(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 682 998**

(51) Int. CI.:

C12N 15/09	(2006.01)	***A61K 39/145***	(2006.01)
A61K 39/155	(2006.01)	***C07K 14/005***	(2006.01)
A61P 31/16	(2006.01)		
C07K 14/11	(2006.01)		
C07K 16/10	(2006.01)		
C07K 19/00	(2006.01)		
C12N 1/15	(2006.01)		
C12N 1/19	(2006.01)		
C12N 1/21	(2006.01)		
C12N 5/10	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2010 PCT/JP2010/064166**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2011 WO11024748**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2010 E 10811798 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2471915**

(54) Título: **Vacuna de péptido modificado derivada de M2 de influenza**

(30) Prioridad:

28.08.2009 JP 2009197564
16.03.2010 JP 2010058577

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.09.2018

(73) Titular/es:

THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
1-6-1 Okubo, Kita-ku
Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8568, JP

(72) Inventor/es:

KAMINAKA, KAZUYOSHI;
NOZAKI, CHIKATERU;
MATSUDA, JUNICHI y
NISHIYAMA, KIYOTO

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

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

Vacuna de péptido modificado derivada de M2 de influenza

Campo técnico

La presente invención está definida por las reivindicaciones. La presente invención se refiere a un péptido modificado que se prepara insertando uno o varios residuos de cisteína en un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las posiciones Núm. 2 a Núm. 24 de la proteína matriz 2 en el virus de la influenza (M2e), en donde dichos uno o varios residuos de cisteína se insertan en una posición entre la Núm. 20 y la Núm. 21 de M2e, o en una combinación de dos o más posiciones entre la Núm. 15 y la Núm. 16, entre la Núm. 20 y la Núm. 21, entre la Núm. 21 y la Núm. 22, entre la Núm. 22 y la Núm. 23 y entre la Núm. 23 y la Núm. 24 de M2e.

Técnica anterior

El virus de la influenza pertenece a la familia Orthomyxoviridae y es un virus de ARN monocatenario de hebra negativa. El tamaño de la partícula viral es de 80 a 120 nm. La partícula viral tiene aglutinina eritrocitaria (hemaglutinina, HA), neuraminidasa (NA) y proteína matriz 2 (M2) en la membrana bicapa lipídica de la capa superficial, que está revestida con proteína matriz 1 (M1). Un ARN de hebra negativa segmentado dentro de la capa superficial forma un complejo (RNP) con una proteína nuclear (NP) y una ARN polimerasa (PA, PB1, PB2). El virus de la influenza se clasifica en tipo A, B o C dependiendo de la antigenicidad de la proteína interna, entre los cuales el tipo A y el tipo B pueden causar una epidemia de influenza en seres humanos. Es el tipo A el que puede causar una pandemia de influenza con una potente patogenicidad. Para el virus de la influenza tipo A, se sabe que hay muchos serotipos resultantes de la combinación de 16 subtipos para HA y 9 subtipos para NA.

Se sabe que, en general, un virus de ARN es susceptible a la mutación. El virus de la influenza no es una excepción y su antigenicidad ha cambiado año tras año a través de la mutación puntual de un gen que codifica HA o NA (deriva antigénica). Para el virus de la influenza tipo A, se sabe que una nueva cepa de virus antigénicamente diferente se desarrolla por una mutación discreta que reemplaza uno o ambos HA y NA por otro u otros subtipos en un intervalo de varias décadas (cambio antigénico). La mutación viral de la influenza por la deriva y/o cambio antigénico continuamente causa daños a los seres humanos. En el pasado, se habían producido varios cambios de antigenicidad en el mundo, que causaban epidemias (pandemias) que producían muchas víctimas. Específicamente, hubo gripe española en 1918, gripe asiática en 1957, gripe de Hong Kong en 1968 y gripe rusa en 1977.

La influenza causada por la infección del virus de la influenza es una de las enfermedades infecciosas graves que se producen en epidemias a escala mundial. Ha habido muchos casos de muerte o encefalitis en ancianos, niños o pacientes con un sistema inmunológico débil. Incluso si la infección por el virus de la influenza no provoca la muerte en los pacientes, los síntomas físicos como fiebre, dolor de cabeza y fatiga pueden obligar a los pacientes a suspender las actividades sociales durante un período de tiempo determinado, lo que da como resultado una gran pérdida económica. Por lo tanto, existe la necesidad de establecer una medida preventiva eficaz incluso contra una nueva cepa de virus, debido a la mayor probabilidad de que se produzca una nueva cepa de virus por cambio de antigenicidad, además de la importancia de la protección convencional contra la infección por virus de la influenza.

Una medida preventiva contra la influenza es realizar la vacunación todos los años. Las vacunas actualmente en uso práctico son vacunas divididas que comprenden como ingrediente principal HA purificada a partir de una cepa para la preparación de una vacuna cultivada con huevos embrionados de pollo. Por lo tanto, como cepa para la preparación de una vacuna se utiliza un virus que se predice que aparecerá en epidemias en el año. Por lo tanto, es necesario determinar una cepa para la preparación de una vacuna cada año prediciendo la cepa que causa epidemias, y en caso de disparidad entre la cepa para la preparación de una vacuna y la cepa que causa epidemias, la vacuna sería menos efectiva. En comparación con las vacunas que brindan inmunidad durante al menos varios años con un solo calendario de vacunación como DPT (difteria, tos ferina, tétanos) y encefalitis japonesa, las vacunas actuales contra la influenza necesitan vacunación cada año y por lo tanto son inconvenientes tanto para quienes reciben la vacuna como para los médicos que se inyectan la vacuna y sería una carga para el gasto. Además, en caso de que se produzca una cepa de virus diferente de una cepa de virus esperada debido a un fallo en la predicción de epidemias, los que reciban la vacuna podría aún ser infectados por el virus de la influenza a pesar de la vacunación. En particular, en caso de que se produzca una nueva cepa de influenza generada por cambio que dé como resultado una antigenicidad significativamente diferente, dado que difícilmente se esperarían efectos protectores con las vacunas convencionales contra la influenza, se produciría una prevalencia explosiva del virus, la llamada pandemia.

Como se describió anteriormente, debido a que las vacunas actuales contra la influenza no pueden hacer frente de manera suficiente a la mutación en el virus, es altamente deseada una vacuna universal contra la influenza menos afectada por la mutación antigénica para resolver dicho problema.

Puesto que el virus de la influenza que causa dicha epidemia es el virus de la influenza tipo A, se obtendría una vacuna contra la influenza deseada no solo contra la epidemia anual sino también contra la pandemia desarrollando una vacuna que proporcione inmunogenicidad común en el virus de la influenza tipo A. Desde ese punto de vista, se realizado una vacuna que se dirige a una proteína M2 común en el virus de la influenza tipo A (Véase, por ejemplo, la Referencia no relacionada con patentes 1). La proteína M2 es una proteína de superficie viral con una secuencia de aminoácidos relativamente bien conservada entre virus de la influenza tipo A. Está presente en una cantidad relativamente pequeña en partículas de virus de la influenza (Véase, por ejemplo, la Referencia no relacionada con patentes 2) pero se expresa a un nivel relativamente alto en células infectadas con virus (Véase, por ejemplo, la Referencia no relacionada con patentes 3).

Se ha informado de que un anticuerpo contra M2 inhibe la replicación del virus de la influenza tipo A tanto en modelos in vivo como in vitro (Véase, por ejemplo, las Referencias no relacionadas con patentes 4 y 5). Además, Slepushkin et al. Han informado de que, en ratones a los que se inocula M2, se previene la infección mortal por virus de la influenza heteróloga tipo A y se facilita la eliminación del virus del tejido pulmonar (Véase, por ejemplo, la Referencia no relacionada con patentes 1). También se ha informado de que una proteína M2 modificada en la que se elimina un dominio transmembrana hidrófobo es útil para la preparación de una vacuna (véase, por ejemplo, la Referencia de patente 1).

Por otro lado, Neirynck et al., han informado de que se utiliza como antígeno de vacuna un dominio extracelular de M2 fusionado al N-terminal de un antígeno central del virus de la hepatitis B (Véase, la Referencia no relacionada con patentes 6). De acuerdo con Neirynck et al., se expresa en E. coli una partícula central del virus de la hepatitis B que expone M2 sobre su superficie, la partícula se purifica de la E. coli, y se induce un anticuerpo contra M2 administrando la partícula junto con un coadyuvante.

Asimismo, con un experimento que utiliza ratones, Wu et al. (Véase, por ejemplo, la Referencia no relacionada con patentes 7) y Mozdzanowska et al. (Véase, por ejemplo, la Referencia no relacionada con patentes 8) han informado de que un péptido (M2e) que corresponde a una región que consiste en 23 residuos de aminoácidos generados después de la eliminación de un dominio transmembrana hidrófobo de M2 también puede proteger de la infección fatal por virus de la influenza heterólogo tipo A mediante la utilización de un coadyuvante o un péptido de oligómero denominado MAP. También se revela que está presente al menos uno de los epítopos contra el anticuerpo protector producido por inmunización con M2e en una región de aminoácidos desde las posiciones Núm. 6 a Núm. 13 de M2e (Véase, por ejemplo, la Referencia no relacionada con patentes 9).

La preparación de las vacunas convencionales contra la influenza requirió procesos largos y laboriosos, es decir, prediciendo primero una cepa de virus prevalente en el año, adaptando el virus al cultivo en huevos, cultivando el virus en una gran cantidad de huevos, aislando el virus del cultivo, inactivando el virus y purificando una proteína antigénica. El desarrollo de una nueva vacuna que haga innecesario predecir una cepa de virus prevalente en el año para preparar una cepa de vacuna y que pueda hacer frente a una pandemia contribuiría en gran medida al bienestar nacional y reduciría los gastos médicos.

Referencia de patente 1: Patente de Estados Unidos Núm. 6169175
Referencia de patente 2: Documento JP-A-2001-512748

Referencia no relacionada con patentes 1: Slepushkin et al., 1995, Vaccine 13: pág. 1399-1402
Referencia no relacionada con patentes 2: Zebedee y Lamb, 1988 J. Virol. 62: pág. 2762-2772
Referencia no relacionada con patentes 3: Lamb et al., 1985 Cell 40: pág. 627-633
Referencia no relacionada con patentes 4: Hughey et al., 1995 Virology 212: pág. 411-421
Referencia no relacionada con patentes 5: Treanor et al., 1990 J. Virol. 64: pág. 1375-1377
Referencia no relacionada con patentes 6: 1999 Nature Med. 5: pág. 1157-1163
Referencia no relacionada con patentes 7: 2007 Vaccine 25: pág. 8868-8873
Referencia no relacionada con patentes 8: 2007 Virology J. 4: 118 doi: 10.1186/1743-422X-4-118
Referencia no relacionada con patentes 9: Wanli et al., 2004 Immunol. Lett 93: pág. 131-136

Descripción de la invención

(Problema técnico a resolver por la invención)

Un objeto de la presente invención es proporcionar un péptido modificado que tiene una potente inmunogenicidad derivada de la proteína matriz 2 (en lo sucesivo también denominada "M2"), una de las proteínas de la capa superficial del virus de la influenza y un método para la utilización del péptido modificado.

(Medios para resolver los problemas)

Bajo las circunstancias, los autores de la presente invención han continuado investigando asiduamente para

alcanzar el objeto descrito anteriormente y como consecuencia han encontrado que un péptido (en lo sucesivo también denominado "péptido M2eC") que se forma mediante la inserción de uno o varios residuos de cisteína en un péptido (en lo sucesivo también denominado "M2e") que consta de 23 residuos de aminoácidos de las posiciones Núm. 2 a Núm. 24 de M2 en el virus de la influenza tipo A tiene una inmunogenicidad mucho mayor (de dos a 20 veces mayor) que la que se había referido$para M2e hasta ahora para completar así la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan el péptido M2eC que se forma insertando uno o varios residuos de cisteína en un péptido (M2e) que consiste en 23 residuos de aminoácido de las posiciones Núm. 2 a Núm. 24 de M2 (Véase, la Referencia de patente 2), consistiendo dicho M2 en 97 residuos de aminoácido y siendo una de las proteínas de la capa superficial; una proteína de fusión del péptido M2eC y otro polipéptido; una vacuna contra la influenza que comprende el péptido M2eC o la proteína de fusión como ingrediente activo; un fragmento de ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido M2eC o la proteína de fusión; un vector de expresión (que incluye un vector de virus) en el que se incorpora el fragmento de ácido nucleico; y un anfitrión en el que se introduce el vector de expresión y un anticuerpo que reconoce M2.

El péptido M2eC y el fragmento de ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido M2eC pueden utilizarse eficazmente para la prevención y el tratamiento de la infección por influenza. Por lo tanto, la presente invención incluye lo siguiente:

[1] Un péptido modificado que se prepara insertando uno o varios residuos de cisteína en un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las posiciones Núm. 2 a Núm. 24 de la proteína matriz 2 en el virus de la influenza (M2e), en donde dichos uno o varios residuos de cisteína se inserta o insertan en una posición entre la Núm. 20 y la Núm. 21 de M2e, o en una combinación de dos o más posiciones entre la Núm. 15 y la Núm. 16, entre la Núm. 20 y la Núm. 21, entre la Núm. 21 y la Núm. 22, entre la Núm. 22 y la Núm. 23 y entre la Núm. 23 y la Núm. 24 de M2e.
[2] El péptido modificado del apartado [1], en donde el virus de la influenza es el virus de la influenza tipo A.
[3] El péptido modificado del apartado [1], en donde el número total de dichos residuos de cisteína insertados es de 1 a 5.
[4] El péptido modificado del apartado [3], en donde el número de residuos de cisteína insertados en cada posición insertada es de hasta 3.
[5] Una proteína de fusión que consiste en el péptido modificado de cualquiera de los apartados [1] a [4] y un polipéptido.
[6] La proteína de fusión del apartado [5], en donde el polipéptido es anexina V o albúmina.
[7] Una vacuna contra la influenza que comprende el péptido modificado de cualquiera de los apartados [1] a [4] o la proteína de fusión del apartado [5] o [6] como ingrediente activo.
[8] Un dispositivo que puede administrarse al organismo a través de una barrera biológica, comprendiendo dicho dispositivo la vacuna contra la influenza del apartado [7] y dicho dispositivo seleccionado entre una microaguja y un parche de gel hidrófilo en diversas formas para inducir inmunidad a través de la piel, y diversas cápsulas entéricas, liposomas y partículas de virus sin envoltura para inducir inmunidad a través del tracto intestinal.
[9] Un fragmento de ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido modificado de cualquiera de los apartados [1] a [4] o la proteína de fusión del apartado [5] o [6].
[10] Un vector de expresión en el que se incorpora el fragmento de ácido nucleico de [9].
[11] Un anfitrión en el que se introduce el vector de expresión del apartado [10].
[12] Un método de producción de

(a) los péptidos o proteínas de fusión modificados de uno cualquiera de los apartados [1] a [6] que comprende la expresión de los péptidos modificados o las proteínas de fusión de un vector introducido en un anfitrión, o (b) los péptidos modificados de cualquiera de los apartados [1] a [4] que comprende la síntesis química de los péptidos modificados.

También se describen en este documento los siguientes elementos:

[1] Un péptido modificado que se prepara insertando uno o varios residuos de cisteína en un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos desde las posiciones Núm. 2 a Núm. 24 de la proteína matriz 2 en el virus de la influenza (M2e).
[2] El péptido modificado del apartado [1], en donde el virus de la influenza es el virus de la influenza tipo A.
[3] El péptido modificado del apartado [1] o [2], en donde dichos uno o varios residuos de cisteína se insertan entre la posición Núm. 15 y la Núm.16 de M2e o en el C-terminal para situarse entre la Núm. 15 y la Núm. 16 de M2e.
[4] El péptido modificado del apartado [3], en donde dichos uno o varios residuos de cisteína se insertan en una o en una combinación de dos o más posiciones entre la Núm. 15 y la Núm. 16, entre la Núm. 20 y la

Núm. 21, entre la Núm. 21 y la Núm. 22, entre la Núm. 22 y la Núm. 23 y entre la Núm. 23 y la Núm. 24 de M2e.

[5] El péptido modificado de uno cualquiera de los apartados [1] a [4], en donde el número total de dichos residuos de cisteína insertados es de 1 a 5.

[6] El péptido modificado del apartado [5], en donde el número de residuos de cisteína insertados en cada posición insertada es de hasta 3.

[7] Una proteína de fusión que consiste en el péptido modificado de cualquiera de los apartados [1] a [6] y un polipéptido.

[8] La proteína de fusión del apartado [7], en donde el polipéptido es anexina V o albúmina.

[9] Una vacuna contra la influenza que comprende el péptido modificado de cualquiera de los apartados [1] a [6] o la proteína de fusión del apartado [7] u [8] como ingrediente activo.

[10] Un dispositivo que puede administrarse al organismo a través de una barrera biológica, comprendiendo dicho dispositivo la vacuna de la influenza del apartado [9].

[11] Un fragmento de ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido modificado de cualquiera de los apartados [1] a [6] o la proteína de fusión del apartado [7] u [8].

[12] Un vector de expresión en el que se incorpora el fragmento de ácido nucleico del apartado [11].

[13] Un anfitrión en el que se introduce el vector de expresión del apartado [12].

[14] Un anticuerpo que reconoce el péptido modificado de cualquiera de los apartados [1] a [6] y tiene un efecto protector contra el virus de la influenza.

(Efectos más eficaces que la técnica anterior)

El péptido M2eC de la presente invención tiene la capacidad de producir un anticuerpo eficaz para la prevención de la infección por el virus de la influenza de dos a 20 veces más alta que la de M2e sin inserción de uno o varios residuos de cisteína. Por ejemplo, el péptido M2eC que consiste en una secuencia de aminoácidos Ser-Leu-Leu-Thr-Glu-Val-Glu-Thr-Pro-Ile-Arg-Asn-Glu-Trp-Gly-Cys-Arg-Cys-Asn-Cys-Asp-Cys-Ser-Cys-Ser-Asp (SEQ ID NO: 10), que es una realización del péptido M2eC de la presente invención, tiene una inmunogenicidad aproximadamente 20 veces mayor que la de M2e referida hasta ahora y puede ser utilizado adecuadamente para una vacuna contra la influenza. Además, los 9 residuos de aminoácidos en el N-terminal del péptido M2eC de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos bien conservada entre los virus de la influenza, y por lo tanto el péptido es independiente de una cepa prevalente. Asimismo, los péptidos de dicho tamaño pueden sintetizarse homogéneamente en una gran cantidad a un precio inferior mediante síntesis química, lo que sería una gran ventaja para el suministro inmediato de una vacuna en caso de emergencia de una pandemia. El péptido M2eC de la presente invención también se puede expresar como una fusión con otro polipéptido.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico que muestra los títulos medios de anticuerpos anti-M2e de los respectivos grupos de inmunización que se muestran en la Tabla 2.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra los títulos medios de anticuerpos anti-M2e de los respectivos grupos de inmunización que se muestran en la Tabla 3.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra los títulos medios de anticuerpos anti-M2e de los respectivos grupos de inmunización que se muestran en la Tabla 4.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra los títulos medios de anticuerpos anti-M2e inmediatamente antes de la sensibilización con un sistema de sensibilización de virus homólogo.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra los títulos medios de anticuerpo anti-M2e inmediatamente antes de la sensibilización con el sistema de sensibilización de virus heterólogo.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención presenta un péptido que se prepara insertando uno o varios residuos de cisteína en 23 residuos aminoácidos que consisten en una secuencia de aminoácidos de las posiciones Núm. 2 a Núm. 24 de la proteína matriz 2 en el virus de la influenza (M2e) (péptido M2eC).

La M2e utilizada en el péptido M2eC de la presente invención se puede obtener a partir de cualquier cepa de virus de la influenza tipo A que tenga la capacidad de producir un anticuerpo protector contra el virus de la influenza. Para el virus de la influenza tipo A, se han aislado muchos serotipos resultantes de la combinación de 16 subtipos para HA y 9 subtipos para NA. Tales serotipos incluyen, como se ha informado, la cepa A/PR/8, la cepa IOWA, la cepa WISC, la cepa TAIW, la cepa LENT, la cepa VIET, la cepa INDO, la cepa HK156, la cepa A/Beijing/262/95, la cepa A/Sydney/5/97, la cepa A/Panamá/2007/99, la cepa A/Wyoming/3/2003, la cepa A/Nueva Caledonia/20/99, la cepa A/Nueva York/55/2004, la cepa A/Hiroshima/52/2005, la cepa A/Salomon Islands/3/2006, la cepa A/Brisbane/59/2007, la cepa A/Uruguay/716/2007 y A/California/05/2009 y A/California/06/2009, M2e derivada de M2 en cualquiera de cuyas cepas se puede utilizar.

M2e puede consistir en una secuencia de aminoácidos representada por la siguiente fórmula: Ser-X1aa-Leu-Thr-Glu-Val-Glu-Thr-Pro-X2aa-Arg-X3aa-X4aa-Trp-X5aa-Cys-X6aa-Cys-X7aa-X8aa-Ser-X9aa-Asp en donde X1aa es Pro o Leu, X2aa es Ile o Thr, X3aa es Asn o Ser, X4aa es Gly o Glu, X5aa es Gly o Glu, X6aa es Lys o Arg, X7aa es Asn o Ser, X8aa es Gly o Asp y X9aa es Asn o Ser (SEQ ID NO: 20). Dichos X1aa, X2aa, X3aa, X4aa, X5aa, X6aa, X7aa, X8aa y X9aa son los que resultan de la sustitución de aminoácidos derivados de los serotipos anteriores. Se puede utilizar M2e que consiste en la secuencia de aminoácidos Ser-Leu-Leu-Thr-Glu-Val-Glu-Thr-Pro-Ile-Arg-Asn-Glu-Trp-Gly-Cys-Arg-Cys-Asn-Asp-Ser- Ser-Asp (SEQ ID NO: 1).

Las posiciones y los números de los uno o varios residuos de cisteína que se deben insertar en M2e no están específicamente limitados en la medida en que las regiones epitópicas importantes implicadas en la producción de un anticuerpo protector puedan no verse afectadas. Con el fin de proporcionar una inmunidad potente contra la enfermedad infecciosa del virus de la influenza, se pueden insertar de uno a cinco residuos de cisteína en cualquier posición entre la Núm. 15 y 16, entre la Núm. 20 y el 21, entre la Núm. 21 y la Núm. 22, entre la Núm. 22 y la Núm. 23 y entre la Núm. 23 y la Núm. 24 de M2e. Preferiblemente, cada residuo de cisteína, cuatro en total, se puede insertar en las posiciones entre la Núm. 20 y la Núm. 21, entre la Núm. 21 y la Núm. 22, entre la Núm. 22 y la Núm. 23 y entre la Núm. 23 y la Núm. 24 de M2e. Asimismo, se pueden insertar hasta tres residuos de cisteína en al menos una de dichas posiciones respectivas descritas anteriormente. Preferiblemente, se insertan tres residuos de cisteína entre la posición Núm. 20 y la Núm. 21 de M2e.

El péptido M2eC de la presente invención se puede obtener mediante síntesis química con un sintetizador de péptidos (por ejemplo, el sintetizador de péptidos 430A: PerkinElmer Japan Co., Ltd., Applied Biosystems) basándose de una secuencia de aminoácidos pronosticada a partir de la secuencia de nucleótidos de Proteína M2 derivada de diversos virus de la influenza hasta ahora referidos (véase, por ejemplo, la Referencia no relacionada con patentes 5) y el diseño relacionado con las inserciones de uno o varios residuos de cisteína descrito anteriormente. Actualmente, hay muchos proveedores para la síntesis de péptidos, por ejemplo, BEX CO., LTD, Toray Research Center, Inc., TAKARA BIO Inc. e Invitrogen, por lo que se les puede confiar sus síntesis.

El péptido M2eC de la presente invención se puede utilizar como una proteína de fusión junto con diversos polipéptidos tales como albúmina, anexina V y proteína de virus (proteína del núcleo del VHB, etc.). Dicho polipéptido no está específicamente limitado, pero preferiblemente es uno que se expresa en un anfitrión seleccionado a un nivel superior. El fragmento de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido se puede obtener utilizando la técnica de recombinación de genes de Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989). Se puede preparar un fragmento de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión conectando el fragmento de ácido nucleico que codifica el péptido M2eC de la presente invención a un fragmento de ácido nucleico que codifica otro polipéptido con PCR o un procedimiento que utiliza una ADN sintetasa. Por ejemplo, cuando se obtiene un fragmento de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión con PCR, un cebador que consiste en la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido M2eC de la presente invención y la secuencia de nucleótidos (21 nucleótidos) que codifica una porción del polipéptido que se va a fusionar y se puede utilizar otro cebador para el polipéptido que se va a fusionar (se puede determinar una dirección de cada cebador mediante cualquiera de los polipéptidos situados en el extremo N). Se puede insertar o añadir una secuencia de nucleótidos del sitio de escisión para la enzima de restricción adecuada al extremo de un cebador.

El fragmento de ácido nucleico así obtenido que codifica el péptido M2eC o la proteína de fusión de la presente invención se puede incorporar a un vector de expresión deseado y el vector se puede introducir en un anfitrión para la expresión del fragmento de ácido nucleico. Se puede utilizar un plásmido y un vector de virus como un vector de expresión. En promotor que se debe incorporar en dicho vector de expresión se puede seleccionar entre un promotor tal como Lac, tac, pho5, adh, temprano de SV40, tardío de SV40, β-actina, dependiendo de los microorganismos o células animales utilizados como anfitrión. Las bacterias, las levaduras, las células animales, las células vegetales y las células de insectos se pueden utilizar generalmente como anfitriones, pero se pueden seleccionar dependiendo del propósito de uso. Para la transformación de una célula anfitriona, se puede utilizar un procedimiento conocido. Por ejemplo, se puede utilizar fosfato de calcio, DEAE dextrano, liposoma del sistema de lipofectina, fusión de protoplastos con polietilenglicol y electroporación, y se puede seleccionar un método deseado dependiendo de la célula anfitrión utilizada.

La purificación del péptido M2eC y la proteína de fusión de la presente invención se puede llevar a cabo combinando de forma adecuada los métodos habitualmente utilizados en la química de proteínas, tales como, por ejemplo, centrifugación, precipitación por adición de sales, ultrafiltración, precipitación isoeléctrica, electroforesis, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía hidrófoba, cromatografía con hidroxiapatita y similares.

Además, con el fin de facilitar la purificación del péptido M2eC de la presente invención, el péptido se puede expresar como una fusión con otro polipéptido o péptido. Un vector que expresa dicha proteína de fusión incluye el sistema de expresión con etiqueta de His que añade oligohistidina (Novagen), un sistema que expresa una proteína

de fusión a la cual se agrega una etiqueta FLAG (Sigma), un sistema de purificación de proteína de fusión glutatión S transferasa (GST) que prepara una proteína de fusión con GST (GE Healthcare Bioscience), MagneHis Protein Purification System (Promega Inc) y similares. Por ejemplo, el péptido M2eC de la presente invención se puede expresar como un péptido de fusión con oligohistidina y a continuación el péptido se puede purificar de forma específica y fácil usando una columna de afinidad de níquel (GE Healthcare Bioscience).

La cantidad del péptido M2eC obtenido se puede determinar mediante gravimetría con una espectrometría de equilibrio y ultravioleta (espectrometría a una longitud de onda de 214 nm). La cantidad de la proteína de fusión con el péptido M2eC se puede determinar mediante BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce Biotechnology, Inc), Protein Assay Kit (Bio-Rad Japan, Inc), etc.

La evaluación como vacuna del péptido M2eC y la proteína de fusión del péptido M2eC y otro polipéptido de la presente invención (en lo sucesivo también denominado simplemente "antígeno") se puede realizar inmunizando animales pequeños tales como pollo, ratón, rata, cobaya, perro o mono con el antígeno, y a continuación obteniendo sangre del animal inmunizado, aislando el suero del mismo y determinando un título de anticuerpo contra el péptido M2eC de la presente invención o un título de anticuerpo neutralizador contra un virus de la influenza en dicho suero en un sistema in vitro , o administrando una dosis letal de virus de la influenza a dicho animal inmunizado, y a continuación observando las condiciones de vida o muerte o enfermedad del animal inmunizado en un sistema in vivo . Para una medición de anticuerpos en el sistema in vitro, se pueden utilizar comúnmente ELISA, PHA o análisis en placa. El péptido M2eC así obtenido de la presente invención tiene una capacidad de producir un anticuerpo eficaz para inhibir una infección del virus de la influenza de dos a 20 veces mayor que la de M2e, y se puede utilizar como antígeno inmunizante de una vacuna contra la influenza. Cuando se utiliza como antígeno inmunizante de una vacuna contra la influenza, se puede utilizar un solo péptido M2eC, o también se pueden utilizar dos o más péptidos M2eC o el péptido M2eC combinado con otros antígenos del virus de la influenza tales como el antígeno HA, NA y NP.

El protocolo de inmunización, por ejemplo, la vía de administración, p.ej. subcutáneamente, intradérmicamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, nasalmente, oralmente y sublingualmente, y el intervalo de inmunización, pueden ser cualquier método que pueda inducir inmunidad tal como un método de inmunización convencional comúnmente utilizado para investigar la inmunogenicidad de una vacuna o inmunización utilizando un dispositivo que puede ser suministrado al organismo a través de una barrera biológica. Tal dispositivo incluye una microaguja y un parche de gel hidrófilo en diversas formas para inducir inmunidad a través de la piel, y diversas cápsulas entéricas, liposomas y partículas de virus sin envoltura para inducir inmunidad a través del tracto intestinal. Se puede añadir cualquier coadyuvante que pueda ser utilizado en seres humanos, tal como, por ejemplo, gel de hidróxido de aluminio, gel de fosfato de aluminio, oligonucleótido CpG, MDP, QS21 y emulsión MPL+TDM a un antígeno utilizado para la inmunización con el fin de aumentar su capacidad de inmunización. Además, con el fin de estabilizar o mantener la forma de un antígeno, se pueden añadir diversos aditivos farmacéuticamente aceptables al antígeno. Dichos aditivos incluyen un agente estabilizante (arginina, Polisorbato 80, Macrogol 4000, etc.) y un excipiente (manitol, sorbitol, sacarosa, lactosa). Una composición que comprende el péptido M2eC así preparado o la proteína de fusión de la presente invención como ingrediente activo se puede someter a filtración 3en condiciones estériles, dispensación, liofilización y similares para su formulación y utilizar como vacuna para la prevención de la infección del virus de la influenza y la aparición de enfermedad.

Como se describió anteriormente, el péptido M2eC de la presente invención es capaz de producir un anticuerpo protector contra el virus de la influenza y el anticuerpo obtenido se puede utilizar como material para tratar a un paciente que padece influenza y material para construir un sistema de detección del virus de la influenza, por ejemplo, un sistema de detección a través de una medición de anticuerpo tal como ELISA, transferencia Western y transferencia puntual. Dicho anticuerpo protector (anticuerpo policlonal) se puede obtener a partir del suero de animales inmunizados mediante el protocolo de inmunización anterior. Para la purificación de un anticuerpo, se puede utilizar la purificación de una proteína como se describió anteriormente.

Se puede obtener un anticuerpo monoclonal como se describe a continuación. A saber, las células productoras de anticuerpos tales como las células del bazo o los linfocitos se retiran del animal inmunizado y se fusionan con la cepa de células de mieloma para preparar hibridomas, de acuerdo con p.ej. Milstein et al., Method Enzymol., 73, 3-46, 1981. Se pueden utilizar cepas de células de mieloma de ratón tales como NSI-Ag4/1 (EUR. J. Immunol., 6: 511, 1976), P3X63-Ag8.U1 (Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81:1, 1978), X63-Ag8.653 (J. Immunol., 123:1548, 1979), y similares. Los hibridomas se pueden obtener mediante cultivo en un medio HAT durante un período de tiempo suficiente para que las células no fusionadas desaparezcan, generalmente de varios días a varias semanas. A partir de los hibridomas así obtenidos, los que producen un anticuerpo de interés se seleccionan a continuación y se clonan con dilución limitante normal usando su fluido de cultivo. La selección de un clon que produce un anticuerpo que se une específicamente al péptido de la presente invención se puede realizar con técnicas analíticas comúnmente utilizadas tales como ELISA, RIA o transferencia Western. También se puede preparar un anticuerpo que se une al péptido M2eC de la presente invención mediante la técnica para la preparación de anticuerpos usando visualización en fagos (Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual Editado por Brian K. Kay et al.,

Antibody Engineering: A PRACTICAL APPROACH Edited by J. McCAFFERTY et al., ANTIBODY ENGINEERING segunda edición editado por Carl A. K. BORREBAECK).

La presente invención se explica con más detalle por medio de los siguientes ejemplos, pero no se limita a estos Ejemplos de ninguna manera.

Ejemplo 1:

<Evaluación de la inmunogenicidad de péptidos M2eC que se preparan insertando uno o varios residuos de cisteína en M2e>

1. Materiales y métodos

(1) Péptido M2eC

Se sintetizó una secuencia de aminoácidos de M2e como molde para preparar el péptido M2eC basándose en la secuencia de aminoácidos de la cepa A/New Caledonia/20/1999 (H1N1) (número de acceso de GeneBank ACF41880) que tiene una secuencia más universal (1999 Nature Med. 5: 1157-1163) (BEX Co., Ltd.). El M2e sintetizado y los respectivos péptidos M2eC se muestran en la Tabla 1. Los péptidos sintetizados respectivos se prepararon a 5 mg/ml con agua destilada para inyectables sustituida por gas nitrógeno que contenía EDTA 1 mM, y se almacenaron como una solución de partida por debajo de -80°C hasta su uso.

Tabla 1

Abreviaturas	Secuencias de aminoácidos
M2e	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (SEQ ID NO: 1)
M2eC16	SLLTEVETPIRNEWCGCRCNDSSD (SEQ ID NO: 2)
M2eC21	SLLTEVETPIRNEWGCRCNCDSSD (SEQ ID NO: 3)
M2eC22	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDCSSD (SEQ ID NO: 4)
M2eC23	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSCSD (SEQ ID NO: 5)
M2eC24	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSCD (SEQ ID NO: 6)
M2eC1621	SLLTEVETPIRNEWCGCRCNCDSSD (SEQ ID NO: 7)
M2eC2122	SLLTEVETPIRNEWGCRCNCDCSSD (SEQ ID NO: 8)
M2eC2123	SLLTEVETPIRNEWGCRCNCDSCSD (SEQ ID NO: 9)
M2eC212223	SLLTEVETPIRNEWGCRCNCDCSCSD (SEQ ID NO: 10)
M2eC151621	SLLTEVETPIRNECWCGCRCNCDSSD (SEQ ID NO: 11)
M2eC162122	SLLTEVETPIRNEWCGCRCNCDCSSD (SEQ ID NO: 12)
M2eC21222324	SLLTEVETPIRNEWGCRCNCDCSCSCD (SEQ ID NO: 13)
M2eC16212223	SLLTEVETPIRNEWCGCRCNCDCSCSD (SEQ ID NO: 14)
M2eC1621222324	SLLTEVETPIRNEWCGCRCNCDCSCSCD (SEQ ID NO: 15)
M2eC212121	SLLTEVETPIRNEWGCRCNCCCDSSD (SEQ ID NO: 16)

(2) Ratones recibieron administración

Se criaron preliminarmente ratones hembra BALB/c (siete semanas de edad, SPF, Charles River Japan Inc.) en condiciones de SPF. Después de aproximadamente una semana de reproducción preliminar, se realizó una prueba de inmunización.

(3) Grupos de inmunización

(3)-1 Evaluación de la inmunogenicidad del péptido M2eC que se prepara insertando un residuo de cisteína en M2e

Se dividieron en seis grupos veinticuatro ratones, cada uno de los cuales constaba de cuatro ratones. Cada grupo se inmunizó con M2e o cada uno de los cinco péptidos M2eC como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Grupos de inmunización	Péptidos (abreviatura)	Núm. de ratones
Grupo 1	M2e	4
Grupo 2	M2eC16	4
Grupo 3	M2eC21	4
Grupo 4	M2eC22	4
Grupo 5	M2eC23	4
Grupo 6	M2eC24	4

(3)-2 Evaluación de la inmunogenicidad de péptidos M2eC que se preparan insertando hasta 3 residuos de cisteína en M2e

Se dividieron en seis grupos veinticuatro ratones, cada uno de los cuales constaba de cuatro ratones. Cada grupo se inmunizó con M2e o cada uno de los cinco péptidos M2eC como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Grupos de inmunización	Péptidos (abreviatura)	Núm. de ratones
Grupo 1	M2e	4
Grupo 2	M2eC21	4
Grupo 3	M2eC1621	4
Grupo 4	M2eC2122	4
Grupo 5	M2eC2123	4
Grupo 6	M2eC212223	4

(3)-3 Evaluación de la inmunogenicidad de péptidos M2eC que se preparan de la inserción de 3 o más residuos de cisteína en M2e

Se dividieron en ocho grupos treinta y dos ratones, cada uno compuesto por cuatro ratones. Cada grupo se inmunizó con M2e o cada uno de los siete péptidos M2eC como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Grupos de inmunización	Péptidos (abreviatura)	Núm. de ratones
Grupo 1	M2e	4
Grupo 2	M2eC212223	4
Grupo 3	M2eC151621	4
Grupo 4	M2eC162122	4
Grupo 5	M2eC21222324	4
Grupo 6	M2eC16212223	4
Grupo 7	M2eC1621222324	4
Grupo 8	M2eC212121	4

(4) Preparación de sustancia inmunológica

El día anterior de la inmunización, cada solución de partida de péptido almacenada por debajo de -80°C se diluyó a 1 mg/ml con PBS (INVITROGEN) y se mezcló con una cantidad igual de coadyuvante de Alum (ALHYDROGEL, BRENNTAG BIOSECTOR), y la mezcla se dejó reposar durante la noche.

(5) Protocolo y calendario de inmunización

Cada material inmunizante preparado el día anterior se diluyó a 0,2 mg/ml con PBS, y cada 100 µL por ratón del

material se administró por vía subcutánea al dorso de los ratones utilizando una jeringa de tuberculina de 1 ml (Terumo, SS-01T2613S) (dosis por individuo: 20 µg de cada péptido). La inmunización se realizó dos veces en un intervalo de dos semanas.

(6) Extracción de sangre

Dos semanas después de la segunda inmunización, todos los ratones se sometieron a extracción de sangre de la vena abdominal inferior mientras se anestesiaba con pentobarbital sódico (Kyoritsu Seiyaku Corporation, somnopentilo) y se sacrificaron. La sangre obtenida se transfirió a Microtina (Becton Dickinson), y después de coagular suficientemente a temperatura ambiente, se centrifugó a 5.000 rpm x 10 min. para aislar el suero. El suero aislado se almacenó a -20°C hasta la medición.

(7) Preparación del suero patrón de ratón

Para comparar el aumento de anticuerpo anti-M2e en cada grupo de inmunización, los sueros de 15 ratones inmunizados subcutáneamente en el dorso con M2e mostrados en la Tabla 1 (10 pg/cuerpo/inyección) y coadyuvante de Alum tres veces en un intervalo de tres semanas se agruparon como suero patrón de ratón que tenía un anticuerpo anti-M2e.

(8) Medición del anticuerpo anti-M2e (IgG)

M2e se diluyó a 2 µg/ml con tampón de Carbonato 0,1 M, pH 9,6, se añadió a una placa de 96 pocillos (Nunc, Immobilizer Amino) a 100 µL/pocillo y se dejó reposar a 4°C durante la noche para la inmovilización. Al día siguiente, cada pocillo se lavó tres veces con 300 µL de tampón de fosfato que contenía Tween 20 al 0,05% (PBST), se añadieron 300 µL/pocillo de monoetanolamina 10 mM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) diluida con Tampón de carbonato 0,1 M, pH 9,6, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora.

Después de una hora, se retiró suficientemente la monoetanolamina 10 mM y a esto se añadieron 100 µl/pocillo de muestras diluidas con PBST (por duplicado para cada muestra). Después de la reacción a temperatura ambiente durante una hora, se extrajo cada suero diluido y se lavó con 300 µL/pocillo de PBST tres veces. Después del lavado, la solución de lavado en cada pocillo se retiró suficientemente y se añadió un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con HRP (American Qualax, A131PS) diluido con PBST 2000 veces a 100 µL/pocillo para la reacción a temperatura ambiente durante una hora. Después de la reacción, se retiró la solución diluida que comprendía el anticuerpo marcado, y el pocillo se lavó con 300 µL/pocillo de PBST dos veces y un volumen igual de agua destilada dos veces, y se añadió una solución de sustrato cromogénico TMB+ (Dako) a 100 µL/pocillo bajo protección de la luz para la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, al pocillo se le añadió ácido sulfúrico 1 N a 100 µL/pocillo para detener la reacción cromogénica y se midió la absorbancia a 450 nm (valor DO 450).

(9) Cálculo del título de anticuerpos anti-M2e en suero patrón

Los sueros de 32 ratones no inmunizados (C57BL/6, macho) se diluyeron con una solución de dilución para muestra hasta 200 veces y se determinó la DO 450 por duplicado. Un promedio de la DO 450 medida más el doble de su desviación típica se definió como corte. A continuación, el suero patrón se diluyó de 15.000 a 960.000 veces a través de una dilución seriada 1:2, determinada por su DO 450, y la escala de dilución máxima sobre el valor de corte se definió como el título de anticuerpo del suero patrón. Dado que los valores de DO 450 estuvieron sobre el corte en este sistema de ensayo hasta una dilución de aproximadamente 400.000 veces, se determinó que el título de anticuerpo anti-M2e de una solución de partida del suero patrón era 400.000 unidades.

(10) Título de anticuerpos anti-M2e en sangre

Se calculó un título de anticuerpos de suero de ratón en cada grupo inmunizado con cada uno de los diversos péptidos como se describe a continuación. En primer lugar, el suero patrón se diluyó con una solución de dilución para la muestra para proporcionar 1, 2, 4, 8, 16 y 32 unidades para preparar el patrón para la determinación de un título de anticuerpo. A continuación, el suero de ratón de cada grupo de inmunización se diluyó con una solución de dilución para la muestra de manera que el suero diluido pudiera estar dentro del alcance del patrón tal como se preparó. La muestra de prueba preparada como se describió anteriormente se determinó en el sistema como se muestra en el Ejemplo 1- (8) y se calculó el título de anticuerpo anti-M2e de cada muestra de suero en ratón utilizando una línea patrón entre la unidad patrón obtenida y el valor DO 450.

2. Resultados

La Fig. 1 muestra títulos de anticuerpos anti-M2e en sangre obtenidos dos semanas después de dos inmunizaciones en un intervalo de dos semanas en grupos de inmunización para M2e o cada péptido M2eC en el que se inserta un

residuo de cisteína. Como se muestra en la Fig. 1, excepto el péptido M2eC22 en el que se inserta un residuo de cisteína en la posición entre la Núm. 21 y la Núm. 22 de M2e, se aumentó el título de anticuerpo anti-M2e del grupo de inmunización con péptido M2eC de dos a cuatro veces en comparación con el de los grupos de inmunización para M2e.

Como resultado, se demostró que los péptidos en los que se inserta un residuo de cisteína en una posición entre la Núm. 15 y la Núm. 16, entre la Núm. 20 y la Núm. 21, entre la Núm. 22 y la Núm. 23 o entre la Núm. 23 y la Núm. 24 de M2e tienen una inmunogenicidad más alta en comparación con la del péptido M2e convencional.

A continuación, se evaluó la inmunogenicidad de los péptidos M2eC en los que se insertan dos o tres residuos de cisteína utilizando un título de anticuerpos anti-M2e. Como se muestra en la Fig. 2, se confirmó que M2eC1621, M2eC2122 y M2eC2123 en los que se insertan dos residuos de cisteína en M2e, es decir, en los que se inserta adicionalmente un residuo de cisteína en M2eC21 en el que se inserta residuo de cisteína entre la posición Núm. 21, tenían un mayor título de anticuerpos anti-M2e que M2eC21. Además, el grupo de inmunización de M2eC212223 en el que cada residuo de cisteína se inserta en posiciones entre la Núm. 20 y la Núm. 21, entre la Núm. 21 y la Núm. 22 y entre la Núm. 22 y la Núm. 23 de M2e, es decir, en el que se insertan un total de tres residuos de cisteína, mostraron una inmunogenicidad extremadamente alta, es decir, el título de anticuerpo anti-M2e era 20 veces mayor que el de los grupos de inmunización de M2e.

De manera similar, la inmunogenicidad del péptido M2eC en el que se inserta un mayor número de residuos de cisteína se evaluó mediante el título de anticuerpo anti-M2e. Como se muestra en la Fig. 3, M2eC162122 en el que se insertan tres residuos de cisteína podría inducir un título de anticuerpo más alto que el de M2e de igual forma que M2eC212223. Sin embargo, M2eC151621 en el que se insertan tres residuos de cisteína de forma similar solo podría inducir un título de anticuerpos comparable al de M2e. A partir de esto, se estima que un epítopo de M2e podría verse afectado al insertar residuos de cisteína entre la posición Núm. 14 y la Núm. 15.

Además, los anticuerpos anti-M2e en los grupos de inmunización M2eC16212223 o M2eC1621222324 fueron mayores que los de M2eC162122, y el título de anticuerpos anti-M2e en el grupo de inmunización M2eC21222324 fue mayor que el de M2eC212223. Esto sugiere que la inmunogenicidad podría potenciarse aumentando el número de residuos de cisteína que se deben insertar. Además, debido a que el grupo de inmunización M2eC212121 en el que se inserta un número total de tres residuos de cisteína entre la posición 20 y 21 de M2e también indujo un alto título de anticuerpos anti-M2e, puede ser posible aumentar la inmunogenicidad insertando múltiples residuos de cisteína entre la posición 15 y 16, entre 20 y 21, entre 22 y 23 o entre 23 y 24, cuya inserción de uno o varios residuos de cisteína se demuestra que aumenta el título de anticuerpo anti-M2e.

En vista de los resultados anteriores, se observó que el péptido M2eC podría ser una vacuna contra la influenza más potente al aumentar el número de residuos de cisteína que se deben insertar en M2e.

Ejemplo 2:

<Evaluación de la capacidad de proteger el inicio de la enfermedad en el péptido M2eC>

1. Materiales y métodos

(1) Péptidos

Entre los péptidos M2eC utilizados en el Ejemplo 1, se utilizó M2eC212223.

(2) Virus de sensibilización

Se utilizó virus de la influenza (cepa A/PR8/8/34, H1N1) almacenado mediante congelación.

(3) Ratones recibieron la administración

Se realizaron los mismos procedimientos que en el Ejemplo 1-(2).

(4) Grupos de inmunización

Se dividieron en tres grupos treinta ratones, cada uno de los cuales consistía en 10, 8 y 12 ratones. Los ratones del primer y el segundo grupo se inmunizaron con 2 µg y 20 µg de M2eC212223, respectivamente, y los ratones del tercer grupo no se inmunizaron como grupo sin administración de péptido como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5

Grupos de inmunización	Péptido (abreviatura)	Cantidad de péptido inmunizante	Núm. de ratones
Grupo 1	M2eC212223	2 µg	10
Grupo 2	M2eC212223	20 µg	8
Grupo 3	ninguno	0 µg	12

(5) Preparación de material de inmunización y protocolo y calendario de vacunación

Para el cebado, el día de la inmunización, la solución de partida de M2eC212223 almacenada por debajo de -60ºC se diluyó a 0,04 mg/ml y 0,4 mg/ml con PBS (INVITROGEN), se mezcló con una cantidad igual de coadyuvante completo de Freund, cada 100 µL por ratón de la mezcla se administró por vía subcutánea al dorso de los ratones con una jeringa de tuberculina de 1 ml (Terumo, SS-01T2613S) (dosis por individuo: 2 µg o 20 µg). Para el tercer grupo como control, se utilizó PBS en lugar de la solución de péptido. Para la segunda inmunización, se repitieron los procedimientos como en el cebado siempre que se utilizara coadyuvante de Freund incompleto para el coadyuvante. La inmunización se realizó dos veces en un intervalo de dos semanas.

(6) Preparación de la solución del virus para la sensibilización y modo de sensibilización

Una semana después de la segunda inmunización, una solución de virus de la influenza (cepa A/PR8) almacenada mediante congelación se diluyó con PBS y se administró nasalmente a ratones anestesiados con Sevofrane (Maruishi Pharmaceutical) a 20 µL (correspondiente a 5 DL_{50}) por ratón.

(7) Observación de ratones

Los ratones de prueba se observaron hasta 21 días después de la sensibilización con el virus para registrar su vida y muerte.

2. Resultados

Como resultado de la observación de ratones después de la sensibilización con el virus de la influenza, el grupo de inmunización M2eC212223 en el que cada residuo de cisteína se inserta entre las posiciones Núm. 20 y Núm. 21, entre la Núm. 21 y la Núm. 22 y entre la Núm. 22 y la Núm. 23 de M2e, es decir, en donde se insertan un total de tres residuos de cisteína, mostraron una tasa de supervivencia más alta que la del grupo sin administración de péptido como se muestra en la Tabla 6. Este resultado reveló que el péptido M2eC212223, incluso mediante inmunización de 2 µg por ratón, tuvo un efecto inhibidor del inicio de la enfermedad por el virus de la influenza.

Tabla 6

Grupos de inmunización	Péptido (abreviatura)	Cantidad de péptido inmunizante	Tasa de supervivencia
Grupo 1	M2eC212223	2 µg	8/10
Grupo 2	M2eC212223	20 µg	7/8
Grupo 3	ninguno	0 µg	4/12

Ejemplo 3:

<Comparación de la capacidad de protección del inicio de la enfermedad entre péptidos M2e y M2eC212223 contra sistemas de sensibilización de virus homólogos y heterólogos>

1. Materiales y métodos

(1) Péptido utilizado en inmunización y virus de sensibilización

Se utilizaron M2e y M2eC212223 del Ejemplo 1 para la inmunización en el sistema de sensibilización de virus homólogo mientras que se utilizaron swM2e y swM2eC212223, sintetizados basándose en la secuencia M2 de una nueva cepa de virus de la influenza (tipo A/H1N1) que se produjo en epidemias en 2009, para la inmunización en un sistema de sensibilización de virus heterólogo (BEX Co., Ltd.). Las soluciones de partida de los péptidos sintetizados se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 y se almacenaron a una temperatura inferior a -60ºC hasta su uso. El virus de prueba fue el mismo que el utilizado en el Ejemplo 2.

La Tabla 7 indica las secuencias M2e de péptidos utilizados en la inmunización y del virus de sensibilización. En el

sistema de sensibilización de virus homólogo, existe una diferencia de solo un aminoácido en la posición Núm. 21 entre la secuencia M2e del virus de sensibilización y las secuencias de los péptidos inmunizantes. Sin embargo, para el sistema de sensibilización de virus heterólogo, los aminoácidos en cinco posiciones Núm. 11, Núm. 13, Núm. 16, Núm. 20 y Núm. 21 son diferentes.

Tabla 7

Sistema de sensibilización	Virus o péptidos	Secuencia de aminoácidos
Homólogo	Virus de sensibilización (A/PR8)	SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD (SEQ ID No: 17)
	M2e	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (SEQ ID No: 1)
	M2eC212223	SLLTEVETPIRNEWGCRCNCDCSCSD (SEQ ID No: 10)
Heterologo	Virus de sensibilización (A/PR8)	SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSO (SEQ ID No: 17)
	swM2e	SLLTEVETPTRSEWECRCSDSSD (SEQ ID No: 18)
	swM2eC212223	SLLTEVETPTRSEWECRCSCDCSCSD (SEQ ID No: 19)
* Los aminoácidos subrayados son aquellos diferentes de los péptidos utilizados en la inmunización.		

(2) Ratones recibieron administración

Se realizaron los mismos procedimientos que en el Ejemplo 1-(2).

(3) Grupos de inmunización

(3)-1 Evaluación de la capacidad de proteger el inicio de la enfermedad en el sistema de sensibilización de virus homólogos

Se dividieron en tres grupos veinticuatro ratones, cada uno compuesto por ocho ratones. Los ratones de los grupos primero y segundo se inmunizaron con péptido M2e y M2eC212223, respectivamente, y a los ratones del tercer grupo se les administró PBS en lugar de péptido como grupo sin administración de péptido (grupo solo de Alum) como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8

Grupos de inmunización	Péptido (abreviatura)	Cantidad de péptido inmunizante	Núm. de ratones
Grupo 1	M2e	2 µg	8
Grupo 2	M2eC212223	2 µg	8
Grupo 3	ninguno	0 µg	8

(3)-2 Evaluación de la capacidad para proteger del inicio de la enfermedad en el sistema de sensibilización de virus heterólogos

Se dividieron en seis grupos sesenta ratones, cada uno compuesto de diez ratones. Los ratones del primer y el segundo grupo se inmunizaron con swM2e, los ratones del tercer y cuarto grupo se inmunizaron con el péptido swM2eC212223, y los ratones del quinto y sexto grupo no se inmunizaron como grupos sin administración de péptido como se muestra en la Tabla 9. A los ratones del quinto grupo se les administró únicamente coadyuvante de Alum y a los ratones del sexto grupo se les administró únicamente PBS.

Tabla 9

Grupos de inmunización	Péptido (abreviatura)	Cantidad de péptido inmunizante	Núm. de ratones
Grupo 1	swM2e	2 µg	10
Grupo 2	swM2e	20 µg	10
Grupo 3	swM2eC212223	2 µg	10

Grupos de inmunización	Péptido (abreviatura)	Cantidad de péptido inmunizante	Núm. de ratones
Grupo 4	swM2eC212223	20 µg	10
Grupo 5	ninguno	0 µg	10
Grupo 6	ninguno	0 µg	10

(4) Preparación de material de inmunización y protocolo y calendario de vacunación

(4)-1 Evaluación de la capacidad para proteger del inicio de la enfermedad en el sistema de sensibilización de virus homólogos

El día previo a la inmunización, se preparó una solución de partida de péptidos como se describe en el Ejemplo 1-(4). Al día siguiente, cada material inmunizante preparado se diluyó a 0,02 mg/ml con PBS, y cada 100 µL por ratón del material se administró por vía subcutánea al dorso de los ratones con jeringa de tuberculina de 1 ml (Terumo, SS-01T2613S) (dosis por individuo: cada péptido 2 µg). La inmunización se realizó dos veces en un intervalo de dos semanas. El día previo a la sensibilización con el virus (6 días después de la segunda inmunización), se realizó la extracción parcial de sangre a través de la vena de la cola en ratones para aislar el suero como se describe en el Ejemplo 1-(6), que se almacenó a -20ºC hasta la determinación de un título de anticuerpos anti-M2e.

(4)-2 Evaluación de la capacidad para proteger del inicio de la enfermedad en el sistema de sensibilización de virus heterólogos

El día previo a la inmunización, se preparó una solución de partida de péptidos como se describe en el Ejemplo 1-(4). Al día siguiente, cada material inmunizante preparado se diluyó a 0,02 mg/ml o 0,2 mg/ml con PBS, y cada 100 µL por ratón del material se administró por vía subcutánea al dorso de los ratones con jeringa de tuberculina de 1 ml (Terumo, SS -01T2613S) (dosis por individuo: cada péptido 2 µg o 20 µg). La inmunización se realizó dos veces en un intervalo de dos semanas, y se obtuvo suero y se almacenó el día anterior de la sensibilización con el virus como se describe en el Ejemplo 3-(4)-1.

(5) Título de anticuerpos anti-M2e en sangre

La determinación de un título de anticuerpo anti-M2e en suero en cada ratón de prueba se realizó como se describe en el Ejemplo 1.

(6) Preparación de la solución del virus para la sensibilización y modo de sensibilización

Se repitieron los procedimientos como se describe en el ejemplo 2.

(7) Observación de ratones

Se observaron ratones de prueba hasta 21 días después de la sensibilización con el virus para registrar su vida y muerte.

2. Resultados

Para el sistema de sensibilización de virus homólogo, como se muestra en la Fig. 4, el grupo de inmunización con 2 µg de M2eC212223 junto con coadyuvante de Alum, que se admite para su uso en seres humanos, pudo inducir un alto título de anticuerpos anti-M2e (un anticuerpo contra un péptido que tiene secuencia similar a la secuencia de M2e del virus de sensibilización). Sin embargo, el grupo de inmunización con M2e en el que no se insertó residuo de cisteína no pudo inducir un título de anticuerpos anti-M2e a una dosis de 2 µg. En cuanto a los resultados obtenidos después de la sensibilización con el virus, como se muestra en la Tabla 10, el grupo de inmunización con M2eC212223 tuvo una tasa de supervivencia significativamente mayor en comparación con el grupo de inmunización con M2e y el grupo sin administración de péptido. Este resultado reveló que el péptido M2eC212223 junto con el coadyuvante de Alum, que se admite para su uso en seres humanos, tenía un alto efecto protector frente a la aparición de la enfermedad frente al virus de la influenza que tiene una secuencia similar a la del péptido M2eC212223. Además, demostró que el péptido M2eC212223 tenía una mayor capacidad para proteger del inicio de la enfermedad en comparación con el péptido M2e.

En vista de los resultados anteriores, se observó que el péptido M2eC en el que se inserta o insertan uno o varios residuos de cisteína en el péptido M2e tiene alta inmunogenicidad y un elevado efecto protector contra la infección del virus de la influenza, en comparación con el péptido M2e y preferiblemente se utilizará como material de una vacuna.

Tabla 10

Grupos de inmunización	Péptido (abreviatura)	Tasa de supervivencia
Grupo 1	M2e	3/8
Grupo 2	M2eC212223	6/8
Grupo 3	ninguno	1/8

Para el sistema de sensibilización de virus heterólogo, como se muestra en la Fig. 5, el título de anticuerpo anti-M2e inmediatamente antes de la prueba (un anticuerpo contra un péptido que tiene una secuencia similar a la secuencia de M2e del virus de sensibilización) fue el más alto en el grupo de inmunización con 20 µg de swM2eC212223, seguido del grupo de inmunización con 2 µg de swM2eC212223, y a continuación el grupo de inmunización con 20 µg de swM2e, pero casi no se observó aumento en el título de anticuerpos en el grupo de inmunización con 2 µg de swM2e. Además, una tasa de supervivencia de ratones después de la sensibilización con el virus, como se muestra en la Tabla 11, corresponde al aumento del título de anticuerpos anti-M2e descrito anteriormente y así se confirmó un efecto protector del inicio de la enfermedad en los grupos de inmunización con 20 µg de swM2e y el grupo de inmunización de swM2eC212223 con 2 µg y 20 µg, que mostró un alto título de anticuerpos anti-M2e. Por lo tanto, se reveló que el péptido swM2eC212223, en el que se insertan residuos de cisteína, que puede inducir un alto título de anticuerpo anti-M2e puede proporcionar una capacidad de protección contra la infección del virus de la influenza en una cantidad menor en comparación con el péptido swM2e en el que no se ha insertado residuo de cisteína.

A la vista de los resultados anteriores, se observó que el péptido M2eC en el que el residuo o los residuos de cisteína se insertan en el péptido M2e tiene un elevado efecto protector contra la infección del virus de la influenza que tiene mutación, y de este modo se puede utilizar preferiblemente como material de una vacuna.

Tabla 11

Grupos de inmunización	Péptido (abreviatura)	Tasa de supervivencia
Grupo 1	swM2e	4/10
Grupo 2	swM2e	8/10
Grupo 3	swM2eC212223	9/9
Grupo 4	swM2eC212223	7/8
Grupo 5	ninguno	4/10
Grupo 6	ninguno	4/10

Aplicabilidad industrial

El péptido modificado de la presente invención se puede utilizar como una vacuna universal contra el virus de la influenza tipo A.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE

<120> Una vacuna peptídica modificada derivada de la proteína M2 del virus de la influenza

<130> 669824

<150> JP 2009-197564
<151> 28-08-2009

<150> JP 2010-58577
<151> 2010-03-16

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
<211> 23

<212> PRT
<213> Virus de la influenza A

<400> 1

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

<210> 2
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Un péptido modificado obtenido mediante la inserción de una cisteína en el péptido derivado de la proteína M2 del virus de la influenza

<400> 2

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Cys Gly
1 5 10 15
Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

<210> 3
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Un péptido modificado obtenido mediante la inserción de una cisteína en el péptido derivado de la proteína M2 del virus de la influenza

<400> 3

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15
Arg Cys Asn Cys Asp Ser Ser Asp
20

<210> 4
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Un péptido modificado obtenido mediante la inserción de una cisteína en el péptido derivado de la proteína M2 del virus de la influenza

<400> 4

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15
Arg Cys Asn Asp Cys Ser Ser Asp
20

<210> 5
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Un péptido modificado obtenido mediante la inserción de una cisteína en el péptido derivado de la proteína M2 del virus de la influenza

<400> 5

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 Cys Ser Asp
20

<210> 6
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Un péptido modificado obtenido mediante la inserción de una cisteína en el péptido derivado de la proteína M2 del virus de la influenza

<400> 6

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 Cys Asp
20

<210> 7
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Un péptido modificado obtenido mediante la inserción de cisteínas en el péptido derivado de la proteína M2 del virus de la influenza

<400> 7
Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Cys Gly
1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Cys Asp Ser Ser Asp
20 25

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

<220>
<223> Un péptido modificado obtenido mediante la inserción de cisteínas en el péptido derivado de la proteína M2 del virus de la influenza

<400> 8

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15
Arg Cys Asn Cys Asp Cys Ser Ser Asp
20 25

<210> 9
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Un péptido modificado obtenido mediante la inserción de cisteínas en el péptido derivado de la proteína M2 del virus de la influenza

<400> 9
Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15
Arg Cys Asn Cys Asp Ser Cys Ser Asp
20 25

<210> 10
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Un péptido modificado obtenido mediante la inserción de cisteínas en el péptido derivado de la proteína M2 del virus de la influenza

<400> 10

```
Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1               5                   10                  15
Arg Cys Asn Cys Asp Cys Ser Cys Ser Asp
            20                  25
```

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

<220>
<223> Un péptido modificado obtenido mediante la inserción de cisteínas en el péptido derivado de la proteína M2 del virus de la influenza

<400> 11

```
Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Cys Trp Cys
1               5                   10                  15
Gly Cys Arg Cys Asn Cys Asp Ser Ser Asp
            20                  25
```

<210> 12
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Un péptido modificado obtenido mediante la inserción de cisteínas en el péptido derivado de la proteína M2 del virus de la influenza

<400> 12

```
Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Cys Gly
1               5                   10                  15
Cys Arg Cys Asn Cys Asp Cys Ser Ser Asp
            20                  25
```

<210> 13
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Un péptido modificado obtenido mediante la inserción de cisteínas en el péptido derivado de la proteína M2 del virus de la influenza

<400> 13

```
Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1               5                   10                  15
Arg Cys Asn Cys Asp Cys Ser Cys Ser Cys Asp
            20                  25
```

<210> 14
<211> 27

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Un péptido modificado obtenido mediante la inserción de cisteínas en el péptido derivado de la proteína M2 del virus de la influenza

<400> 14

```
Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Cys Gly
1               5                   10                  15
Cys Arg Cys Asn Cys Asp Cys Ser Cys Ser Asp
            20                  25
```

<210> 15
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Un péptido modificado obtenido mediante la inserción de cisteínas en el péptido derivado de la proteína M2 del virus de la influenza

<400> 15

```
Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Cys Gly
1               5                   10                  15
Cys Arg Cys Asn Cys Asp Cys Ser Cys Ser Cys Asp
            20                  25
```

<210> 16
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Un péptido modificado obtenido mediante la inserción de cisteínas en el péptido derivado de la proteína M2 del virus de la influenza

<400> 16

```
Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1               5                   10                  15
Arg Cys Asn Cys Cys Cys Asp Ser Ser Asp
            20                  25
```

<210> 17
<211> 23
<212> PRT
<213> Virus de la influenza A

<400> 17

```
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
```

<210> 18
<211> 23
<212> PRT
<213> Virus de la influenza A

<400> 18

```
Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Ser Glu Trp Glu Cys
1               5                   10                  15
Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp
            20
```

<210> 19
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Un péptido modificado obtenido mediante la inserción de cisteínas en el péptido derivado de la proteína M2 del virus de la influenza

<400> 19

```
Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Ser Glu Trp Glu Cys
1               5                   10                  15
Arg Cys Ser Cys Asp Cys Ser Cys Ser Asp
            20                  25
```

<210> 20
<211> 23
<212> PRT
<213> Virus de la influenza A

<220>
<223> Xaa en la posición 2 es Pro o Leu

<220>
<223> Xaa en la posición 10 es Ile o Thr

<220>
<223> Xaa en la posición 12 es Asn o Ser

<220>
<223> Xaa en la posición 13 es Gly o Glu

<220>
<223> Xaa en la posición 15 es Gly o Glu

<220>
<223> Xaa en la posición 17 es Lys o Arg

<220>
<223> Xaa en la posición 19 es Asn o Ser

<220>
<223> Xaa en la posición 20 es Gly o Asp

<220>
<223> Xaa en la posición 22 es Asn o Ser

<400> 20

```
Ser Xaa Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Xaa Arg Xaa Xaa Trp Xaa Cys
                5                   10                  15
Xaa Cys Xaa Xaa Ser Xaa Asp
            20
```

REIVINDICACIONES

1. Un péptido modificado que se prepara insertando uno o varios residuos de cisteína en un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las posiciones Núm. 2 a Núm. 24 de la proteína matriz 2 en el virus de la influenza (M2e), en donde dichos uno o varios residuos de cisteína se insertan una posición entre la Núm. 20 y la Núm. 21 de M2e, o en una combinación de dos o más posiciones entre la Núm. 15 y la Núm. 16, entre la Núm. 20 y la Núm. 21, entre la Núm. 21 y la Núm. 22, entre la Núm. 22 y la Núm. 23 y entre la Núm. 23 y la Núm. 24 de M2e.

2. El péptido modificado de la reivindicación 1, en donde el virus de la influenza es el virus de la influenza tipo A.

3. El péptido modificado de la reivindicación 1 o 2, en donde el número total de dichos uno o varios residuos de cisteína insertados es de 1 a 5.

4. El péptido modificado de la reivindicación 3, en donde el número de residuos de cisteína insertados en cada posición de inserción es de hasta 3.

5. Una proteína de fusión que consiste en el péptido modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un polipéptido.

6. La proteína de fusión de la reivindicación 5, en donde el polipéptido es anexina V o albúmina.

7. Una vacuna contra la influenza que comprende el péptido modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la proteína de fusión de la reivindicación 5 o 6 como ingrediente activo.

8. Un dispositivo que se puede administrar al organismo a través de una barrera biológica, comprendiendo dicho dispositivo la vacuna contra la influenza de la reivindicación 7 y seleccionándose dicho dispositivo de una microaguja y un parche de gel hidrófilo en diversas formas para inducir inmunidad a través de la piel, y diversas cápsulas entéricas, liposomas y partículas de virus sin envoltura para inducir inmunidad a través del tracto intestinal.

9. Un fragmento de ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la proteína de fusión de la reivindicación 5 o 6.

10. Un vector de expresión en el que se incorpora el fragmento de ácido nucleico de la reivindicación 9.

11. Un anfitrión en el que se introduce el vector de expresión de la reivindicación 10.

12. Un método de producción de

(a) los péptidos modificados o proteínas de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende la expresión de los péptidos o proteínas de fusión modificados de un vector introducido en un anfitrión, o
(b) los péptidos modificados de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende la síntesis química de los péptidos modificados.

Fig. 1

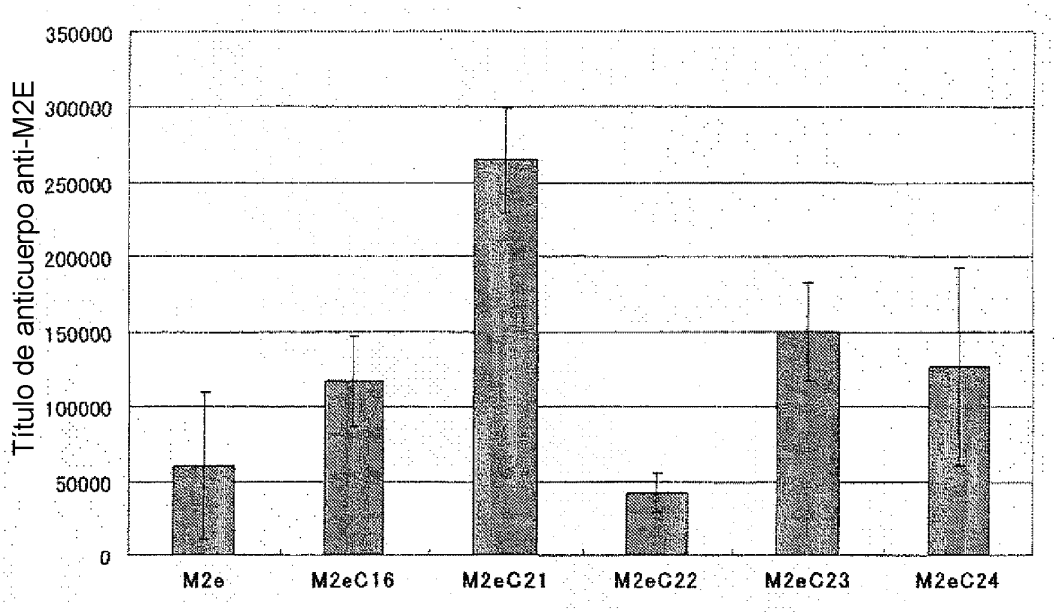

Título de anticuerpo anti-M2E
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
M2e
M2eC16
M2eC21
M2eC22
M2eC23
M2eC24

Fig. 2

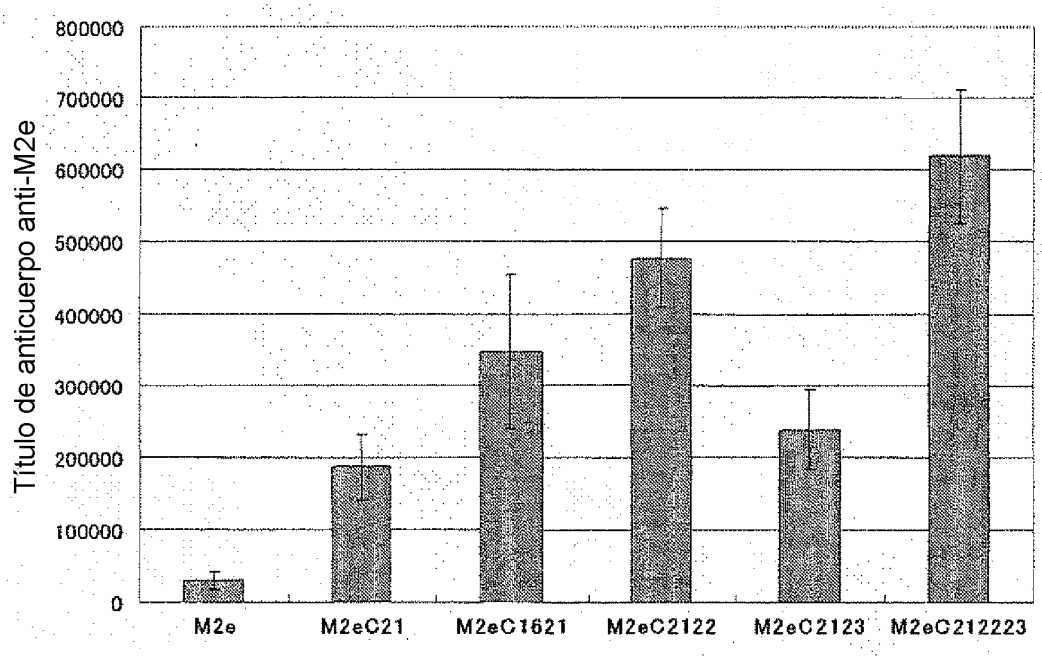

Título de anticuerpo anti-M2e
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
M2e
M2eC21
M2eC1621
M2eC2122
M2eC2123
M2eC212223

Fig. 3

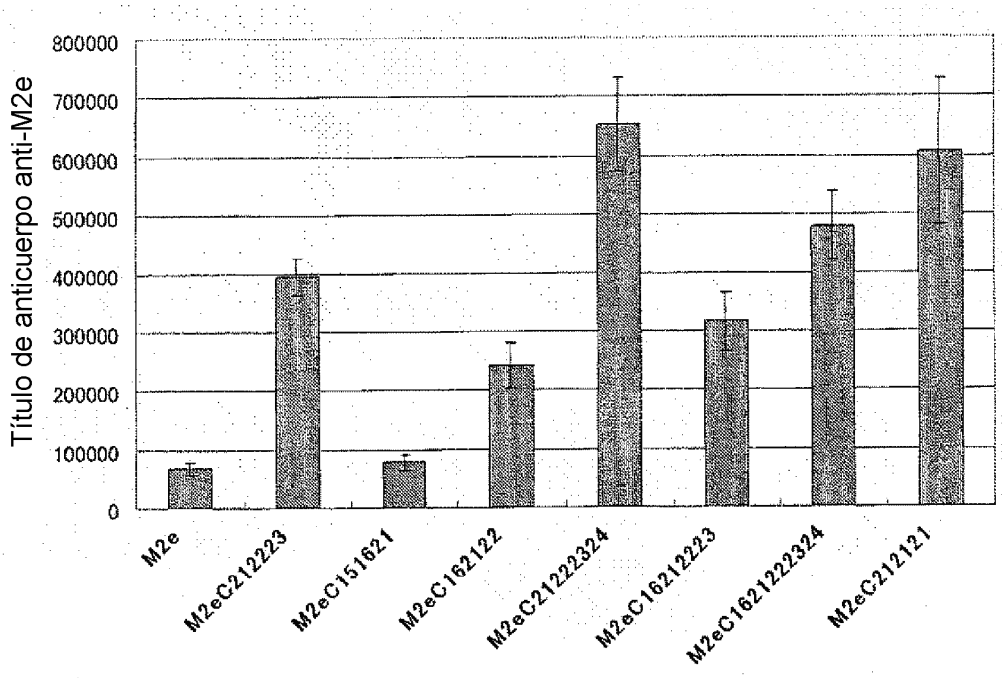

Título de anticuerpo anti-M2e
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
M2e
M2eC212223
M2eC151621
M2eC162122
M2eC21222324
M2eC16212223
M2eC1621222324
M2eC212121

Fig. 4

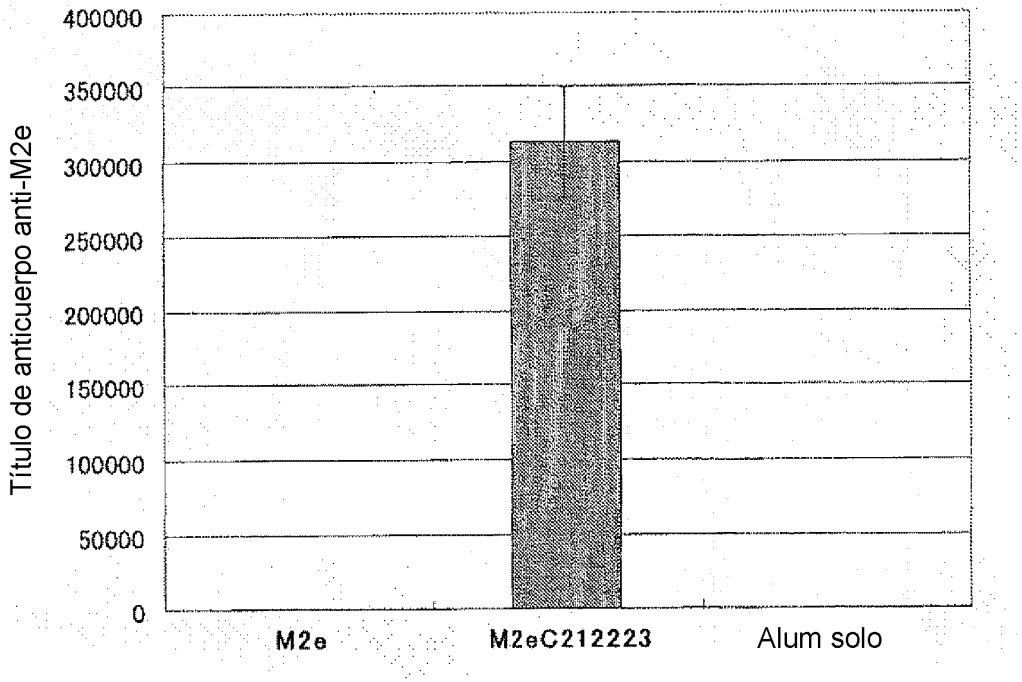
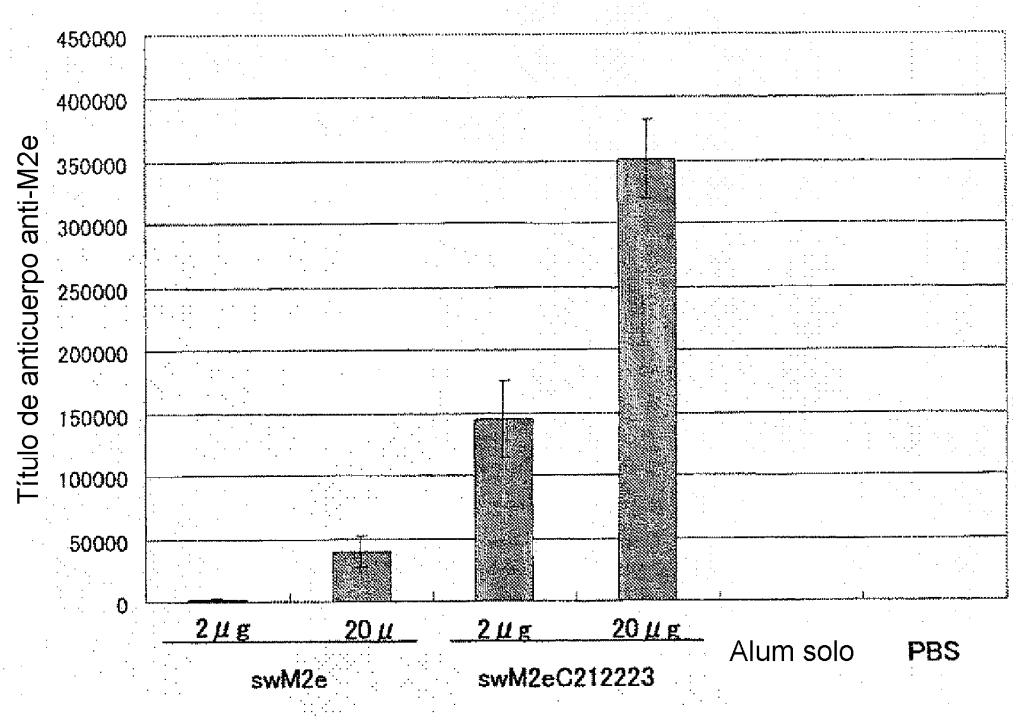

Título de anticuerpo anti-M2e
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
M2e
M2eC212223
Alum solo

Fig. 5


Título de anticuerpo anti-M2e
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
2 μ g
20 μ
2 μ g
20 μ g
swM2e
swM2eC212223
Alum solo
PBS