

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 705 588**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2015 PCT/EP2015/050289**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2015 WO15104352**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2015 E 15700281 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 3092245**

(54) Título: **Nanopartículas proteicas que contienen flagelina como plataforma de vacunas**

(30) Prioridad:

**09.01.2014 EP 14150600
16.10.2014 EP 14189264**

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

26.03.2019

(73) Titular/es:

**ALPHA-O PEPTIDES AG (100.0%)
Lörracherstrasse 50
4125 Riehen, CH**

(72) Inventor/es:

**BURKHARD, PETER;
RAMAN, SENTHIL KUMAR;
PAULILLO, SARA MARIA;
PIAZZA, MATTEO;
KULANGARA, CAROLINE y
MITTELHOLZER, CHRISTIAN**

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 705 588 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

Nanopartículas proteicas que contienen flagelina como plataforma de vacunas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nanopartículas proteicas de autoensamblaje que incorporan la secuencia de 5 proteínas de la flagelina, proteína de unión a TLR5, como un adyuvante incorporado. Además, la invención se refiere al uso de dichas nanopartículas para vacunación.

Antecedentes de la invención

La primera línea de defensa contra los patógenos invasores es a través de la inmunidad innata del huésped, y los 10 receptores tipo Toll (TLR), que son receptores unidos a la membrana, desempeñan un papel clave en ella (Yoon S.I. y otros., Science 2012, 335:859-64). Los TLR reconocen los antígenos con una estructura molecular altamente conservada usando sus ectodomios de repetición ricos en leucina (LRR). Este LRR tiene forma de herradura. Cada 15 TLR tiene un dominio de unión al ligando distinto que reconoce su antígeno molecular particular, que puede ser una forma especial de ácidos nucleicos virales o bacterianos, moléculas de superficie bacteriana tales como lipopolisacáridos (LPS) u otras moléculas asociadas a patógenos con un patrón particular. Aunque reconocen diversos antígenos moleculares no relacionados, todas las estructuras de TLR activados por agonistas conocidos, es decir, los 20 TLR que han reconocido y se han unido a su antígeno molecular, forman una organización dímera similar al unirse al antígeno, lo que hace que sus regiones C-terminales se acerquen entre sí, lo que a su vez activa sus dominios intracelulares Toll/receptor de interleucina-1 (TIR) y, por tanto, inicia las cascadas de señalización celular.

Con respecto al alcance de esta invención, es interesante observar que, de los muchos receptores TLR diferentes, 25 TLR5 es el único TLR de unión a proteínas que se conserva en los vertebrados desde peces hasta mamíferos. TLR5 se une a una forma desensamblada de flagelina del filamento flagelar similar a un látigo de proteobacterias β y γ , que es responsable de la flagelina de locomoción. Recientes estudios cristalográficos han mostrado un complejo dimérico entre la flagelina y TLR5. Tras la unión de la flagelina a TLR5, se induce la vía de señalización dependiente de MyD88, que a su vez activa el factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B en células dendríticas, monocitos y células epiteliales, lo que finalmente lleva a respuestas inmunitarias innatas contra bacterias flageladas.

La flagelina tiene una arquitectura molecular que se compone de cuatro dominios D0, D1, D2 y D3. La cadena proteica comienza con el extremo N en el dominio D0 y discurre en un gran bucle a través de los otros dominios D1, D2 y D3 hasta la punta de la molécula donde gira y discurre de nuevo a través de D3, D2 y D1 para llevar su extremo C-terminal en el dominio D0 muy cerca del extremo N-terminal. La flagelina tiene dos modos de activación del sistema inmunitario innato. El primer modo es uniéndose al receptor TLR5 principalmente a través de una parte altamente conservada de su dominio D1 (Yoon y otros., Loc. Cit.). El otro modo de activación es mediante la interacción con el inflamasoma principalmente a través de una parte C-terminal altamente conservada de su dominio D0 (Lightfield K.L. y otros., Nat Immunol. 2008, 9:1171-8).

30 La flagelina se ha usado como un adyuvante convencional, es decir, como una entidad independiente que se inyecta junto con el antígeno, o también se ha diseñado para contener el propio antígeno dentro de su propia arquitectura molecular. El segundo enfoque tiene la ventaja de que el efecto adyuvante se colocaliza con el efecto del antígeno, por lo tanto, la dosis del adyuvante se puede reducir significativamente y, como consecuencia, los efectos secundarios también se pueden reducir significativamente.

35 Una de las posibles limitaciones de la flagelina es su potencial para inducir respuestas inmunitarias inflamatorias. 40 Podría ser posible reducir la parte inflamatoria de la estimulación inmunitaria mediante el diseño de construcciones de flagelina que carezcan de la parte C-terminal de D0 que interactúa con el inflamasoma.

Muchos adyuvantes tienen limitaciones significativas en su uso debido a sus efectos secundarios graves. Por ejemplo, 45 el adyuvante completo de Freund, que es una formulación inmunoestimuladora muy potente, ya no se puede usar en experimentos con animales. Actualmente, solo hay muy pocos adyuvantes aprobados para uso humano, siendo el más importante la alúmina. Una posible forma de limitar los efectos secundarios de los adyuvantes aplicados sistémicamente es su formulación como un sistema de partículas, es decir, incorporando adyuvantes en forma de partículas o en una emulsión oleosa que puede limitar los efectos secundarios y concentrar el adyuvante cerca del antígeno de interés. Por lo tanto, el antígeno y el adyuvante pueden alcanzar el mismo ganglio linfático al mismo tiempo, lo que aumenta el efecto adyuvante al tiempo que reduce los efectos secundarios sistémicos del adyuvante.

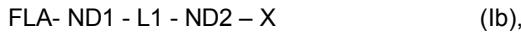
50 La flagelina es un adyuvante particularmente interesante para uso en nanopartículas proteicas como las que se describen en el documento WO 2004/071493, ya que la propia flagelina es una proteína, a diferencia de muchos otros adyuvantes que son moléculas pequeñas, tales como el imiquimod o entidades basadas en ácido nucleico, tales como CpG. Dado que la flagelina es una proteína, se puede diseñar en la nanopartícula por medio de la biología molecular sin necesidad de reticulación química.

Compendio de la invención

La invención se refiere a una nanopartícula proteica de autoensamblaje que consiste en agregados de una multitud de unidades estructurales de fórmula (Ia) o (Ib)



5 o



que consiste en una cadena continua que comprende un dominio de oligomerización de proteínas ND1, un enlazador L1, un dominio de oligomerización de proteínas ND2, un derivado de flagelina FLA y un sustituyente adicional X, en donde

10 ND1 es una proteína que forma oligómeros $(ND1)_m$ de m subunidades ND1,

ND2 es una proteína que forma oligómeros $(ND2)_n$ de n subunidades ND2,

m y n son, cada uno, una cifra entre 2 y 10, con la condición de que m no sea igual a n y no sea un múltiplo de n, y de que n no sea un múltiplo de m,

L1 es un enlace o un enlazador flexible corto,

15 FLA es flagelina o un derivado de flagelina que carece de partes de la secuencia de aminoácidos de flagelina en donde uno o varios dominios seleccionados de los dominios D2 y D3 de la flagelina se eliminan de la secuencia de aminoácidos de flagelina uniendo los dos extremos en una cadena peptídica continua, y/o de 1 a 20 aminoácidos se substituyen por otros aminoácidos, y/o que comprende además un antígeno directamente unido o unido a través de un enlazador que comprende entre 1 y 20 aminoácidos; X está ausente o es una secuencia peptídica o proteica que comprende de 1 a 1000 aminoácidos, en donde cada uno de ND1 y ND2 es un dominio de superhélice o el dominio de trimerización (foldon) de la proteína fibríntina del bacteriófago T4.

20 opcionalmente coensamblada con una multitud de unidades estructurales de fórmula (II)



25 que consiste en una cadena continua que comprende un dominio de oligomerización de proteínas ND3, un enlazador L2, un dominio de oligomerización de proteínas ND4 y sustituyentes adicionales Y y Z, en donde

ND3 es una proteína que forma oligómeros $(ND3)_y$ de y subunidades ND3,

ND4 es una proteína que forma oligómeros $(ND4)_z$ de z subunidades ND4,

y y z son, cada uno, una cifra entre 2 y 10, con la condición de que y no sea igual a z y no sea un múltiplo de z, y de que z no sea un múltiplo de y,

30 bien ND3 es idéntico a ND1, o ND4 es idéntico a ND2 o bien tanto ND3 como ND4 son idénticos a ND1 y ND2, respectivamente,

L2 es un enlace o un enlazador flexible corto que puede ser diferente de L1 o idéntico a L1, y

Y y Z están, independientemente entre sí, ausentes o son una secuencia peptídica o proteica que comprende de 1 a 1000 aminoácidos.

35 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1: presentación esquemática de diferentes nanopartículas proteicas compuestas por un coensamblaje de cadenas que contienen epítopos y cadenas que contienen flagelina o derivados de flagelina en posición vertical.

En la esquina superior izquierda se muestra el monómero de la cadena proteica que contiene flagelina fusionado con los dominios de oligomerización ND2 y ND1; a la derecha, la nanopartícula coensamblada con ND3-L2-ND4-Z a una proporción de 1:59 asumiendo una simetría icosaédrica T=1. Para mayor claridad, no se muestran los marcadores de His más probablemente desordenados (X e Y).

"ND1" y "ND3": dominios de oligomerización pentaméricos; "ND2" y "ND4": dominios de oligomerización triméricos; "FLA": flagelina o derivado de flagelina; "Z": epítopo

A) Un modelo de flagelina D0-D1-D2-D3 y la correspondiente nanopartícula presentadora de epítopo.

45 B) Un modelo de flagelina D0-D1-D2 y la correspondiente nanopartícula presentadora de epítopo.

- C) Un modelo de flagelina D0-D1 y la correspondiente nanopartícula presentadora de epítopo.
- D) Un modelo de flagelina D1-D2-D3 y la correspondiente nanopartícula presentadora de epítopo.
- E) Un modelo del epítopo de linfocitos B NANP (Z) fusionado con el dominio de oligomerización ND4 del núcleo ND3-L2-ND4.

5 *Figura 2: Representación esquemática de la interacción de flagelina con TLR5.*

Idealmente, la flagelina debe ser dimérica y mostrarse en una orientación volteada en las nanopartículas. La parte mostrada de las cadenas proteicas comienza con el dominio de oligomerización (p. ej., pentamérico) ND1 que está unido al dominio de oligomerización (p. ej., dimérico) ND2 mediante el enlazador L, conectado además al derivado de flagelina FLA que consiste en los dominios D2 y continuación de D1 de la flagelina hasta la punta (T). En la punta, la secuencia de D1 se une y se repliega sobre sí misma y dentro del dominio D2. Para mayor claridad, no se muestran los marcadores de His más probablemente desordenados.

A) Izquierda: un modelo del monómero. Derecha: un modelo del dímero en el que se mantiene la flagelina en la conformación dimérica derecha para la interacción con TLR5.

B) Panel superior: un modelo del dímero de flagelina que interactúa con un dímero de TLR5. Panel inferior, izquierda: un modelo de una partícula "solo de flagelina" totalmente ensamblada en una vista recortada. Derecha: un modelo de una partícula "solo de flagelina" totalmente ensamblada en una vista completa.

Figura 3: Mapa vectorial de pPEP-T.

"prom": promotor; "term": terminador; "ori": origen; "pb": pares de bases; "amp": gen de resistencia a ampicilina.

Figura 4: Microfotografías electrónicas de transmisión de nanopartículas de proteínas.

20 Después del replegamiento y el coensamblaje de proteínas expresadas de forma recombinante, las muestras se adsorbiieron en rejillas recubiertas con carbono y se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2%.

A) T81c-WRW-8RRVRA-D0-D1: T81c-WRW-8RRVRA-T1BT*, proporción de coensamblaje 12:48 descrita en la sección "Diseño de un FLA-SAPN" y el ejemplo 6. La barra representa 500 nm.

B) T81c-8-D0-D1: T81c-8-Pf, proporción de coensamblaje 3:57 descrita en el ejemplo 8. La barra representa 200 nm.

25 C) PD52-2i88-PANDORA-D2-D1-ori: PD52-2i88-PANDORA-Noro, proporción de coensamblaje 5:55 descrita en el ejemplo 7. La barra representa 200 nm.

D) DIM-D0-D1: DIM-D2-D1-tip3_NIC-pept, proporción de coensamblaje 5:55 descrita en el ejemplo 9. La barra representa 200 nm.

Figura 5: SDS-PAGE de la construcción LONG-D2-D1-ori de los ejemplos 1 y 5.

30 Esta construcción tiene un peso molecular teórico de 41,1 kDa.

CL - lisado aclarado

FT - Flujo pasante

1 - Lavado a pH 8,0 con imidazol 10 mM

2 - Lavado a pH 8,0 con NaH₂PO₄ 500 mM

35 3 - Lavado a pH 6,3

4 - Lavado a pH 5,9

5 - Lavado a pH 4,5

Elu - Elución de imidazol 250 mM con 5 y 10 µl de muestra aplicados al gel.

Figura 6: Microfotografías electrónicas de transmisión de nanopartículas proteicas de la construcción LONG-D2-D1-ori a diferentes resoluciones.

40 Después del replegamiento y el coensamblaje de una proteína expresada de forma recombinante, la nanopartícula se adsorbió en rejillas recubiertas con carbono y se tiñó negativamente con acetato de uranilo al 2%.

La barra representa 1000 nm, 500 nm, 200 nm y 100 nm para las imágenes superior derecha, superior izquierda, inferior derecha e inferior izquierda, respectivamente.

Figura 7: Activación de la ruta celular de TLR5.

- A) Long-D2-D1-ori (ejemplo 5)
- B) T81C-WRW-8RRVRA-D0-D1: T81c-WRW-8RRVRA-T1BT* (12:48) (ejemplo 6)
- C) PD52-2i88-PANDORA-D2-D1-ori: PD52-2i88-PANDORA-Noro (5:55) (ejemplo 7)

5 Paneles superiores: evaluación de la actividad de respuesta a la dosis

Paneles inferiores: evaluación de CE50

IMG-2205: flagelina de *Salmonella typhimurium* (0,29 ng/ml), control positivo.

Eje X: concentración (ng/ml) de la nanopartícula.

Eje Y: expresión de SEAP (ng/ml) o %A = % de actividad

10 *Figura 8: Análisis de unión por ELISA de títulos de anticuerpos después de la inmunización en ratones C57Bl/6 (descrito en los ejemplos 8 [panel A] y 9 [panel B]).*

A)

- T81c-8-Pf solo a una dosis de 1 µg
- ◆ T81c-8-Pf solo a una dosis de 10 µg

15 X Coensamblaje de T81c-8-D0-D1 y T81c-8-Pf a una proporción de 3:57 y una dosis de 1 µg

▲ Coensamblaje de T81c-8-D0-D1 y T81c-8-Pf a una proporción de 3:57 y una dosis de 10 µg

● Coensamblaje de T81c-8-D0-D1 y T81c-8-Pf a una proporción de 9:51 y una dosis de 1 µg

☒

Coensamblaje de T81c-8-D0-D1 y T81c-8-Pf a una proporción de 9:51 y una dosis de 10 µg

20 Eje X: factor de dilución del suero

Eje Y: DO = densidad óptica

La placa ELISA está recubierta con el inmunógeno completo usado para la inmunización

B)

- Coensamblaje de DIM-D0-D1 y DIM-D2-D1-tip3_NIC-pept a una proporción de 5:55 y una dosis de 10 µg

25 ▪ Nicotina acoplada al portador KLH a una dosis de 10 µg

Eje X: factor de dilución del suero

Eje Y: DO = densidad óptica

La placa de ELISA está recubierta solo con nicotina unida a un portador no relacionado

Figura 9: Microfotografías electrónicas de transmisión de nanopartículas proteicas de la construcción Nic-DEDDL.

30 Después del replegamiento y el coensamblaje de una proteína expresada de forma recombinante, la nanopartícula se adsorbió en rejillas recubiertas con carbono y se tiñó negativamente con acetato de uranilo al 2%.

La barra representa 1000 nm

Figura 10: Formación de anticuerpos

35 Se inmunizaron s.c. grupos de tres ratones C57Bl/6 con 10 µg de Nic-DEDDL (ejemplo 10) o 10 µg de Nic-KLH (nicotina acoplada al portador KLH) como control positivo en tres inyecciones cada una con una semana de diferencia. El título de anticuerpos en el día 0 (es decir, antes de la primera inyección) y luego una semana después de cada inyección se determinó mediante ELISA.

d = días después de la primera inmunización; A = título de anticuerpos (escala log2).

Descripción detallada de la invención

En la presente invención se describen diferentes formas de flagelina que incorporan diferentes dominios de flagelina en cualquier orientación incorporada en las nanopartículas. Algunos de los diseños tienen flagelina unida a las nanopartículas con su extremo N y C terminal cerca de la superficie de la nanopartícula (figura 1), mientras que en otros diseños las partes distantes de la flagelina están cerca de la superficie de la nanopartícula, presentando de este modo la flagelina en la orientación opuesta en las nanopartículas (figura 2).

Dado que las respuestas inmunitarias inflamatorias son uno de los principales problemas de los adyuvantes, y en particular de los adyuvantes de unión a TLR, es beneficioso reducir su potencial para inducir respuestas inflamatorias. Se sabe que la parte C-terminal de la flagelina, que es parte del dominio D0, contiene una secuencia peptídica que interactúa con el inflamasoma y, por lo tanto, es responsable de las reacciones inflamatorias de la flagelina. Por lo tanto, se han diseñado construcciones de flagelina que carecen de la parte C-terminal del dominio D0 que activa el inflamasoma (figura 2).

La invención se refiere a una nanopartícula proteica de autoensamblaje que consiste en agregados de una multitud de unidades estructurales de fórmula (Ia) o (Ib)

15 X - ND1 - L1 - ND2 – FLA (Ia)

o

FLA- ND1 - L1 - ND2 – X (Ib),

que consiste en una cadena continua que comprende un dominio de oligomerización de proteínas ND1, un enlazador L1, un dominio de oligomerización de proteínas ND2, un derivado de flagelina FLA y un sustituyente adicional X, en donde

ND1 es una proteína que forma oligómeros $(ND1)_m$ de m subunidades ND1,

ND2 es una proteína que forma oligómeros $(ND2)_n$ de n subunidades ND2,

m y n son, cada uno, una cifra entre 2 y 10, con la condición de que m no sea igual a n y no sea un múltiplo de n, y de que n no sea un múltiplo de m,

25 L1 es un enlace o un enlazador flexible corto,

FLA es flagelina o un derivado de flagelina que carece de partes de la secuencia de aminoácidos de flagelina en donde uno o varios dominios seleccionados de los dominios D2 y D3 de la flagelina se eliminan de la secuencia de aminoácidos de flagelina uniendo los dos extremos en una cadena peptídica continua, y/o de 1 a 20 aminoácidos se sustituyen por otros aminoácidos, y/o que comprende además un antígeno directamente unido o unido a través de un enlazador que comprende entre 1 y 20 aminoácidos; X está ausente o es una secuencia peptídica o proteica que comprende de 1 a 1000 aminoácidos, en donde cada uno de ND1 y ND2 es un dominio de superhélice o el dominio de trimerización (foldon) de la proteína fibratina del bacteriófago T4.

opcionalmente coensamblada con una multitud de unidades estructurales de fórmula (II)

Y-ND3-L2-ND4-Z (II),

35 que consiste en una cadena continua que comprende un dominio de oligomerización de proteínas ND3, un enlazador L2, un dominio de oligomerización de proteínas ND4 y sustituyentes adicionales Y y Z, en donde

ND3 es una proteína que forma oligómeros $(ND3)_y$ de y subunidades ND3,

ND4 es una proteína que forma oligómeros $(ND4)_z$ de z subunidades ND4,

y y z son, cada uno, una cifra entre 2 y 10, con la condición de que y no sea igual a z y no sea un múltiplo de z, y de que z no sea un múltiplo de y,

bien ND3 es idéntico a ND1, o ND4 es idéntico a ND2 o bien tanto ND3 como ND4 son idénticos a ND1 y ND2, respectivamente,

L2 es un enlace o un enlazador flexible corto que puede ser diferente de L1 o idéntico a L1, y

45 Y y Z están, independientemente uno de otro, ausentes o son una secuencia peptídica de 1 a 100 aminoácidos que comprende de 1 a 1000 aminoácidos.

Las nanopartículas de proteínas de esta invención ofrecen una forma muy elegante de colocalizar la molécula adyuvante con el inmunógeno de interés, por lo tanto, la propiedad adyuvante de la flagelina puede colocalizarse con el antígeno de vacuna contra el cual se desea una respuesta inmunitaria. Por coensamblaje de dos cadenas de

proteínas formadoras de nanopartículas, una con flagelina o un derivado de flagelina (FLA) en una molécula de fórmula (Ia) o (Ib), la otra de fórmula (II) que incorpora el antígeno de interés (Y o Z), en una única nanopartícula proteica, el adyuvante y el antígeno están perfectamente colocalizados. Por lo tanto, en estos diseños, el efecto adyuvante se colocaliza con el beneficio de la presentación repetitiva de antígenos de las nanopartículas. Además, la contribución del efecto adyuvante puede aumentarse o disminuirse usando diferentes proporciones de ensamblaje de cadenas proteicas que contienen flagelina de fórmula (Ia) o (Ib) con cadenas proteicas que contienen antígeno de fórmula (II). El efecto adyuvante se adapta para optimizar entre la mejor antigenicidad y el efecto secundario más bajo.

Como se ha expuesto anteriormente, FLA es flagelina o un derivado de flagelina que carece de partes de la secuencia de aminoácidos de flagelina pero que contiene al menos el dominio de unión a TLR5, D1. El o los dominios faltantes pueden ser sustituidos por un segmento enlazador flexible de 1 a 20 aminoácidos que une los dos extremos de la secuencia de flagelina restante, o pueden ser reemplazados por un antígeno proteico totalmente plegado. La región enlazadora flexible puede contener sitios de unión adecuados para el acoplamiento covalente de antígenos.

Las nanopartículas que contienen flagelina por sí mismas (es decir, sin coensamblaje con una cadena proteica formadora de nanopartículas que contienen antígeno) pueden usarse como un adyuvante convencional que simplemente se añade a cualquier forma de administración de antígeno en una vacuna dada.

Como una opción alternativa adicional, los antígenos pueden diseñarse como sustituyentes X en las cadenas proteicas formadoras de nanopartículas que contienen solo flagelina de fórmula (Ia) o (Ib), es decir, de nuevo sin coensamblaje con una cadena proteica formadora de nanopartículas que contiene antígeno de fórmula (II), para maximizar los beneficios del efecto adyuvante y el efecto de presentación de antígeno repetitivo, usando un antígeno X como epítopo de linfocitos B y el derivado de flagelina FLA como adyuvante.

Dado que en la arquitectura de la flagelina la cadena proteica se ejecuta como un bucle a través de todos los dominios D0, D1, D2 y D3 y viceversa, se pueden eliminar uno o varios dominios de la secuencia al unir los dos extremos en una cadena peptídica continua que da como resultado un derivado de flagelina FLA. Por lo tanto, una construcción de derivado de flagelina que carece de los dominios D2 y D3 de la flagelina se puede diseñar fácilmente, simplemente conectando la cadena proteica en la interfaz de los dominios D1 y D2. De manera similar, los dominios de la punta (ya sea D3, o D2 y D3 juntos) pueden reemplazarse por un antígeno proteico, siempre que este antígeno proteico con sus extremos N y C se pueda conectar a los extremos N y C en la interfaz entre D1 y D2. Los dominios de la punta D2 y D3 también pueden reemplazarse por una secuencia peptídica con residuos adecuados para el acoplamiento covalente de moléculas de antígeno. Un ejemplo de dicho bucle peptídico es la secuencia KYKDGDKGDDK (SEQ ID NO:1), que contiene cuatro residuos de lisina para el acoplamiento covalente a su grupo amino primario. Dicho bucle hidrófilo que incorpora residuos de lisina proporciona sitios de acoplamiento para la unión covalente de moléculas de ligando al aminoácido primario de la cadena lateral de la lisina. Reemplazar los residuos de lisina dentro de la secuencia de flagelina por arginina elimina los sitios de acoplamiento no deseados en el resto de la molécula. Estas dos modificaciones dan un derivado de flagelina con la siguiente secuencia:

```

MAQVINTNSLSLLTQNNLNRSQALGTAIERLSSGLRINSARDDAAQQAIAANRFTANIRGLTQASR
NANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQF
NGVRVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIIDLRQINSQTLGLDQLNVQQKYKDGDKGDDKTENPLQRIDA
ALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQIQAGTSVL
AQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO: 28)

```

Un alcance adicional de esta invención es diseñar la flagelina como un dímero sobre la nanopartícula. Por lo tanto, la interacción con TLR5, que también es un dímero, se optimiza. Esto se consigue fácilmente usando un dominio de oligomerización de proteínas *dimérico* como ND1 (m es 2) o ND2 (n es 2) y se usa como sitio de unión para el derivado de flagelina FLA, es decir, como se muestra en la fórmula (Ib) o (Ia), respectivamente. Esto forzará al derivado de la flagelina a una forma dimérica, que interactúa más fácilmente con TLR5 (figura 2). Preferiblemente, en un diseño tal, el dominio de oligomerización dimérico en la unidad estructural de la fórmula (Ia) o (Ib) al que está unida la flagelina (ya sea ND2 en la fórmula (Ia) o ND1 en la fórmula (Ib)) es diferente del dominio de oligomerización correspondiente en la unidad estructural de fórmula (II) (ya sea ND4 cuando se coensambla con cadenas de fórmula (Ia), o ND3 cuando se coensambla con cadenas de fórmula (Ib)). Preferiblemente, el dominio de oligomerización dimérico en la unidad estructural de fórmula (Ia) o (Ib) tiene una interacción, es decir, un potencial de formación de dímeros, más potente que el dominio de oligomerización correspondiente (ND3 o ND4) en la unidad estructural de fórmula (II). Esto garantizará que, en una nanopartícula coensamblada con unidades estructurales de fórmula (Ia) o (Ib) y fórmula (II), la flagelina o el derivado de flagelina FLA siempre forma un dímero en unidades estructurales adyacentes de fórmula (Ia) o (Ib) y no se distribuye como un monómero único por toda la nanopartícula coensamblada.

Además, diseñando la flagelina en la orientación volteada, preferentemente como un dímero, sobre la nanopartícula, la interacción con el dímero de TLR5 puede optimizarse (figura 2). Se prefiere dicha nanopartícula. Por ejemplo, una construcción de flagelina D1-D2 puede diseñarse uniendo las cadenas proteicas con una secuencia peptídica como KAKKKDGKDDKDS (SEQ ID NO: 29, "T" en la figura 2) en la interfaz entre el dominio D0 y D1, omitiendo de este modo el dominio D0, y eliminando el dominio D3 completamente sin unir las cadenas proteicas. En consecuencia, la

molécula de flagelina resultante tendrá sus extremos N y C en el dominio D2 para dar una secuencia D2-D1 como

```
SARLSDLEANNAVRGESKITVNGAEYTANATGDRITLAGRTMFI DRTASGVSTLINE DAAAARRST
ANPLASIDSALS RVD AVRSSLGAIQNRFDSAKAKKDGKDKDSKNANDGISIAQTTEGALNEINN
NLQRVRELSVQATNGTNSDSDLRSIQDEIQQRLEEDRVSNQTQFNGVKVL SQDNQM KIQVGAKDG
ETITIDLQKIDVKSLGLDG FNVNGPREATVGDLRSSFRNVTGYDTYAGADRYRVDINSGAV
```

(SEQ ID NO:30)

Se podrían usar secuencias enlazadoras flexibles similares ("T" en la figura 2) con de 1 a 20 aminoácidos como, por ejemplo, GS o GKDGDGS (SEQ ID NO:31) o GKDGKDGDGDGS (SEQ ID NO: 32). Preferiblemente, las secuencias enlazadoras contienen principalmente aminoácidos cargados o polares intercalados con residuos de glicina para hacer que el enlazador sea flexible. Para evitar los sitios de acoplamiento no deseados en esta construcción D2-D1, los residuos de lisina son reemplazados por residuos de arginina.

El derivado de la flagelina FLA tiene que estar conectado a un dominio de oligomerización dimérico ND1 o ND2 en la parte D2 de la flagelina. La preparación de una nanopartícula a partir de dicha unidad estructural, ya sea sola o 10 conensamblada con una unidad estructural correspondiente de fórmula (II), formará una nanopartícula preferida con un derivado de flagelina en orientación volteada.

Unidades estructurales monoméricas

Un péptido (o polipéptido o proteína) es una cadena o secuencia de aminoácidos covalentemente unidos por enlaces amida. El péptido puede ser natural, modificado natural, parcialmente sintético o totalmente sintético. Se entiende que 15 natural modificado, parcialmente sintético o totalmente sintético significa que no se aparece en la naturaleza. El término aminoácido abarca tanto aminoácidos de origen natural seleccionados de los 20 α-L-aminoácidos naturales esenciales, aminoácidos sintéticos, tales como α-D-aminoácidos, ácido 6-aminohexanoico, norleucina, homocisteína o similares, así como los aminoácidos naturales que se han modificado de alguna manera para alterar ciertas propiedades tales como la carga, tales como fosfoserina o fosftotirosina, u otras modificaciones tales como n-octanoilserina, o similares. En derivados de aminoácidos, el grupo amino que forma el enlace amida se alquila, o las funciones amino, hidroxi o tio de la cadena lateral se alquilan o acilan, o la función carboxi de la cadena lateral se amida o se esterifica. Preferiblemente, una proteína de la invención comprende aminoácidos seleccionados de los 20 α-L-aminoácidos naturales esenciales.

En una aproximación grosera, los péptidos pueden distinguirse de las proteínas tomando como base su tamaño, es decir, aproximadamente una cadena de 50 aminoácidos o menos puede considerarse un péptido, mientras que las cadenas más largas pueden considerarse proteínas. Los dipéptidos son los péptidos más cortos y consisten en 2 aminoácidos unidos por un solo enlace peptídico. Del mismo modo, los tripéptidos consisten en tres aminoácidos, los tetrapéptidos consisten en cuatro aminoácidos, etc. Un polipéptido es una cadena peptídica larga, continua y no ramificada. En la bibliografía, los límites del tamaño que distinguen los péptidos de las proteínas son algo débiles. A veces, los "péptidos" largos, tales como el beta amiloide, se han considerado proteínas, y viceversa, las proteínas más pequeñas, tales como la insulina, se han denominado péptidos.

Una cadena enlazadora flexible corta L1 o L2 se selecciona de átomos de carbono opcionalmente sustituidos, átomos de nitrógeno opcionalmente sustituidos, átomos de oxígeno, átomos de azufre y combinaciones de los mismos, con preferiblemente de 1 a 60 átomos, en particular de 1 a 20 átomos en la cadena. Una cadena enlazadora flexible corta de este tipo es, p. ej., una cadena de polietilenoxi, una cadena de azúcar flexible o, preferiblemente, una cadena peptídica flexible, p. ej., una cadena peptídica que consta de 1 a 20 aminoácidos, en particular de 1 a 6 aminoácidos que comprenden uno o varios aminoácidos glicina. Los enlazadores más preferidos consisten en 1 a 6 aminoácidos con un alto contenido de glicina.

Los dominios de oligomerización según la invención son preferiblemente superhélices. Una superhélice es una secuencia proteica con un patrón contiguo de residuos principalmente hidrófobos separados por 3 y 4 residuos, que se ensambla para formar un haz multimérico de hélices, como se explicará con más detalle a continuación.

Los dominios de oligomerización, que no son superhélices, son, por ejemplo, el dominio de trimerización (foldon) de la proteína fibríntina del bacteriófago T4 (Tao, Y. y otros., Structure 1997, 5:789-798)

Los dominios de oligomerización ND1, ND2, ND3 y/o ND4, y los enlazadores L1 y/o L2 pueden estar opcionalmente sustituidos adicionalmente por entidades de direccionamiento, o sustituyentes que refuerzan las propiedades adyuvantes de la nanopartícula, tales como un ácido nucleico inmunoestimulador, preferiblemente un oligodesoxinucleótido que contiene desoxinosina, un oligodesoxinucleótido que contiene desoxiuridina, un oligodesoxinucleótido que contiene un motivo CG, CpG, imiquimod, resiquimod, gardiquimod, una molécula de ácido nucleico que contiene inosina y citidina, o similares. Otros sustituyentes que refuerzan las propiedades adyuvantes de la nanopartícula son los péptidos antimicrobianos, tales como péptidos catiónicos, que son una clase de moléculas inmunoestimuladoras cargadas positivamente que son capaces de facilitar y/o mejorar las respuestas inmunitarias

adaptativas. Un ejemplo de un péptido de este tipo con propiedades inmunopotenciadoras es el péptido antimicrobiano artificial cargado positivamente KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO:2) que induce una potente inmunidad adaptativa impulsada por el tipo 2 específico de proteínas después de inmunizaciones de sensibilización y de refuerzo. Una entidad de direccionamiento particular considerada como sustituyente es una señal de direccionamiento al RE, es decir, un péptido señal que induce el transporte de una proteína o péptido al retículo endoplasmático (RE).

Los sustituyentes opcionales, p. ej., aquellos sustituyentes opcionales descritos anteriormente en la presente memoria, están conectados preferiblemente a aminoácidos adecuados cerca del extremo y opuestos al extremo unido a L1 o L2 del dominio de oligomerización ND1, ND2, ND3 y/o ND4. En el autoensamblaje de la nanopartícula proteica, dichos sustituyentes se presentarán a continuación en la superficie de la nanopartícula. Dichos sustituyentes pueden estar conectados al extremo de la cadena proteica continua, o pueden estar conectados a un grupo funcional de cadena lateral de un aminoácido ubicado cerca del extremo de ND1, ND2, ND3 y/o ND4 opuesto al extremo unido a L1 o L2.

En la realización más preferida, el sustituyente es un sustituyente peptídico o proteico y se denomina X, Y y/o Z que representa una extensión simple de la cadena proteica, p. ej., como X - ND1 - L1 - ND2 - FLA en el extremo N-terminal de ND1, o en ambos extremos como Y - ND3 - L2 - ND4 - Z para generar una secuencia proteica continua única combinada, que puede expresarse en un sistema de expresión de proteínas recombinantes como una sola molécula.

En otras realizaciones, un sustituyente peptídico o no peptídico puede estar conectado a un grupo funcional de cadena lateral de un aminoácido ubicado cerca del extremo de ND1, ND2, ND3 y/o ND4 opuesto al extremo unido a L1 o L2, o preferiblemente a un grupo funcional de cadena lateral de un aminoácido dentro de las extensiones X, Y y/o Z si X, Y y/o Z son péptidos o proteínas.

También es posible unir un sustituyente al enlazador L1 o L2. En tal caso, después del replegamiento de la nanopartícula de proteína de autoensamblaje, el sustituyente se ubicará en la cavidad interna de la nanopartícula proteica de autoensamblaje.

Una tendencia a formar oligómeros significa que dichas proteínas pueden formar oligómeros dependiendo de las condiciones, p. ej., en condiciones de desnaturización son monómeros, mientras que en condiciones fisiológicas pueden formar, por ejemplo, dímeros, trímeros, tetrámeros o pentámeros. En condiciones predefinidas, adoptan un solo estado de oligomerización, que es necesario para la formación de nanopartículas. Sin embargo, su estado de oligomerización se puede cambiar tras cambiar las condiciones, p. ej. de dímeros a trímeros tras aumentar la concentración de sal (Burkhard P. y otros., Protein Science 2000, 9:2294-2301) o de pentámeros a monómeros tras disminuir el pH.

Una arquitectura de unidades estructurales según la fórmula (Ia), (Ib) o (II) es claramente distinta de las proteínas de la cápsida viral. Las cápsidas virales están compuestas por una sola proteína, que forma oligómeros de 60 o un múltiplo del mismo, como p. ej., las partículas del virus de la hepatitis B (EP 1 262 555, EP 0 201 416), o de más de una proteína, que se conensamblan para formar la estructura de la cápsida viral, que puede adoptar también otras geometrías distintas de icosahédrica, dependiendo del tipo de virus (Fender P. y otros., Nature Biotechnology 1997, 15:52-56). Las nanopartículas proteicas de autoensamblaje (SAPN) de la presente invención también son claramente distintas de las partículas similares a virus, ya que (a) están construidas a partir de proteínas distintas de las de la cápsida viral y (b) que la cavidad en el medio de la nanopartícula es demasiado pequeña para acomodar el ADN/ARN de un genoma viral completo.

Los dominios de oligomerización de proteínas son bien conocidos (Burkhard P. y otros., Trends Cell Biol 2001, 11:82-88). La base de datos de estructura de proteínas RCSB-PDB (<http://www.rcsb.org/>) contiene estructuras atómicas de proteínas. Este sitio web ofrece herramientas para identificar oligómeros de proteínas entre esas estructuras atómicas. El uso del modo de búsqueda avanzada (<http://www.rsb.org/pdb/search/advSearch.do>) con el calificador "A5" en "Estequiométría de proteínas" recupera los dominios de oligomerización de proteínas pentaméricos. El uso del modo de búsqueda avanzada con el calificador "Proteínas de superhélice" en el "Navegador de clasificación SCOP" recupera los dominios de oligomerización de proteínas de superhélice. La combinación de las dos búsquedas recupera todas las estructuras de proteínas de superhélice pentaméricas en la base de datos. Del mismo modo, las estructuras de superhélice dímeras, triméricas o tetraméricas se pueden recuperar usando "A2", "A3" o "A4" como calificadores, respectivamente. En la presente invención, los dominios de oligomerización ND1, ND2, ND3 y ND4 son preferiblemente dominios de superhélice. Una superhélice es una secuencia proteica con un patrón contiguo de residuos principalmente hidrófobos separados por 3 y 4 residuos, generalmente en una secuencia de siete aminoácidos (repetición heptada) u once aminoácidos (repetición undecada), que se ensambla (se pliega) para formar un haz multimérico de hélices. También se contemplan superhélices con secuencias que incluyen alguna distribución irregular de la separación de 3 y 4 residuos. Los residuos hidrófobos son, en particular, los aminoácidos hidrófobos Val, Ile, Leu, Met, Tyr, Phe y Trp. Principalmente hidrófobo significa que al menos el 50% de los residuos deben seleccionarse de los aminoácidos hidrófobos mencionados.

Por ejemplo, en una unidad estructural monomérica preferida de fórmula (Ia), (Ib) o (II), ND1, ND2, ND3 y ND4 son proteínas de cualquiera de las fórmulas

[aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)]_x (IIIa),

	[aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)] _x	(IIIb),
	[aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)] _x	(IIIc),
	[aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)] _x	(IIId),
	[aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)] _x	(IIIe),
5	[aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)] _x	(IIIff),
	[aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)] _x	(IIIg),

en las que aa significa un aminoácido o un derivado del mismo, aa(a), aa(b), aa(c), aa(d), aa(e), aa(f) y aa(g) son los mismos o diferentes aminoácidos o derivados de los mismos, preferiblemente aa(a) y aa(d) son los mismos o diferentes aminoácidos hidrófobos o derivados de los mismos; y x es una cifra entre 2 y 20, preferiblemente entre 3 y 10.

10 Una heptada es un heptapéptido de fórmula aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g) (IIIa) o cualquiera de sus permutaciones de fórmulas (IIIb) a (IIIg).

Se prefieren las unidades estructurales monoméricas de fórmula (Ia), (Ib) o (II) en donde todos los dominios de oligomerización de proteínas ND1, ND2, ND3 y ND4 son

15 1. (1) una proteína de cualquiera de las fórmulas (IIIa) a (IIIg) en donde x es 3, y aa(a) y aa(d) se seleccionan de los 20 α-L-aminoácidos naturales de manera que la suma de las puntuaciones de la tabla 1 para estos 6 aminoácidos sea al menos 14, y dichas proteínas comprendan hasta 17 heptadas más; o

20 2. (2) una proteína de cualquiera de las fórmulas (IIIa) a (IIIg) en donde x es 3, y aa(a) y aa(d) se seleccionan de los 20 α-L-aminoácidos naturales de manera que la suma de las puntuaciones de la tabla 1 para estos 6 aminoácidos sea al menos 12, con la condición de que un aminoácido aa(a) sea un aminoácido cargado capaz de formar un puente salino inter-helicoidal a un aminoácido aa(d) o aa(g) de una heptada vecina, o que un aminoácido aa(d) sea un aminoácido cargado capaz de formar un puente salino inter-helicoidal a un aminoácido aa(a) o aa(e) de una heptada vecina, y proteínas de este tipo que comprenden hasta dos heptadas adicionales. Un aminoácido cargado capaz de formar un puente salino inter-helicoidal a un aminoácido de una heptada vecina es, por ejemplo, Asp o Glu si el otro aminoácido es Lys, Arg o His, o viceversa.

25 Tabla 1: Puntuaciones de aminoácidos para determinación de preferencia

Aminoácido	Posición aa(a)	Posición aa(d)
L (Leu)	3,5	3,8
M (Met)	3,4	3,2
I (Ile)	3,9	3,0
Y (Tyr)	2,1	1,4
F (Phe)	3,0	1,2
V (Val)	4,1	1,1
Q (Gln)	-0,1	0,5
A (Ala)	0,0	0,0
W (Trp)	0,8	-0,1
N (Asn)	0,9	-0,6
H (His)	-1,2	-0,8
T (Thr)	0,2	-1,2
K (Lys)	-0,4	-1,8
S (Ser)	-1,3	-1,8
D (Asp)	-2,5	-1,8

E (Glu)	-2,0	-2,7
R (Arg)	-0,8	-2,9
G (Gly)	-2,5	-3,6
P (Pro)	-3,0	-3,0
C (Cys)	0,2	-1,2

También se prefieren unidades estructurales monoméricas de fórmula (Ia), (Ib) o (II) en donde uno o más dominios de oligomerización de proteínas ND1, ND2, ND3 o ND4 se seleccionan de las siguientes proteínas preferidas:

- (11) Proteína de cualquiera de las fórmulas (IIIa) a (IIIg) en donde
 5 aa (a) se selecciona de Val, Ile, Leu y Met, y un derivado de los mismos, y
 aa (d) se selecciona de Leu, Met, Val e Ile, y un derivado de los mismos.
- (12) Proteína de cualquiera de las fórmulas (IIIa) a (IIIg) en donde un aa(a) es Asn y el otro aa(a) se selecciona de Asn, Ile y Leu, y aa(d) es Leu. Dicha proteína es habitualmente un dominio de dimerización.
 10 (13) Proteína de cualquiera de las fórmulas (IIIa) a (IIIg) en donde aa(a) y aa(d) son ambos Leu o ambos Ile. Dicha proteína es habitualmente un dominio de trimerización.
- (14) Proteína de cualquiera de las fórmulas (IIIa) a (IIIg) en donde aa(a) y aa(d) son ambos Trp. Dicha proteína es habitualmente un dominio de pentamerización.
- (15) Proteína de cualquiera de las fórmulas (IIIa) a (IIIg) en donde aa(a) y aa(d) son ambos Phe. Dicha proteína es habitualmente un dominio de tetramerización.
 15 (16) Proteína de cualquiera de las fórmulas (IIIa) a (IIIg) en donde aa(a) y aa(d) son Trp o Phe. Dicha proteína es habitualmente un dominio de pentamerización.
- (17) Proteína de cualquiera de las fórmulas (IIIa) a (IIIg) en donde aa(a) es Leu o Ile, y un aa(d) es Gln y el otro aa(d) se seleccionan de Gln, Leu y Met. Dicha proteína tiene el potencial de ser un dominio de pentamerización.
 20 Otras proteínas preferidas son las proteínas (1), (2), (11), (12), (13), (14), (15), (16) y (17) como se definieron anteriormente en la presente memoria, y en donde además
- (21) al menos un aa(g) se selecciona de Asp y Glu y aa(e) en una heptada siguiente es Lys, Arg o His; y/o
 (22) al menos un aa(g) se selecciona de Lys, Arg y His, y aa(e) en una heptada siguiente es Asp o Glu, y/o
 (23) al menos un aa(de a a g) se selecciona de Lys, Arg y His, y un aa(de a a g) con 3 o 4 aminoácidos separados en la secuencia es Asp o Glu. Dichos pares de aminoácidos aa(de a a g) son, por ejemplo, aa(b) y aa(e) o aa(f).
 25 Programas de predicción de superhélices, tales como PCOILS (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/pcoils>; Gruber M. y otros., J. Struct. Biol. 2006155 140-5) o MULTICOIL (<http://groups.csail.mit.edu/cb/multicoil/cgi-bin/multicoil.cgi>) pueden predecir secuencias de proteínas formadoras de superhélices. Por lo tanto, en una unidad estructural monomérica de fórmula (Ia), (Ib) o (II), ND1, ND2, ND3 y ND4 son proteínas que contienen al menos una secuencia de dos repeticiones de heptadas que es predicha por el programa de predicción de superhélices PCOILS para formar una superhélice con una probabilidad mayor que 0,9 para todos sus aminoácidos con al menos uno de los tamaños de ventana de 14, 21 o 28.
 30 En una unidad estructural monomérica más preferida de fórmula (Ia), (Ib) o (II), ND1, ND2, ND3 y ND4 son proteínas que contienen al menos una secuencia de tres repeticiones de heptadas que es predicha por el programa de predicción de superhélices PCOILS para formar una superhélice con una probabilidad mayor que 0,9 para todos sus aminoácidos con al menos uno de los tamaños de ventana de 14, 21 o 28.
 35 En otra unidad estructural monomérica más preferida de fórmula (Ia), (Ib) o (II), ND1, ND2, ND3 y ND4 son proteínas que contienen al menos dos secuencias independientes de dos repeticiones de heptadas que son predichas por el programa de predicción de superhélices PCOILS para formar una superhélice con una probabilidad mayor que 0,9 para todos sus aminoácidos con al menos uno de los tamaños de ventana de 14, 21 o 28.
 40 Las secuencias de superhélice conocidas pueden recuperarse de bancos de datos tales como el banco de datos de proteínas RCSB (<http://www.rcsb.org>).

Las más preferidas son las secuencias de superhélice y las unidades estructurales monoméricas descritas en los ejemplos.

En aún otra realización preferida, un dominio de oligomerización ND1, ND2, ND3 o ND4 es el dominio de trimerización (foldon) de la proteína fibríntina del bacteriófago T4 (Tao, Y. y otros., Structure 1997, 5:789-798) o un derivado del mismo. Este dominio de trimerización tiene la secuencia GYIPEAPRDGQAYVRKDGEVLLSTFL (SEQ ID NO:3). También se contemplan pequeñas modificaciones de este dominio.

Nanopartículas proteicas de autoensamblaje: unidades de MCM

Las nanopartículas proteicas de autoensamblaje (SAPN) se forman a partir de unidades estructurales monoméricas de fórmula (Ia), (Ib) o mezclas de unidades estructurales monoméricas de fórmula (Ia) o (Ib) con unidades estructurales monoméricas de fórmula (II). Si dichas unidades estructurales se ensamblan, formarán las llamadas "unidades de MCM". El número de unidades estructurales monoméricas, que se ensamblarán en una unidad de MCM de este tipo, se definirá por el mínimo común múltiplo (MCM). Por lo tanto, si, por ejemplo, los dominios de oligomerización de la unidad estructural monomérica forman un pentámero ($ND1_5$) ($m=5$) y un dímero ($ND2_2$) ($n=2$), 10 monómeros formarán una unidad de MCM. Si el segmento enlazador L tiene la longitud adecuada, esta unidad de MCM se puede ensamblar en forma de una nanopartícula proteica esférica.

Las nanopartículas proteicas de autoensamblaje (SAPN) pueden formarse por el ensamblaje de solo una o más de una unidades de MCM (tabla 2). Dichas SAPN representan estructuras topológicamente cerradas.

Poliedros regulares

Existen cinco poliedros regulares, el tetraedro, el cubo, el octaedro, el dodecaedro y el icosaedro. Tienen diferentes elementos internos de simetría rotacional. El tetraedro tiene un eje de 2 veces y dos ejes de 3 veces, el cubo y el octaedro tienen un eje de simetría rotacional de 2 veces, uno de 3 veces, y uno de 4 veces y el dodecaedro y el icosaedro tienen un eje de simetría rotacional de 2 veces uno de 3 veces y uno de 5 veces. En el cubo, la orientación espacial de estos ejes es exactamente la misma que en el octaedro, y también en el dodecaedro y en el icosaedro, la orientación espacial de estos ejes unos con respecto otros es exactamente la misma. Por lo tanto, para el fin de SAPN de la invención, el dodecaedro y el icosaedro pueden considerarse idénticos. El dodecaedro/icosaedro se construye a partir de 60 unidades estructurales tridimensionales idénticas (tabla 2). Estas unidades estructurales son las unidades asimétricas (UA) del poliedro. Son pirámides y los bordes de la pirámide corresponden a uno de los ejes de simetría rotacional, por lo tanto, estas UA llevarán en sus bordes elementos de simetría de 2, 3 y 5 veces. Si estos elementos de simetría se generan a partir de dominios de oligomerización de proteínas, dichas UA se construyen a partir de unidades estructurales monoméricas como se describió anteriormente. Es suficiente alinear los dos dominios de oligomerización ND1 y ND2, o ND3 y ND4 a lo largo de dos de los ejes de simetría de la UA. Si estos dos dominios de oligomerización forman oligómeros estables, la interfaz de simetría a lo largo del tercer eje de simetría se generará automáticamente, y puede estabilizarse optimizando las interacciones a lo largo de esta interfaz, p. ej., interacciones hidrófobas, hidrófilas o iónicas, o enlaces covalentes, tales como puentes disulfuro.

35 Tabla 2: Posibles combinaciones de estados de oligomerización en la formación de poliedros regulares

ID No.	m	n	Tipo de poliedro	MCM	No. de unidades pares	No. de unidades estructurales
1	5	2	dodecaedro / icosaedros	10	6	60
2	5	3	dodecaedro / icosaedros	15	4	60
3	4	3	cubo / octaedro	12	2	24
4	3	4	cubo / octaedro	12	2	24
5	3	5	dodecaedro / icosaedros	15	4	60
6	2	5	dodecaedro / icosaedros	10	6	60
7	5	4	Irregular	20	1	20
8	4	5	Irregular	20	1	20

Ensamblaje para nanopartículas proteicas de autoensamblaje (SAPN) con simetría poliédrica regular

Para generar nanopartículas proteicas de autoensamblaje (SAPN) con una geometría regular (dodecaedro, icosaedro, octaedro, cubo), se necesita más de una unidad de MCM. P.ej., para formar un icosaedro a partir de un monómero

que contiene dominios de oligomerización triméricos y pentaméricos, se necesitan 4 unidades de MCM, cada una compuesta por 15 unidades estructurales monoméricas, es decir, la nanopartícula proteica con geometría regular estará compuesta por 60 unidades estructurales monoméricas. Las combinaciones de los estados de oligomerización de los dos dominios de oligomerización necesarios y el número de unidades de MCM para formar los dos poliedros posibles se enumeran en la tabla 2.

Si las unidades de MCM se ensamblarán adicionalmente para formar poliedros regulares compuestos por más de una unidad de MCM, depende del alineamiento geométrico de los dos dominios de oligomerización ND1 y ND2, o ND3 y ND4 entre sí, especialmente en el ángulo entre los ejes de simetría rotacional de los dos dominios de oligomerización.

Esto se rige principalmente por i) las interacciones entre dominios vecinos en una nanopartícula, ii) la longitud del segmento enlazador L, iii) la forma de los dominios de oligomerización individuales. Este ángulo es mayor en las unidades de MCM en comparación con la disposición en un poliedro regular. Además, este ángulo no es idéntico en las unidades estructurales monoméricas en comparación con el poliedro regular. Si este ángulo está restringido a los valores más pequeños del poliedro regular (por medio de interacciones hidrófobas, hidrófilas o iónicas atractivas, o un puente de disulfuro covalente entre los dos dominios de oligomerización) y el segmento enlazador L es lo suficientemente corto, un número dado de unidades de MCM que contienen, cada una, un número definido de unidades estructurales monoméricas hibridarán aún más para formar un poliedro regular (tabla 2), o encerrarán más unidades estructurales monoméricas a partir de nanopartículas que carezcan de la estricta simetría interna de un poliedro.

Si el ángulo entre los dos dominios de oligomerización es suficientemente pequeño (incluso más pequeño que en un poliedro regular con simetría icosaédrica), entonces un gran número (varios cientos) de cadenas proteicas pueden ensamblarse en una nanopartícula proteica. En un diseño de este tipo, las SAPN pueden tener un peso molecular que corresponde a varias veces 60 cadenas proteicas similares a las arquitecturas descritas por la teoría de la cuasi-equivalencia o la teoría del mosaico de las cápsidas virales para las arquitecturas de virus "totalmente pentaméricas".

Preferiblemente, los antígenos que estarán comprendidos en las nanopartículas que contienen flagelina pueden ser epítitos de linfocitos B y/o epítitos de linfocitos T y se seleccionan del grupo que consiste en

(a) proteínas o péptidos adecuados para inducir una respuesta inmunitaria contra células cancerosas;

(b) proteínas, péptidos o carbohidratos adecuados para inducir una respuesta inmunitaria contra enfermedades infecciosas; (c) proteínas o péptidos adecuados para inducir una respuesta inmunitaria contra alérgenos; (d) hormonas proteicas o peptídicas adecuadas para inducir una respuesta inmunitaria para el tratamiento de una enfermedad

humana; y (e) moléculas de haptoenfoque adecuadas para inducir una respuesta inmunitaria para tratar las adicciones u otros trastornos. Las nanopartículas proteicas que comprenden dichas proteínas, fragmentos peptídicos de las mismas, péptidos, carbohidratos o haptoenfoques pueden ser adecuados para inducir una respuesta inmunitaria en seres humanos, o también en animales de granja y mascotas.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a unidades estructurales monoméricas de fórmula (Ia) o (Ib) como se definió anteriormente.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende una nanopartícula proteica como se describe en la presente memoria. Dicha composición es particularmente adecuada como vacuna. Las composiciones de vacuna preferidas comprenden la nanopartícula proteica en una solución tampón acuosa y pueden comprender además, por ejemplo, excipientes derivados de azúcar (tales como glicerol, trehalosa, sacarosa o similares) o

excipientes derivados de aminoácidos (tales como arginina, prolina, glutamato, o similares) o detergentes aniónicos, catiónicos, no iónicos o de zwitteriónicos (tales como colato, desoxicolato, tween o similares) o cualquier tipo de sal (tal como NaCl, MgCl₂ o similares) para ajustar la fuerza iónica de la solución.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de vacunación de un ser humano o animal no humano, que comprende administrar una cantidad eficaz de una nanopartícula proteica como se describió anteriormente en la presente memoria a un sujeto que necesita dicha vacunación.

Diseño de una FLA-SAPN (nanopartícula proteica de autoensamblaje que contiene flagelina)

Un ejemplo particular de una FLA-SAPN según la invención son las siguientes construcciones "FLA-SAPN-1a" y "FLA-SAPN-2".

T81c-WRW-8RRVRA-D0-D1 (FLJB_SALTY)(FLA-SAPN-1a) que corresponde a la fórmula (Ia)

MGHHHHHHASWRWDGGLVPRGSWQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWRDDWARWRA
 LWMGGRLLLRLLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERRLEELERRRIEEI
 ARGMAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANR
 FTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDL
 DSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINS
 QTLGLDSLNHGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAITN
 LGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLR
(SEQ ID NO:4)

T81c-WRW-8RRVRA-T1BT* (FLA-SAPN-2), que corresponde a la fórmula (II)

MGHHHHHHASEYLNIQNSLSTEWPSSVTGSWQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQA
 WRDDWARWRALWMGGRLLLRLLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERRRL
 EELERRRIEEIARGSGDPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANP **(SEQ ID NO:5)**

Dichas construcciones están compuestas por las siguientes estructuras parciales:

X	MGHHHHHHASWRWDGGLVPRGS (SEQ ID NO:6)
ND1	WQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWRDDWARWRALWM (SEQ ID NO:7)
L1	GG
ND2	RLLLRLLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERRLEELERRRIEEIARG (SEQ ID NO:8)
FLA	MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFT ANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDL DSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINS QTLGLDSLNHGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAIT NLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVSL LR (SEQ ID NO:9)
Y	MGHHHHHHASEYLNIQNSLSTEWPSSVTGS (SEQ ID NO:10)
ND3	WQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWRDDWARWRALWM (SEQ ID NO:7)
L2	GG
ND4	RLLLRLLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERRLEELERRRIEEIARG (SEQ ID NO:8)
Z	SGDPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANP (SEQ ID NO:11)

5

Para facilitar la purificación, la FLA-SAPN-1a comienza con la secuencia X como se define en la fórmula (Ia) o (Ib):

MGHHHHHHASWRWDGGLVPRGS (SEQ ID NO:6)

que contiene un marcador His para purificación por afinidad a níquel y en los sitios de restricción a nivel de ADN para una subclonación adicional (Ncol, Nhel, BamHI).

- 10 Para ND1 se eligió un dominio de pentamerización (m=5). La superhélice pentamérica particular es una modificación novedosa del dominio de pentamerización de cremallera de triptófano (Liu J. y otros, Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101(46):16156-61, entrada pdb 1T8Z).

El dominio de pentamerización de cremallera de triptófano original tiene la secuencia

SSNAKWDQWSSDWQTWNNAKWDQWSNDWNAWRSDWQAWKDDWARWNQRWDNWAT (SEQ ID NO:12).

La secuencia de superhélice modificada del dominio de pentamerización usado para FLA-SAPN-1a comienza en la posición 13, termina en la posición 49 y contiene ligeras variaciones de secuencia en el extremo C-terminal (RALWM en lugar de NQRWD) pero manteniendo el patrón de repetición de heptada de los residuos de triptófano como en la secuencia original (SEQ ID NO:12).

- 5 13- WQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWRDDWARWRALWM-4 9 (SEQ ID NO:7).

Esta secuencia se extiende a continuación mediante el enlazador corto L1 (GG) de dos residuos de glicina, a continuación se conecta con el dominio de trimerización ND2 de la siguiente secuencia, que es un trímero de superhélice extremadamente estable:

 RLLLRLLEELERRLEELERFVAATLVRVALERRLEELERRRIEEIARG (SEQ ID NO:8)

- 10 Se ha demostrado que un trímero se forma incluso en condiciones de desnaturización total de una SDS-PAGE (figura 5). También contiene la cadena RFVAATLVRVA de epítopo HTL de unión a pan-DR, que es un derivado de la secuencia PADRE con propensión a superhélice trimérica optimizada.

En la FLA-SAPN-1a, la parte "FLA" de fórmula 1a se compone de los dominios D0 y D1 de la flagelina de *Salmonella typhimurium* (como en la patente US 8,420,102) con la siguiente secuencia

 MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTA
 NIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSI
 QAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTL
 GLDSLNVHGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSIDLGAQVNRFNSAITNLGN
 TVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSSLR

15 (SEQ ID NO:9)

Este diseño da como resultado la siguiente secuencia que se usó para la expresión, la purificación y el análisis biofísico de proteínas:

 MGHHHHHHASWRWDGGLVPRGSWQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWRDDWARWRA
 LWMGGRLLLRLLEELERRLEELERFVAATLVRVALERRLEELERRRIEEI
 ARGMAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANR
 FTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDL
 DSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINS
 QTLGLDSLNVHGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSIDLGAQVNRFNSAITN
 LGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSSLR

(SEQ ID NO:4)

En la figura 1C se muestra un modelo de monómero FLA-SAPN-1a.

- 20 La construcción correspondiente "FLA-SAPN-2" es la siguiente:

Para facilitar la purificación, la FLA-SAPN-2 comienza con la secuencia Y como se define en la fórmula (II)

MGHHHHHHASEYLNKIQNSLSTEWPSSVTGS (SEQ ID NO:10)

que contiene un marcador His para la purificación por afinidad a níquel, la secuencia del epítopo de linfocitos T, T1BT* (Calvo-Calle J.M., Infection and immunity 2006:6929-6939) de la proteína CS de *Plasmodium falciparum*

- 25 EYLNKIQNSLSTEWPSSVT (SEQ ID NO:13)

con una cisteína reemplazada por una serina y en los sitios de restricción a nivel de ADN para una subclonación adicional (Ncol, Nhel, BamHI) y, por lo tanto, es algo diferente de "X" de FLA-SAPN-1a.

ND3 en FLA-SAPN-2 es completamente idéntico a ND1 en FLA-SAPN-1a para garantizar el ensamblaje correcto.

 13- WQTWNNAKWDQWSNDWNAWRSDWQAWKDDWARWRALWM-49 (SEQ ID NO:7).

- 30 Esta secuencia se extiende a continuación mediante el enlace corto L2 (GG) de dos residuos de glicina, que también

es idéntico a FLA-SAPN-1a.

En FLA-SAPN-2, el enlazador se conecta a continuación con el dominio de trimerización ND4 de la siguiente secuencia

RLLLRLLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERRLEELERRRIEEIARG (SEQ ID NO:8)

que es exactamente igual que en FLA-SAPN-1a, por lo tanto, los núcleos ND1-L1-ND2 y ND3-L2-ND4 y de las nanopartículas FLA-SAPN-1a y FLA-SAPN-2 son completamente idénticos y garantizan un coensamblaje adecuado de la cadena de dos proteínas al replegarse.

En el FLA-SAPN-2, la parte "Z" de fórmula (II) está compuesta por la región de repetición de la proteína circumsporozoito (CSP) de *Plasmodium falciparum*, que contiene tres repeticiones de (NANP) y algunas modificaciones de la misma (DPNANPNVDPNANPNV, SEQ ID NO:14) que se producen en la secuencia de la proteína CS nativa y es el epítopo de linfocitos B, al cual se debe generar una respuesta inmunitaria. Está enlazada a la partícula por la secuencia SG:

SGDPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANP (SEQ ID NO:11)

Este diseño da como resultado la siguiente secuencia que se usó para la expresión, la purificación y el análisis biofísico de proteínas:

MGHHHHHASEYLNKIQNSLSTEWSPPSVTGSWQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQA
WRDDWARWRAWMGGRLLLRLLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERRL
EELERRRIEEIARGSGDPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANP (SEQ ID NO:5)

En la figura 1C se muestra un modelo de monómero FLA-SAPN-2.

En la figura 1C se muestra un modelo de una nanopartícula coensamblada a partir de FLA-SAPN-1a y FLA-SAPN-2 a una proporción de 1:59, asumiendo una simetría icosaédrica T=1.

En la figura 4 se muestra una imagen de ME de las proteínas FLA-SAPN-1a y FLA-SAPN-2 coensambladas a una proporción de 48:12.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - 3 Clonación

El ADN que codifica las construcciones de nanopartículas se preparó usando procedimientos estándar de biología molecular. Plásmidos que contienen el ADN que codifica la secuencia proteica LONG-D2-D1-ori

MGHHHHHASWRWDGGLVPRGSWQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQA
LWMGGRLLLRLLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERRLEELERRRIEEI
ARGSGSSARLSDEANNAVKGESKITVNGAEYATANATGDKITLAGKTMFIDKTASG
VSTLINEDAAA
AKKSTANPLASIDSALS
KVD
AVRSSILGAIQNRFDSAIGSRNANDG
ISIAQTTEGALNEINNNLQRVREL
SVQATNGTN
SDSDLKSIQDEI
QQRLEEIDRVS
NQTQFNGVKVLSQDNQM
KIQVGANDGETIT
IDLQKIDV
KSLGDFNVNGP
KEATV
GDLKSSFKNVTGYDTYAAGADKYRVDINSGAV (SEQ ID NO:15)

se construyeron mediante clonación en los sitios de restricción Ncol/EcoRI de la construcción de expresión básica de SAPN de la figura 3.

Para esta construcción no hay una etapa de mezcla/coensamblaje de dos construcciones diferentes. El inmunógeno de la vacuna se generará uniendo covalentemente los epítopos de la vacuna, tales como la nicotina, al portador que ya incorpora el derivado de flagelina, preferentemente a los residuos de lisina.

Esta construcción está compuesta por una cremallera de triptófano de superhélice pentamérica (ND1) enlazada por dos residuos de glicina (GG) a una superhélice (ND2) diseñada de novo trimérica que contiene una cadena de epítopo CD4 de unión a panDR ERFVAAWTLRVRAL (SEQ ID NO:16). En el extremo N contiene un marcador de His y un sitio de escisión de trombina (X). Esta arquitectura del núcleo X - ND1 - L1 - ND2 se describió en detalle anteriormente. En el extremo C, una construcción de flagelina (FLA) compuesta por los dominios D1 y D2 de la flagelina de *Salmonella* de la estructura con código pdb 3V47 (banco de datos de proteínas RCSB) adjunta. Los residuos 348 a 447 que abarcan partes de los dominios D1 y D2 están enlazados a los residuos 24 a 214 que nuevamente abarcan partes de D1 y D2 en la dirección opuesta por medio de un único residuo de glicina. Este diseño une las moléculas de

flagelina D1 y D2 a las nanopartículas de tal manera que el dominio D1 se muestra en la superficie exterior de la nanopartícula y el sitio de unión a TLR5 está expuesto a la superficie de la nanopartícula (figura 2a). En contraste con la figura 2, la superhélice ND2 diseñada de novo es una superhélice trimérica.

Ejemplo 2 - Expresión

- 5 Los plásmidos se transformaron en células de *Escherichia coli* BL21 (DE3), que se cultivaron en caldo Luria con ampicilina a 37°C. La expresión se indujo con isopropil β-D-tiogalactopiranósido. Cuatro horas después de la inducción, las células se retiraron de 37°C y se recogieron mediante centrifugación a 4.000 x g durante 15 min. El sedimento celular se almacenó a -20°C. El sedimento se descongeló en hielo y se suspendió en un tampón de lisis que consistía en urea 9 M, NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM pH 8, imidazol 20 mM y Tris-2-carboxietilfosfina (TCEP) 0,2 mM.
- 10 Alternativamente, también se pueden usar otras líneas celulares para la expresión, tales como células KRX. La expresión de células KRX se puede realizar con el protocolo de autoinducción temprana de células KRX usando el precultivo O/N a 37 grados con Amp (100 µg/ml) y glucosa (0,4%). Diluyendo los precultivos de O/N a 1:100 en el cultivo de expresión que contiene Amp (100 µg/ml), glucosa (0,05%) y ramnosa (0,1%) a 25°C durante 24 horas. El nivel de expresión de la proteína se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y se muestra en la figura 5. La construcción forma monómeros, trímeros y tetrámeros incluso en las condiciones de desnaturalización de la SDS-PAGE.
- 15

Ejemplo 3 - Purificación

- Las células se lisaron por sonicación y el lisado se retiró mediante centrifugación a 30.500 x g durante 45 min. El lisado aclarado se incubó con perlas de agarosa Ni-NTA Agarose Beads (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) durante al menos 20 1 hora. La columna se lavó con tampón de lisis y a continuación un tampón que contenía urea 9 M, NaH₂PO₄ 500 mM, Tris 10 mM, pH 8, imidazol 20 mM y TCEP 0,2 mM. La proteína se eluyó con un gradiente de pH: urea 9 M, NaH₂PO₄ 100 mM, citrato 20 mM, imidazol 20 mM y TCEP 0,2 mM. Los lavados subsiguientes se realizaron a pH 6,3, 5,9 y 4,5. Tras el gradiente de pH, se usó un gradiente de tampón de lisis con aumento de la concentración de imidazol para eluir aún más la proteína. La pureza se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) como se muestra en la figura 5.
- 25

Ejemplo 4 - Replegamiento

- Para el replegamiento, la proteína se tamponó de nuevo en las siguientes condiciones: urea 9 M, Tris 20 mM, pH 8,5, NaCl 50 mM, glicerol al 5%, EDTA 2 mM. Para el replegamiento rápido de una primera criba, se añadieron 4 µl de una solución con una concentración de 1,8 mg/ml a una solución tampón como se indica en la tabla 3, hasta una concentración final de 0,05 mg/ml. La solución se analizó a continuación mediante microscopía electrónica de transmisión de tinción negativa a diferentes resoluciones.
- 30

Tabla 3: Tampones usados para el replegamiento de LONG-D2-D1 (primera criba)

No.	pH	NaCl (mM)	MES (mM)	HEPES (mM)	TRIS (mM)	Glicerol (%)
1	6,5	50	20	-	-	5
2	6,5	150	20	-	-	5
3	7,5	50	-	20	-	5
4	7,5	150	-	20	-	5
5	8,5	50	-	-	20	5
6	8,5	150	-	-	20	5

MES = ácido 2-morfolinoetanosulfónico
 HEPES = ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico
 TRIS = 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

- Si es necesario, se pueden realizar cribas adicionales para optimizar las condiciones de replegamiento con tamaños de muestreo más pequeños del pH y la fuerza iónica. Adicionalmente, se pueden añadir excipientes tales como trehalosa, sacarosa, arginina, prolina u otros, o si es necesario, se pueden añadir detergentes tales como colato, desoxicolato, Tween-80 u otros. Para LONG-D2-D1-ori no fue necesaria una optimización adicional del replegamiento y las condiciones de replegamiento fueron de pH 8,5, NaCl 50 mM, Tris 20 mM, glicerol al 5%. Las imágenes en ME de LONG-D2-D1-ori a diferente resolución después del replegamiento muestran una buena formación de
- 35

nanopartículas (figura 6).

Ejemplo 5 - Ensayo I de activación de la ruta de TLR5

La actividad agonista de LONG-D2-D1-ori sobre el receptor tipo Toll 5 (TLR5) se ensayó usando células TLR5/SEAPorter HEK 293 (IMGENEX, No. de Cat. IML-105) y se evaluó la CE_{50} de LONG-D2-D1-ori activo. La línea

5 celular IML-105 se colocó en placas de 96 pocillos a 5×10^4 células por pocillo durante 16 h. Las células se trataron con diversas concentraciones (entre 0,01 y 1000 ng/ml) de cada muestra de ensayo, control positivo (IMGENEX flagellin, No. de Cat. IMG-2205) o control de vehículo (cada tampón correspondiente) por duplicado durante 24 horas. El medio de cultivo celular de cada pocillo se diluyó a continuación a 1:2 y se transfirió a placas de microtitulación de
10 96 pocillos por duplicado, en las que también se añadieron por duplicado los patrones de fosfatasa alcalina secretada en serie (SEAP). Las placas se incubaron a 65°C durante 30 minutos para inactivar cualquier fosfatasa alcalina endógena. El sustrato de fosfatasa se añadió a continuación a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Las placas se analizaron mediante lectura a 405 nm y se evaluó la actividad de respuesta a la dosis y se preparó una evaluación de CE_{50} (figura 7A).

15 La actividad agonista de TLR5 fue moderadamente alta con un valor de CE_{50} calculado de 12,59 ng/ml en comparación con 0,29 ng/ml de la flagelina de control positivo de *Salmonella typhimurium*.

Ejemplo 6 - Ensayo II de activación de la ruta de TLR5

Compuesto de fórmula (Ia) designado T81c-WRW-8RRVRA-D0-D1 (FLJB_SALTY):

```
MGHHHHHHASWRWDGLVPRGSWQTWNARWDQWSNDWNAWRSRSDWQAWRDDWARWRA
LWMGGRLLLRLEELERRLEELERFVAATLVRVALERRLEELERRRIEEI
ARGMAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANR
FTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDL
DSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINS
QTLGLDSLNVHGAAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAITN
LGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSSLR
(SEQ ID NO:4)
```

Compuesto de fórmula (II) designado T81c-WRW-8RRVRA-T1BT* (FLA-SAPN-2):

```
MGHHHHHHASEYLNKIQNSLSTEWPSSVTGSWQTWNARWDQWSNDWNAWRSRSDWQA
WRDDWARWRAWMGGRLLLRLEELERRLEELERFVAATLVRVALERR
EELERRRIEEIARGSGDPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANP (SEQ ID NO:5)
```

20 Estas dos cadenas coensambladas se describieron en detalle anteriormente. La arquitectura del núcleo ND1 - L1 - ND2, que es la misma tanto en la fórmula (Ia) como en (II), es decir, la misma que ND3 - L2 - ND4, también es la misma que en el ejemplo 1. En la cadena 1 (fórmula Ia) la parte FLA está compuesta por los dominios D0 y D1 de la flagelina pero de una cepa diferente a la del ejemplo 1. Los sustituyentes Y y Z en la cadena 2 son el epítopo de linfocitos T, T1BT* y una secuencia de 28 residuos de la región de repetición NANP de la proteína CS de *Plasmodium falciparum* como epítopo de linfocitos B.

25 La clonación, la expresión, la purificación y el replegamiento de las dos cadenas se realizan esencialmente siguiendo los protocolos descritos en los ejemplos 1, 2, 3 y 4. Las condiciones de replegamiento de estas nanopartículas coensambladas son pH 7,5, NaCl 50 mM, HEPES 20 mM, glicerol al 5%. En la figura 4A se muestra una imagen de ME de las nanopartículas coensambladas.

30 La evaluación de la actividad de respuesta a la dosis como un agonista de TLR5 y una evaluación de CE_{50} se realizaron según el protocolo descrito en el ejemplo 5. La actividad agonista de TLR5 fue muy alta, con un valor de EC_{50} calculado de solo 0,0901 ng/ml en comparación con 0,29 ng/ml de flagelina de control positivo de *Salmonella typhimurium* (figura 7B). Por lo tanto, estas nanopartículas inducen una activación muy fuerte de TLR5, que es aproximadamente tres veces más fuerte que la flagelina nativa, aunque la cadena que contiene flagelina solo está presente en una proporción molar de 12:48. La curva de respuesta a la dosis parece ser una curva en forma de campana, por lo tanto, a mayor concentración de flagelina, la respuesta inmunitaria es decreciente. La concentración óptima es de aproximadamente 50 ng/ml.

Ejemplo 7 - Ensayo III de activación de la ruta de TLR5

Compuesto de fórmula (Ia) designado PD52-2i88-PANDORA-D2-D1-ori:

```
MGHHHHHASGSWEKWNKDEWKNDWWDWRDWQAWVDDWAYWTLTWKYGELYSK
LAEELERRNEELERRLEELARFVAALSMRLAEELERRNEELARGSGSSARLSDEANN
AVRGESKITVNGAEYTANATGDRITLAGRTMFIDRTASGVSTLINEEDAAAARRSTA
NPLASIDSALSRVDAVRSSLGAIQNRFDSAIGSKNANDGISIAQTTEGALNEINNN
LQRVRELSVQATNGTNSDLRSIQDEIQQRLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQM
KIQVGAKDGETITIDLQKIDVKSLGLDFNVNGPREATVGDLRSSFRNVTGYDTYA
AGADRYRVDINSGAV (SEQ ID NO:17)
```

Compuesto de fórmula (II) designado PD52-2i88-PANDORA-Noro:

```
MGHHHHHASGSWEKWNKDEWKNDWWDWRDWQAWVDDWAYWTLTWKYGELYSK
LAEELERRNEELERRLEELARFVAALSMRLAEELERRNEELARGSGSTVEQKTRPFTL
PNLPLSSLSNSRAPLISSMGISPNDVQSVQFQNGRCTLDGRLVGTTPVSLSHVAK
IRGTSNGTVINLTLDGTPHPFEGPAPIGFDPDLGGCDWHINMTQFGHSSQTQYDV
DTTPDTFVPHLGSIQANGIGSGNYGVVLWISPPSHPSGSQVDLWKPONYGSSITE
ATHLAPSVPFGFGEVLVFFMSKMPGPGAYNLPCLLPQEYISHLASEQAPTVGEAA
LLHYVDPDTGRNLGEFKAYPDGFLTCVPGASSGPQQLPINGVFVFVSWVSRFYQL
5 KPVGTAS (SEQ ID NO:18)
```

Estas dos cadenas coensambladas PD52-2i88-PANDORA-D2-D1-ori y PD52-2i88-PANDORA-Noro tienen la misma arquitectura central tanto en la fórmula (Ia) como en la fórmula (II), es decir, ND1 - L1 - ND2 es igual que ND3 - L2 - ND4. En PD52-2i88-PANDORA-D2-D1-ori (fórmula Ia), la parte FLA está compuesta por los dominios D2 y D1 de la flagelina. El dominio de oligomerización ND2 (o ND4, respectivamente) está diseñado para formar una superhélice dimérica. Esto es importante porque tanto el epítopo de linfocitos B (Z) como la forma de flagelina (FLA) son proteínas diméricas. La proporción de coensamblaje es 5:55.

Los sustituyentes Y y Z en PD52-2i88-PANDORA-Noro (fórmula II) son un marcador de His y una secuencia larga de 298 residuos de la proteína P de norovirus enlazada a ND4 por el enlazador GSGS, respectivamente. Esta secuencia corresponde al subdominio P2 del norovirus Hu/1968/US (Jiang X. y otros, Virology 1993; 195(1):51-61) con el correspondiente código de entrada pdb 1IHM para la estructura cristalina a los rayos X. Contiene los residuos 223 a 520 que son el dominio P (que carecen de los 10 residuos C-terminales 521-530 porque estos 10 residuos están desordenados en la estructura cristalina a los rayos X y porque están muy cargados positivamente) más 3 aminoácidos del extremo C-terminal del dominio S según la nomenclatura presentada por Prasad B.V.V. y otros, Science 1999; 286:287-290. El residuo treonina 223 se eligió cuidadosamente mediante programas de visualización por ordenador para ser el punto de unión a noro-SAPN porque es el contacto más cercano entre las cadenas a través del eje de 2 veces en la estructura cristalina de la cápsida viral.

La clonación, la expresión, la purificación y el replegamiento de las dos cadenas se realizan esencialmente siguiendo los protocolos descritos en los ejemplos 1, 2, 3 y 4. Las condiciones de replegamiento de estas nanopartículas coensambladas son pH 6,8, NaCl 80 mM, MES 20 mM, glicerol al 5%. En la figura 4C se muestra una imagen de ME de las nanopartículas coensambladas (proporción 5:55). Una evaluación de la actividad de respuesta a la dosis como un agonista de TLR5 y una evaluación de CE_{50} se realizaron según el protocolo descrito en el ejemplo 5. La actividad agonista de TLR5 fue moderadamente alta con un valor de CE_{50} calculado de 17,66 ng/ml en comparación con 0,29 ng/ml de la flagelina de control positivo de *Salmonella typhimurium* (figura 7C).

Ejemplo 8 - Inmunogenicidad I

Compuesto de fórmula (Ia) designado T81c-8-D0-D1 (Eurogentec 0):

```
MGHHHHHHASWKWDGLVPRGSWQTWNNAKWDQWSNDWNAWRSWDQAWKDDWARWRA
LWMGGRLLLRLEELERRLEELAKFVAAWTLKAAAVDLELAALRRRLEELARGNTNS
LSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTANIKGLTQAS
RNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQAEITQRLN
EIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLDGENPL
QKIDAALAQVDTLRSIDLGAQNRNFNSAITNLGNTVNNLTSVRSRIEDSDYATEVSN
MSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQN (SEQ ID NO:19)
```

Compuesto de fórmula (II) designado T81c-8-Pf:

```
MGHHHHHHASWKWDGLVPRGSWQTWNNAKWDQWSNDWNAWRSWDQAWKDDWARLRA
LLMGGRLLLRLEELERRLEELAKFVAAWTLKAAAVDLELAALRRRLEELARGGSGA
NANPNANPNANPNANP (SEQ ID NO:20)
```

Estas dos cadenas coensambladas son similares a las descritas en el ejemplo 6. No hay un epítopo de linfocitos T, T1BT * en Y, y el epítopo de linfocitos B de la región de repetición de la proteína CS de *Plasmodium falciparum* en Z tiene solo 16 residuos de longitud. La superhélice trimérica (ND2 y ND4) contiene el epítopo de unión a panDR, PADRE. En la cadena 1 (fórmula Ia), la parte FLA está compuesta por los dominios D0 (residuos 6 a 171) y D1 (residuos 229 a 312) de flagelina pero de la variante de dominio medio de la fase I C150 de *Salmonella enterica* subsp. *enterica serovariedad Typhimurium*, que es de nuevo una cepa diferente a la de los ejemplos 1 y 6. D0 y D1 están conectados por dos residuos de glicina.

La clonación, la expresión, la purificación y el replegamiento de las dos cadenas se realizan esencialmente siguiendo los protocolos descritos en los ejemplos 1, 2, 3 y 4. Las condiciones de replegamiento de este tipo de nanopartículas coensambladas son pH 8,5, NaCl 50 mM, Tris 20 mM, glicerol al 5%. En la figura 4B se muestra una imagen de ME de las nanopartículas coensambladas a una proporción de 3:57. Se inmunizaron i.p. grupos de siete ratones C57Bl/6 con 10 µg o 1 µg en tres inyecciones con dos semanas de diferencia. Los inmunógenos fueron T81c-8-Pf (fórmula II) solo o el coensamblaje de T81c-8-D0-D1 (fórmula Ia) y T81c-8-Pf (fórmula II) en dos proporciones de coensamblaje diferentes de 3:57 y 9:51. En otras palabras - asumiendo la simetría T1-icosáédrica de las nanopartículas - hubo tres inmunógenos diferentes que contenían cero o tres o nueve moléculas D0-D1 por nanopartícula. El título de anticuerpos después de la tercera inyección se determinó mediante ELISA y se muestra en la figura 8A. Parece que hay una saturación de la respuesta inmunitaria, con 1 µg en una proporción de coensamblaje de 3:57 (que corresponde a un total de aproximadamente 20 ng de flagelina) aumentando el título de anticuerpos en un factor de aproximadamente nueve en comparación con la nanopartícula sin dominios D0-D1. De hecho, la dosis más alta de 10 µg en una proporción de coensamblaje de 9:51 (que corresponde a un total de aproximadamente 2 µg de flagelina) reduce la respuesta inmunitaria en comparación con la nanopartícula sin dominios D0-D1.

Ejemplo 9 - Inmunogenicidad II

Compuesto de fórmula (Ia) designado DIM-D0-D1 (Eurogentec 1):

```
MGHHHHHHASGSWEENARWDEWENDWREDWQAWRDDWARWRATWMGGRLLSR
LERLERRNEELRRLLQLLRNRLERLAQFVRALSMQNAELERRLEELARGMAQVINT
NSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTANIKGLTQ
ASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQAEITQ
LNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLDSLNV
HGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSIDLGAQNRNFNSAITNLGNTVNNLSE
ARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSSLR
(SEQ ID NO:21)
```

Compuesto de fórmula (II) designado DIM-D2-D1-tip3_NIC-pept:

```
MGHHHHHASGSWEENARDEWENDWNWREDWQAWRDDWARWRATWMGGRLLSR
LERLERRNEELRRLLQLLRNRLERLAQFVRALSMQNAELERRLEELARGSGSSARL
SDLEANNAVRGESKITVNGAEYTANATGDRITLAGRTMFIDRTASGVSTLINEADA
AARRSTANPLASIDSALSRVDAVRSSLGAIQNRFDSAKAKKKDGKDDKDSKNANDG
ISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLRSIQDEIQQRLEEIDRVS
NQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGAKDGETITIDLQKIDVKSLGLDFNVNGPREATV
GDLRSSFRNVTGYDTYAAGADRYRVDINSGAV (SEQ ID NO:22)
```

Según el ejemplo 5 y el ejemplo 6, el derivado de flagelina parece ser más inmunógeno en su forma D0-D1 que en su forma D2-D1. Por lo tanto, la forma D0-D1 se puede usar como agonista de TLR5 para aumentar la inmunogenicidad de un inmunógeno que porta la forma de flagelina D2-D1. Por tanto, en este ejemplo la secuencia D0-D1

5 MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTA
NIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSNTNSQSDLDSI
QAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTL
GLDSLNVHGAPVPDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSIDLGAQVNRFNSAITNLGN
TVNNLSEARSRIEDSDYATEVSMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR
(SEQ ID NO:23)

corresponde a "FLA" en la fórmula (Ia), mientras que la secuencia D2-D1-tip3

```
SARLSDLEANNAVRGESKITVNGAEYTANATGDRITLAGRTMFIDRTASGVSTLIN
EDAAAARRSTANPLASIDSALSRVDAVRSSLGAIQNRFDSAKAKKKDGKDDKDSKN
ANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLRSIQDEIQQRLEEI
DRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGAKDGETITIDLQKIDVKSLGLDFNVNGPR
EATVGDLRSSFRNVTGYDTYAAGADRYRVDINSGAV (SEQ ID NO:24)
```

10 corresponde a "Z" en la fórmula (II). Esta secuencia "Z" en D2-D1-tip3 es una modificación de la flagelina en la que el dominio D2 se combina con el dominio D1 de la flagelina como se describió anteriormente. Además, el armazón proteico de D2-D1-tip3 se usa como portador para la presentación del antígeno nicotina. Para permitir el acoplamiento covalente de la nicotina activada al armazón proteico, las cadenas laterales de lisina que no están expuestas en la superficie se mutan a argininas, mientras que las argininas que están expuestas en la superficie se mutan a lisinas. Tras la unión covalente de la nicotina activada a las aminas primarias de la secuencia proteica, la nicotina se presenta 15 a continuación en la superficie de la nanopartícula. Además, para presentar las moléculas de nicotina en la superficie más externa de las nanopartículas, la proteína D2-D1 porta la denominada secuencia "tip3" KAKKKDGKDDKD (SEQ ID NO:25) en la parte más expuesta de la molécula (figura 2A) que contiene una alta densidad de lisinas, por tanto, el acoplamiento covalente de nicotina a las cadenas laterales de lisina proporcionará una presentación de alta densidad de moléculas de nicotina en la superficie de la nanopartícula.

20 Los núcleos de DIM-D0-D1 y DIM-D2-D1-tip3_NIC-pept (es decir, ND1-L1-ND2 y ND3-L2-ND4) son idénticos y, en particular, los dominios de oligomerización ND2 y ND4, respectivamente, están diseñados para formar superhélices diméricas. Esto permite presentar la molécula de flagelina (en cualquiera de sus formas) como un dímero, lista para interactuar con el receptor TL5 dimérico (figura 2B).

25 La clonación, la expresión, la purificación y el replegamiento de las dos cadenas se realizan esencialmente siguiendo los protocolos descritos en los ejemplos 1, 2, 3 y 4. Las condiciones de replegamiento de este tipo de nanopartículas coensambladas son pH 7,0, NaCl 50 mM, HEPES 20 mM, glicerol al 5%. En la figura 4D se muestra una imagen de ME de las nanopartículas coensambladas a una proporción de 5:55.

30 Se inmunizaron i.p. grupos de siete ratones C57Bl/6 con 10 µg en tres inyecciones con dos semanas de diferencia. Los inmunógenos fueron el coensamblaje de DIM-D0-D1 (fórmula Ia) y DIM-D2-D1-tip3_NIC-pept (fórmula II) en la proporción de coensamblaje de 5:55 o el portador estándar KLH (hemocianina de lapa californiana) a la que se unió la misma molécula de nicotina activada. KLH es una metaloproteína grande, multisubunidad, portadora de oxígeno, que se encuentra en la hemolinfa de la lapa californiana gigante y se usa con frecuencia como portador de antígenos

en experimentos de inmunización. El título de anticuerpos después de la tercera inyección se determinó mediante ELISA y se muestra en la figura 8B. El título de anticuerpos de este tipo de inmunógeno de nanopartícula con el agonista TLR5 aumenta significativamente en comparación con el título del portador estándar KLH que presenta el mismo antígeno (nicotina) en su superficie.

5 **Ejemplo 10 - Inmunogenicidad III**

Compuesto de fórmula (la) designado DEDDL:

```

MGDKHHHHHKDGSDKGSWEENARWDEWENDWNDWREDWQAWRDDWARWRATWMG
GRLLSRLERLERNEELRRLLQLLRNRLERLAQFVRALSMQNAELEERRLEELARGM
AQVINTNSLSLLTQNNLNRSQSALGTAIERLSSGLRINSARDDAAGQAIANRFTAN
IRGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQ
AEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVRVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLQINSQTLG
LDQLNVQQKYKDGDKGDDKTENPLQRIDAALAQVDALRSQDLGAVQNRFNSAITNLG
NTVNNILEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSSLR
(SEQ ID NO:26)

```

Esta cadena proteica de nanopartícula contiene como "FLA" un dominio D0-D1 modificado de la variante del dominio medio de flagelina de fase I C150 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovariiedad *Typhimurium*, como en el ejemplo 8. Todos los residuos de lisina dentro de esta secuencia se reemplazan por arginina. Los dominios D0 y D1 están conectados por la secuencia de aminoácidos KYKDGDKGDDK (SEQ ID NO:1), que contiene cuatro lisinas como sitios de acoplamiento para la unión covalente de moléculas.

La superhélice trimérica (ND2) contiene la secuencia de unión a panDR ELRRLLQLLRNRLERLAQFVRALSMQNA (SEQ ID NO:27). El sustituyente "X" contiene un marcador de his de seis aminoácidos y tres residuos de lisina distribuidos de manera aproximadamente uniforme por toda la secuencia para la unión covalente de las moléculas. Además, el extremo N es adecuado para la unión covalente, por ejemplo, mediante la química del éster de N-hidroxisuccinimida (NHS).

La clonación, la expresión y la purificación de la cadena proteica se realizan esencialmente siguiendo los protocolos descritos en los ejemplos 1, 2 y 3.

20 Antes del intercambio de tampón para la reacción de acoplamiento, las fracciones de elución combinadas provenientes de la purificación por afinidad se incubaron con EDTA 5 mM al menos durante una hora para quitar cualquier posible ion níquel lixiviado. A continuación, el tampón se intercambió usando una columna de desalinización HiPrep 26/10. La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna del siguiente tampón de acoplamiento: clorhidrato de guanidio 6 M, NaCl 150 mM, HEPES 20 mM pH 7.2, seguido de la unión de la muestra a la columna. La etapa de elución se realizó con 2 volúmenes de columna de tampón de acoplamiento.

25 El acoplamiento de NHS-nicotina (éster N-hidroxisuccinimídico del ácido nicotínico) se realizó en una proporción molar de 1:50 (DEDDL: NHS-nicotina) con 11,1 mg de proteína (volumen de 2,5 ml) correspondiente a 0,24 µmol de proteína. La NHS-nicotina (5 mg) se disolvió en 150 µl de DMSO al 100% correspondiente a 12,8 µmol. Para un exceso molar de 50 veces de NHS-nicotina, se añadieron a la proteína 141 µl de esta solución de NHS-nicotina correspondiente a 12 µmol. La reacción de acoplamiento se incubó durante 3 horas en la oscuridad (cubierta con papel de aluminio) y agitándose con un agitador magnético.

30 En una siguiente etapa de intercambio de tampón para deshacerse de la nicotina NHS no acoplada y para el intercambio de tampón con el tampón de pre-replegamiento, se usó una columna pre-rellenada G-25 de PD minitrap para retamponar en las siguientes condiciones: urea 8 M, Tris 20 mM pH 8,5, NaCl 150 mM y trehalosa al 10%.

35 El replegamiento de la cadena proteica fue esencialmente siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 4. En particular, se añadieron gota a gota 8 mg de proteína Nic-DEDDL acoplada (proteína DEDDL acoplada a nicotina, 2,4 ml de solución proteica de 3,35 mg/ml) a 158,4 ml de tampón de replegamiento (HEPES 20 mM, pH 7,0, NaCl 150 mM, trehalosa al 10%) mientras se agitaba. La concentración final de proteína deseada fue de 0,05 mg/ml. La reacción de replegamiento se realizó durante un tiempo total de 10 minutos. Las nanopartículas de Nic-DEDDL replegadas se muestran en la figura 9.

40 Se inmuniñaron s.c. grupos de tres ratones C57Bl/6 con 10 µg de Nic-DEDDL o 10 µg de Nic-KLH (nicotina acoplada a hemocianina de lapa californiana) como control positivo en tres inyecciones cada una con una semana de diferencia. El título de anticuerpos en el día 0 (es decir, antes de la primera inyección) y luego una semana después de cada inyección (día 7, 14 y 21) se determinó mediante ELISA y se muestra en la figura 10. Estos experimentos revelan que Nic-DEDDL es altamente inmunógeno con una inducción de anticuerpos >30 veces mejor en comparación con Nic

KLH. Los valores máximos después de solo 3 inmunizaciones se encuentran en títulos cercanos a 163840.

Lista de secuencias

<110> Alpha-O Peptides AG

<120> Nanopartículas proteicas que contienen flagelina como plataforma de vacunas

5 <130> P3091PC00

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 1

Lys	Tyr	Lys	Asp	Gly	Asp	Lys	Gly	Asp	Asp	Lys
1				5						10

15

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 2

Lys	Leu	Lys	Leu	Leu	Leu	Leu	Lys	Leu	Lys
1				5					10

25 <210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

30 <400> 3

Gly	Tyr	Ile	Pro	Glu	Ala	Pro	Arg	Asp	Gly	Gln	Ala	Tyr	Val	Arg	Lys
1				5					10						15

Asp	Gly	Glu	Trp	Val	Leu	Leu	Ser	Thr	Phe	Leu
				20						25

<210> 4

<211> 392

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 4

ES 2 705 588 T3

Met Gly His His His His Ala Ser Trp Arg Trp Asp Gly Gly
1 5 10 15

Leu Val Pro Arg Gly Ser Trp Gln Thr Trp Asn Ala Arg Trp Asp Gln
20 25 30

Trp Ser Asn Asp Trp Asn Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Arg
35 40 45

Asp Asp Trp Ala Arg Trp Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu
50 55 60

Leu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg
65 70 75 80

Leu Glu Glu Leu Glu Arg Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Arg Val Arg
85 90 95

Ala Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Ile Glu Glu Ile
100 105 110

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

Thr Gln Asn Asn Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile
130 135 140

Glu Arg Leu Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala
145 150 155 160

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

Thr Gln Ala Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr
180 185 190

Thr Glu Gly Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg
195 200 205

Glu Leu Ala Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu
210 215 220

Asp Ser Ile Gln Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg
225 230 235 240

ES 2 705 588 T3

Val Ser Gly Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp
245 250 255

Asn Thr Leu Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp
260 265 270

Ile Asp Leu Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Ser Leu
275 280 285

Asn Val His Gly Ala Pro Val Asp Pro Ala Ser Pro Trp Thr Glu Asn
290 295 300

Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Ala Leu Arg
305 310 315 320

Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn
325 330 335

Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Ser Glu Ala Arg Ser Arg Ile Glu
340 345 350

Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile
355 360 365

Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro
370 375 380

Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg
385 390

<210> 5

<211> 155

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 5

Met Gly His His His His His Ala Ser Glu Tyr Leu Asn Lys Ile
1 5 10 15

Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Ser Ser Val Thr Gly Ser
20 25 30

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Arg Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn
35 40 45

ES 2 705 588 T3

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Arg Asp Asp Trp Ala Arg Trp
50 55 60

Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu
65 70 75 80

Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg
85 90 95

Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Arg Val Arg Ala Leu Glu Arg Arg Leu
100 105 110

Glu Glu Leu Glu Arg Arg Ile Glu Glu Ile Ala Arg Gly Ser Gly Asp
115 120 125

Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asn
130 135 140

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro
145 150 155

<210> 6

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 6

Met Gly His His His His His Ala Ser Trp Arg Trp Asp Gly Gly
1 5 10 15

Leu Val Pro Arg Gly Ser
20

10 <210> 7

<211> 37

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 7

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Arg Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn
1 5 10 15

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Arg Asp Asp Trp Ala Arg Trp
20 25 30

Arg Ala Leu Trp Met
35

20 <210> 8

<211> 54

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

ES 2 705 588 T3

<400> 8

Arg Leu Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu
1 5 10 15

Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu
20 25 30

Arg Val Arg Ala Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Ile
35 40 45

Glu Glu Ile Ala Arg Gly
50

<210> 9

<211> 277

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 9

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

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

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

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

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

Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala

10

ES 2 705 588 T3

	85	90	95
	Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile		
	100	105	110
	Gln Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly		
	115	120	125
	Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu		
	130	135	140
	Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu		
	145	150	155
	Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Ser Leu Asn Val His		
	165	170	175
	Gly Ala Pro Val Asp Pro Ala Ser Pro Trp Thr Glu Asn Pro Leu Gln		
	180	185	190
	Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Ala Leu Arg Ser Asp Leu		
	195	200	205
	Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn		
	210	215	220
	Thr Val Asn Asn Leu Ser Glu Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp		
	225	230	235
	Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln		
	245	250	255
	Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val		
	260	265	270
	Leu Ser Leu Leu Arg		
	275		
	<210> 10		
	<211> 32		
	<212> PRT		
5	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 10		
	Met Gly His His His His His Ala Ser Glu Tyr Leu Asn Lys Ile		
	1	5	10
10			
	15		
	Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Ser Ser Val Thr Gly Ser		
	20	25	30
	<210> 11		
	<211> 30		
	<212> PRT		
15	<213> Secuencia artificial		

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 11

Ser	Gly	Asp	Pro	Asn	Ala	Asn	Pro	Asn	Val	Asp	Pro	Asn	Ala	Asn	Pro
1					5					10					15

Asn	Val	Asn	Ala	Asn	Pro	Asn	Ala	Asn	Pro	Asn	Ala	Asn	Pro	
					20					25				30

5 <210> 12

<211> 53

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 12

Ser	Ser	Asn	Ala	Lys	Trp	Asp	Gln	Trp	Ser	Ser	Asp	Trp	Gln	Thr	Trp
1				5					10					15	

Asn	Ala	Lys	Trp	Asp	Gln	Trp	Ser	Asn	Asp	Trp	Asn	Ala	Trp	Arg	Ser
		20						25					30		

Asp	Trp	Gln	Ala	Trp	Lys	Asp	Asp	Trp	Ala	Arg	Trp	Asn	Gln	Arg	Trp
		35			40					45					

Asp	Asn	Trp	Ala	Thr
		50		

<210> 13

<211> 20

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 13

Glu	Tyr	Leu	Asn	Lys	Ile	Gln	Asn	Ser	Leu	Ser	Thr	Glu	Trp	Ser	Pro
20				1		5			10					15	

Ser	Ser	Val	Thr
		20	

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 14

Asp	Pro	Asn	Ala	Asn	Pro	Asn	Val	Asp	Pro	Asn	Ala	Asn	Pro	Asn	Val
					1		5			10				15	

30 <210> 15

<211> 368

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 705 588 T3

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 15

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

ES 2 705 588 T3

Thr Ala Asn Ala Thr Gly Asp Lys Ile Thr Leu Ala Gly Lys Thr Met			
145	150	155	160
Phe Ile Asp Lys Thr Ala Ser Gly Val Ser Thr Leu Ile Asn Glu Asp			
165	170	175	
Ala Ala Ala Ala Lys Lys Ser Thr Ala Asn Pro Leu Ala Ser Ile Asp			
180	185	190	
Ser Ala Leu Ser Lys Val Asp Ala Val Arg Ser Ser Leu Gly Ala Ile			
195	200	205	
Gln Asn Arg Phe Asp Ser Ala Ile Gly Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly			
210	215	220	
Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn			
225	230	235	240
Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ser Val Gln Ala Thr Asn Gly Thr			
245	250	255	
Asn Ser Asp Ser Asp Leu Lys Ser Ile Gln Asp Glu Ile Gln Gln Arg			
260	265	270	
Leu Glu Glu Ile Asp Arg Val Ser Asn Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val			
275	280	285	
Lys Val Leu Ser Gln Asp Asn Gln Met Lys Ile Gln Val Gly Ala Asn			
290	295	300	
Asp Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asp Leu Gln Lys Ile Asp Val Lys Ser			
305	310	315	320
Leu Gly Leu Asp Gly Phe Asn Val Asn Gly Pro Lys Glu Ala Thr Val			
325	330	335	
Gly Asp Leu Lys Ser Ser Phe Lys Asn Val Thr Gly Tyr Asp Thr Tyr			
340	345	350	
Ala Ala Gly Ala Asp Lys Tyr Arg Val Asp Ile Asn Ser Gly Ala Val			
355	360	365	

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 16

Glu Arg Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Arg Val Arg Ala Leu		
1	5	10

10 <210> 17

<211> 351

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 705 588 T3

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 17

Met Gly His His His His Ala Ser Gly Ser Trp Glu Lys Trp
1 5 10 15

Asn Ala Lys Trp Asp Glu Trp Lys Asn Asp Trp Asn Asp Trp Arg Arg
20 25 30

Asp Trp Gln Ala Trp Val Asp Asp Trp Ala Tyr Trp Thr Leu Thr Trp
35 40 45

Lys Tyr Gly Glu Leu Tyr Ser Lys Leu Ala Glu Leu Glu Arg Arg Asn
50 55 60

Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Phe Val Ala Ala
65 70 75 80

Leu Ser Met Arg Leu Ala Glu Leu Glu Arg Arg Asn Glu Glu Leu Ala
85 90 95

Arg Gly Ser Gly Ser Ser Ala Arg Leu Ser Asp Leu Glu Ala Asn Asn
100 105 110

Ala Val Arg Gly Glu Ser Lys Ile Thr Val Asn Gly Ala Glu Tyr Thr
115 120 125

Ala Asn Ala Thr Gly Asp Arg Ile Thr Leu Ala Gly Arg Thr Met Phe
130 135 140

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

Ala Ala Ala Arg Arg Ser Thr Ala Asn Pro Leu Ala Ser Ile Asp Ser
165 170 175

ES 2 705 588 T3

Ala Leu Ser Arg Val Asp Ala Val Arg Ser Ser Leu Gly Ala Ile Gln
180 185 190

Asn Arg Phe Asp Ser Ala Ile Gly Ser Lys Asn Ala Asn Asp Gly Ile
195 200 205

Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn
210 215 220

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

Ser Asp Ser Asp Leu Arg Ser Ile Gln Asp Glu Ile Gln Gln Arg Leu
245 250 255

Glu Glu Ile Asp Arg Val Ser Asn Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys
260 265 270

Val Leu Ser Gln Asp Asn Gln Met Lys Ile Gln Val Gly Ala Lys Asp
275 280 285

Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asp Leu Gln Lys Ile Asp Val Lys Ser Leu
290 295 300

Gly Leu Asp Gly Phe Asn Val Asn Gly Pro Arg Glu Ala Thr Val Gly
305 310 315 320

Asp Leu Arg Ser Ser Phe Arg Asn Val Thr Gly Tyr Asp Thr Tyr Ala
325 330 335

Ala Gly Ala Asp Arg Tyr Arg Val Asp Ile Asn Ser Gly Ala Val
340 345 350

<210> 18

<211> 399

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 18

Met Gly His His His His His Ala Ser Gly Ser Trp Glu Lys Trp
1 5 10 15

Asn Ala Lys Trp Asp Glu Trp Lys Asn Asp Trp Asn Asp Trp Arg Arg
20 25 30

Asp Trp Gln Ala Trp Val Asp Asp Trp Ala Tyr Trp Thr Leu Thr Trp

ES 2 705 588 T3

35

40

45

Lys Tyr Gly Glu Leu Tyr Ser Lys Leu Ala Glu Leu Glu Arg Arg Asn
 50 55 60

Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Phe Val Ala Ala
 65 70 75 80

Leu Ser Met Arg Leu Ala Glu Leu Glu Arg Arg Asn Glu Glu Leu Ala
 85 90 95

Arg Gly Ser Gly Ser Thr Val Glu Gln Lys Thr Arg Pro Phe Thr Leu
 100 105 110

Pro Asn Leu Pro Leu Ser Ser Leu Ser Asn Ser Arg Ala Pro Leu Pro
 115 120 125

Ile Ser Ser Met Gly Ile Ser Pro Asp Asn Val Gln Ser Val Gln Phe
 130 135 140

Gln Asn Gly Arg Cys Thr Leu Asp Gly Arg Leu Val Gly Thr Thr Pro
 145 150 155 160

Val Ser Leu Ser His Val Ala Lys Ile Arg Gly Thr Ser Asn Gly Thr
 165 170 175

Val Ile Asn Leu Thr Glu Leu Asp Gly Thr Pro Phe His Pro Phe Glu
 180 185 190

Gly Pro Ala Pro Ile Gly Phe Pro Asp Leu Gly Gly Cys Asp Trp His
 195 200 205

Ile Asn Met Thr Gln Phe Gly His Ser Ser Gln Thr Gln Tyr Asp Val
 210 215 220

Asp Thr Thr Pro Asp Thr Phe Val Pro His Leu Gly Ser Ile Gln Ala
 225 230 235 240

Asn Gly Ile Gly Ser Gly Asn Tyr Val Gly Val Leu Ser Trp Ile Ser
 245 250 255

Pro Pro Ser His Pro Ser Gly Ser Gln Val Asp Leu Trp Lys Ile Pro
 260 265 270

Asn Tyr Gly Ser Ser Ile Thr Glu Ala Thr His Leu Ala Pro Ser Val
 275 280 285

ES 2 705 588 T3

Tyr Pro Pro Gly Phe Gly Glu Val Leu Val Phe Phe Met Ser Lys Met
290 295 300

Pro Gly Pro Gly Ala Tyr Asn Leu Pro Cys Leu Leu Pro Gln Glu Tyr
305 310 315 320

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

Leu Leu His Tyr Val Asp Pro Asp Thr Gly Arg Asn Leu Gly Glu Phe
340 345 350

Lys Ala Tyr Pro Asp Gly Phe Leu Thr Cys Val Pro Asn Gly Ala Ser
355 360 365

Ser Gly Pro Gln Gln Leu Pro Ile Asn Gly Val Phe Val Phe Val Ser
370 375 380

Trp Val Ser Arg Phe Tyr Gln Leu Lys Pro Val Gly Thr Ala Ser
385 390 395

<210> 19

<211> 360

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 19

Met Gly His His His His His Ala Ser Trp Lys Trp Asp Gly Gly
1 5 10 15

Leu Val Pro Arg Gly Ser Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln
20 25 30

Trp Ser Asn Asp Trp Asn Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys
35 40 45

Asp Asp Trp Ala Arg Trp Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu
50 55 60

Leu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Lys Phe
65 70 75 80

Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Asp Leu Glu Leu Ala
85 90 95

Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Gly Asn Thr Asn Ser

ES 2 705 588 T3

100	105	110
Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu		
115	120	125
Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala		
130	135	140
Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn		
145	150	155
Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser		
165	170	175
Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu		
180	185	190
Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser		
195	200	205
Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn		
210	215	220
Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val		
225	230	235
240		
Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly		
245	250	255
Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly		
260	265	270
Leu Asp Gly Gly Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala		
275	280	285
Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe		
290	295	300
Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser		
305	310	315
320		
Val Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn		
325	330	335
Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala		
340	345	350
Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn		
	355	360

- 5 <210> 20
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética

ES 2 705 588 T3

<400> 20

Met Gly His His His His His Ala Ser Trp Lys Trp Asp Gly Gly
1 5 10 15

Leu Val Pro Arg Gly Ser Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln
20 25 30

Trp Ser Asn Asp Trp Asn Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys
35 40 45

Asp Asp Trp Ala Arg Leu Arg Ala Leu Leu Met Gly Gly Arg Leu Leu
50 55 60

Leu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Lys Phe
65 70 75 80

Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Asp Leu Glu Leu Ala
85 90 95

Ala Leu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Gly Gly Ser Gly Ala
100 105 110

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro
115 120 125

<210> 21

<211> 382

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 21

Met Gly His His His His His Ala Ser Gly Ser Trp Glu Glu Trp
1 5 10 15

10 Asn Ala Arg Trp Asp Glu Trp Glu Asn Asp Trp Asn Asp Trp Arg Glu
20 25 30

ES 2 705 588 T3

Asp Trp Gln Ala Trp Arg Asp Asp Trp Ala Arg Trp Arg Ala Thr Trp
35 40 45

Met Gly Gly Arg Leu Leu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Arg Arg Asn
50 55 60

Glu Glu Leu Arg Arg Leu Leu Gln Leu Leu Arg Asn Arg Leu Glu Arg
65 70 75 80

Leu Ala Gln Phe Val Arg Ala Leu Ser Met Gln Asn Ala Glu Leu Glu
85 90 95

Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Gly Met Ala Gln Val Ile Asn Thr
100 105 110

Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn Leu Asn Lys Ser Gln Ser
115 120 125

Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn
130 135 140

Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr
145 150 155 160

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

Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn
180 185 190

Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr
195 200 205

Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln Ala Glu Ile Thr Gln Arg
210 215 220

Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val
225 230 235 240

Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn
245 250 255

Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr
260 265 270

Leu Gly Leu Asp Ser Leu Asn Val His Gly Ala Pro Val Asp Pro Ala
275 280 285

ES 2 705 588 T3

Ser Pro Trp Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala
290 295 300

Gln Val Asp Ala Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe
305 310 315 320

Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Ser Glu
325 330 335

Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn
340 345 350

Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala
355 360 365

Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg
370 375 380

<210> 22

<211> 368

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 22

Met Gly His His His His His Ala Ser Gly Ser Trp Glu Glu Trp
1 5 10 15

Asn Ala Arg Trp Asp Glu Trp Glu Asn Asp Trp Asn Asp Trp Arg Glu
20 25 30

Asp Trp Gln Ala Trp Arg Asp Asp Trp Ala Arg Trp Arg Ala Thr Trp
35 40 45

Met Gly Gly Arg Leu Leu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Arg Arg Asn
50 55 60

Glu Glu Leu Arg Arg Leu Leu Gln Leu Leu Arg Asn Arg Leu Glu Arg
65 70 75 80

Leu Ala Gln Phe Val Arg Ala Leu Ser Met Gln Asn Ala Glu Leu Glu
85 90 95

Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Gly Ser Gly Ser Ser Ala Arg Leu
100 105 110

ES 2 705 588 T3

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

Val Asn Gly Ala Glu Tyr Thr Ala Asn Ala Thr Gly Asp Arg Ile Thr
130 135 140

Leu Ala Gly Arg Thr Met Phe Ile Asp Arg Thr Ala Ser Gly Val Ser
145 150 155 160

Thr Leu Ile Asn Glu Asp Ala Ala Ala Arg Arg Ser Thr Ala Asn
165 170 175

Pro Leu Ala Ser Ile Asp Ser Ala Leu Ser Arg Val Asp Ala Val Arg
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Ala Ile Gln Asn Arg Phe Asp Ser Ala Lys Ala Lys
195 200 205

Lys Lys Asp Gly Lys Asp Asp Lys Asp Ser Lys Asn Ala Asn Asp Gly
210 215 220

Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn
225 230 235 240

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

Asn Ser Asp Ser Asp Leu Arg Ser Ile Gln Asp Glu Ile Gln Gln Arg
260 265 270

Leu Glu Ile Asp Arg Val Ser Asn Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val
275 280 285

Lys Val Leu Ser Gln Asp Asn Gln Met Lys Ile Gln Val Gly Ala Lys
290 295 300

Asp Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asp Leu Gln Lys Ile Asp Val Lys Ser
305 310 315 320

Leu Gly Leu Asp Gly Phe Asn Val Asn Gly Pro Arg Glu Ala Thr Val
325 330 335

Gly Asp Leu Arg Ser Ser Phe Arg Asn Val Thr Gly Tyr Asp Thr Tyr
340 345 350

Ala Ala Gly Ala Asp Arg Tyr Arg Val Asp Ile Asn Ser Gly Ala Val
355 360 365

- <210> 23
<211> 277
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Construcción sintética
<400> 23

ES 2 705 588 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Ser Leu Asn Val His
 165 170 175

Gly Ala Pro Val Asp Pro Ala Ser Pro Trp Thr Glu Asn Pro Leu Gln
 180 185 190

Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Ala Leu Arg Ser Asp Leu
 195 200 205

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

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

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

Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val
 260 265 270

Leu Ser Leu Leu Arg
 275

ES 2 705 588 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

5 <400> 24

Ser Ala Arg Leu Ser Asp Leu Glu Ala Asn Asn Ala Val Arg Gly Glu
1 5 10 15

Ser Lys Ile Thr Val Asn Gly Ala Glu Tyr Thr Ala Asn Ala Thr Gly
20 25 30

Asp Arg Ile Thr Leu Ala Gly Arg Thr Met Phe Ile Asp Arg Thr Ala
35 40 45

Ser Gly Val Ser Thr Leu Ile Asn Glu Asp Ala Ala Ala Arg Arg
50 55 60

Ser Thr Ala Asn Pro Leu Ala Ser Ile Asp Ser Ala Leu Ser Arg Val
65 70 75 80

Asp Ala Val Arg Ser Ser Leu Gly Ala Ile Gln Asn Arg Phe Asp Ser
85 90 95

Ala Lys Ala Lys Lys Lys Asp Gly Lys Asp Asp Lys Asp Ser Lys Asn
100 105 110

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

ES 2 705 588 T3

Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ser Val Gln Ala
130 135 140

Thr Asn Gly Thr Asn Ser Asp Ser Asp Leu Arg Ser Ile Gln Asp Glu
145 150 155 160

Ile Gln Gln Arg Leu Glu Glu Ile Asp Arg Val Ser Asn Gln Thr Gln
165 170 175

Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ser Gln Asp Asn Gln Met Lys Ile Gln
 180 185 190

Val Gly Ala Lys Asp Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asp Leu Gln Lys Ile
195 200 205

Asp Val Lys Ser Leu Gly Leu Asp Gly Phe Asn Val Asn Gly Pro Arg
210 215 220

Glu	Ala	Thr	Val	Gly	Asp	Leu	Arg	Ser	Ser	Phe	Arg	Asn	Val	Thr	Gly
225					230					235					240

Tyr Asp Thr Tyr Ala Ala Gly Ala Asp Arg Tyr Arg Val Asp Ile Asn
245 250 255

Ser Gly Ala Val
260

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 25

Lys Ala Lys Lys Lys Asp Gly Lys Asp Asp Lys Asp
1 5 10

10 <210> 26
<211> 390
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Construcción sintética

<400>

Met Gly Asp Lys His His His His His Lys Asp Gly Ser Asp Lys
1 5 10 15

ES 2 705 588 T3

Gly Ser Trp Glu Glu Trp Asn Ala Arg Trp Asp Glu Trp Glu Asn Asp
20 25 30

Trp Asn Asp Trp Arg Glu Asp Trp Gln Ala Trp Arg Asp Asp Trp Ala
35 40 45

Arg Trp Arg Ala Thr Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ser Arg Leu Glu
50 55 60

Arg Leu Glu Arg Arg Asn Glu Glu Leu Arg Arg Leu Leu Gln Leu Leu
65 70 75 80

Arg Asn Arg Leu Glu Arg Leu Ala Gln Phe Val Arg Ala Leu Ser Met
85 90 95

Gln Asn Ala Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Gly Met
100 105 110

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn
115 120 125

Leu Asn Arg Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
130 135 140

Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Arg Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala
145 150 155 160

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

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
180 185 190

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
195 200 205

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln
210 215 220

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

Thr Gln Phe Asn Gly Val Arg Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr
245 250 255

Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Arg
260 265 270

ES 2 705 588 T3

Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Gln Leu Asn Val Gln Gln
275 280 285

Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Lys Gly Asp Asp Lys Thr Glu Asn Pro Leu
290 295 300

Gln Arg Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Ala Leu Arg Ser Asp
305 310 315 320

Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly
325 330 335

Asn Thr Val Asn Asn Leu Ser Glu Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser
340 345 350

Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln
355 360 365

Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn
370 375 380

Val Leu Ser Leu Leu Arg
385 390

<210> 27

<211> 28

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 27

Glu Leu Arg Arg Leu Leu Gln Leu Leu Arg Asn Arg Leu Glu Arg Leu
1 5 10 15

Ala Gln Phe Val Arg Ala Leu Ser Met Gln Asn Ala
20 25

10 <210> 28

<211> 279

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 28

Met Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn

ES 2 705 588 T3

1	5	10	15
Asn Leu Asn Arg Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu			
20	25	30	
Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Arg Asp Asp Ala Ala Gly Gln			
35	40	45	
Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Arg Gly Leu Thr Gln Ala			
50	55	60	
Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly			
65	70	75	80
Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala			
85	90	95	
Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile			
100	105	110	
Gln Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly			
115	120	125	
Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Arg Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu			
130	135	140	
Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu			
145	150	155	160
Arg Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Gln Leu Asn Val Gln			
165	170	175	
Gln Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Lys Gly Asp Asp Lys Thr Glu Asn Pro			
180	185	190	
Leu Gln Arg Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Ala Leu Arg Ser			
195	200	205	
Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu			
210	215	220	
Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Ser Glu Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp			
225	230	235	240
Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu			
245	250	255	
Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln			
260	265	270	
Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg			

5 <210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 705 588 T3

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 29

Lys Ala Lys Lys Lys Asp Gly Lys Asp Asp Lys Asp Ser
1 5 10

5 <210> 30

<211> 260

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 30

Ser Ala Arg Leu Ser Asp Leu Glu Ala Asn Asn Ala Val Arg Gly Glu
1 5 10 15

Ser Lys Ile Thr Val Asn Gly Ala Glu Tyr Thr Ala Asn Ala Thr Gly
20 25 30

Asp Arg Ile Thr Leu Ala Gly Arg Thr Met Phe Ile Asp Arg Thr Ala
35 40 45

Ser Gly Val Ser Thr Leu Ile Asn Glu Asp Ala Ala Ala Ala Arg Arg
50 55 60

Ser Thr Ala Asn Pro Leu Ala Ser Ile Asp Ser Ala Leu Ser Arg Val
65 70 75 80

Asp Ala Val Arg Ser Ser Leu Gly Ala Ile Gln Asn Arg Phe Asp Ser
85 90 95

Ala Lys Ala Lys Lys Asp Gly Lys Asp Asp Lys Asp Ser Lys Asn
100 105 110

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

ES 2 705 588 T3

Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ser Val Gln Ala
130 135 140

Thr Asn Gly Thr Asn Ser Asp Ser Asp Leu Arg Ser Ile Gln Asp Glu
145 150 155 160

Ile Gln Gln Arg Leu Glu Glu Ile Asp Arg Val Ser Asn Gln Thr Gln
165 170 175

Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ser Gln Asp Asn Gln Met Lys Ile Gln
180 185 190

Val Gly Ala Lys Asp Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asp Leu Gln Lys Ile
195 200 205

Asp Val Lys Ser Leu Gly Leu Asp Gly Phe Asn Val Asn Gly Pro Arg
210 215 220

Glu Ala Thr Val Gly Asp Leu Arg Ser Ser Phe Arg Asn Val Thr Gly
225 230 235 240

Tyr Asp Thr Tyr Ala Ala Gly Ala Asp Arg Tyr Arg Val Asp Ile Asn
245 250 255

Ser Gly Ala Val
260

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 31

Gly Lys Asp Gly Lys Asp Gly Ser
1 5

10 <210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 32

Gly Lys Asp Gly Lys Asp Gly Lys Asp Gly Lys Asp Gly Ser
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula proteica de autoensamblaje que consiste en agregados de una multitud de unidades estructurales de fórmula (Ia) o (Ib)

X - ND1 - L1 - ND2 – FLA (Ia)

5 o

FLA- ND1 - L1 - ND2 – X (Ib),

que consiste en una cadena continua que comprende un dominio de oligomerización de proteínas ND1, un enlazador L1, un dominio de oligomerización de proteínas ND2, un derivado de flagelina FLA y un sustituyente adicional X, en donde

10 ND1 es una proteína que forma oligómeros $(ND1)_m$ de m subunidades ND1,

ND2 es una proteína que forma oligómeros $(ND2)_n$ de n subunidades ND2,

m y n son, cada uno, una cifra entre 2 y 10, con la condición de que m no sea igual a n y no sea un múltiplo de n, y de que n no sea un múltiplo de m,

L1 es un enlace o un enlazador flexible corto,

15 FLA es flagelina o un derivado de flagelina que carece de partes de la secuencia de aminoácidos de flagelina en donde uno o varios dominios seleccionados de los dominios D2 y D3 de la flagelina se eliminan de la secuencia de aminoácidos de flagelina uniendo los dos extremos en una cadena peptídica continua, y/o de 1 a 20 aminoácidos se sustituyen por otros aminoácidos, y/o que comprende además un antígeno directamente unido o unido a través de un enlazador que comprende entre 1 y 20 aminoácidos;

20 X está ausente o es una secuencia peptídica o proteica que comprende de 1 a 1000 aminoácidos,

en donde cada uno de ND1 y ND2 es un dominio de superhélice o el dominio de trimerización (foldon) de la proteína fibríntina del bacteriófago T4.

2. La nanopartícula proteica según la reivindicación 1, coensamblada con una multitud de unidades estructurales de fórmula (II)

25 Y-ND3-L2-ND4-Z (II),

que consiste en una cadena continua que comprende un dominio de oligomerización de proteínas ND3, un enlazador L2, un dominio de oligomerización de proteínas ND4 y sustituyentes adicionales Y y Z, en donde

ND3 es una proteína que forma oligómeros $(ND3)_y$ de y subunidades ND3,

ND4 es una proteína que forma oligómeros $(ND4)_z$ de z subunidades ND4,

30 y y z son, cada uno, una cifra entre 2 y 10, con la condición de que y no sea igual a z y no sea un múltiplo de z, y de que z no sea un múltiplo de y,

bien ND3 es idéntico a ND1, o ND4 es idéntico a ND2 o bien tanto ND3 como ND4 son idénticos a ND1 y ND2, respectivamente,

L2 es un enlace o un enlazador flexible corto que puede ser diferente de L1 o idéntico a L1, y

35 Y y Z están, independientemente entre sí, ausentes o son una secuencia peptídica o proteica que comprende de 1 a 1000 aminoácidos.

3. La nanopartícula proteica según la reivindicación 2, en la que al menos uno de ND3 y ND4 es una superhélice.

4. La nanopartícula proteica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde al menos uno de X, Y y Z es un antígeno de interés.

40 5. La nanopartícula proteica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde FLA es flagelina o un derivado de flagelina que carece de partes de la secuencia de aminoácidos de flagelina en donde los dominios D2 y D3 de la flagelina se eliminan de la secuencia de aminoácidos de flagelina uniendo los dos extremos en una cadena peptídica continua, y/o de 1 a 20 aminoácidos se sustituyen por otros aminoácidos, y/o que comprende además un antígeno directamente unido o unido a través de un enlazador que comprende entre 1 y 20 aminoácidos.

45 6. La nanopartícula proteica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde FLA es un derivado de

flagelina que carece de los dominios D2 y D3 de flagelina.

7. La nanopartícula proteica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde FLA es un derivado de flagelina que comprende un antígeno de interés.

5 8. La nanopartícula proteica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde n en una unidad estructural de fórmula (la) o m en una unidad estructural de fórmula (lb) es 2.

9. La nanopartícula proteica según la reivindicación 8, en donde FLA está conectada en la parte D2 de la flagelina al dominio de oligomerización ND2 en la fórmula (la), en donde n es 2, o al dominio de oligomerización ND1 en la fórmula (lb), en donde m es 2.

10 10. La nanopartícula proteica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde al menos uno de ND3 y ND4 es el dominio de trimerización (foldon) de la proteína fibríntina del bacteriófago T4.

11. Una composición que comprende una nanopartícula proteica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12 Una unidad estructural monomérica de fórmula (la) o (lb)

X - ND1 - L1 - ND2 – FLA (la)

o

15 FLA- ND1 - L1 - ND2 – X (lb),

que consiste en una cadena continua que comprende un dominio de oligomerización de proteínas ND1, un enlazador L1, un dominio de oligomerización de proteínas ND2, un derivado de flagelina FLA y un sustituyente adicional X, en donde

ND1 es una proteína que forma oligómeros $(ND1)_m$ de m subunidades ND1,

20 ND2 es una proteína que forma oligómeros $(ND2)_n$ de n subunidades ND2,

m y n son, cada uno, una cifra entre 2 y 10, con la condición de que m no sea igual a n y no sea un múltiplo de n, y de que n no sea un múltiplo de m,

L1 es un enlace o un enlazador flexible corto,

25 FLA es flagelina o un derivado de flagelina que carece de partes de la secuencia de aminoácidos de flagelina en donde uno o varios dominios seleccionados de los dominios D2 y D3 de la flagelina se eliminan de la secuencia de aminoácidos de flagelina uniendo los dos extremos en una cadena peptídica continua, y/o de 1 a 20 aminoácidos se sustituyen por otros aminoácidos, y/o que comprende además un antígeno directamente unido o unido a través de un enlazador que comprende entre 1 y 20 aminoácidos;

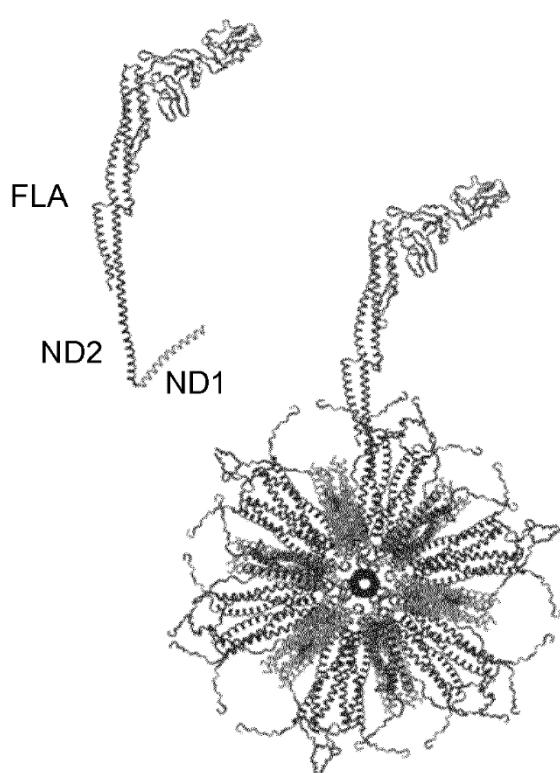
30 X está ausente o es una secuencia peptídica o proteica que comprende de 1 a 1000 aminoácidos, en donde cada uno de ND1 y ND2 es un dominio de superhélice o el dominio de trimerización (foldon) de la proteína fibríntina del bacteriófago T4.

35 13. La unidad estructural monomérica según la reivindicación 12, en donde FLA es flagelina o un derivado de flagelina que carece de partes de la secuencia de aminoácidos de flagelina en donde los dominios D2 y D3 de la flagelina se eliminan de la secuencia de aminoácidos de flagelina uniendo los dos extremos en una cadena peptídica continua, y/o de 1 a 20 aminoácidos se sustituyen por otros aminoácidos, y/o que comprende además un antígeno directamente unido o unido a través de un enlazador que comprende entre 1 y 20 aminoácidos.

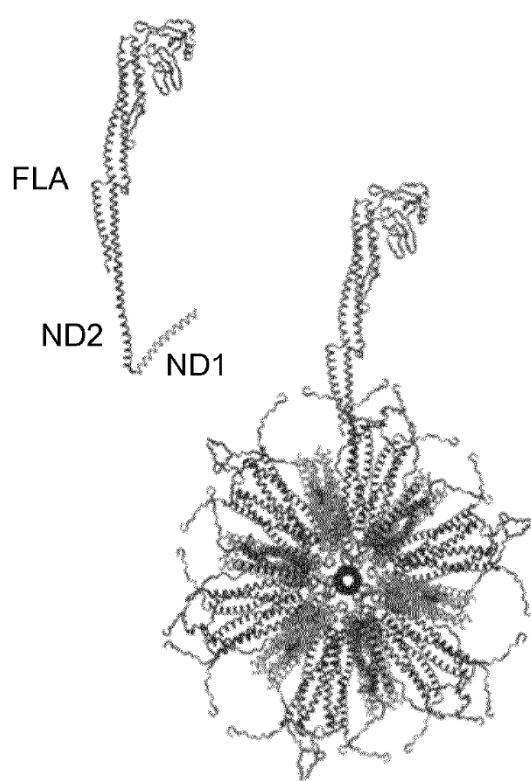
14. Una nanopartícula proteica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso en un método de vacunación de un ser humano o animal no humano, que comprende administrar una cantidad eficaz de la nanopartícula proteica a un sujeto que necesita dicha vacunación.

Fig. 1

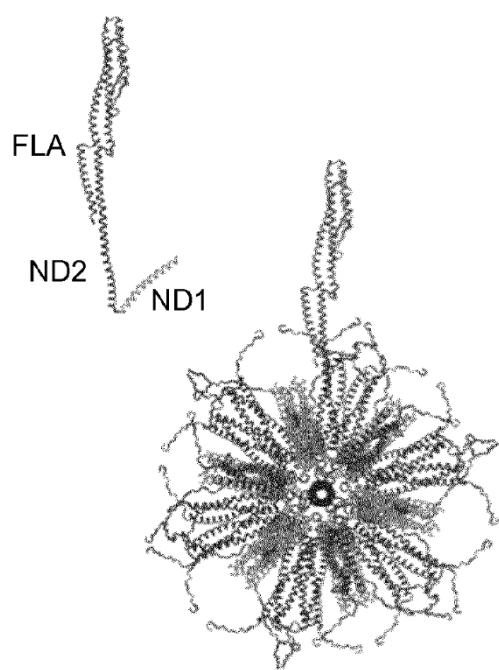
A)



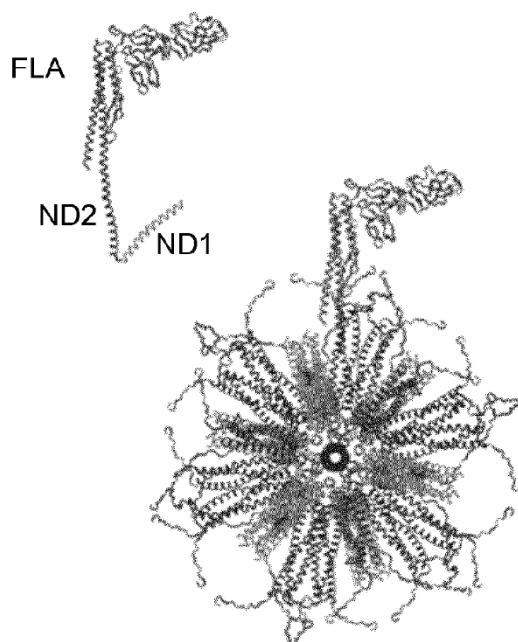
B)



C)



D)



E)

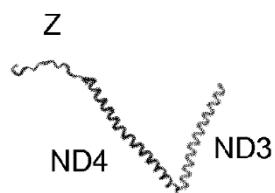
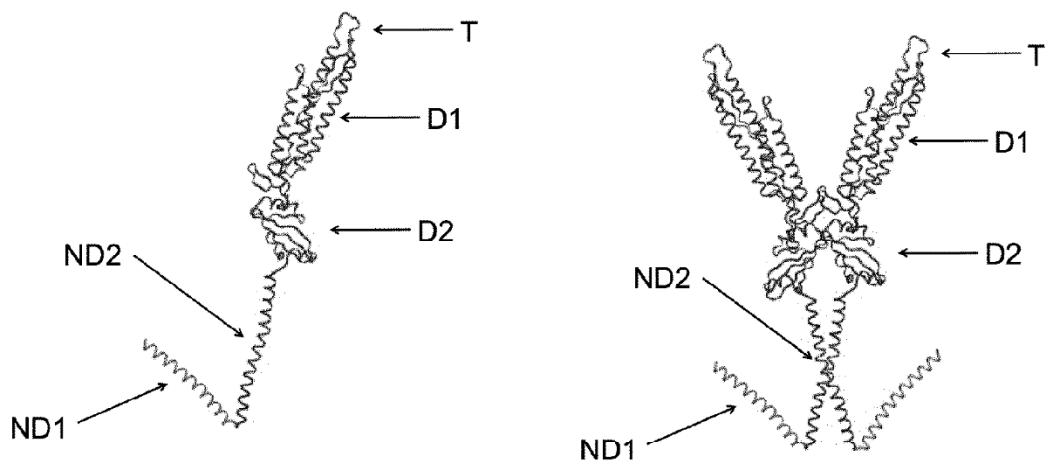


Fig. 2

A)



B)

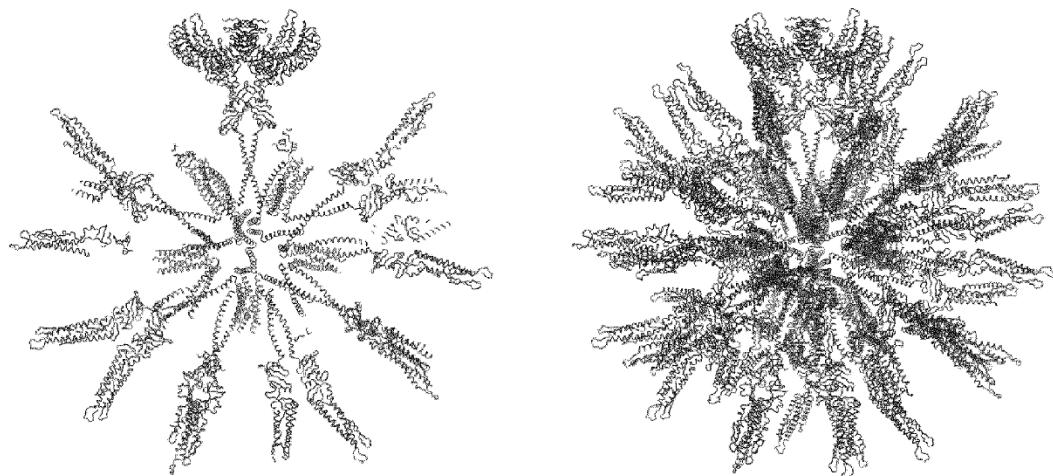
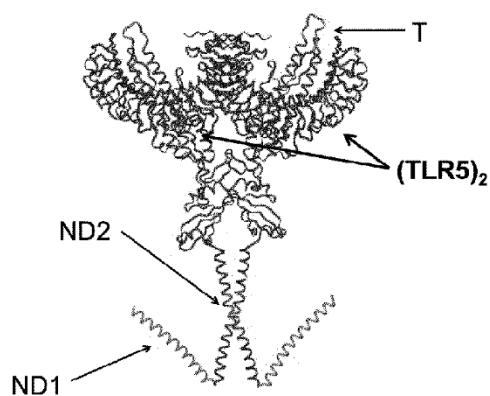


Fig. 3

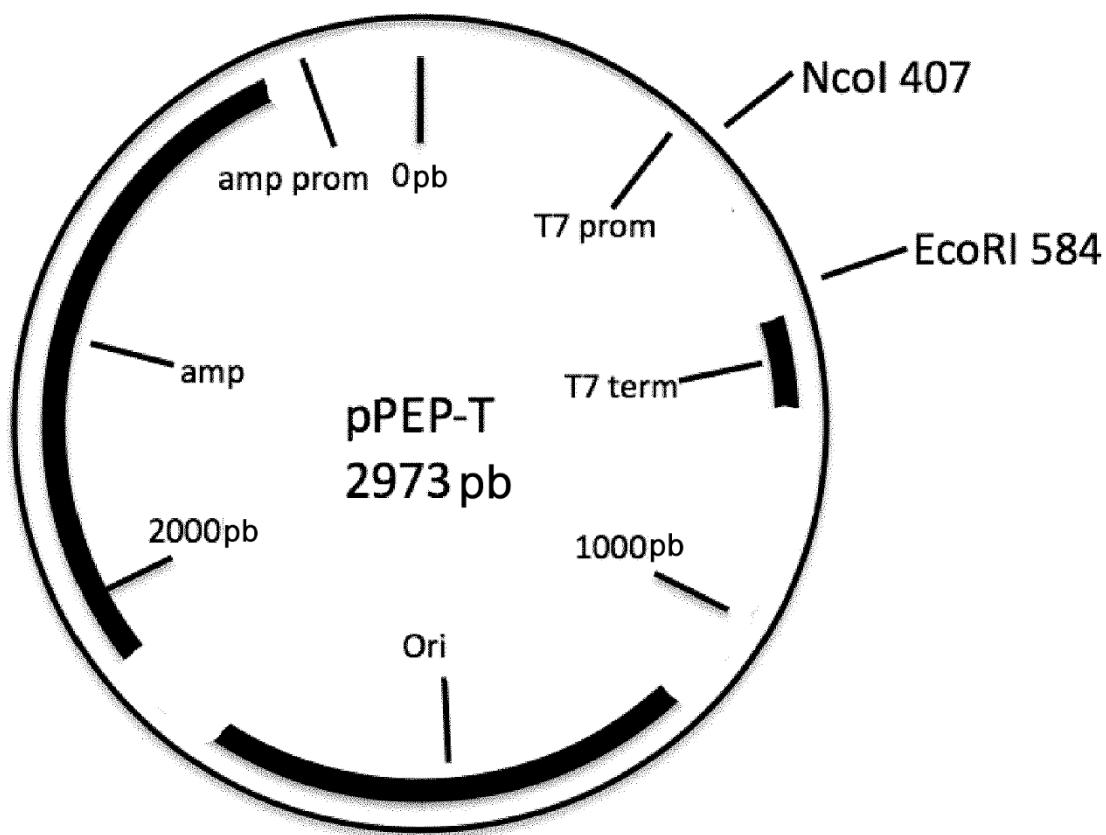
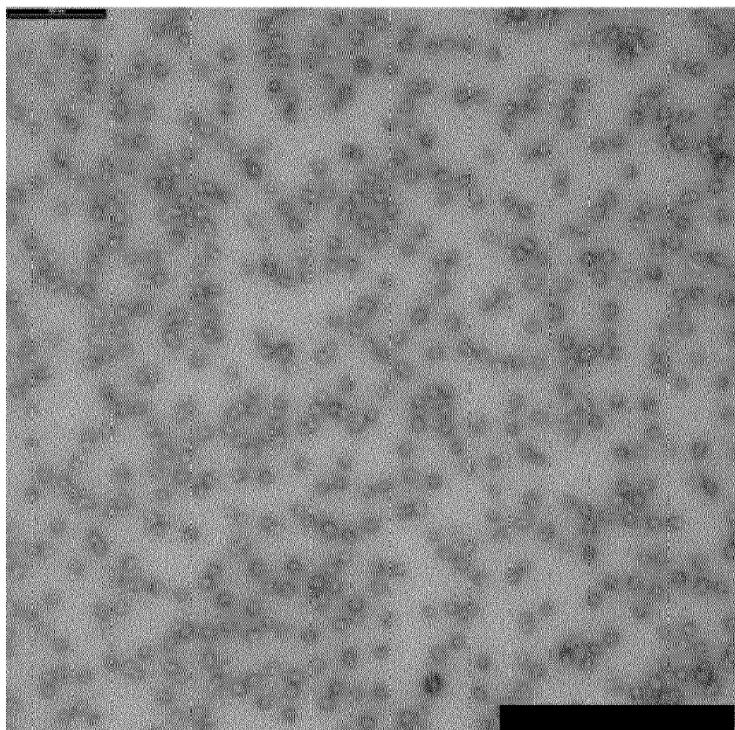
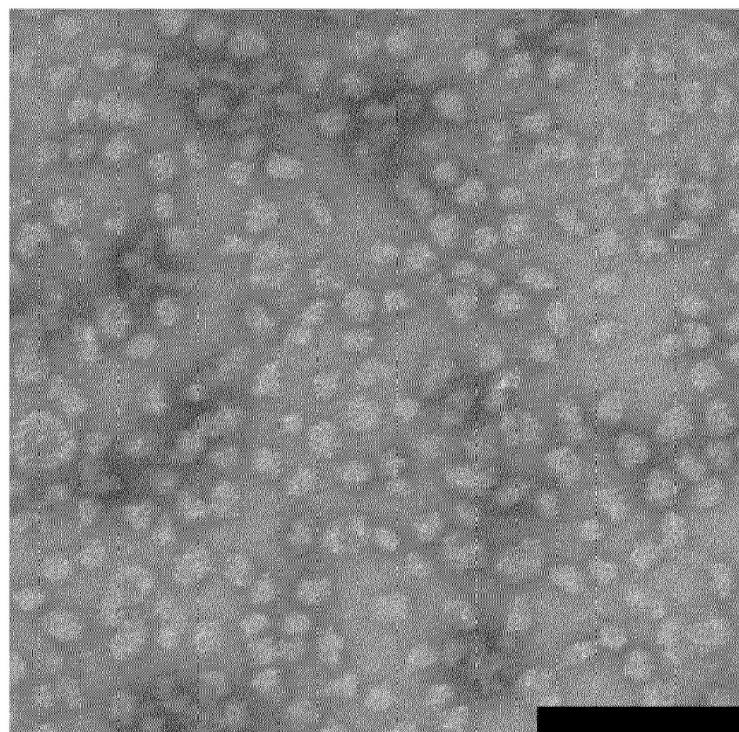


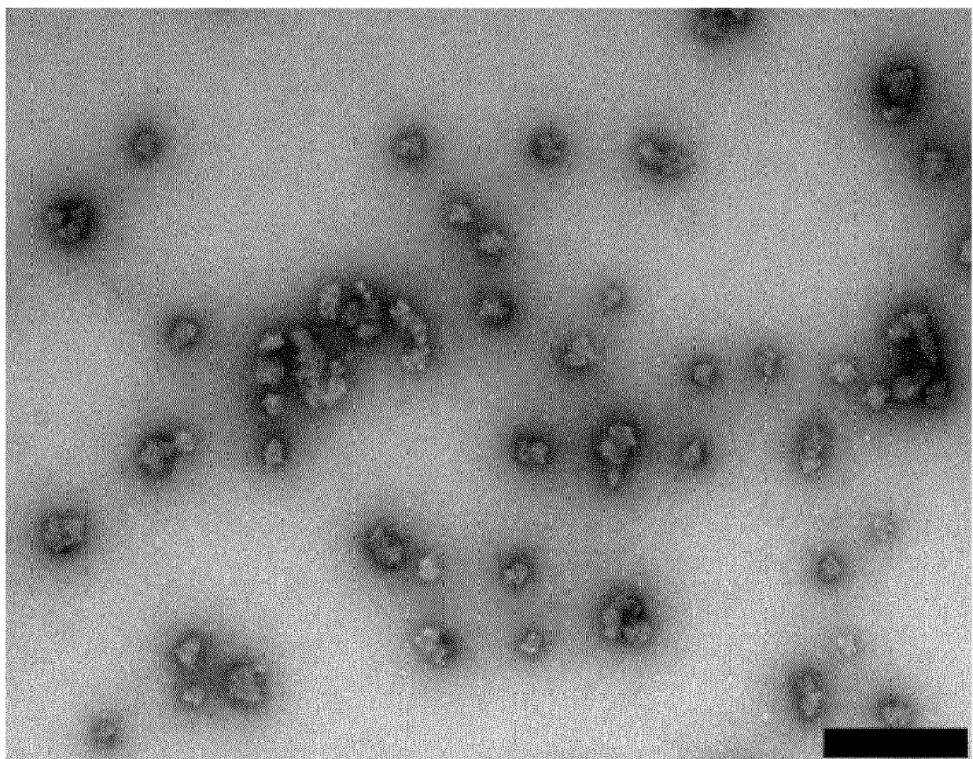
Fig. 4
A



B



C



D

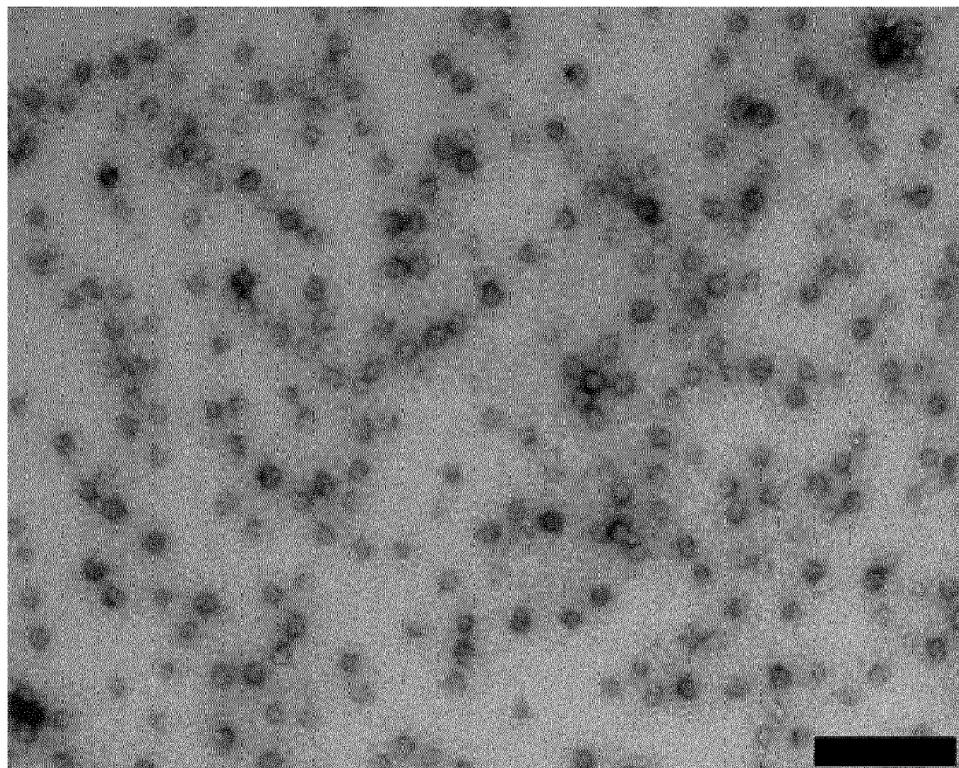


Fig. 5

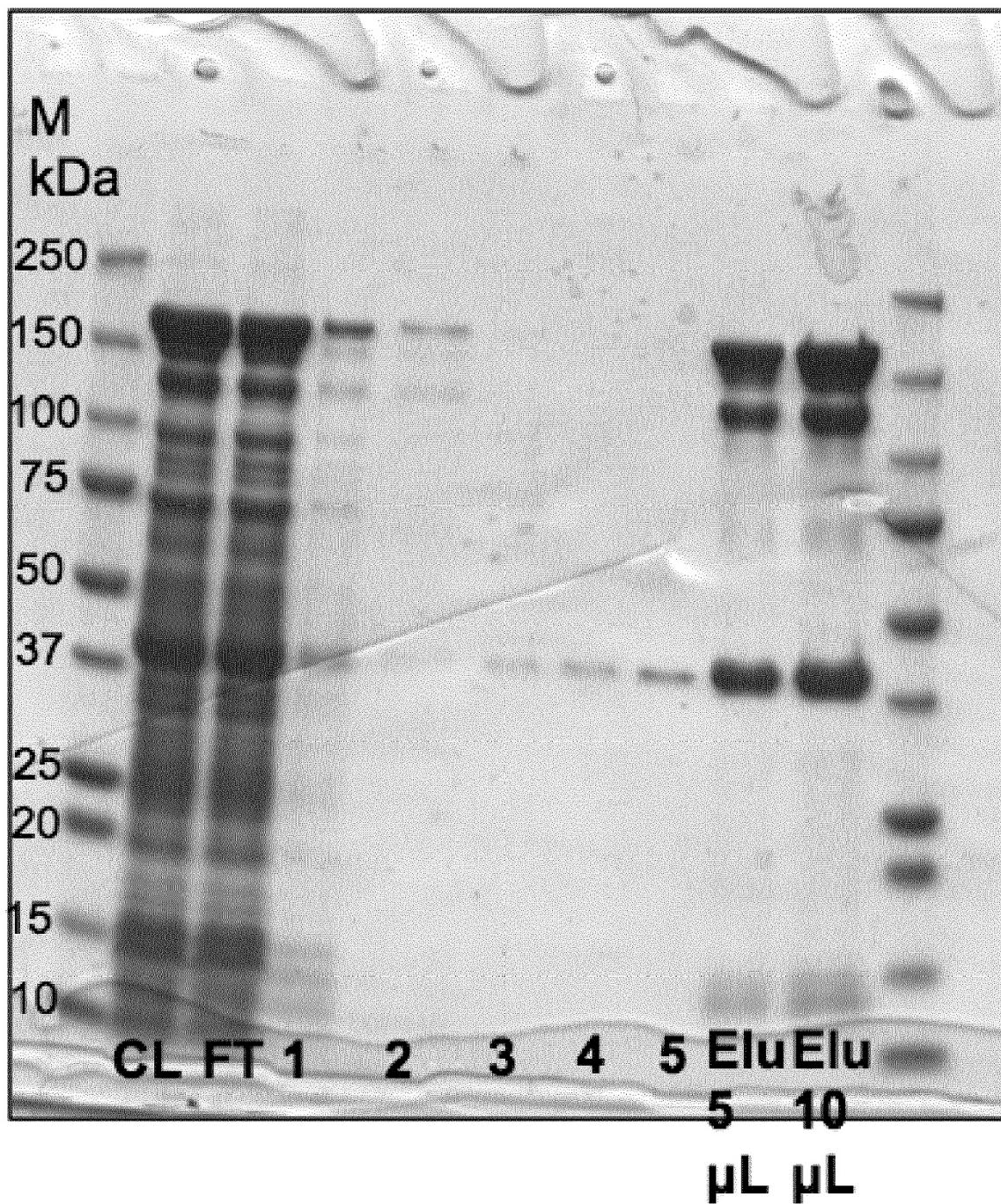


Fig. 6

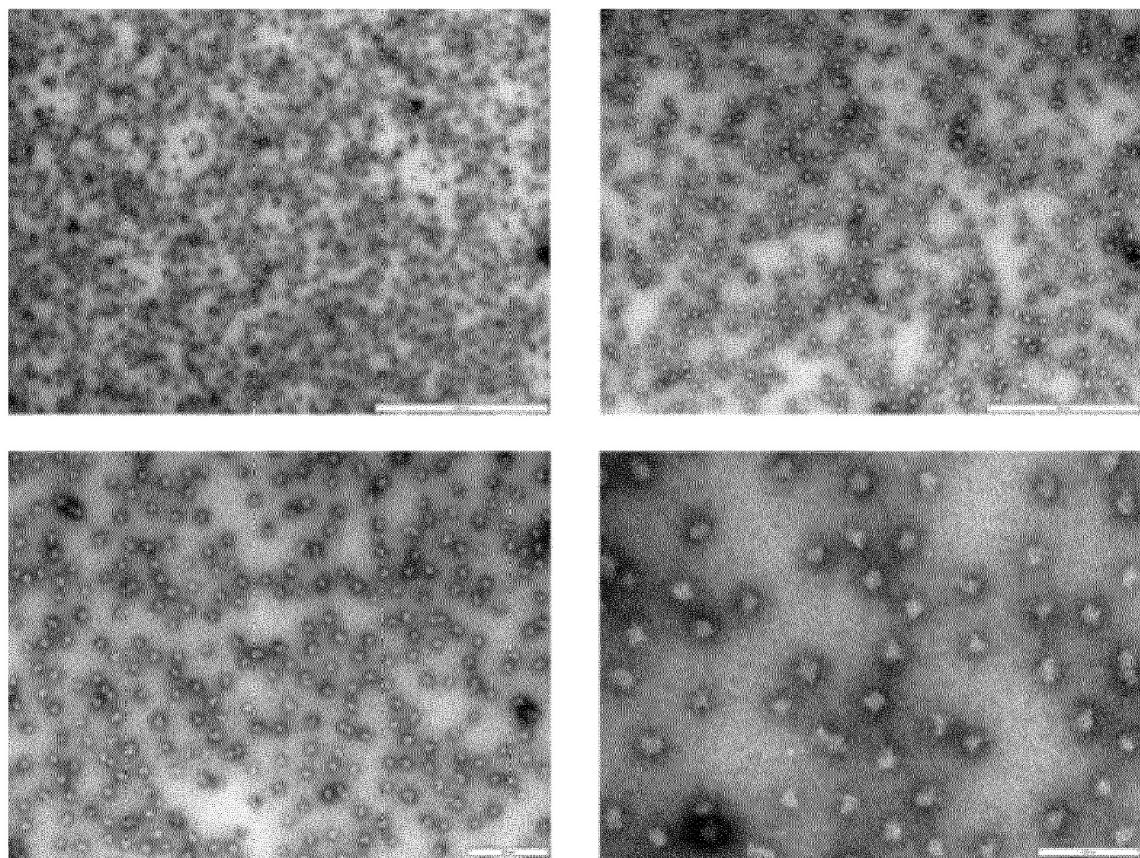
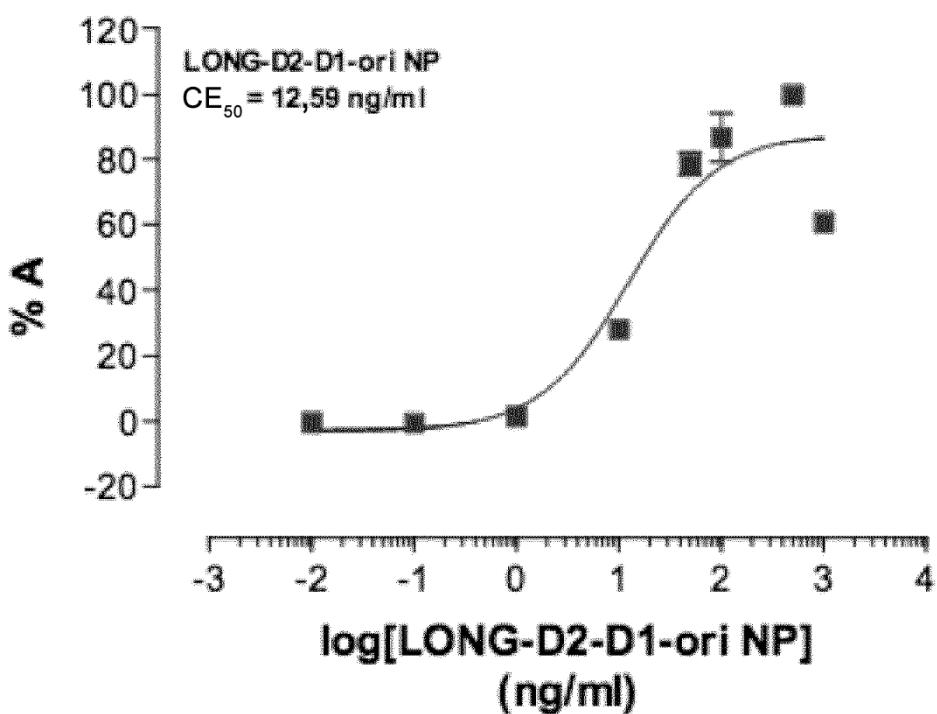
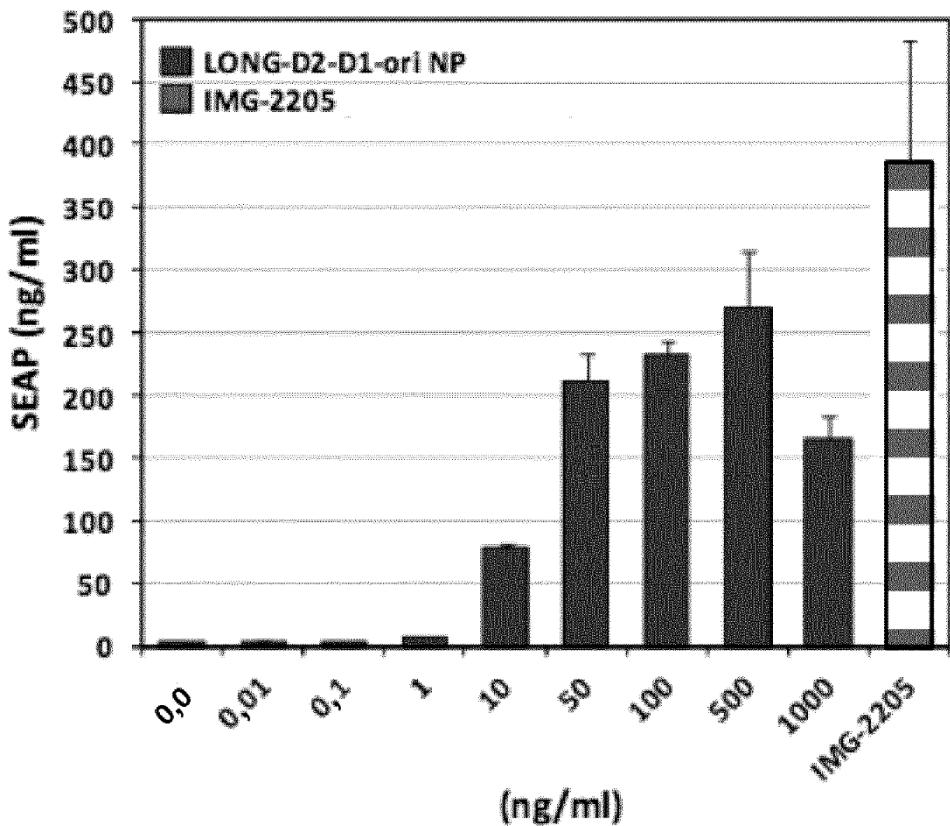
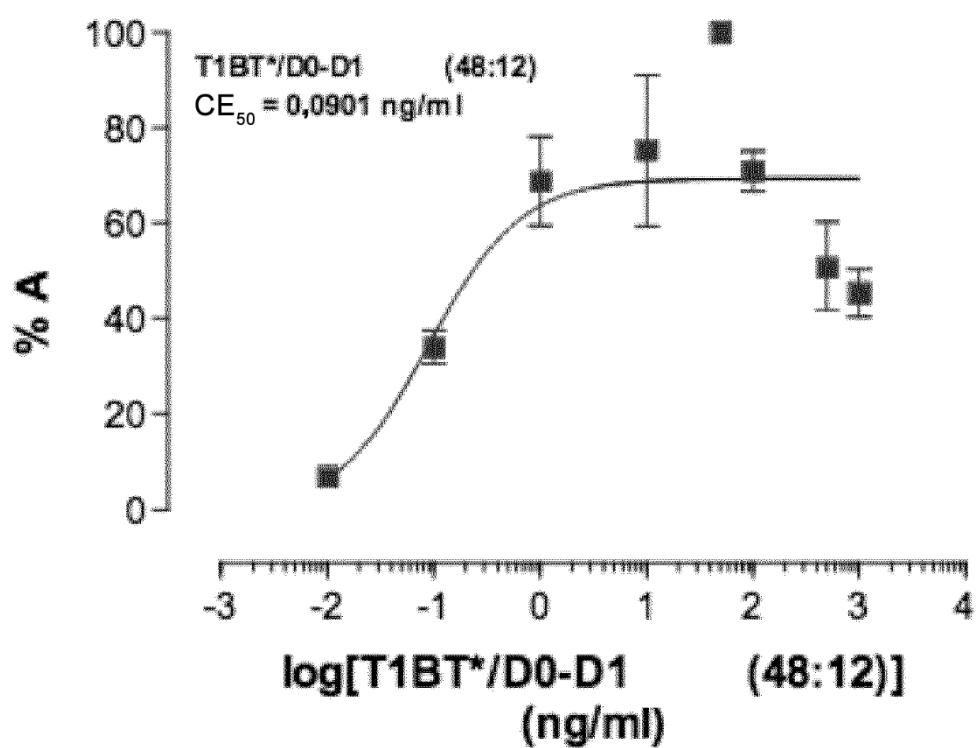
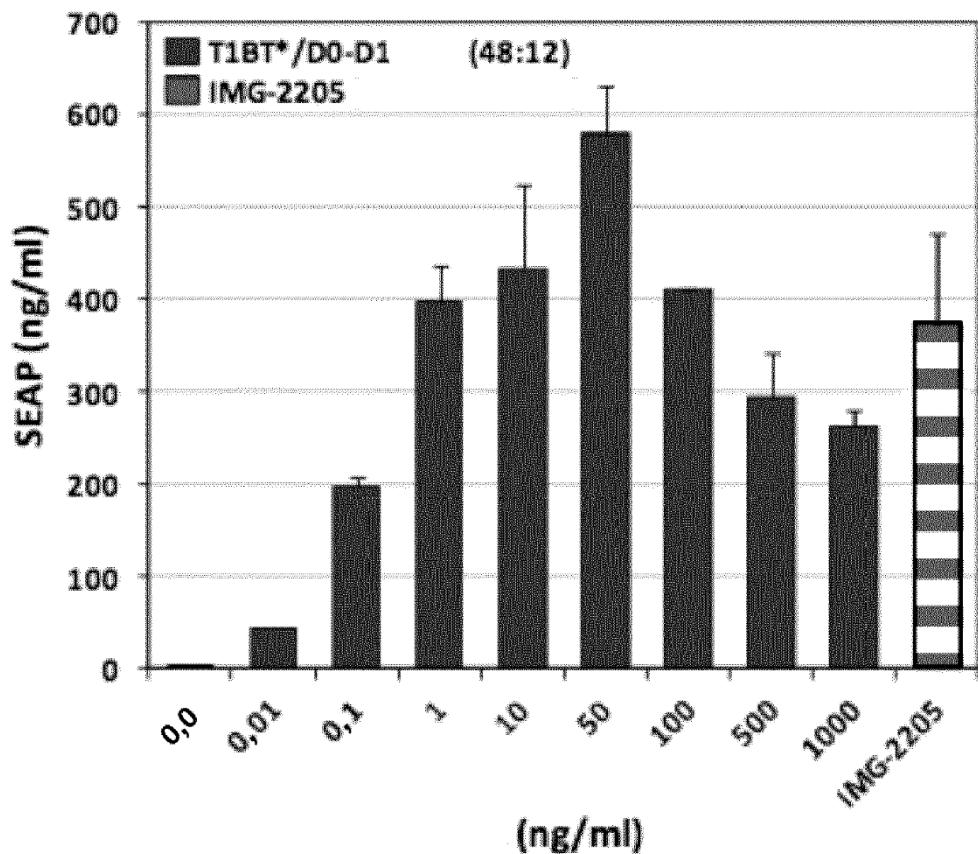


Fig. 7**A)**

B)



C)

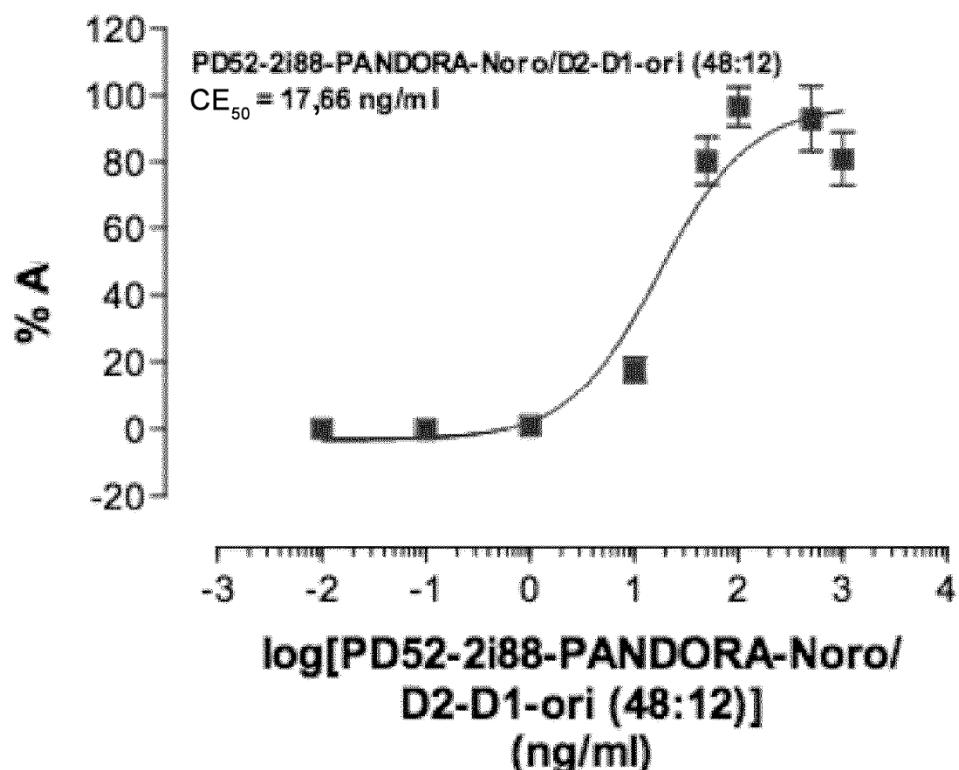
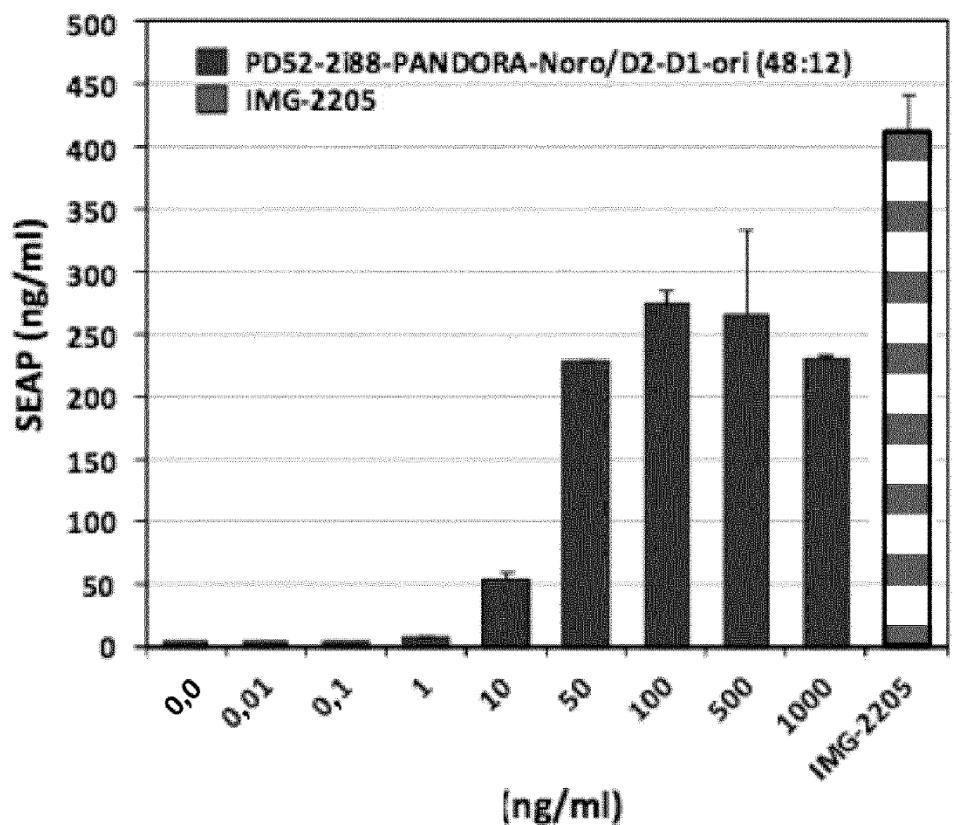


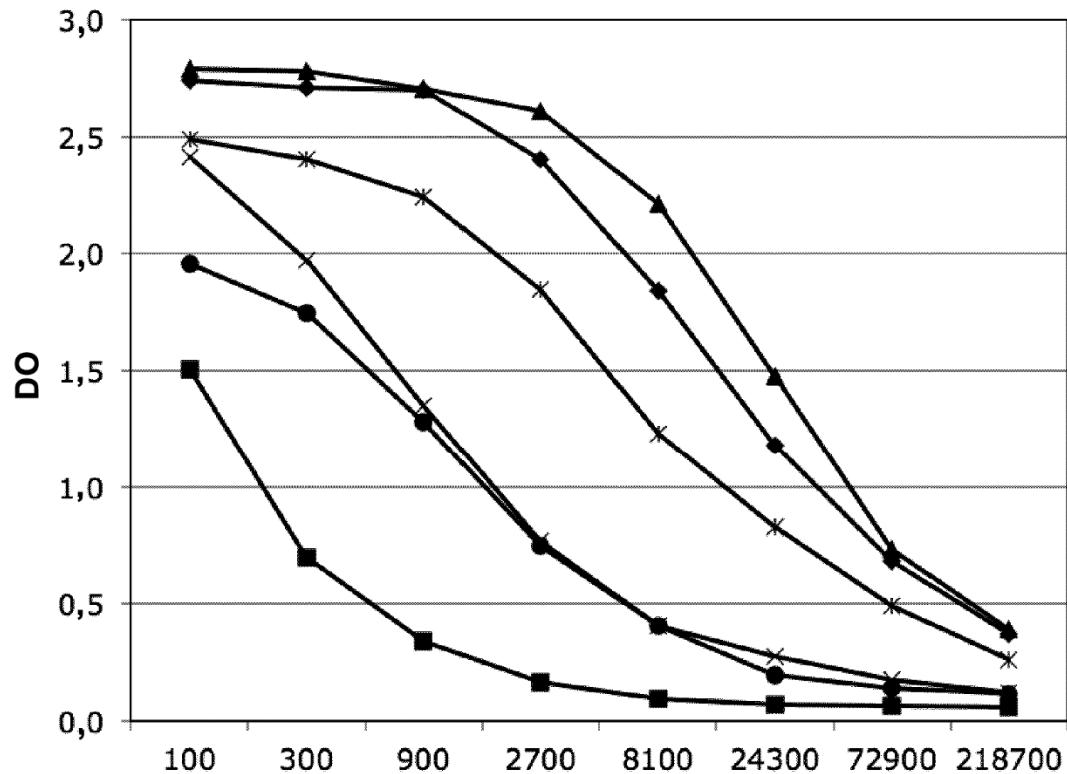
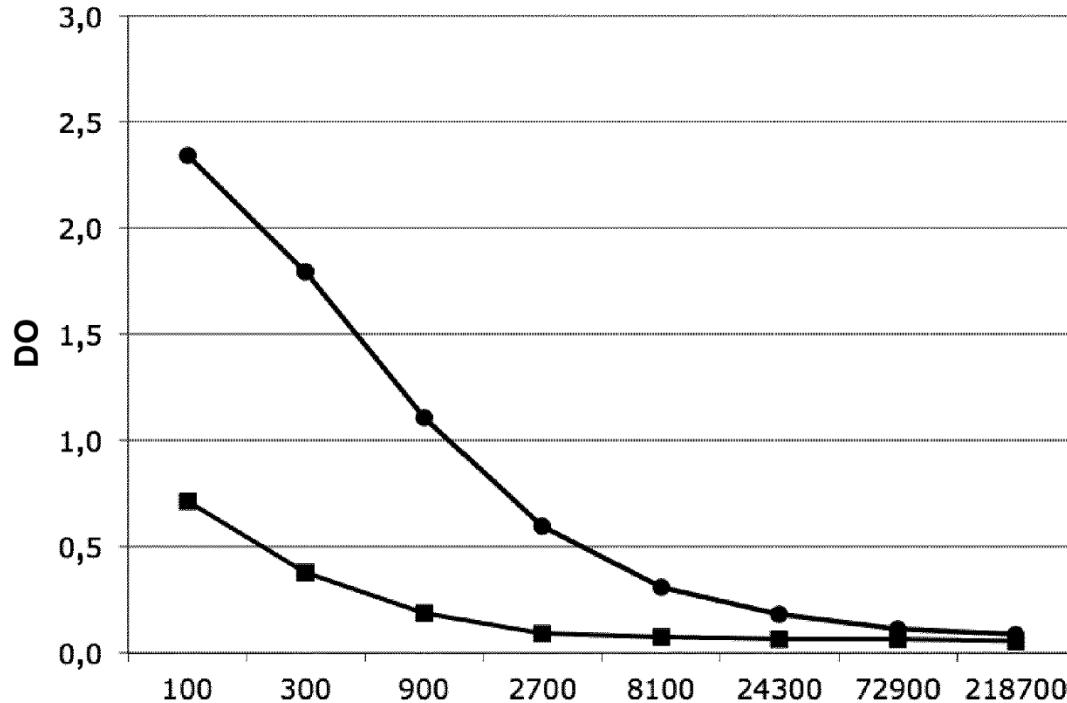
Fig. 8**A****B**

Fig. 9

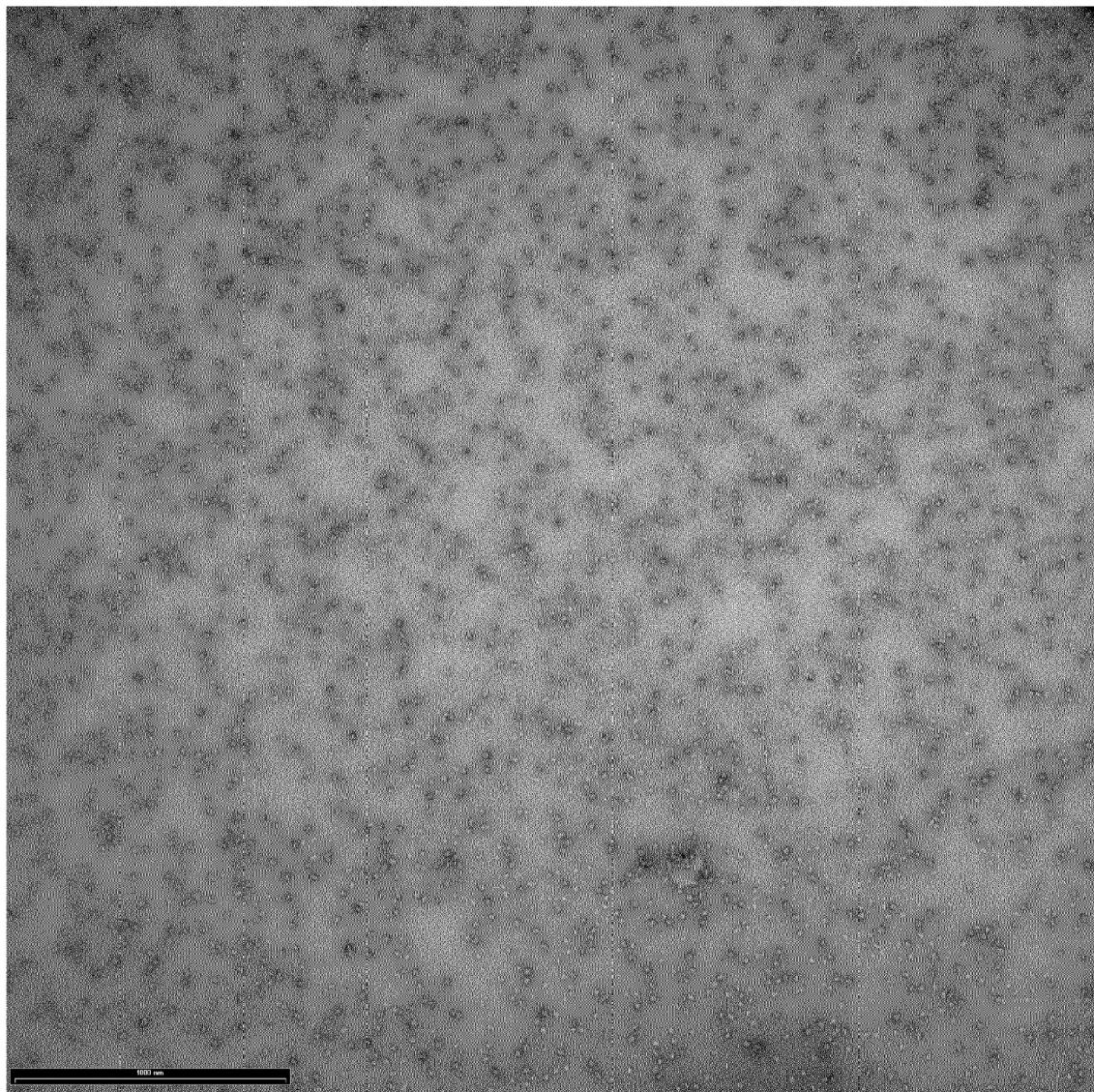


Fig. 10