr
1 5

10
<210> 210
<211> 9
<212> PRT
15 <213> Virus Influenza

<400> 210

Met Leu Ala Asn Ile Asp Leu Lys Tyr
1 5

20
<210> 211
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

25
<400> 211

Met Leu Ala Ser Ile Asp Leu Lys Tyr
1 5

30 <210> 212
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

35 <400> 212

Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe Tyr
1 5

<210> 213
40 <211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 213

45

Leu Val Ser Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr
1 5 10

<210> 214
<211> 9
50 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 214

ES 2 603 779 T3

Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala
1 5

<210> 215
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 215

Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu
1 5

10
<210> 216
<211> 9
<212> PRT
15 <213> Virus Influenza

<400> 216

Arg Leu Ile Asp Phe Leu Lys Asp Val
1 5

20
<210> 217
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

25
<400> 217

Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val
1 5

30 <210> 218
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

35 <400> 218

Phe Val Tyr Phe Val Glu Thr Leu Ala
1 5

<210> 219
40 <211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 219

45

Arg Met Phe Leu Ala Met Ile Thr Tyr Ile
1 5 10

<210> 220
<211> 9
50 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 220

ES 2 603 779 T3

Leu Leu Ile Asp Gly Thr Ala Ser Leu
1 5

<210> 221
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 221

Asn Met Leu Ser Thr Val Leu Gly Val
1 5

10

<210> 222
<211> 9
<212> PRT
15 <213> Virus Influenza

<400> 222

Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu
1 5

20

<210> 223
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza
25

<400> 223

Ala Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile
1 5

30 <210> 224
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza
35 <400> 224

Arg Leu Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val
1 5 10

<210> 225
40 <211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 225

45

Gln Thr Tyr Asp Trp Thr Leu Asn Arg
1 5

<210> 226
<211> 10
50 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 226

ES 2 603 779 T3

Ala Leu Ala Asn Thr Ile Glu Val Phe Arg
1 5 10

<210> 227
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 227

Met Val Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys

10 1 5

<210> 228
<211> 10
<212> PRT
15 <213> Virus Influenza

<400> 228

Met Val Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Lys
1 5 10

20

<210> 229
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza
25

<400> 229

Ala Leu Thr Leu Asn Thr Met Thr Lys
1 5

30 <210> 230
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

35 <400> 230

Thr Leu Ala Arg Ser Ile Cys Glu Lys
1 5

<210> 231
40 <211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 231

45

Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys
1 5 10

<210> 232
<211> 10
50 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 232

Ile Gln Ala Gly Val Asp Arg Phe Tyr Arg
1 5 10

5

<210> 233
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

10

<400> 233

Lys Leu Val Gly Ile Asn Met Ser Lys
1 5

15

<210> 234
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

20

<400> 234

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

25

<210> 235
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

30

<400> 235

Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe Tyr
1 5 10

35

<210> 236
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 236

40

Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe Tyr Arg
1 5 10

<210> 237
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

45

<400> 237

Ala Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Lys
1 5 10

50

<210> 238
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

ES 2 603 779 T3

<400> 238

Leu Gln Leu Phe Ile Lys Asp Tyr Arg
1 5

5

<210> 239
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

10

<400> 239

Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys
1 5

15

<210> 240
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

20

<400> 240

Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg
1 5 10

25

<210> 241
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

30

<400> 241

Tyr Gln Lys Cys Cys Thr Leu Phe Glu Lys
1 5 10

35

<210> 242
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 242

40

Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys
1 5 10

45

<210> 243
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 243

50

Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser Tyr Arg
1 5

<210> 244
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

ES 2 603 779 T3

<400> 244

5 Ser Tyr Leu Ile Arg Ala Leu Thr Leu
1 5

<210> 245
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

10 <400> 245

15 Met Phe Leu Ala Met Ile Thr Tyr Ile
1 5

<210> 246
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

20 <400> 246

25 Arg Tyr Thr Lys Thr Thr Tyr Trp Trp
1 5

<210> 247
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

30 <400> 247

35 Ser Tyr Ile Asn Arg Thr Gly Thr Phe
1 5

<210> 248
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

40 <400> 248

45 Phe Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe
1 5 10

<210> 249
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

50 <400> 249

55 Leu Tyr Asn Ile Arg Asn Leu His Ile
1 5

<210> 250
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

ES 2 603 779 T3

<400> 250	
5	Met Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe 1 5
<210> 251	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> Virus Influenza	
10	<400> 251
	Met Tyr Gln Lys Cys Cys Thr Leu Phe 1 5
15	<210> 252
<211> 9	
<212> PRT	
<213> Virus Influenza	
20	<400> 252
	Asn Pro Arg Met Phe Leu Ala Met Ile 1 5
<210> 253	
25	<211> 9
<212> PRT	
<213> Virus Influenza	
<400> 253	
30	Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val Leu 1 5
<210> 254	
<211> 9	
35	<212> PRT
<213> Virus Influenza	
<400> 254	
40	Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met 1 5
<210> 255	
<211> 9	
<212> PRT	
45	<213> Virus Influenza
<400> 255	
50	Ile Pro Ala Glu Met Leu Ala Ser Ile 1 5
<210> 256	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> Virus Influenza	

ES 2 603 779 T3

<400> 256

Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe
1 5

5 <210> 257
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

10 <400> 257

Gly Pro Ala Thr Ala Gln Met Ala Leu
1 5

15 <210> 258
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

20 <400> 258

Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Ser Met
1 5 10

25 <210> 259
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

30 <400> 259

Ile Pro Lys Arg Asn Arg Ser Ile Leu
1 5

35 <210> 260
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

40 <400> 260

Phe Pro Ser Ser Ser Tyr Arg Arg Pro Val
1 5 10

45 <210> 261
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

50 <400> 261

Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val
1 5

50 <210> 262
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

ES 2 603 779 T3

<400> 262

Cys Glu Lys Leu Glu Gln Ser Gly Leu
 1 5

5
 <210> 263
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

10
 <400> 263

Ile Glu Lys Ile Arg Pro Leu Leu Ile
 1 5

15 <210> 264
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

20 <400> 264

Ile Glu Ser Val Asn Asn Ala Val Val
 1 5

<210> 265
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 265

30
 Ser Thr Val His Tyr Pro Lys Val Tyr
 1 5

<210> 266
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 266

Lys Ile Ser Pro Leu Met Val Ala Tyr
 1 5

40
 <210> 267
 <211> 10
 <212> PRT
 45 <213> Virus Influenza

<400> 267

Arg Val Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr
 1 5 10

50
 <210> 268
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

ES 2 603 779 T3

<400> 268

Gly Thr Glu Lys Leu Thr Ile Thr Tyr
1 5

5

<210> 269
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

10

<400> 269

Gln Trp Ser Gln Glu Pro Thr Met Leu Tyr
1 5 10

15

<210> 270
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

20

<400> 270

Trp Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr
1 5

25

<210> 271
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

30

<400> 271

Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu
1 5

35

<210> 272
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 272

40

Phe Gln Asn Trp Gly Ile Glu His Ile
1 5

45

<210> 273
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 273

50

Phe Gln Asn Trp Gly Ile Glu Pro Ile
1 5

<210> 274
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

ES 2 603 779 T3

<400> 274

Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val
1 5

5

<210> 275
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

10

<400> 275

Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys
1 5 10

15

<210> 276
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

20

<400> 276

Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys
1 5

25

<210> 277
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

30

<400> 277

Arg Ile Met Glu Met Ile Pro Glu Arg
1 5

35

<210> 278
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 278

40

Thr Thr Ser Thr Val His Tyr Pro Lys
1 5

<210> 279

<211> 10

<212> PRT

45

<213> Virus Influenza

<400> 279

Ser Thr Val His Tyr Pro Lys Val Tyr Lys
1 5 10

50

<210> 280
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

ES 2 603 779 T3

<400> 280

Thr Val His Tyr Pro Lys Val Tyr Lys
1 5

5
<210> 281
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

10
<400> 281

Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys
1 5

15 <210> 282
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

20 <400> 282

Gly Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg
1 5

<210> 283
25 <211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 283
30

Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys
1 5 10

<210> 284
<211> 9
35 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 284

Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys
1 5

40

<210> 285
<211> 10
<212> PRT
45 <213> Virus Influenza

<400> 285

Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg
1 5 10

50
<210> 286
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

ES 2 603 779 T3

<400> 286

Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg
1 5

5

<210> 287
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

10

<400> 287

Val Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu Lys
1 5 10

15

<210> 288
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

20

<400> 288

His Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys
1 5

25

<210> 289
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

30

<400> 289

Val Val Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg
1 5

35

<210> 290
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 290

40

Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys
1 5 10

<210> 291
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

45

<400> 291

Gly Thr Phe Asp Thr Val Gln Ile Ile Lys
1 5 10

50

<210> 292
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

ES 2 603 779 T3

<400> 292

5 Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala Pro Pro Lys
1 5 10

<210> 293

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Virus Influenza

<400> 293

15 Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys
1 5 10

<210> 294

<211> 10

<212> PRT

<213> Virus Influenza

20

<400> 294

Ser Ile Asn Glu Leu Ser Asn Leu Ala Lys
1 5 10

25 <210> 295

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus Influenza

30 <400> 295

Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile
1 5

<210> 296

35 <211> 10

<212> PRT

<213> Virus Influenza

<400> 296

40

His Tyr Pro Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe
1 5 10

<210> 297

<211> 10

45 <212> PRT

<213> Virus Influenza

<400> 297

50 Leu Tyr Asn Lys Met Glu Phe Glu Pro Phe
1 5 10

<210> 298

<211> 10

<212> PRT

55 <213> Virus Influenza

ES 2 603 779 T3

<400> 298

Gln Tyr Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe
1 5 10

5

<210> 299
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

10

<400> 299

Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys Trp Met
1 5

15 <210> 300

<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

20 <400> 300

Tyr Pro Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe
1 5

<210> 301

25

<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 301

30

Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val
1 5

<210> 302

35

<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 302

Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile Leu
1 5 10

40

<210> 303

<211> 9

<212> PRT

45

<213> Virus Influenza

<400> 303

Ser Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu
1 5

50

<210> 304

<211> 10

<212> PRT

<213> Virus Influenza

ES 2 603 779 T3

<400> 304

Ala Pro Pro Lys Gln Ser Arg Met Gln Phe
1 5 10

5

<210> 305
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

10

<400> 305

Ala Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe
1 5 10

15 <210> 306

<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

20 <400> 306

Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu
1 5

<210> 307

25 <211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 307

30

Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu
1 5 10

<210> 308

35 <211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 308

Met Glu Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu
1 5

40

<210> 309

45 <211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 309

Lys Glu Asp Lys Arg Tyr Gly Pro Ala Leu
1 5 10

50

<210> 310
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza

ES 2 603 779 T3

<400> 310

Cys Glu Leu Thr Asp Ser Ser Trp Ile
1 5

5

<210> 311
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus Influenza

10

<400> 311

Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly
1 5 10

15

<210> 312
<211> 23
<212> PRT
<213> Virus Influenza

20

<400> 312

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

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

25

<210> 313
<211> 23
<212> PRT
<213> Virus Influenza

30

<400> 313

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

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

35

<210> 314
<211> 23
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 314

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

Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp
20

40

<210> 315
<211> 23
<212> PRT

<213> Virus Influenza

<400> 315

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

5 Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

<210> 316

<211> 23

<212> PRT

10 <213> Virus Influenza

<400> 316

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

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

15

<210> 317

<211> 23

<212> PRT

<213> Virus Influenza

20

<400> 317

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

Arg Cys Ser Gly Ser Ser Asp
20

25 <210> 318

<211> 23

<212> PRT

<213> Virus Influenza

30 <400> 318

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

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 319

35 <211> 23

<212> PRT

<213> Virus Influenza

<400> 319

40

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Lys Asn Glu Trp Glu Cys

ES 2 603 779 T3

1 5 10 15

Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 320
<211> 23
5 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 320

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

10 Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 321
<211> 23
<212> PRT
15 <213> Virus Influenza

<400> 321

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

20 Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 322
<211> 23
<212> PRT
25 <213> Virus Influenza

<400> 322

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

Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

30 <210> 323
<211> 23
<212> PRT
<213> Virus Influenza

35 <400> 323

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

Asn Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

ES 2 603 779 T3

<210> 324
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5

<400> 324

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

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
 20

10 <210> 325
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

15 <400> 325

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

Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp
 20

20 <210> 326
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

25 <400> 326

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

Lys Cys Asn Asp Ser Ser Asp
 20

30 <210> 327
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 327

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

Arg Cys Ser Gly Ser Ser Asp
 20

35

40 <210> 328
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 328

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

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

5 <210> 329
<211> 23
<212> PRT
<213> Virus Influenza

10 <400> 329

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

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 330
15 <211> 23
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 330

20

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

Lys Cys Asn Asp Ser Asn Asp
20

<210> 331
<211> 23
25 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 331

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

Arg Cys Ser Gly Ser Ser Asp
20

30

<210> 332
<211> 23
<212> PRT
35 <213> Virus Influenza

<400> 332

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr His Thr Arg Asn Gly Trp Gly Cys

40

ES 2 603 779 T3

1 5 10 15

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 333
<211> 23
5 <212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 333

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

10 Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 334
<211> 23
<212> PRT
15 <213> Virus Influenza

<400> 334

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

20 Lys Cys Arg Asp Ser Ser Asp
20

<210> 335
<211> 23
<212> PRT
<213> Virus Influenza

25 <400> 335

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

Asn Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

30 <210> 336
<211> 16
<212> PRT
<213> Virus Influenza

35 <400> 336

Gly Ala Ala Ala Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Asn Ala Ala
1 5 10 15

<210> 337
40 <211> 24
<212> PRT

<213> Virus Influenza

<400> 337

Leu Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly
1 5 10 15

5 Asn Thr Asn Gln Gln Arg Ala Ser
20

<210> 338

<211> 19

<212> PRT

10 <213> Virus Influenza

<400> 338

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

Leu Ala Ile

15

<210> 339

<211> 29

<212> PRT

<213> Virus Influenza

20

<400> 339

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

Trp Glu Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Leu Gly Ser
20 25

25 <210> 340

<211> 87

<212> ADN

<213> Virus Influenza

30 <400> 340

ctgggcagca gcctgctgac cgaggtggag acccccaccc gcaacgagtg ggagtgccgc 60

tgcagcgaca gcagcgacct gggcagc 87

<210> 341

35

<211> 87

<212> ADN

<213> Virus Influenza

<400> 341

40

ctgggcagca gtcttctaac cgaggtcgaa acgcctacca gaaacgaatg ggagtgcaga 60

tgcagcgatt caagtgatct gggcagc 87

<210> 342

ES 2 603 779 T3

<211> 29
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

5 <400> 342

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

Trp Glu Cys Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp Leu Gly Ser
 20 25

<210> 343
 10 <211> 87
 <212> ADN
 <213> Virus Influenza

<400> 343

15 ctgggcagca gcctgctgac cgaggtggag acccccaccc gcaacggctg ggagtgcaag 60
 tgcagcgaca gcagcgacct gggcagc 87

<210> 344
 <211> 29
 20 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 344

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

Trp Glu Cys Arg Cys Ser Gly Ser Ser Asp Leu Gly Ser
 20 25

25 <210> 345
 <211> 87
 <212> ADN
 30 <213> Virus Influenza

<400> 345

ctgggcagca gcctgctgac cgaggtggag accctgaccc gcaacggctg ggagtgccgc 60
 tgcagcggca gcagcgacct gggcagc 87

35 <210> 346
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 346

ES 2 603 779 T3

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

Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Leu Gly Ser
 20 25

<210> 347
 <211> 87
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 347

ctgggcagca gcctgctgac cgaggtggag acccccatcc gcaacgagtg gggctgccgc 60

10 tgcaacgaca gcagcgacct gggcagc 87

<210> 348
 <211> 30
 <212> PRT
 15 <213> Virus Influenza

<400> 348

Leu Gly Ser Leu Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg
 1 5 10 15

Ser Gly Gly Asn Thr Asn Gln Gln Arg Ala Ser Leu Gly Ser
 20 25 30

20 <210> 349
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Virus Influenza

25 <400> 349

ctgggcagcc ttgaactgag aagcagatat tgggctataa gaaccagaag cggaggaaac 60

accaaccagc agagggcatc tctgggcagc 90

30 <210> 350
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

35 <400> 350

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

Asn Ala Ala Leu Gly Ser
 20

<210> 351
 40 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Virus Influenza

ES 2 603 779 T3

<400> 351

ctgggcagcg ggcgcccgcg cgggattttg ggatttgtat tcacgctcaa cgccgcctg 60

ggcagc 66

5

<210> 352

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Secuencia de enlazador peptídica

<400> 352

Gly Ala Ala Ala

15

1

<210> 353

<211> 5

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia espaciadora peptídica

25 <400> 353

Gly Pro Gly Pro Gly

1

5

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que comprende un vector adenovirico que comprende una primera secuencia heterologa, donde dicho vector adenovirico es capaz de reaplicarse y tiene una eliminacion parcial de E3, y donde la primera secuencia heterologa se integra a la eliminacion parcial de E3 y se une operativamente a un sitio de aceptor de corte y empalme adenovirico nativo bajo el control del promotor tardio principal endogeno.
2. La vacuna de la reivindicacion 1, donde el vector adenovirico se deriva de Ad2, Ad3, Ad4, Ad5, Ad6, Ad7, Ad11, Ad20, Ad21, Ad22, Ad23, Ad24, Ad25, Ad26, Ad28, Ad34, Ad35, Ad40, Ad41, Ad48, Ad49 o Ad50.
3. La vacuna de la reivindicacion 1, donde la eliminacion parcial de E3 comprende la eliminacion de al menos 1, 2 o 3 marcos de lectura abiertos dentro de la region E3.
4. La vacuna de la reivindicacion 1, donde el vector adenovirico se deriva de Ad4 y la eliminacion parcial de E3 comprende una eliminacion de E3 24,8 k, E3 6,3 k, y E3 29,7 k.
5. La vacuna de la reivindicacion 1, donde la expresion de la primera secuencia heterologa esta bajo el control del promotor tardio principal endogeno y la secuencia lider tripartita.
6. La vacuna de la reivindicacion 1, donde la primera secuencia heterologa se une operativamente a un aceptor de corte y empalme E3 24,8 k nativo.
7. La vacuna de la reivindicacion 1, donde la primera secuencia heterologa se une operativamente a una secuencia senal de poliA adenovirica, tal como una secuencia senal de poliA E3 de Ad5.
8. La vacuna de la reivindicacion 1, donde la primera secuencia heterologa codifica una proteina inmunogena de un patogeno infeccioso, y donde el patogeno infeccioso se selecciona del grupo que consiste en un virus, una bacteria, un protista y un hongo.
9. La vacuna de la reivindicacion 8, donde el patogeno infeccioso es influenza, el virus de la inmunodeficiencia humano, o el virus del papiloma humano.
10. La vacuna de la reivindicacion 1, donde la primera secuencia heterologa codifica hemaglutinina de influenza, neuraminidasa de influenza, M2 de influenza, un multimer de M2e, un multimer de epitopos HTL, o un multimer de epitopos CTL.
11. La vacuna de la reivindicacion 1, que se formula para administracion oral, intranasal, sublingual, intravesical, rectal o intravaginal.
12. Una unidad de dosificacion de la vacuna de la reivindicacion 1, donde una dosis individual comprende de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^{13} particulas adenoviricas.
13. La vacuna de la reivindicacion 1, para su uso en un metodo para inducir una respuesta inmunitaria a un patogeno infeccioso en un sujeto, comprendiendo dicho metodo administrar la vacuna al sujeto.
14. La vacuna para su uso en el metodo de la reivindicacion 13, donde el patogeno infeccioso es influenza, VIH, VPH, *Bacillus*, *Plasmodium*, *Mycobacteria* o *Shigella*.
15. La vacuna para su uso en el metodo de la reivindicacion 13, donde el sujeto tiene una infeccion inducida por dicho patogeno infeccioso.

Figura 1.

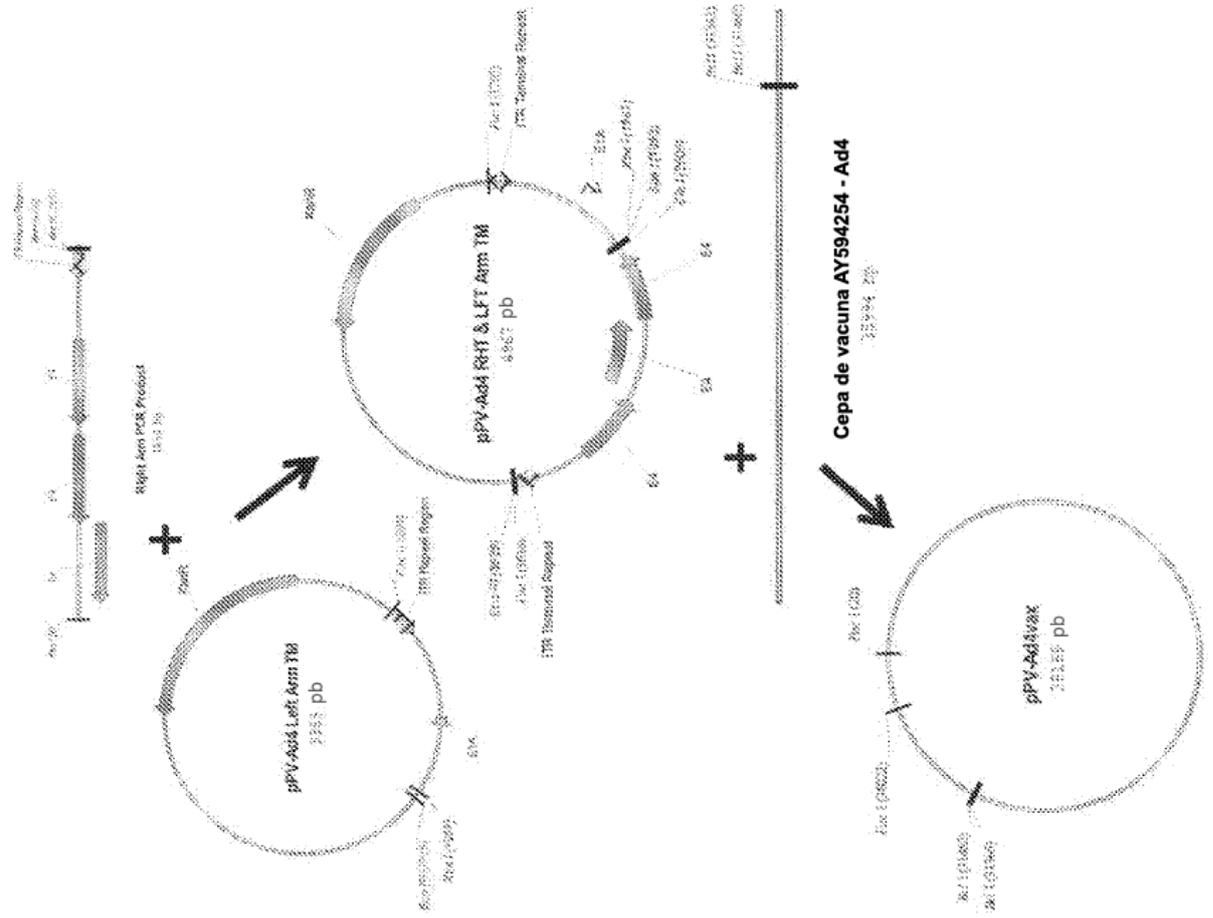


Figura 2.

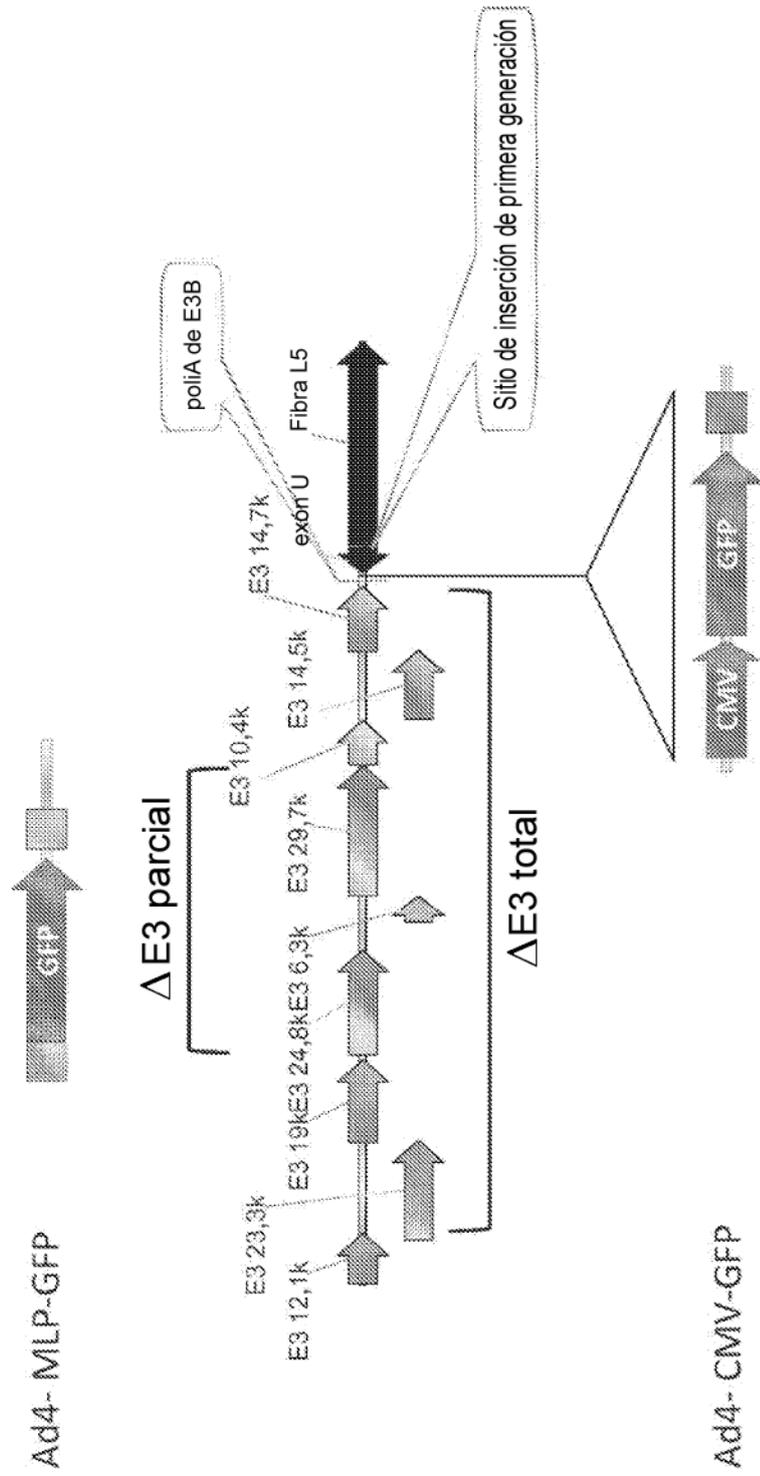


Figura 3.

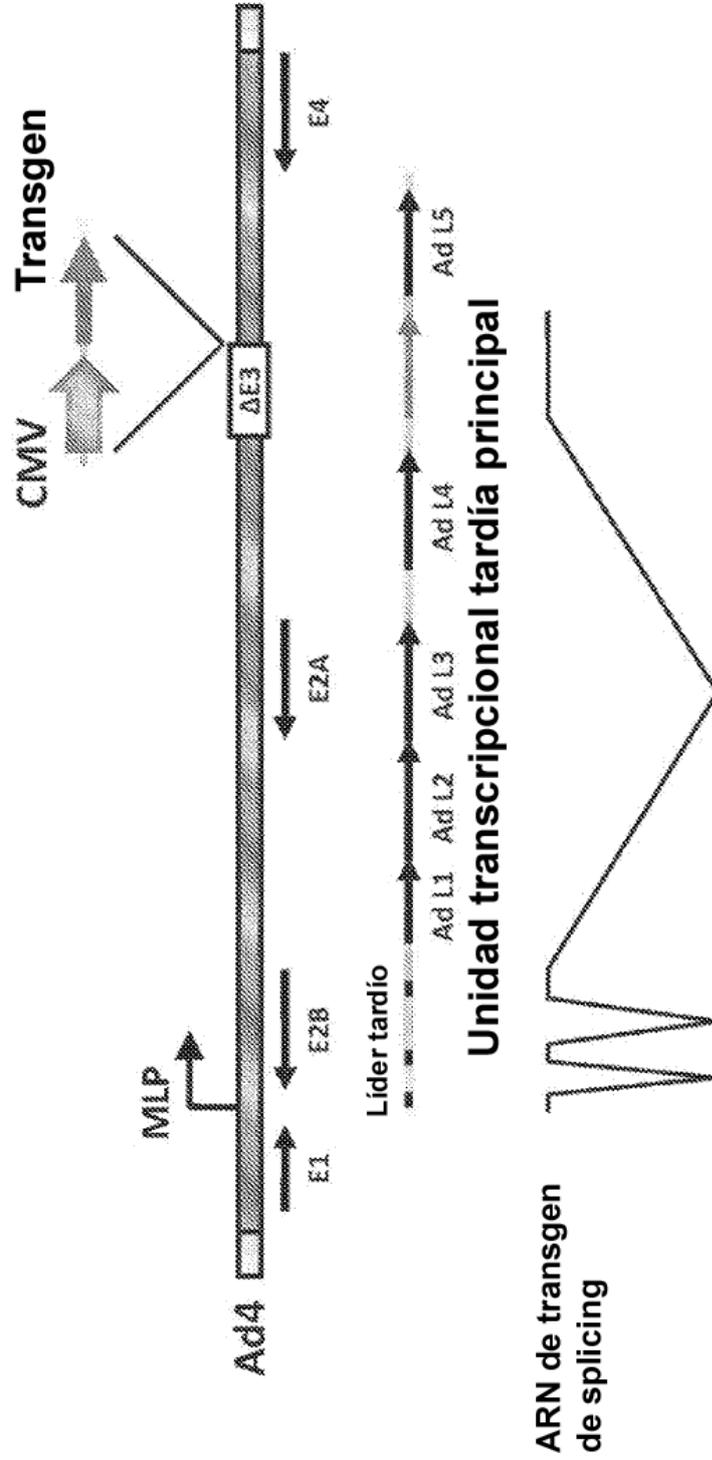


Figura 4

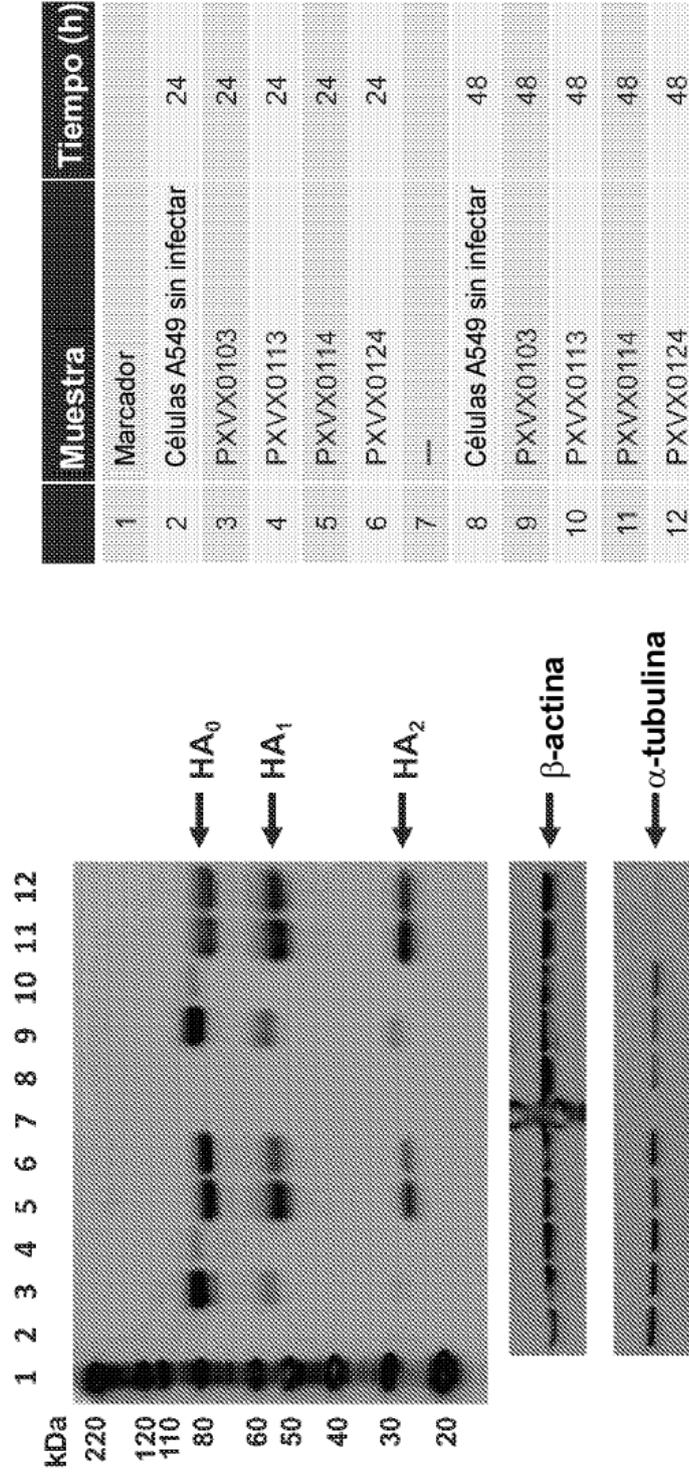
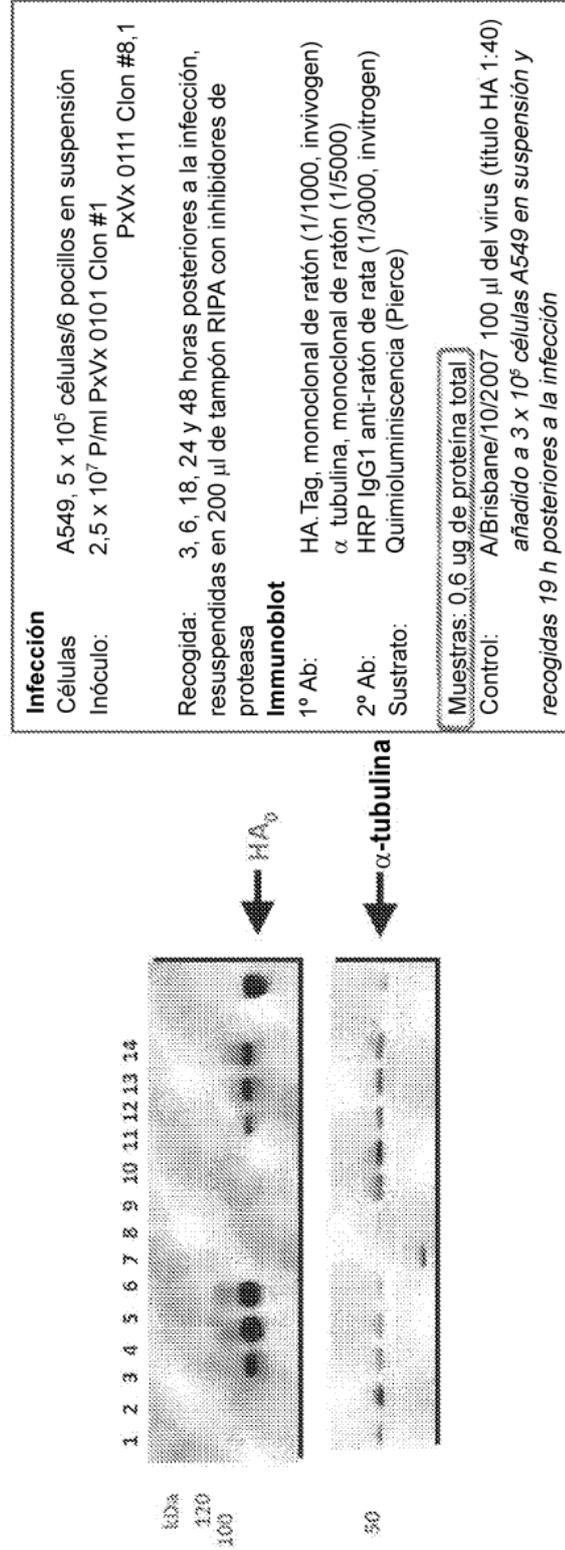


Figura 5
Transcurso temporal de la expresión de HA Brisbane
(nativa) de PXVX0101 y PXVX0111



Muestra	PXVX0101 Ad4-Parcial E3 MLTU-Bbn (Nativo)	Carriles	células A549	Control de Influenza
3	6	18	24	48
6	6	18	24	48
18	6	18	24	48
24	6	18	24	48
48	6	18	24	48
19				

Figura 6

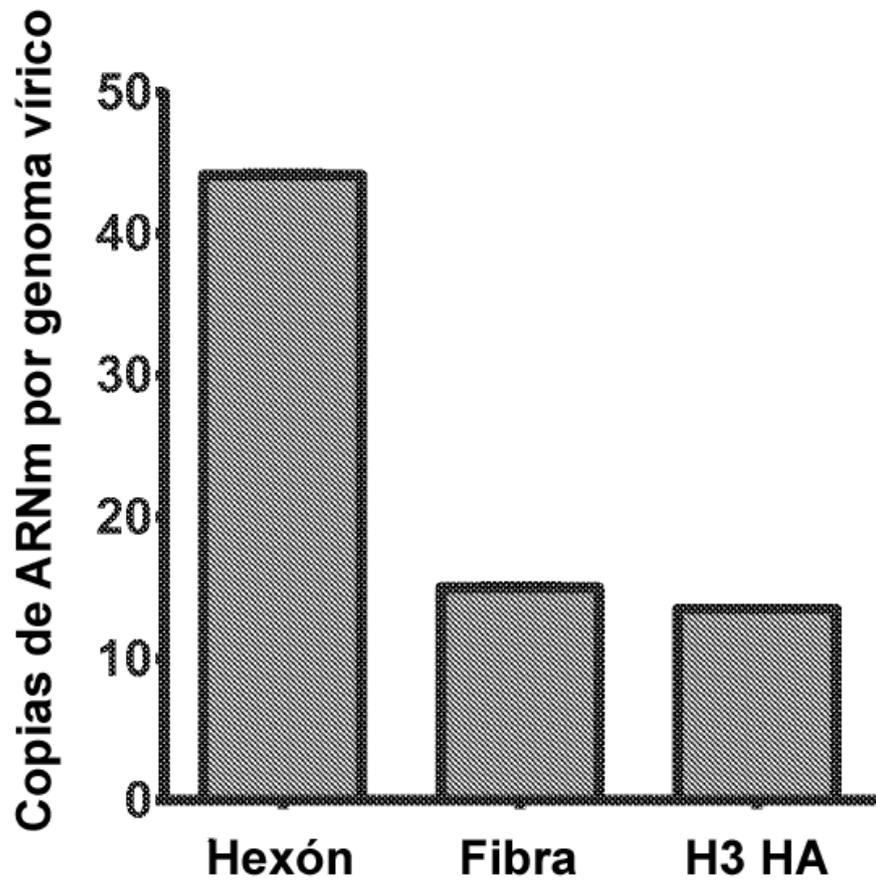


Figura 7

Expresión superficial de HA (2 días posteriores a la infección)

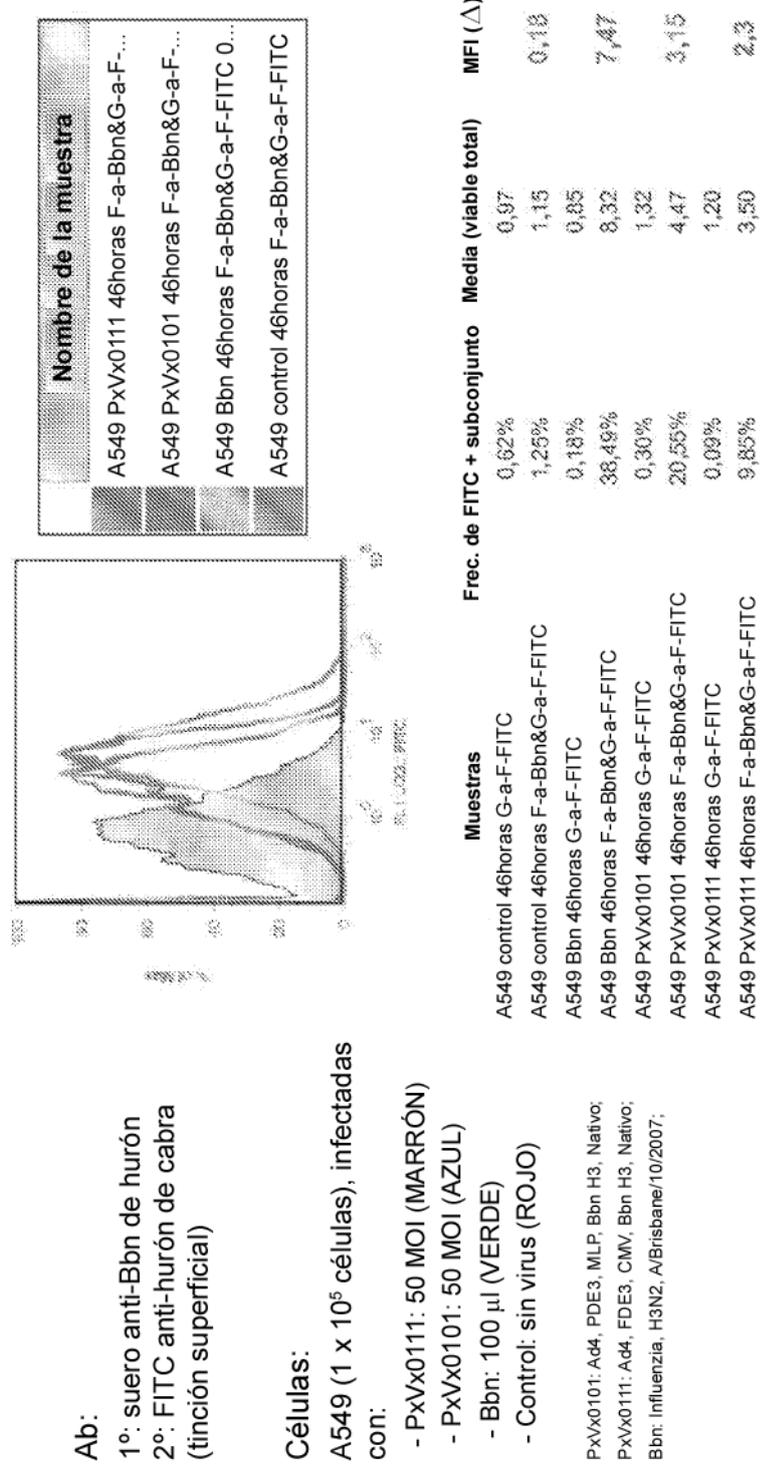


Figura 8A

Ensayo de crecimiento de una etapa

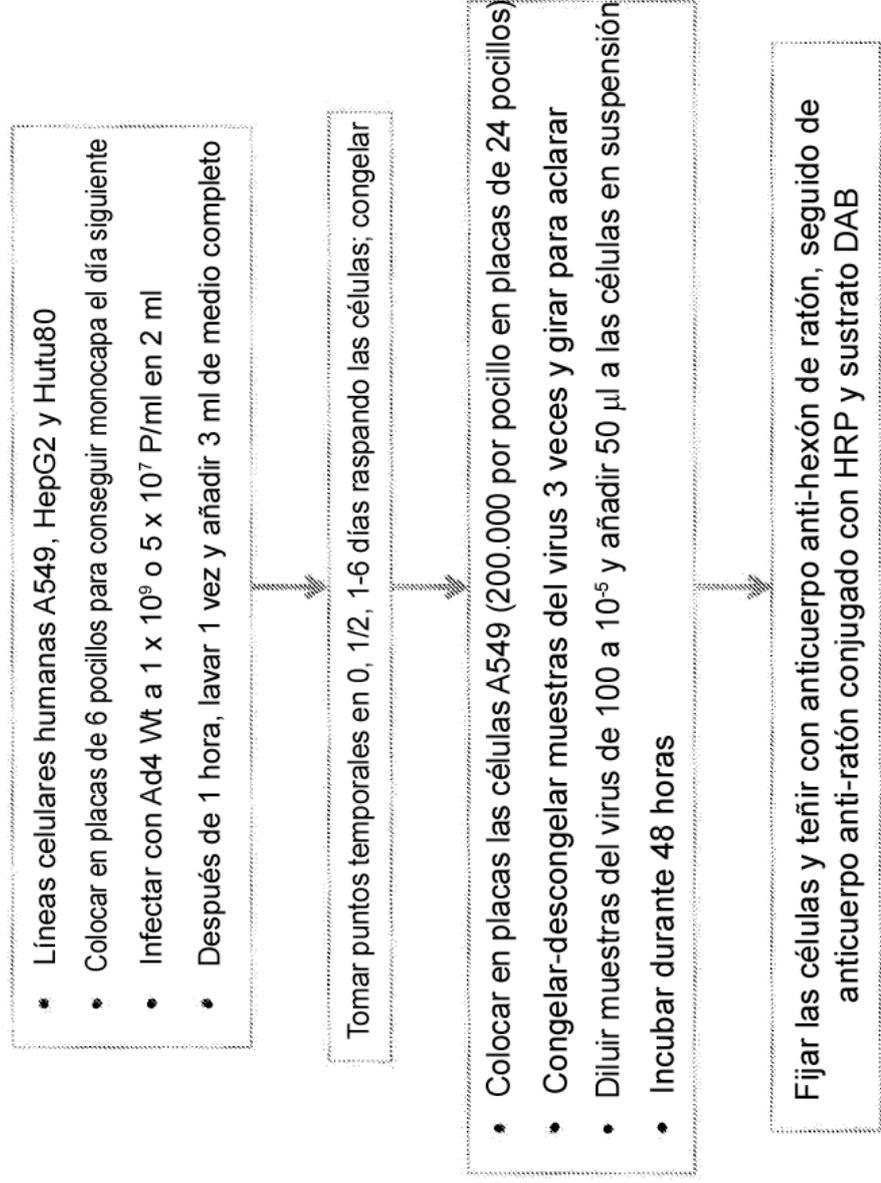


Figura 8B
Ensayo de crecimiento de una etapa
Comparación de PXVX0101 y PXVX0111

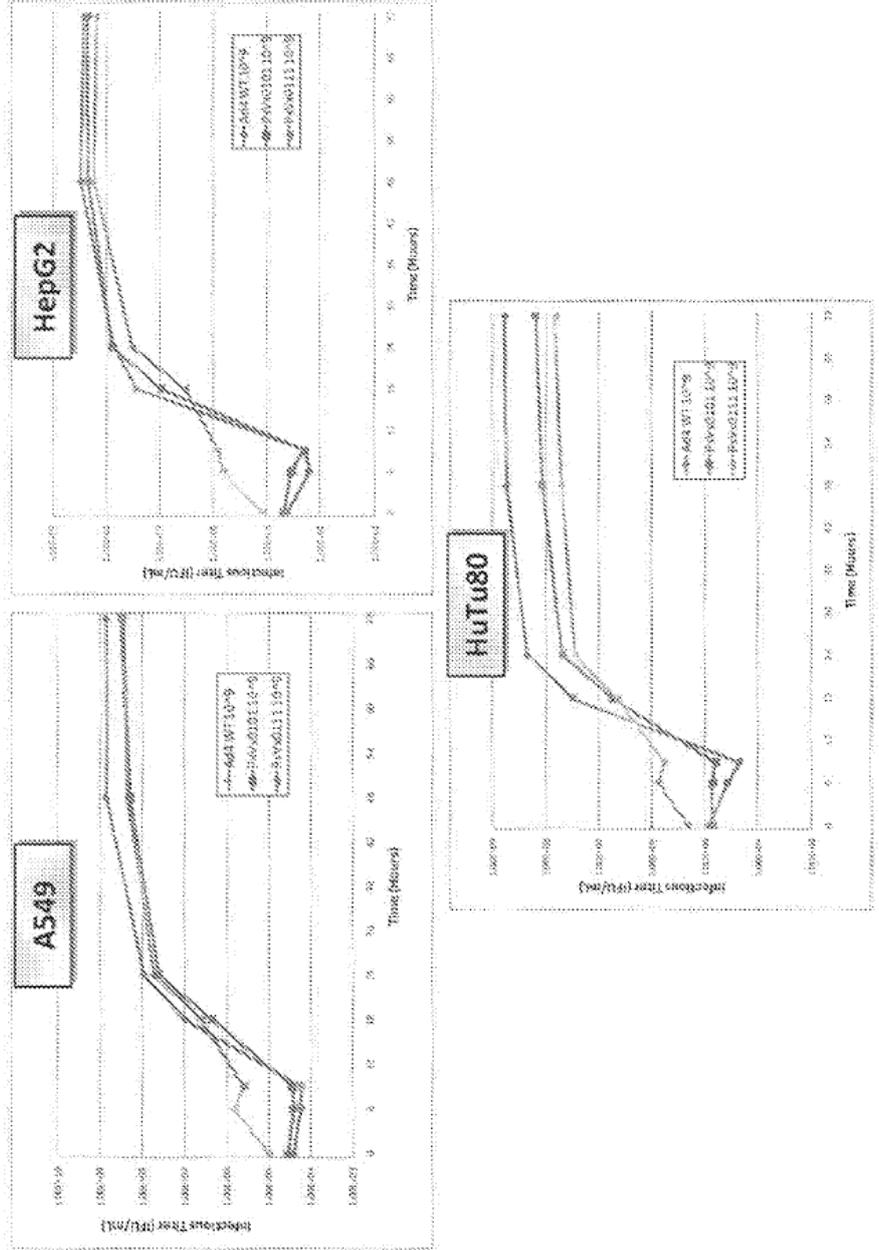
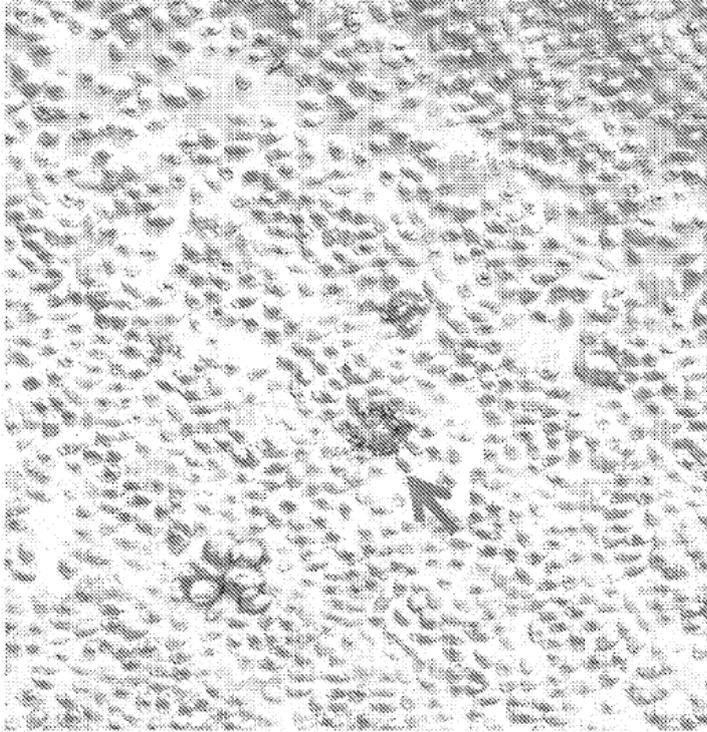


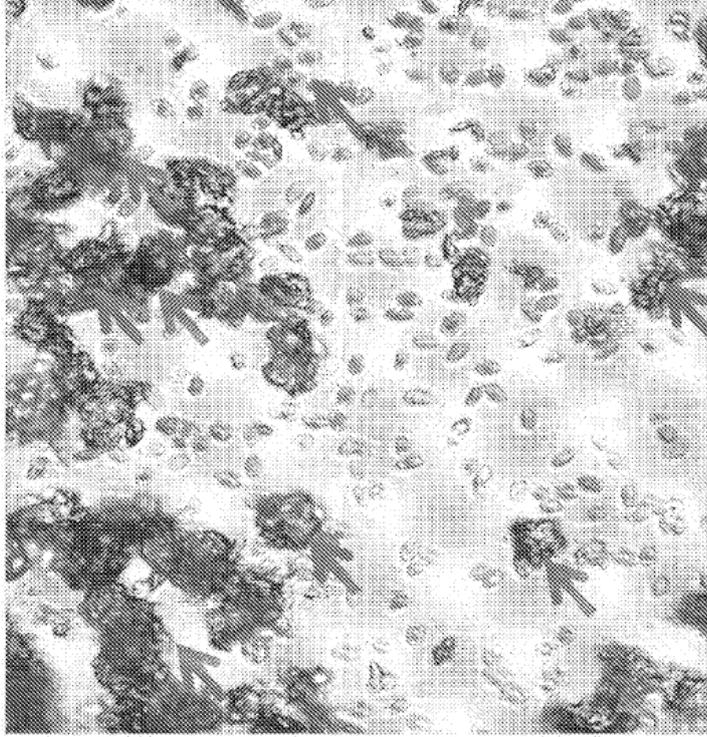
Figura 9A

**Células A549 infectadas con virus de
Influenza más RBC de pollo**



Virus de la gripe Bbn (H3N2)

+/-

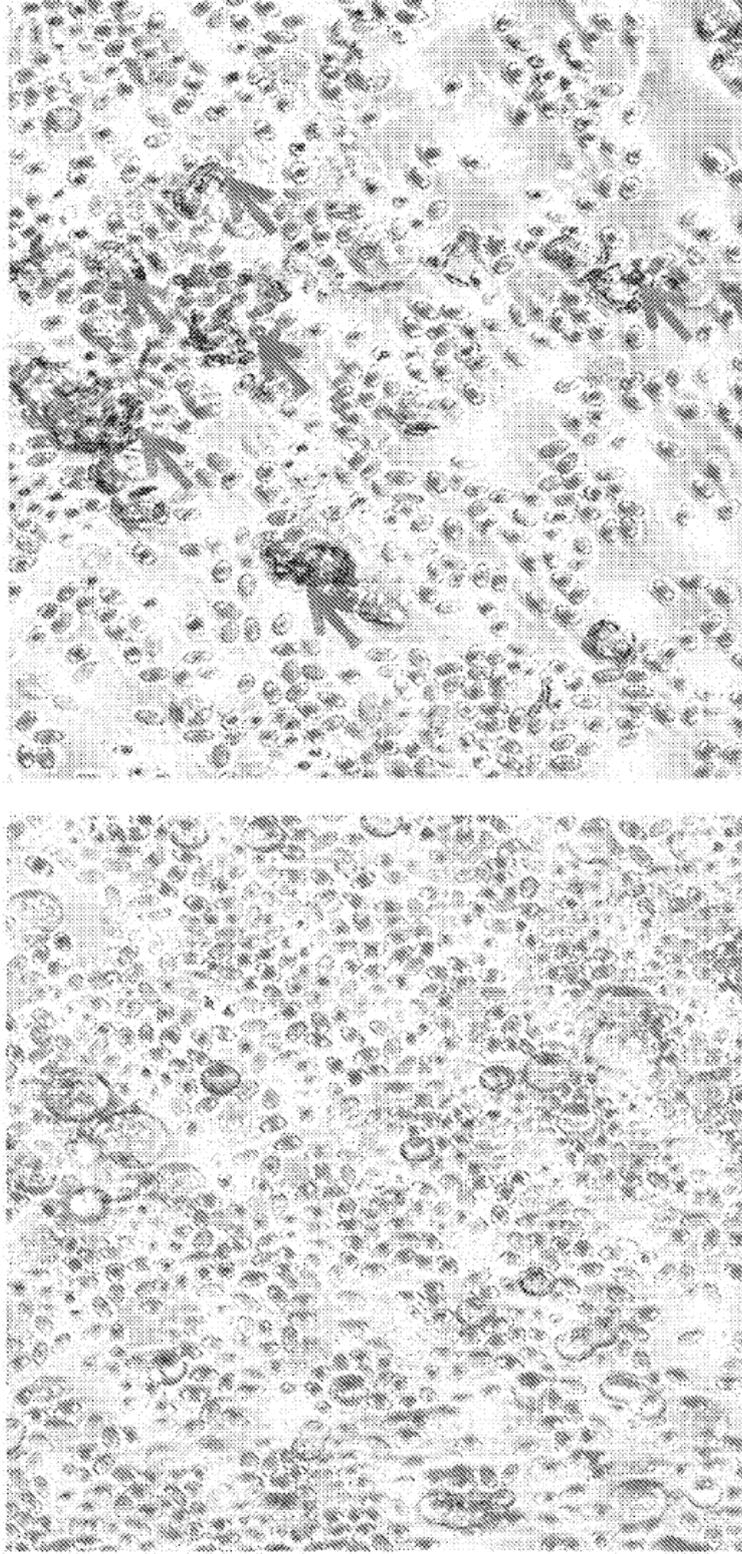


Virus de la gripe PR8 (H1N1)

++++

Figura 9B

**Células A549 infectadas
con Ad4-Ha más RBC de pollo**



Ad4 wt

PXVX0101 PE3 MLTU-Bbn H3

-

++

Figura 10

Diseño de hexón

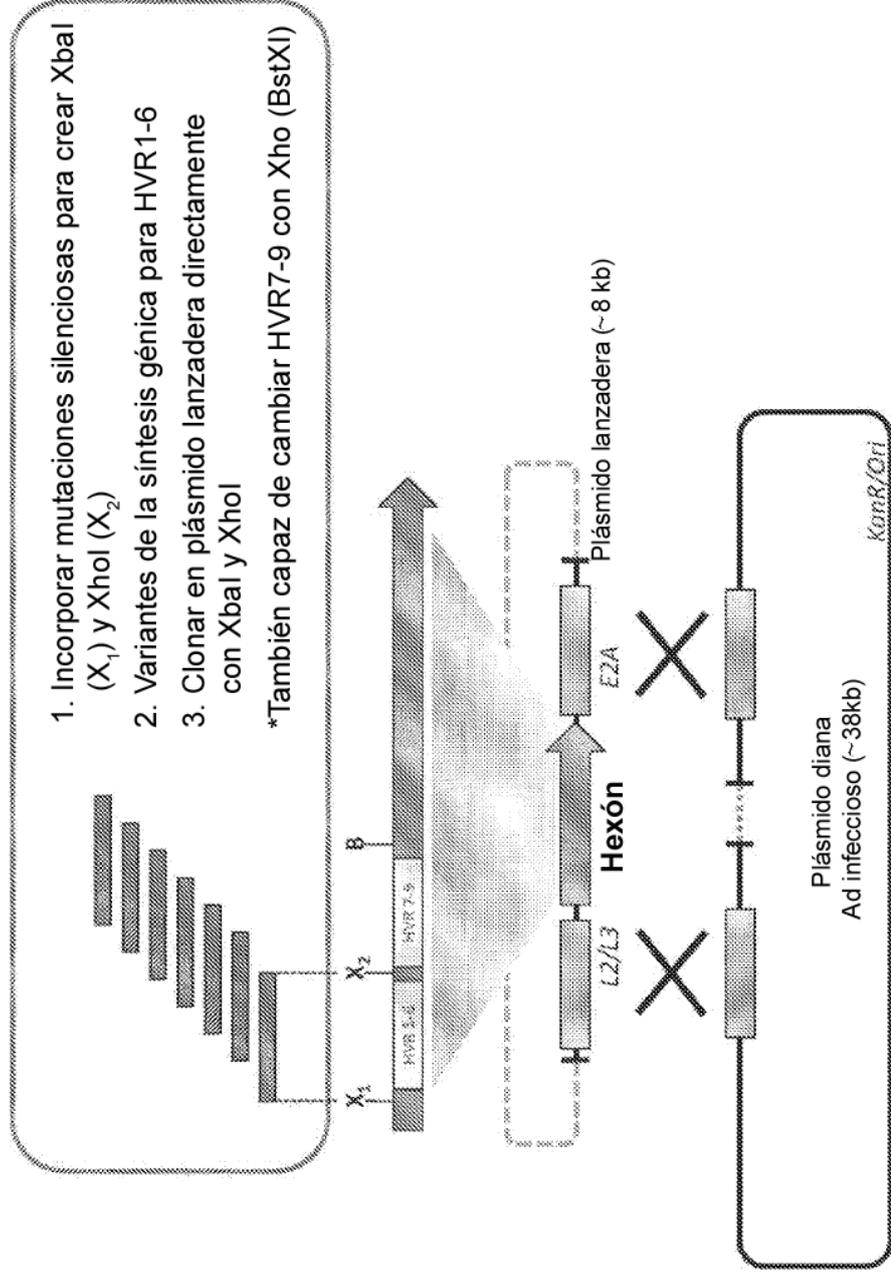


Figura 11

Diseño de hexón

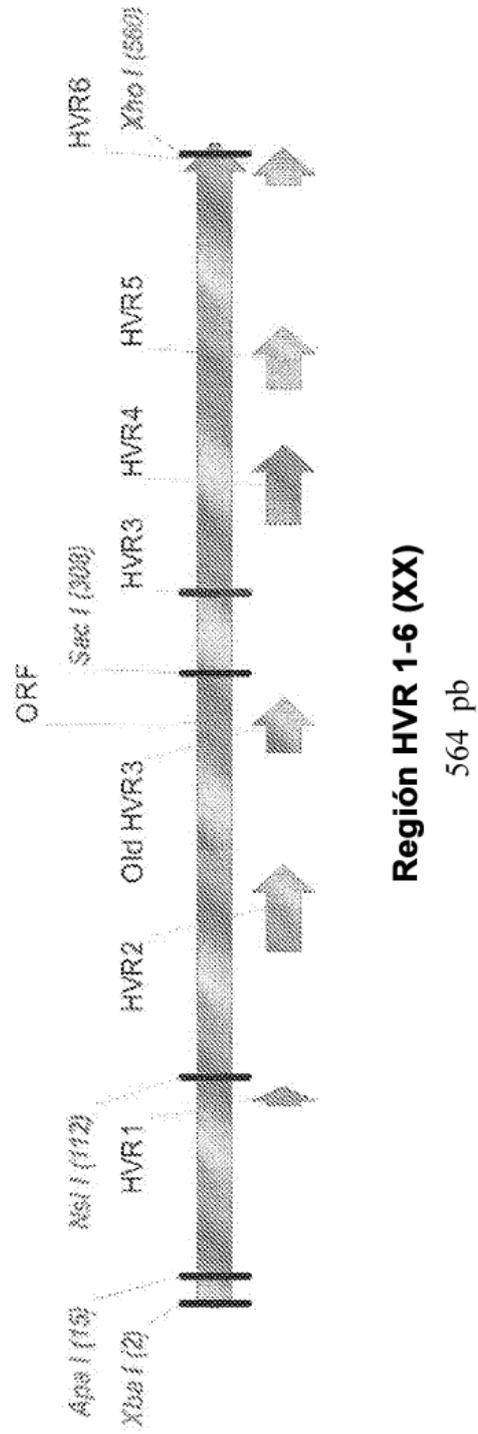


Figura 13 Diagrama de sitios y secuencias de inserción

Hex	1	2	3	4	5	6	7(7-9)
Hex1					M2e (H5)		
Hex2	M2e (H5)						
Hex3		M2e (H5)					
Hex4			M2e (H5)				
Hex5				M2e (H5)			
Hex6	M2e (H5)				M2e (H5)		
Hex7	M2e (H5)						
Hex8	M2e (H7)						
Hex9	M2e (H7)						
Hex10	Ad7						
Hex11	Ad7						
Hex12	Matriz						
Hex13	Matriz						
Hex14							
Hex15							
Hex16	Matriz						
Hex17							

Figura 14
PXVX0103 y PXVX0116 purificados
inducen respuestas de anticuerpo
específico de HA en ratones

Estudio 3 - Criterios de valoración de ELISA H5 y HAI

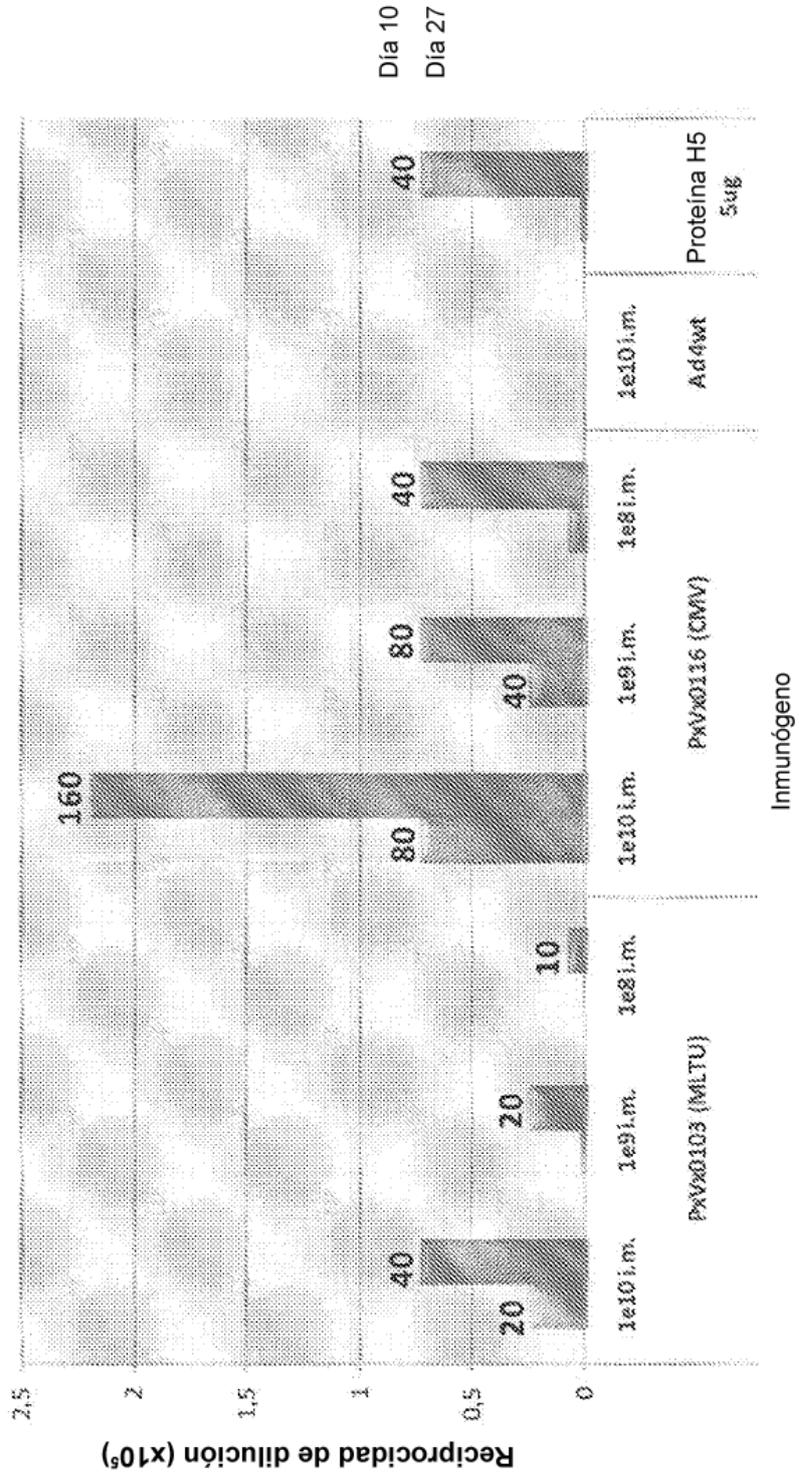


Figura 15

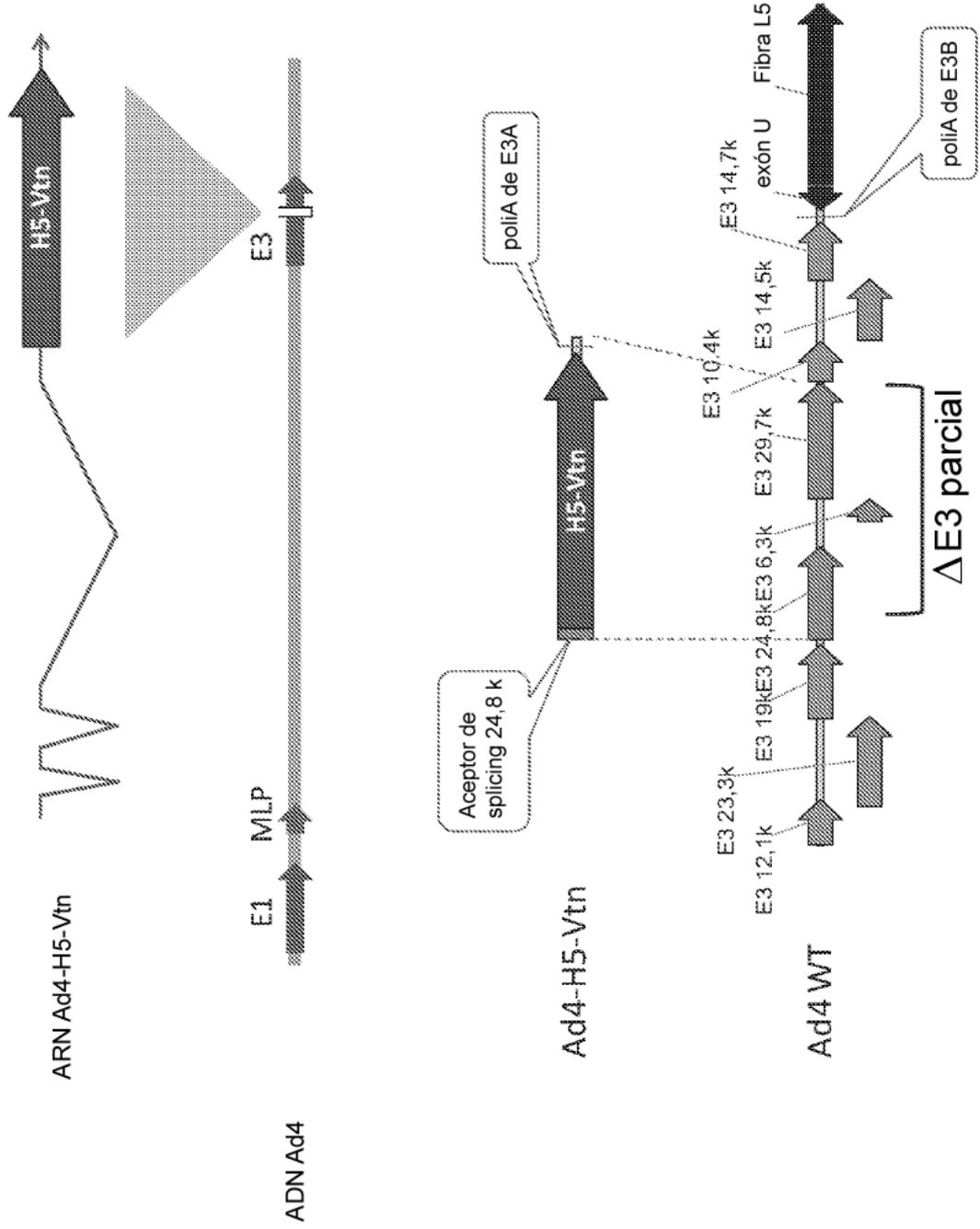


Figura 16

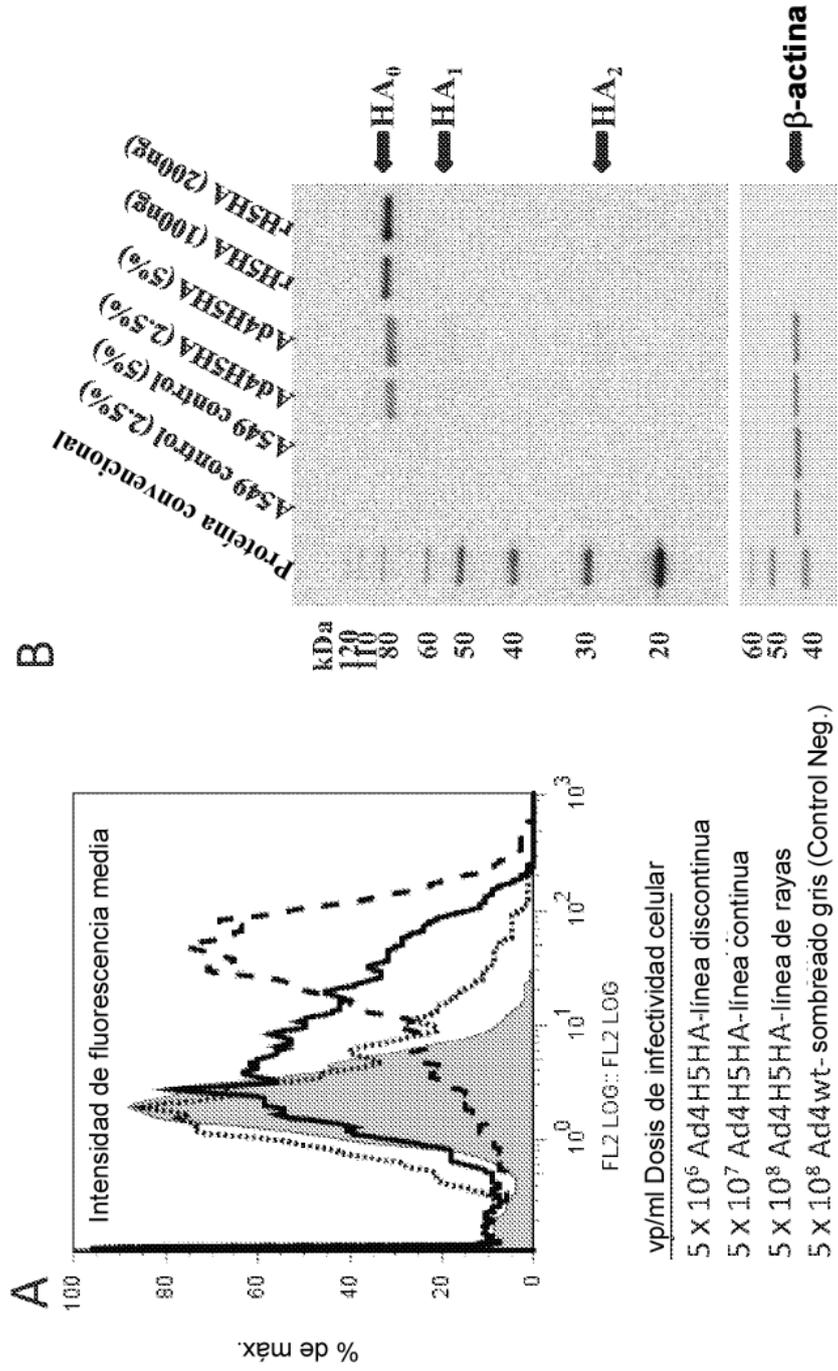


Figura 17

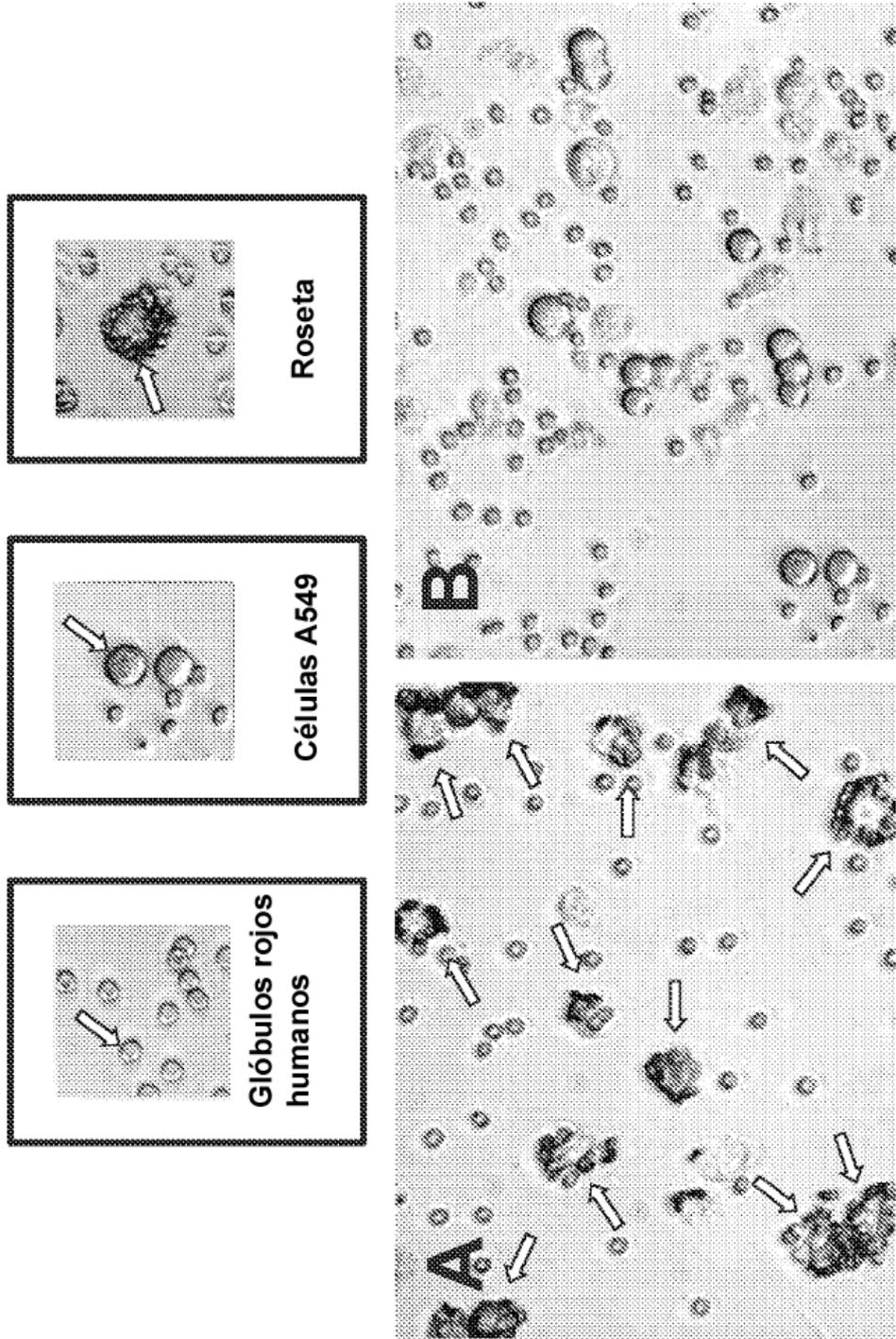


Figura 18

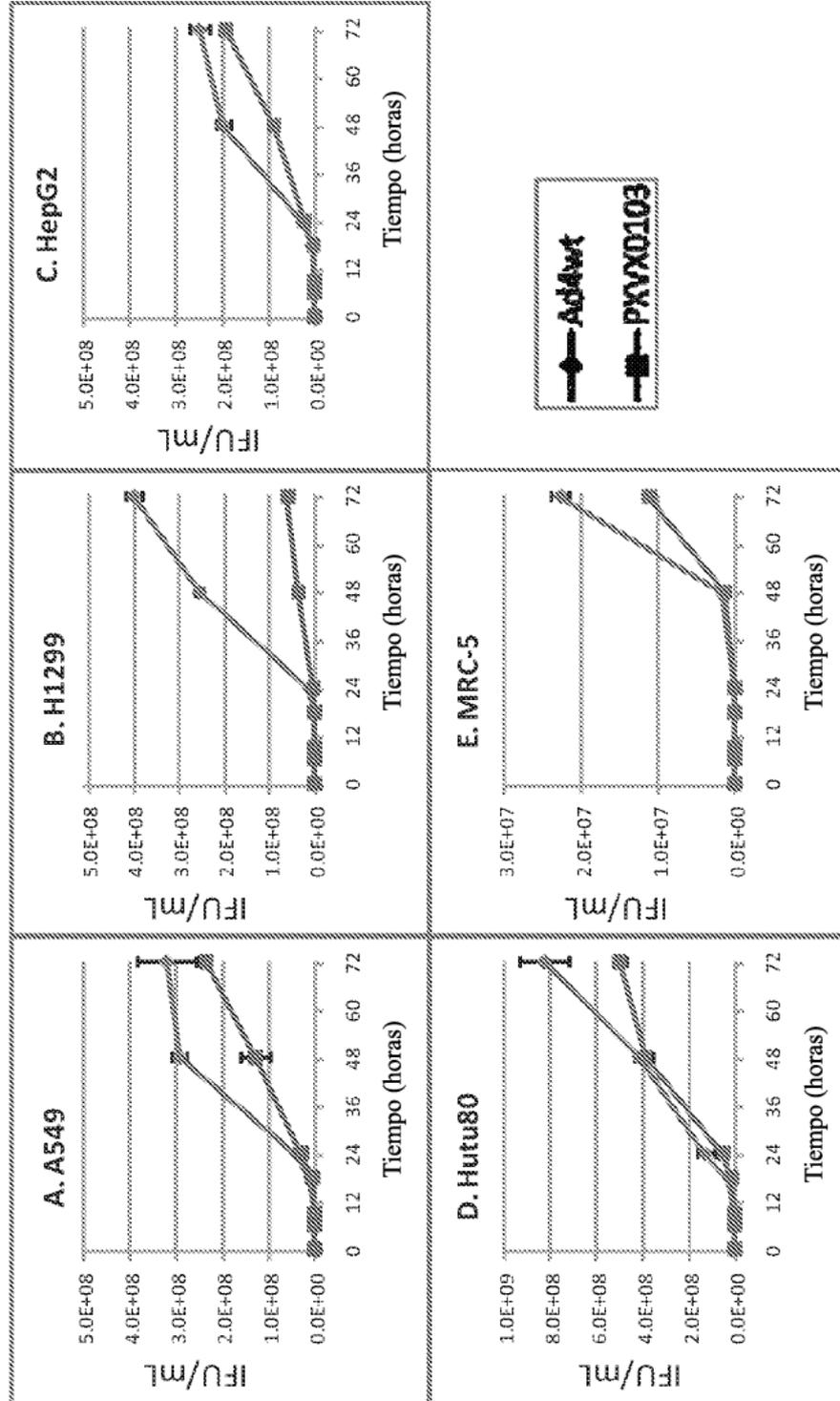


Figura 19

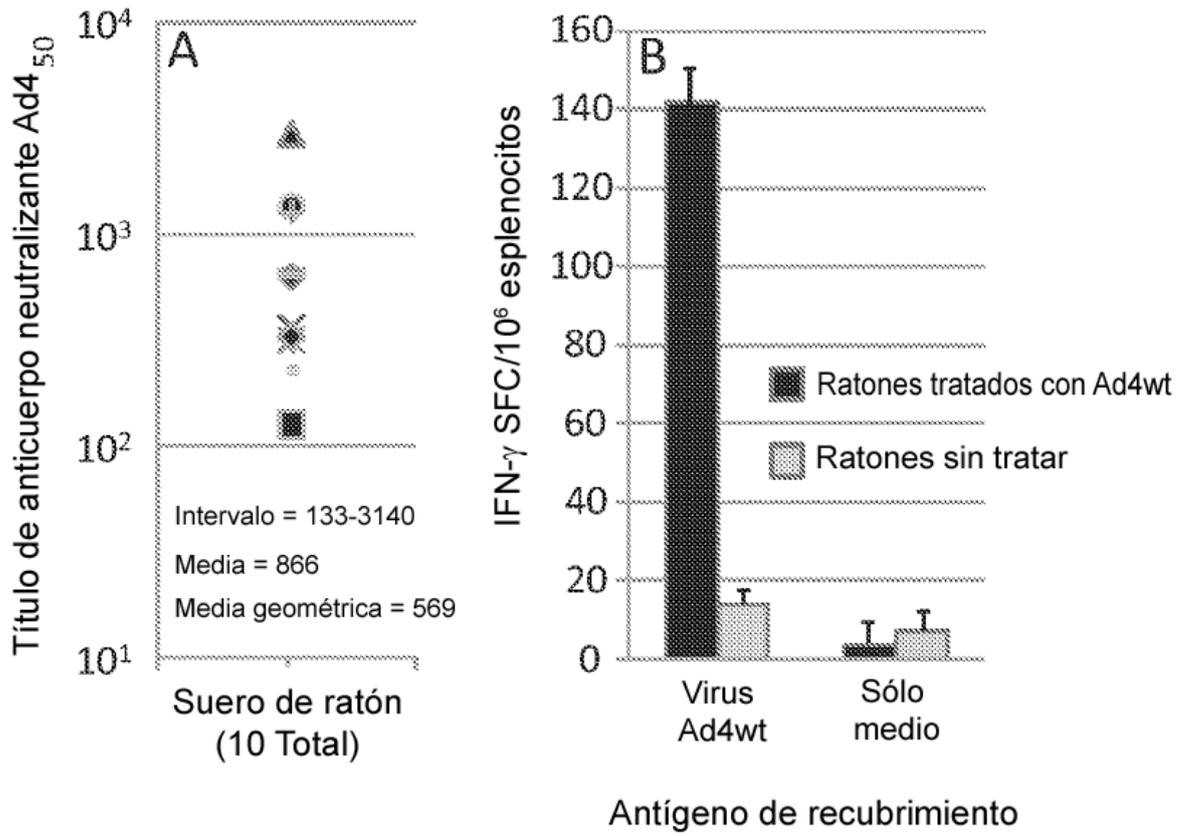


Figura 20

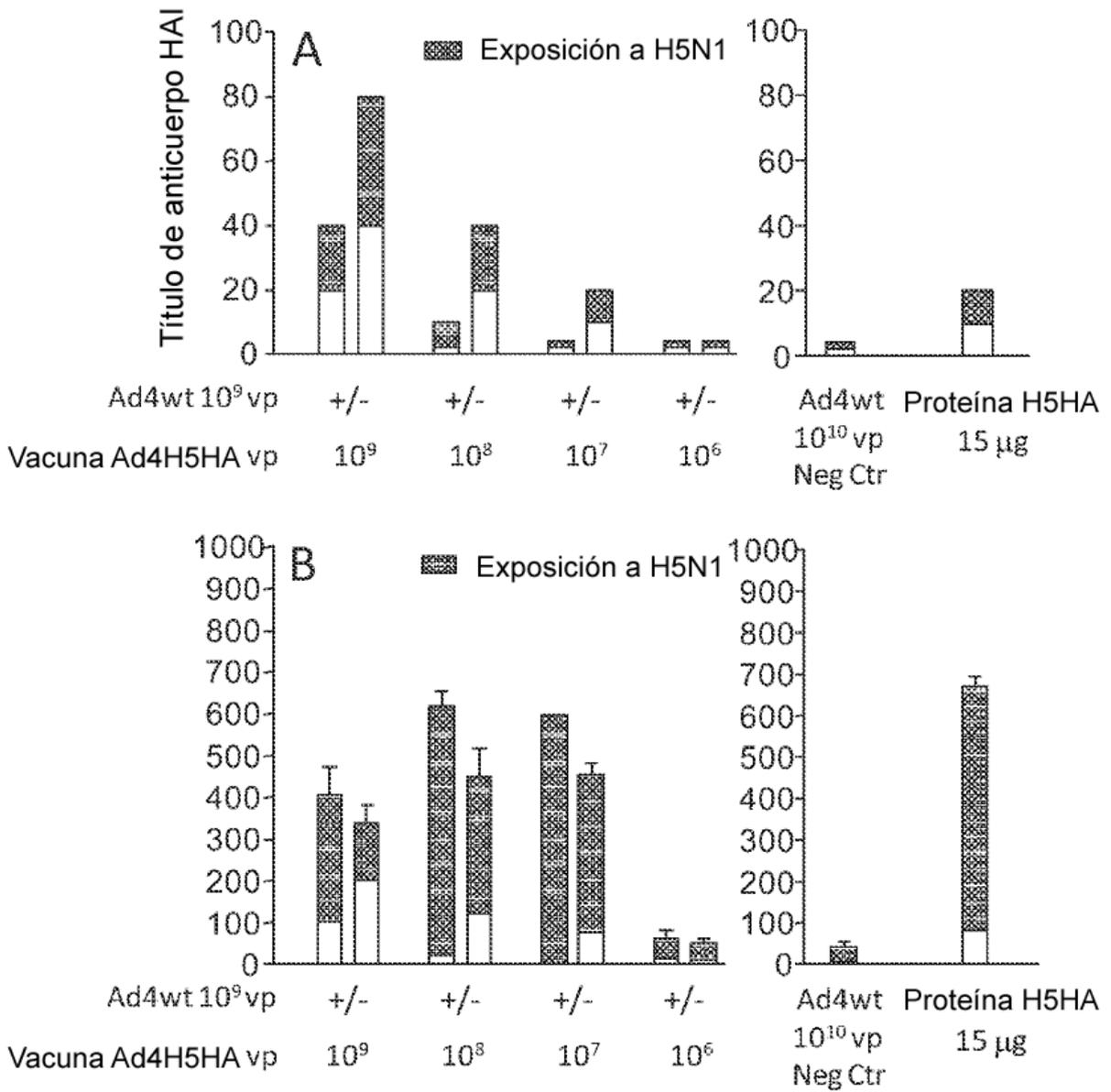


Figura 21

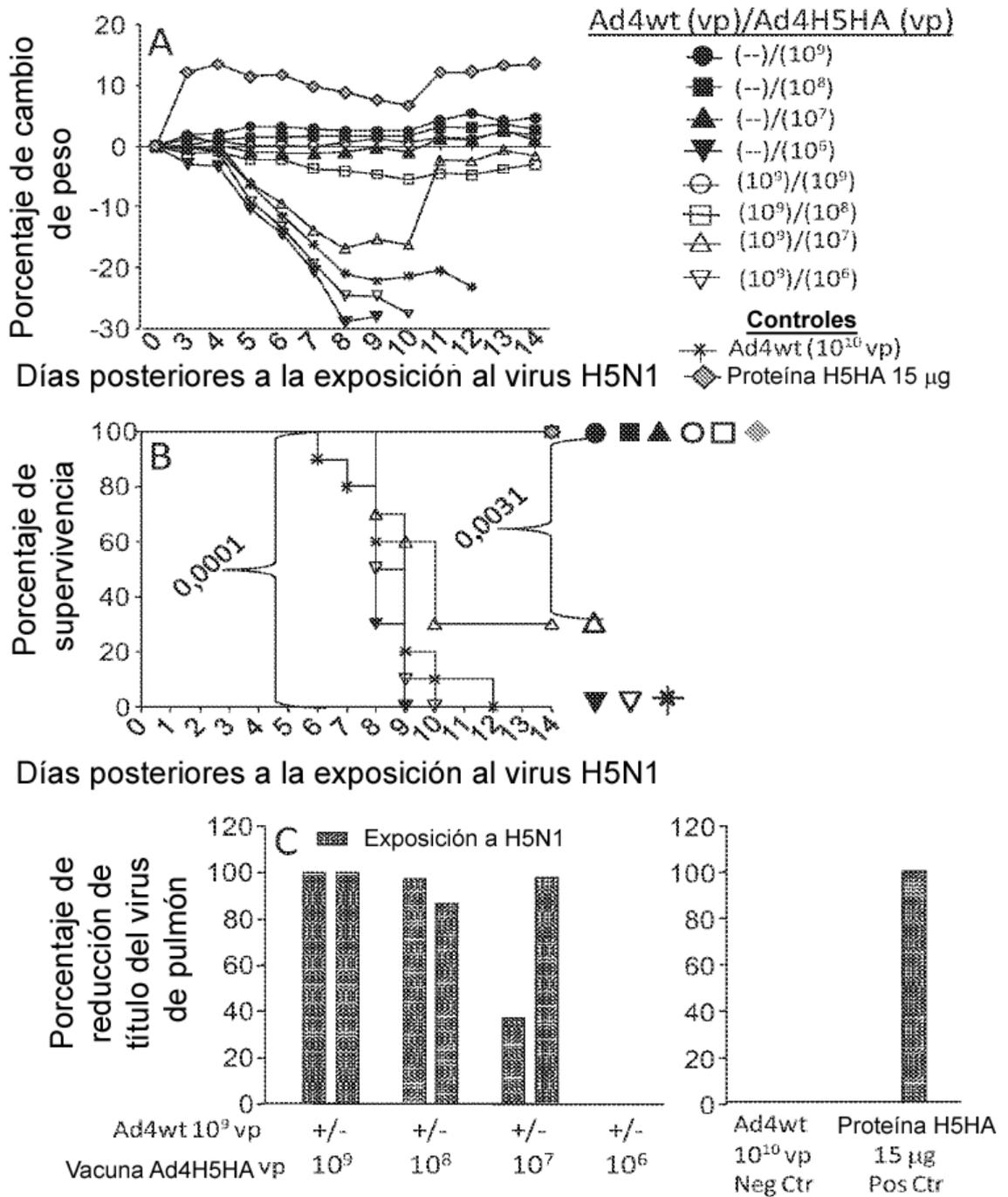


Figura 22

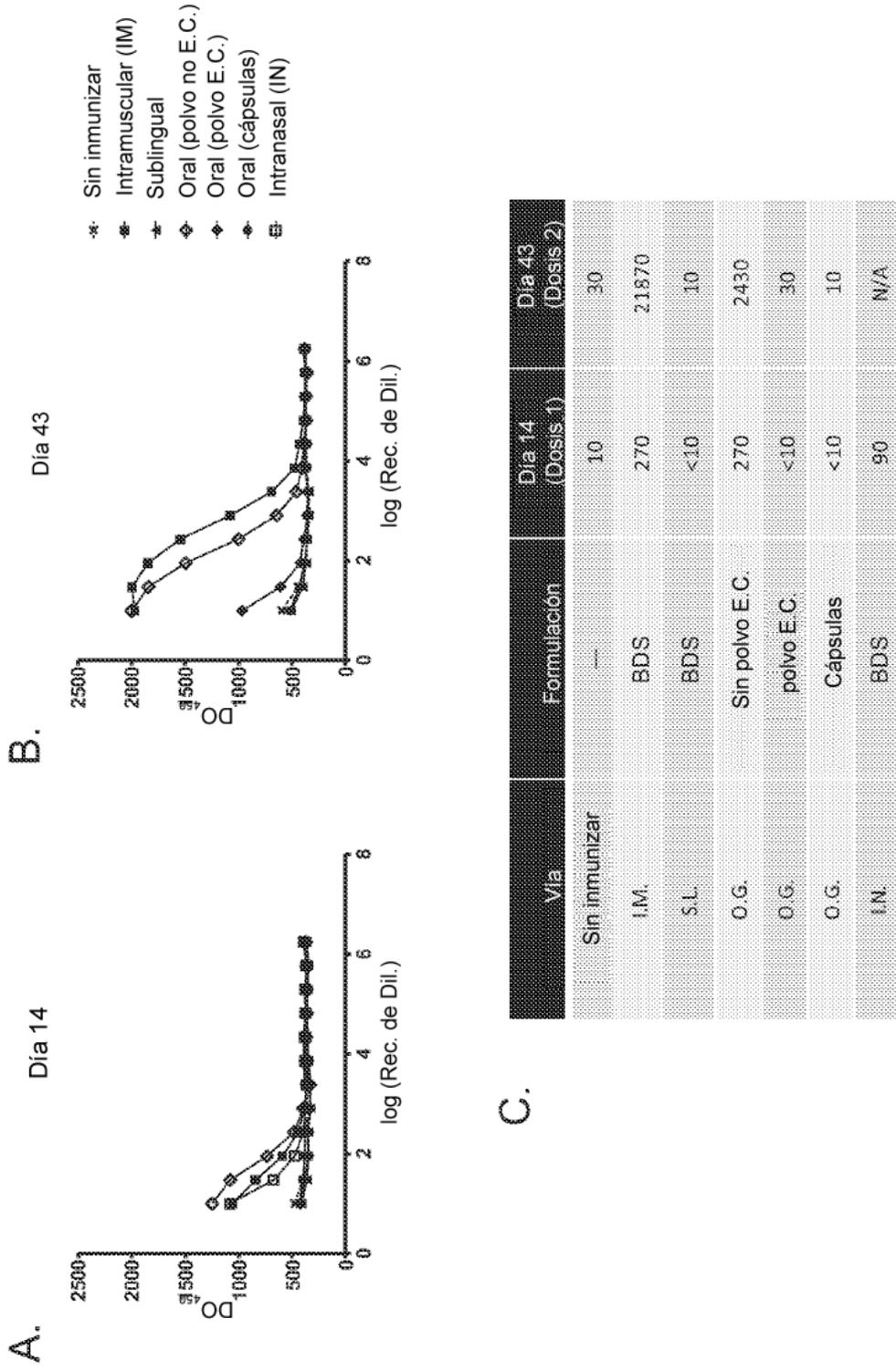


Figura 23

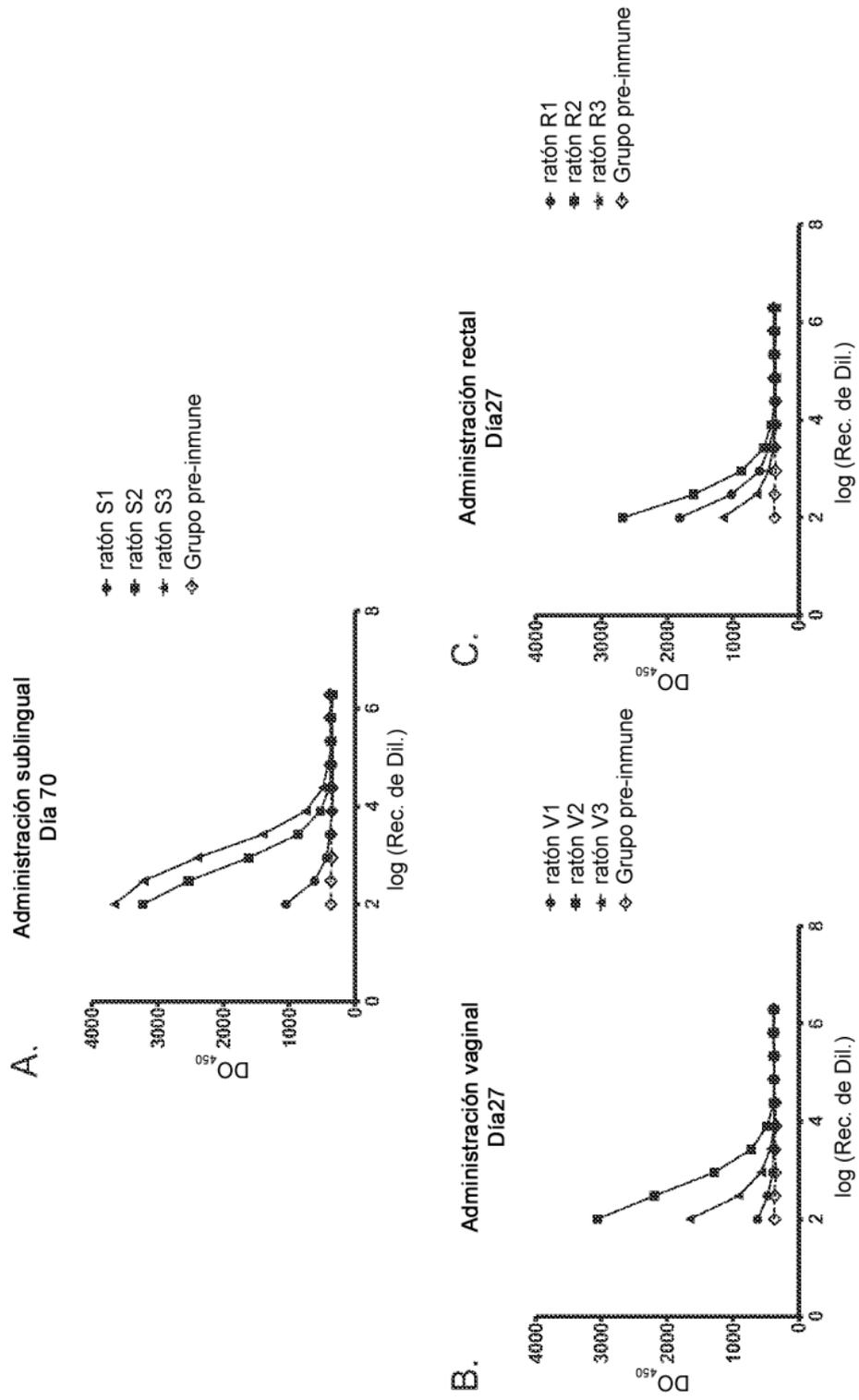


Figura 24

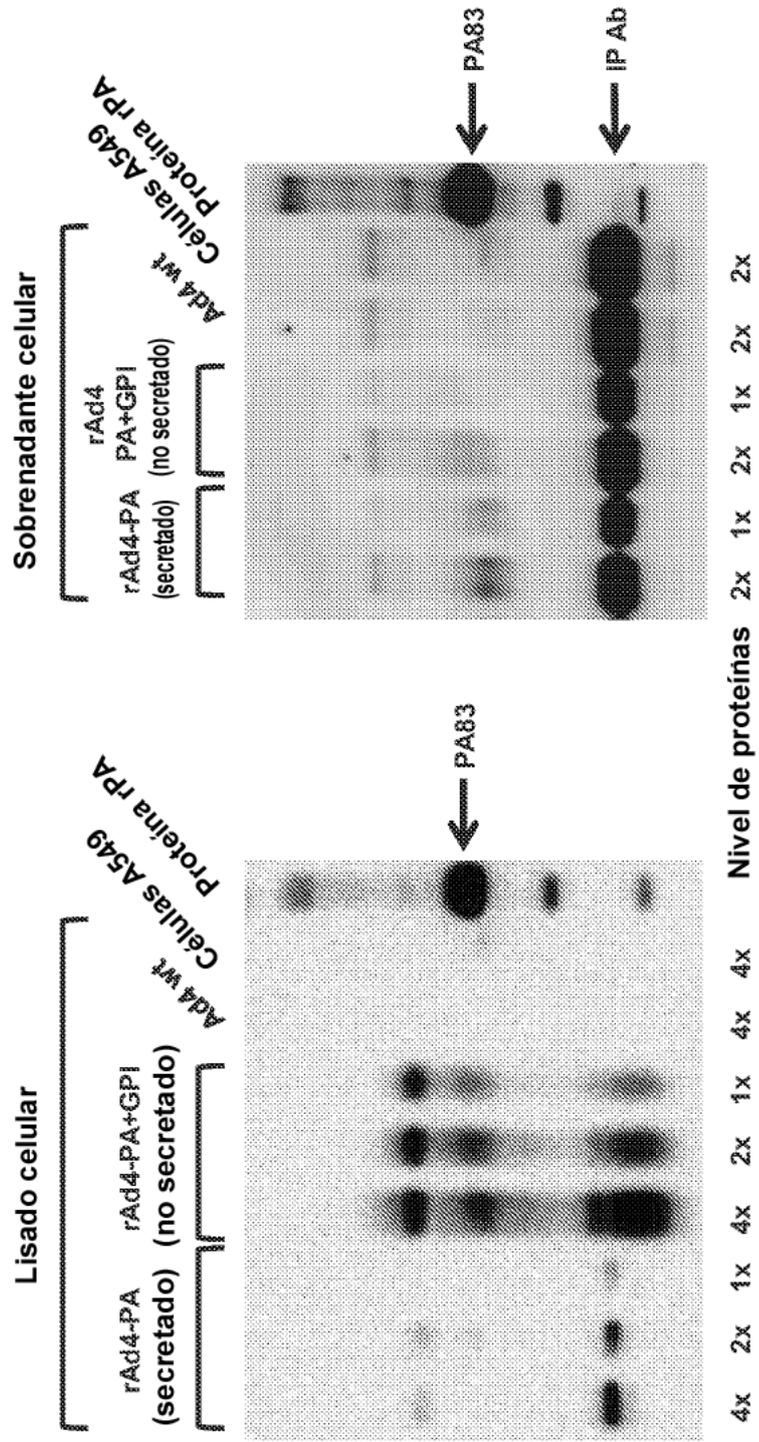


Figura 25

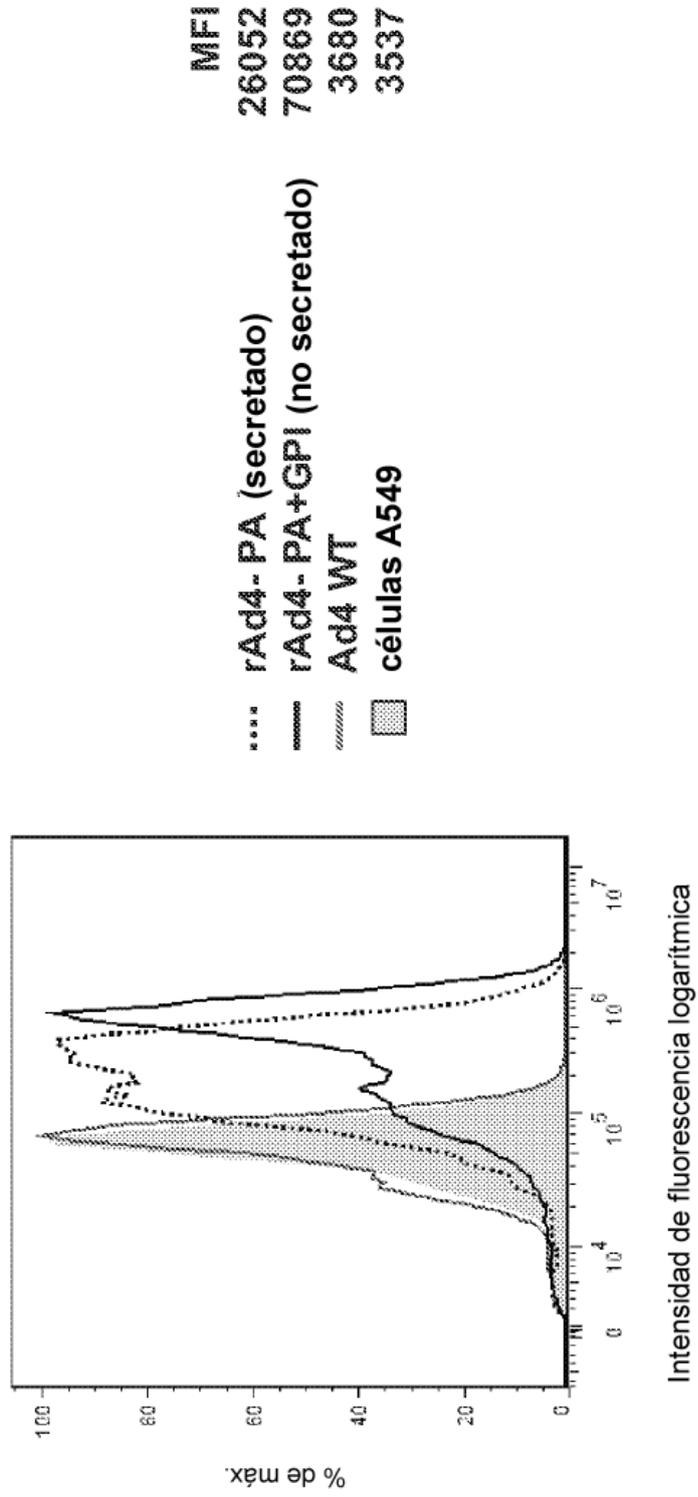
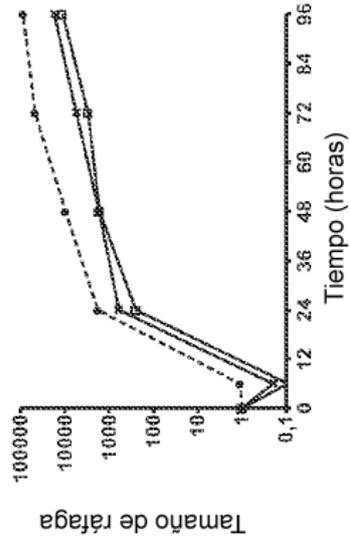
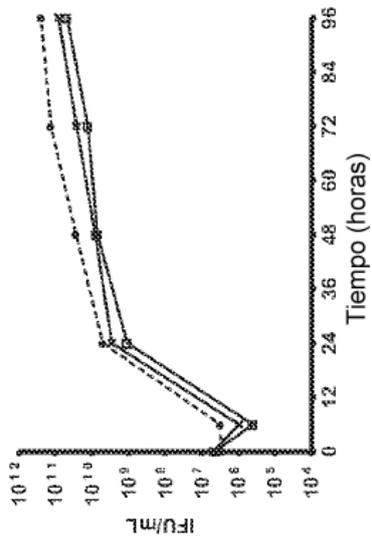
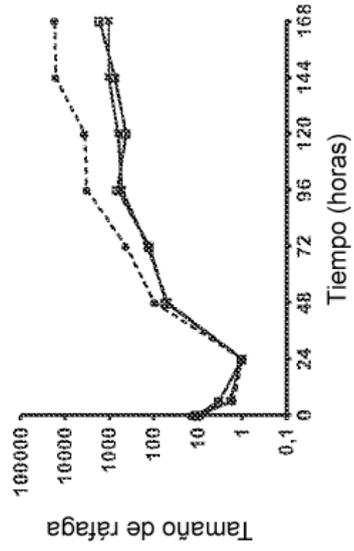
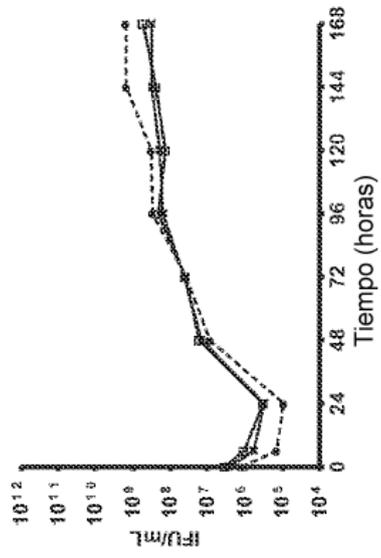


Figura 26

A549



MRC-5



- WT Ad4
- PXVX0212 (PA)
- PXVX0214 (PA+GPI)
- MRC-5

Figura 27

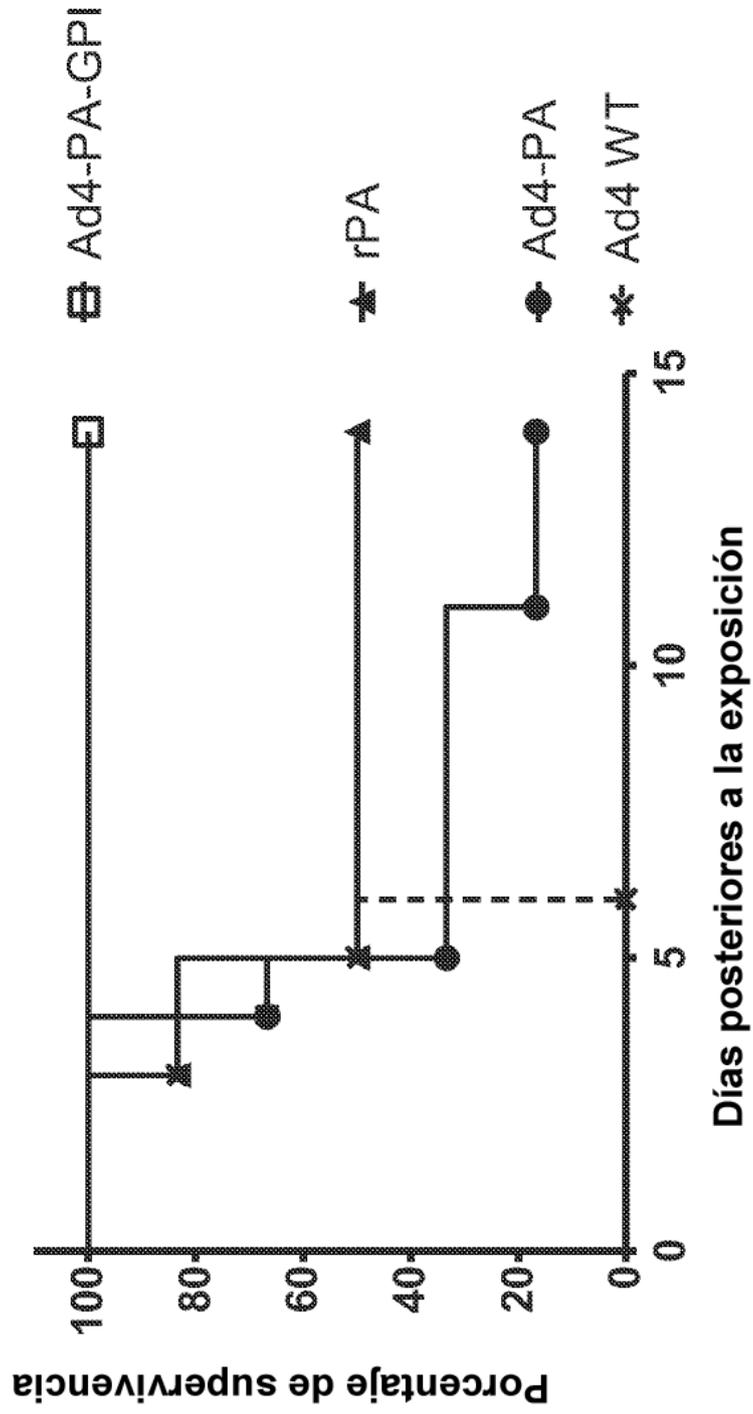


Figura 28

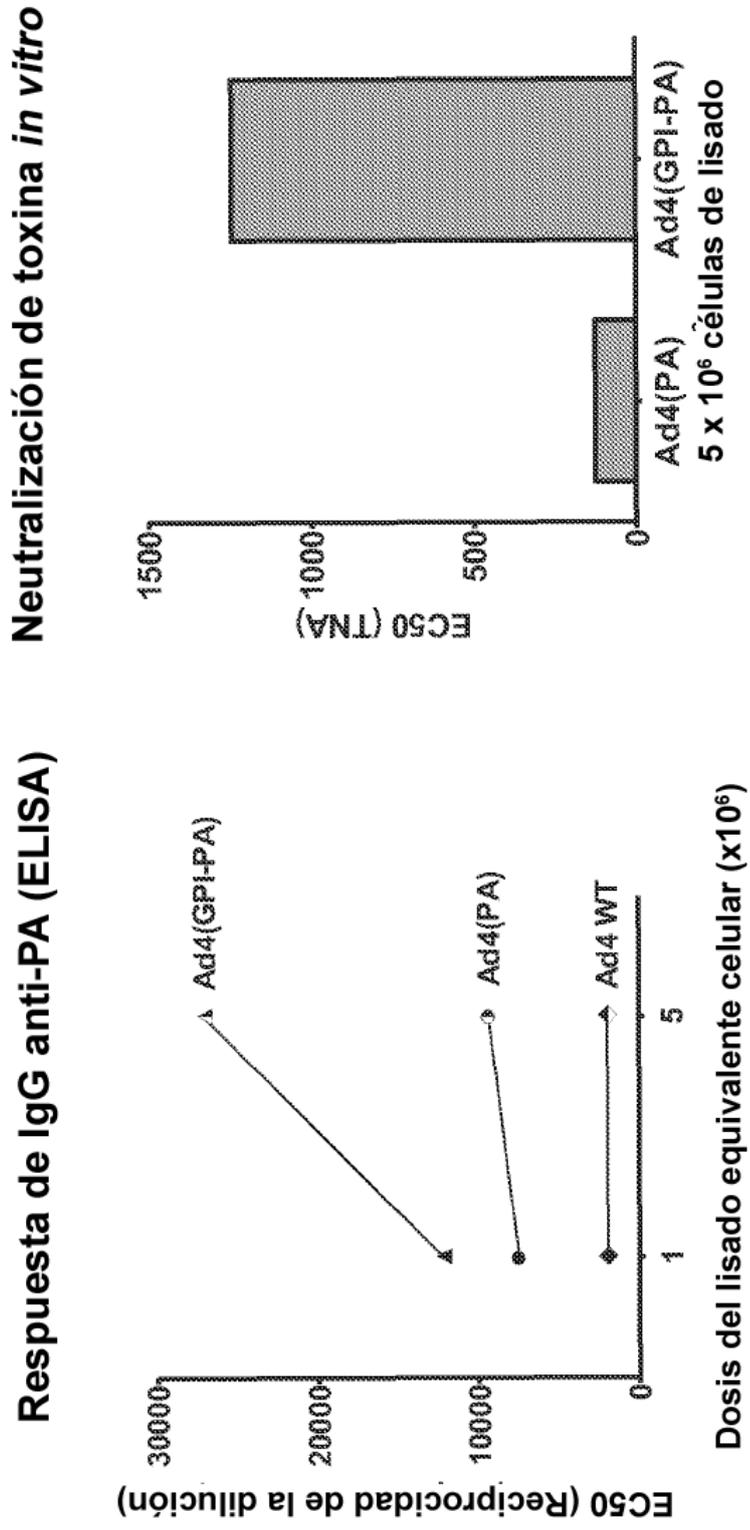


Figura 29

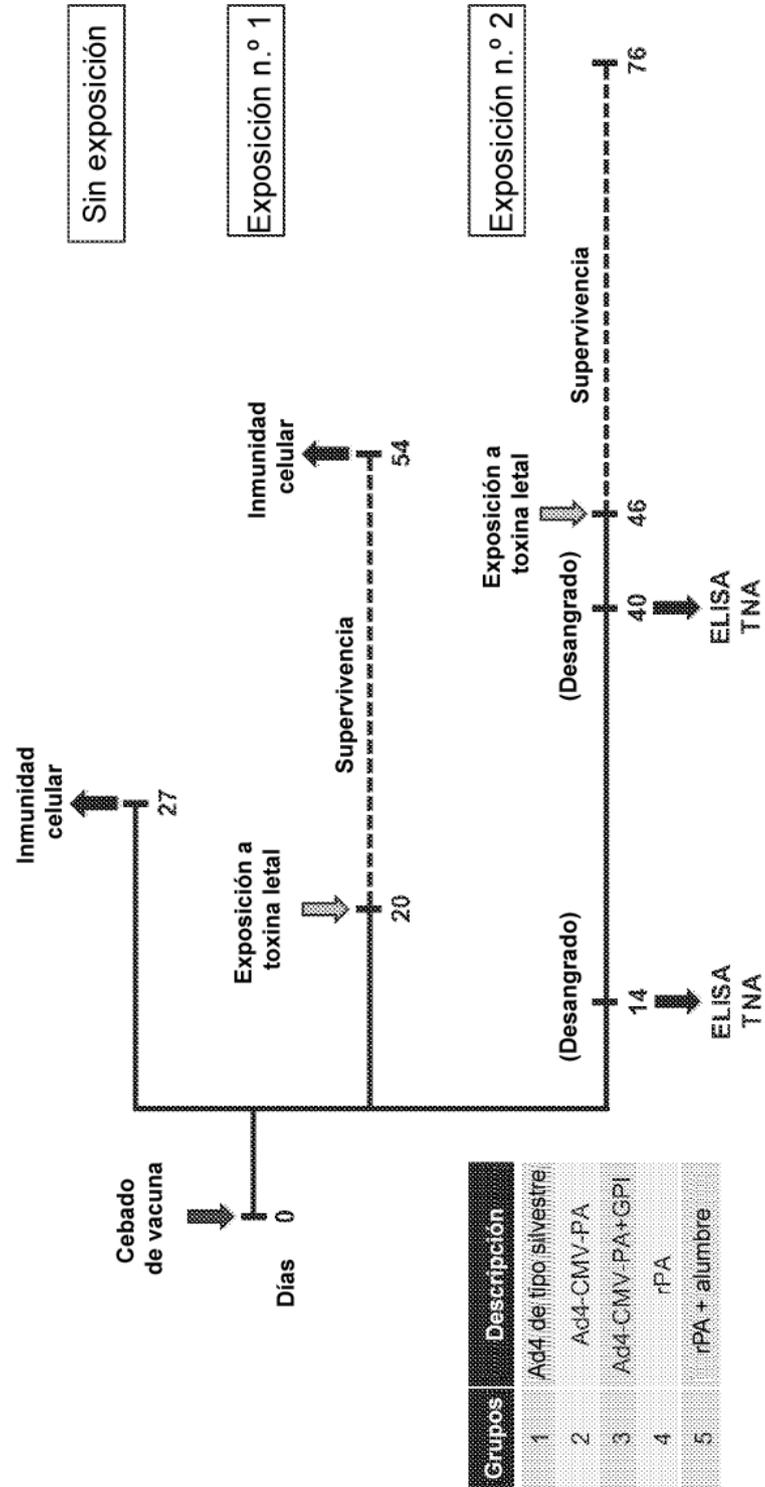


Figura 30

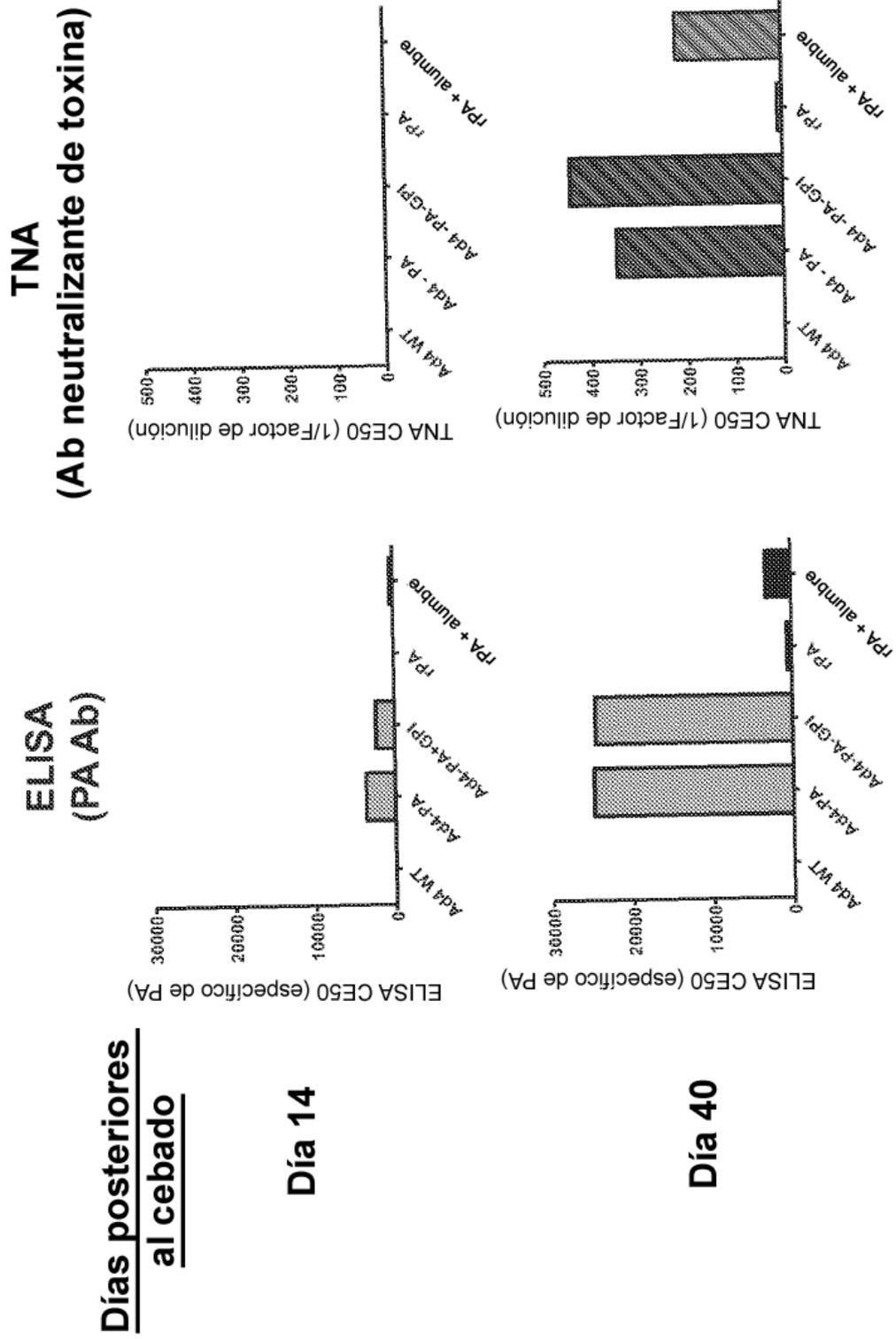


Figura 31

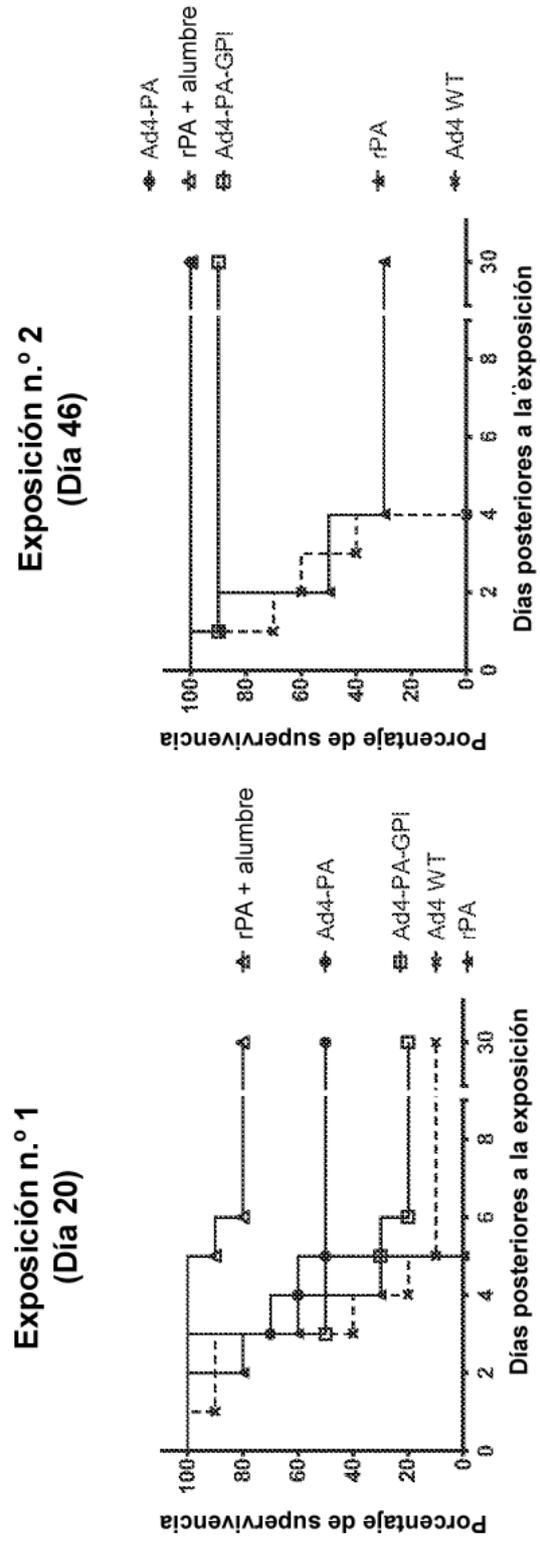


Figura 32

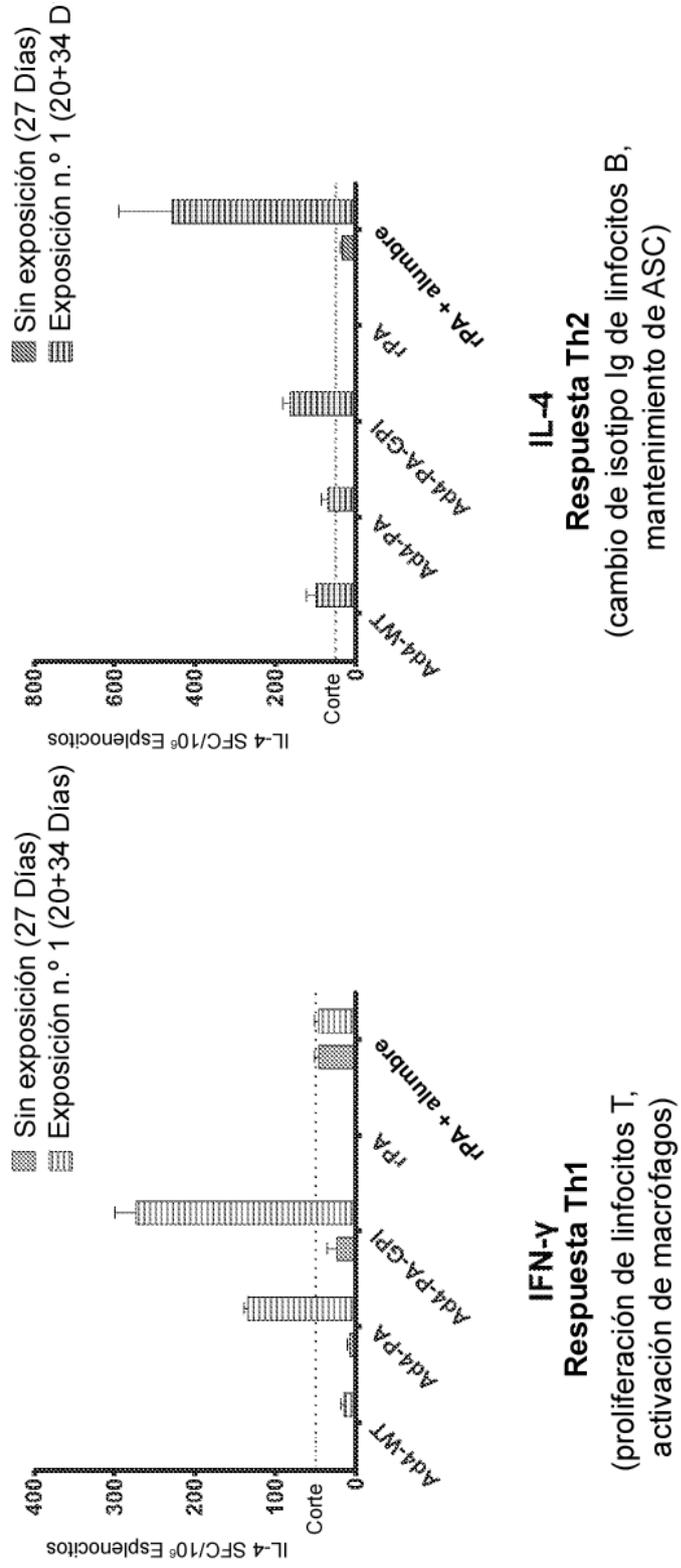


Figura 33

