

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 256**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/02** (2006.01)  
**A61K 39/12** (2006.01)  
**A61K 39/385** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**A61K 39/085** (2006.01)  
**A61K 39/04** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2013 PCT/EP2013/076289**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14090905**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2013 E 13802415 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2931896**

54 Título: **Proteínas de tipo superhélice modificadas que presentan unas propiedades mejoradas**

30 Prioridad:

**11.12.2012 EP 12306560**  
**18.03.2013 US 201361802836 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.07.2019**

73 Titular/es:

**OSIVAX SAS (100.0%)**  
**4 rue de Copenhague**  
**75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**DEL CAMPO ASCARATEIL, JUDITH;**  
**TURKI HANI, IMENE y**  
**HILL, FERGAL**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 719 256 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

Proteínas de tipo superhélice modificadas que presentan unas propiedades mejoradas.

5 La presente invención se refiere a antígenos recombinantes que contienen dominios de superhélice o a antígenos fusionados a proteínas que contienen superhélices, en los que las superhélices están modificadas. La modificación mejora la inmunogenicidad de dichos antígenos. Simultáneamente, mejora su capacidad de unión a polímeros cargados negativamente tales como ácidos nucleicos, incluidos ADN y ARN, y a la heparina.

10 **Antecedentes**

Una superhélice es un motivo estructural en proteínas, en las que las hélices alfa se enrollan como las hebras de una cuerda. Los dominios de superhélice son abundantes en proteínas naturales (1, 2) y pueden ser el procedimiento más común en la naturaleza de proteínas oligomerizantes. Las superhélices consisten en dos o 15 más hélices alfa que están enrolladas unas alrededor de otras formando una superhélice, un plegamiento de proteínas simple pero versátil (3). Una secuencia primaria de superhélice típica es repetitiva, hecha de repeticiones de siete residuos llamadas "heptadas".

Muchas proteínas del tipo de superhélice están involucradas en funciones biológicas importantes. Son de 20 particular interés en la presente memoria aquellas que se encuentran en antígenos o en proteínas transportadoras.

Los ejemplos de superhélices que se encuentran en antígenos incluyen, pero sin limitación:

25 i) las superhélices diméricas que se encuentran en la familia OCA (OCA significa adhesión de superhélice oligomérica): los ejemplos son NadA, un antígeno protector de *Neisseria meningitidis* (4); YadA de *Yersinia enterocolitica* (5); UspA2 de *Moraxella catarrhalis* (6); BadA de *Bartonella henselae* (7) y HadA de *Haemophilus influenzae* (8).

30 ii) las superhélices triméricas que se encuentran, entre otras, en la proteína hemaglutinina HA2 de la gripe (9), la glucoproteína F del virus sincitial respiratorio (10), las glucoproteínas gp41 del VIH-1 (11) y el VIH-2 (12) y gp1,2 del virus del Ébola (13).

35 iii) las superhélices tetraméricas que se encuentran en la glucoproteína HN (hemaglutinina-neuraminidasa) de la enfermedad de Newcastle y otros paramixovirus (14, y sus referencias).

Las proteínas transportadoras se utilizan en particular para mejorar la inmunogenicidad de antígenos. Se han descrito anteriormente proteínas transportadoras que contienen superhélices, en particular un pentámero derivado de COMP (15) y una secuencia artificial que asimismo forma pentámeros (34) y heptámeros derivada 40 de dominios de oligomerización de C4bp de mamíferos, tales como el dominio murino IMX108 (16) o dominios de oligomerización de C4bp de aves (16, documentos WO 2005/077976 y WO 2007/062819). Un dominio de oligomerización de aves híbrido denominado IMX313 (WO 2007/062819) se utiliza como ejemplo en la presente memoria.

45 **Técnica anterior**

En la técnica anterior, las superhélices han sido objeto de amplias investigaciones para comprender qué determina sus estados de oligomerización y la orientación relevante (paralela o antiparalela) de sus hélices (35). Pero no se han producido estudios para mejorar la inmunogenicidad de antígenos mediante la modificación de 50 sus superhélices. Dos ejemplos notables en la técnica anterior se refieren a grupos asociados dentro de la industria de vacunas que necesitaban purificar dos antígenos separados que contenían superhélices con vistas a vacunación (10, 36, 37); ninguno de los grupos modificó las superhélices en el antígeno.

En la técnica anterior, se ha demostrado que algunos péptidos específicos mejoran las propiedades de unión de 55 proteínas monoméricas que carecen de superhélices. Se ha demostrado que cuando una cola de poliarginina se fusiona a proteínas recombinantes, son más fáciles de purificar mediante cromatografía de intercambio iónico (17, 18). En usos anteriores, las argininas adicionales se eliminaron después de la purificación por medios enzimáticos (17, 18) o, alternativamente, se dejaron en su lugar y se utilizaron para la inmovilización y/o el replegamiento de enzimas (19, 20). Se usó un péptido tan corto como de seis argininas consecutivas para 60 inmovilizar una enzima monomérica en una columna de heparina-sefarosa, evitando la agregación de monómeros mediante su unión a la matriz y permitiendo la reutilización de la enzima (19, 20). Fuchs y Raines han demostrado que se puede utilizar una etiqueta de poliarginina de nueve aminoácidos para inmovilizar una enzima monomérica (RNasa A) en una diversidad de soportes, tales como vidrio y resina de sílice (22).

65 Se han divulgado otros péptidos de unión a ácidos nucleicos, tales como el motivo SPKK que se identificó en la década de 1980 como un motivo de unión a ADN, y los péptidos que contienen el motivo SPKK pueden unirse a

ADN bicatenario (21). Sin embargo, no se demostró la unión a ARN o a ADN monocatenario, y los datos de Suzuki sugieren con intensidad que no se producirá la unión a ADN monocatenario, ya que el surco menor solo existe en moléculas de doble hélice.

- 5 Otros péptidos que se ha demostrado que se unen al ADN incluyen el dominio de tipo protamina del antígeno central de la hepatitis B (38) que contiene la secuencia peptídica SPRRRRS, utilizada en algunos de los ejemplos del presente documento.

10 Sin embargo, las colas de poliarginina son muy susceptibles a su escisión por proteasas, especialmente serina proteasas, y se han reemplazado en el uso rutinario por etiquetas de polihistidina, tanto para propósitos de purificación como de inmovilización (45).

15 Por separado en la técnica anterior, los péptidos se han fusionado a proteínas monoméricas para mejorar su inmunogenicidad. Shibagaki y sus colegas han demostrado que pueden utilizarse dominios de transducción de proteínas (PTD) para mejorar la transducción de células dendríticas (CD) *in vitro* y que cuando las CD transducidas se reinyectan en los animales, se obtiene una inmunogenicidad mejorada del antígeno (43). Además, Shimada y sus colegas han demostrado que péptidos de poliarginina pueden mejorar la inmunogenicidad de una proteína, la ovoalbúmina, a la que están fusionados (42), ya sea cuando se inyectan directamente en un tumor que expresa la proteína o cuando se inyectan por vía intradérmica (41).

20 La mayor parte de los antígenos purificados son débilmente inmunógenos. Se han utilizado adyuvantes para aumentar su inmunogenicidad. El uso de un dominio pequeño, que contiene una superhélice, de proteínas C4bp para aumentar la inmunogenicidad de los antígenos se ha demostrado anteriormente:

- 25 - El documento WO 2007/062819 describe complejos que comprenden como primer componente un dominio C4bp de ave y como segundo componente un antígeno, estando dichos componentes en forma de una proteína de fusión o estando asociados de forma no covalente. Este complejo muestra un aumento de la inmunogenicidad del antígeno cuando se administra a un organismo.
- 30 - El documento WO 2011/045612 describe una proteína de fusión que contiene un fragmento de la proteína C4bp del pollo y el antígeno micobacteriano 85A. Dicha proteína híbrida mejora la inmunogenicidad de 85A, no solo en animales tales como los roedores, sino asimismo en primates.

35 Además, para mejorar los procedimientos de inmunización, asimismo es de gran importancia inducir señalización a través de receptores TLR, pero es por lo menos tan importante poder limitar esta señalización. Los receptores tipo Toll (TLR) son una clase de proteínas que desempeñan un papel clave en el sistema inmunitario innato. Una vez que los microbios han roto las barreras físicas de los organismos, son reconocidos por los TLR. Las características reconocidas de los microbios incluyen ARN bicatenario de virus, sitios CpG no metilados de ADN bacteriano y vírico, y otras determinadas moléculas de ARN y ADN.

40 Existe un interés sustancial en dichos ácidos nucleicos, ya que son ligandos para una clase de receptores tipo Toll (en adelante, TLR), y en particular para TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 y TLR13 (23 y sus referencias). En ocasiones, estos se clasifican como "receptores tipo Toll intracelulares", pero por lo menos TLR3 asimismo está presente en algunas superficies celulares (24). TLR7 y TLR9 están localizados en compartimientos intracelulares (en particular el retículo endoplásmico y los endosomas) y se ha demostrado claramente para TLR9 y TLR7 que la escisión del receptor es necesaria para la activación de MyD88, a través de la cual se realiza la señalización de los ligandos de los receptores (25, 26). Como esta escisión se produce solo en los endolisosomas, es posiblemente una adaptación evolutiva para evitar la señalización inadecuada de los ácidos nucleicos propios.

50 El TLR3 se expresa por una diversidad de células epiteliales que incluyen células epiteliales de las vías respiratorias, uterinas, corneales, vaginales, cervicales, biliares e intestinales, y estas células parecen expresar el TLR3 en sus superficies celulares (24). Quizás no sea sorprendente, por lo tanto, que la administración de poli I:C se haya asociado con una serie de efectos adversos (26). En ese estudio, se usó la administración repetida en dosis de 3 miligramos por gramo. Si un ratón promedio pesa casi 35 g, una dosis de 100 mg administrada repetidamente puede inducir estos efectos. Necesitamos solo 2.5 µg de poli I:C por dosis en las inmunizaciones descritas en la presente memoria.

60 La importancia de limitar la señalización a través de estos receptores, y en particular el receptor TLR3, es dependiente de la dosis. Por tanto, la ventaja de unir estrechamente los ligandos nucleicos al antígeno es esencial. Los ligandos de TLR intracelulares estrechamente unidos son, por lo tanto, muy preferidos sobre las formulaciones en las que la unión es menos estrecha. Por lo tanto, los expertos en la materia están buscando composiciones antigénicas capaces de unirse de forma eficaz a ligandos de TLR, de modo que no se separen del antígeno antes de que el antígeno llegue a las células donde desencadenará una respuesta inmunitaria, con el objetivo de disminuir los posibles efectos adversos mediados por la unión de los ligandos a receptores TLR en otros lugares.

65

**Descripción de la invención**

5 La divulgación general se refiere a proteínas que comprenden dominios de superhélice que están modificadas mediante la unión de un péptido cargado positivamente al dominio de superhélice. Todas las proteínas de superhélice son recombinantes, y la modificación se obtiene mediante la fusión de secuencias peptídicas cortas con los extremos terminales de las superhélices. En los ejemplos de la presente memoria, la modificación se lleva a cabo mediante técnicas de ingeniería genética, pero existen otros procedimientos para obtener las superhélices modificadas, tales como la síntesis de péptidos.

10 Las proteínas del tipo de superhélice modificadas según la invención presentan una inmunogenicidad mejorada y, simultáneamente, propiedades de unión mejoradas para polímeros cargados negativamente, tales como heparina y ácidos nucleicos. El péptido cargado positivamente comprende argininas y es corto.

15 La presente invención se refiere a una proteína modificada que comprende:

- (i) una proteína que presenta un dominio de superhélice y por lo menos un péptido cargado positivamente directamente unido al dominio de superhélice, siendo dicha proteína modificada tal como se indica en la SEC ID n° 42 (IMX313P) o en la SEC ID n° 7 (IMX313T) o
- 20 (ii) una proteína que presenta un dominio de superhélice trimérica directamente unida a un péptido de secuencia SEC ID n° 37 (SPRRRRRRRRRS).

25 En la presente invención, la proteína modificada definida anteriormente en (i) comprende la proteína transportadora IMX313, derivada de las proteínas C4bp de pollo.

La invención se refiere asimismo a una proteína de fusión que comprende una proteína transportadora de superhélice modificada fusionada a un antígeno.

30 La invención se refiere asimismo a un antígeno modificado que comprende un dominio de superhélice modificado.

La invención se refiere asimismo a una composición inmunógena que comprende la proteína de fusión modificada o un antígeno modificado, y ligandos de ácido nucleico para TLR intracelulares.

35 La descripción se refiere asimismo a un soporte que porta la proteína modificada de la invención, formándose la unión al soporte a través del péptido unido al dominio de superhélice. Puede utilizarse el soporte de heparina *in vitro* o *in vivo*. Los procedimientos para utilizar heparina para mejorar la inmunogenicidad de las proteínas cargadas positivamente son bien conocidos (47, y sus referencias).

40 La presente solicitud se refiere asimismo a un antígeno modificado o a una proteína de fusión modificada o una composición inmunógena tal como se ha descrito anteriormente para su uso como una vacuna, para inducir una respuesta inmunitaria en un paciente.

45 Una proteína del tipo de superhélice modificada según la presente solicitud, en la que el péptido cargado positivamente está unido al dominio de superhélice de la proteína modificada, presenta ventajas en comparación con la proteína correspondiente no modificada, y en particular:

- una mejor unión a las columnas de cromatografía cargadas negativamente tales como la columna de intercambio de iones catiónicos SP FF y especialmente a columnas de heparina-sefarosa;
- 50 - una mejor unión a ácidos nucleicos;
- en el caso de proteínas transportadoras y antígenos, una inmunogenicidad aumentada de los antígenos que son estas proteínas del tipo de superhélice modificadas, o de los antígenos asociados con dichas proteínas transportadoras modificadas.

**Descripción detallada de la invención**

60 Antes de describir la presente invención en detalle, debe apreciarse que la presente invención no está limitada a procedimientos ejemplificados de forma particular y que, por supuesto, puede variar. En particular, la presente invención se refiere a antígenos modificados que poseen dominios de superhélice, y no se limita a antígenos específicos que contienen superhélices.

65 Las publicaciones mencionadas en la presente memoria se citan con el propósito de describir y divulgar los protocolos, reactivos y vectores de los que se informa en las publicaciones y que podrían utilizarse con respecto a la invención.

Además, para la puesta en práctica de la presente invención se utilizan, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de purificación de proteínas y de biología molecular dentro de los conocimientos de la técnica. Dichas técnicas son bien conocidas por el experto en la materia, y se explican completamente en la literatura. En las reivindicaciones siguientes y en la descripción consecutiva de la invención, excepto cuando el contexto exija lo contrario debido al lenguaje expreso o la implicación necesaria, la palabra "comprende", "contiene", "involucra" o "incluye" o variaciones tales como "comprende", "que comprende", "que contiene", "involucrado", "incluye", "que incluye" se utilizan en un sentido inclusivo, es decir, para indicar la presencia de las características indicadas, pero no para excluir la presencia o la adición de otras características en diversas formas de realización de la invención.

Para una mejor comprensión de la invención se definen los términos y las expresiones siguientes:

Una "proteína del tipo de superhélice" asimismo denominada "proteína que contiene una superhélice" o "proteína que tiene un dominio de superhélice" designa una proteína que comprende un motivo de superhélice, es decir, por lo menos dos hebras alfa-helicoidales que se enrollan una alrededor de otra formando una superhélice. En la literatura se ha informado de diversas proteínas que contienen dichas superhélices.

Según la invención, las proteínas del tipo de superhélice preferidas son antígenos y proteínas transportadoras.

Una "proteína transportadora" designa generalmente una proteína a la que se han conjugado o fusionado antígenos y, por lo tanto, los antígenos resultan más inmunógenos. En la presente memoria, la expresión se utiliza específicamente con el significado de una proteína que porta un antígeno. La función de la proteína es aumentar la inmunogenicidad de dicho antígeno al que se ha conjugado o fusionado. La fusión tiene la ventaja de crear un producto homogéneo. Más formalmente, la "conjugación" puede describirse como genética: el ADN que codifica la etiqueta proinmunógena o proteína transportadora se empalma con el ADN que codifica el antígeno. Con los procedimientos tradicionales de conjugación química no siempre es posible controlar con precisión en qué posiciones se une el antígeno a la proteína. De esta forma, esta subclase de proteínas transportadoras asimismo se denomina "etiquetas proinmunógenas" o incluso "adyuvante" (16) o "adyuvante genético".

Según la invención, una "proteína modificada" designa una proteína que tiene una secuencia modificada en comparación con la secuencia de tipo silvestre, con la adición o sustitución parcial de un péptido cargado positivamente según la invención. La diferencia entre la proteína no modificada y la proteína modificada de la invención reside en el péptido cargado positivamente unido al dominio de superhélice, ya sea añadido o de forma parcialmente sustituida. El experto en la materia apreciará que la proteína modificada de la invención es una proteína recombinante, o una quimera que no se encuentra en la naturaleza. Las proteínas naturales que comprenden un dominio de superhélice y un dominio peptídico cargado modificadas en otro sitio que no sea el dominio peptídico cargado no son parte de la presente invención.

La invención se refiere a una proteína modificada que comprende:

(i) una proteína que tiene un dominio de superhélice y por lo menos un péptido cargado positivamente directamente unido al dominio de superhélice, siendo dicha proteína modificada tal como se indica en la SEC ID nº 42 (IMX313P) o en la SEC ID nº 7 (IMX313T) o

(ii) una proteína que tiene un dominio de superhélice trimérica directamente unido a un péptido de secuencia SEC ID nº 37 (SPRRRRRRRRRS).

El último aminoácido del péptido puede no ser un residuo de arginina ni de lisina cuando se desea proteger el péptido contra la destrucción por exoproteasas tales como la carboxipeptidasa B.

Particularmente para superhélices triméricas, una fusión de dos péptidos cargados positivamente de secuencia SPRRRRRRRRRRS (SEC ID nº 37) se debe unir al dominio de la superhélice, tal como se ha definido anteriormente en (ii). El péptido puede fusionarse a la superhélice en el extremo C-terminal o en el extremo N-terminal. En un aspecto preferido de la invención, el péptido se une a la superhélice en su extremo C-terminal.

En un aspecto de la invención, la proteína modificada tiene función de proteína transportadora, en particular actúa como un vehículo para antígenos.

En algunos aspectos de la invención, la proteína modificada es la proteína de unión a C4 transportadora derivado de pollo denominada IMX313, que comprende una superhélice heptamérica, que se describe en la solicitud de patente WO 2007/062819.

Una proteína modificada específica preferida según la invención es la proteína IMX313 en la que el péptido SPRRRRS (SEC ID nº 2) está unido al dominio de superhélice de IMX313. Las secuencias de aminoácidos de

IMX313, IMX313T e IMX313P se muestran a continuación (el \* representa el codón STOP (de detención)):

5 IMX313 KKQGDADVCGEVAYIQSWSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLVKVELQGLSKE\* (SEC ID nº 6)  
 IMX313T KKQGDADVCGEVAYIQSWSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLVKVELQSPRRRRRS\* (SEC ID nº 7)  
 IMX313P KKQGDADVCGEVAYIQSWSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLVKVEGRRRRRS\* (SEC ID nº 42).

10 En una forma de realización preferida, la proteína que tiene la función de una proteína transportadora es IMX313P (SEC ID nº 42). Una proteína que comprende la secuencia de IMX313P (SEC ID nº 42) asimismo es un objeto de la presente invención, sola o fusionada a uno o más péptidos cargados positivamente y un antígeno u otra proteína.

Asimismo se describe el dominio de superhélice de IMX313P (SEC ID nº 42) unido a un péptido de secuencia SPRRRRRRRRRRS (SEC ID nº 37).

15 En otro aspecto de la invención, la proteína modificada no es una proteína transportadora, sino que es un antígeno. Dicho antígeno oligomérico se selecciona en particular del grupo que consiste en:

- la proteína hemaglutinina HA de la gripe,
- la glucoproteína F del virus sincitial respiratorio,
- 20 - la glucoproteína gp41 del VIH-1,
- la glucoproteína gp41 del VIH-2,
- gp1,2 del virus del Ébola,
- NadA de *Neisseria meningitidis*,
- YadA de *Yersinia enterocolitica*,
- 25 - UspA2 de *Moraxella catarrhalis*,
- BadA de *Bartonella henselae* y
- HadA de *Haemophilus influenza*.

30 La invención se refiere asimismo a una asociación entre una proteína transportadora modificada y un antígeno. Ya se ha demostrado que dicha asociación de una proteína transportadora (IMX313) y un antígeno aumenta la inmunogenicidad de dicho antígeno (véase la solicitud de patente WO 2007/062819). Con una proteína transportadora modificada, el aumento de la inmunogenicidad es incluso mejor que con la proteína IMX313 no modificada.

35 En particular, la proteína transportadora modificada asociada a un antígeno es IMX313P que tiene la secuencia SEC ID nº 42.

40 En una alternativa, los dos componentes asociados están asociados de forma no covalente entre sí. En una alternativa preferida, los dos componentes asociados están acoplados químicamente, y se encuentran en forma de una proteína de fusión. El experto en la materia sabe cómo conectar dos componentes peptídicos con el objetivo de producir una proteína de fusión.

45 La invención se refiere en particular a una proteína de fusión que comprende una proteína transportadora con una superhélice modificada y uno o más antígenos.

En un aspecto preferido de la invención, uno de los antígenos siguientes se fusiona a la proteína modificada IMX313T o IMX313P:

- 50 i) la proteína Proteína A de *Staphylococcus aureus*, mutada tal como se describe (27, 44), o la proteína hemolisina alfa de *Staphylococcus aureus*, o la proteína CifB de *Staphylococcus aureus* o la proteína sortasa A de *Staphylococcus aureus*;
- ii) 85A, una proteína secretada por *Mycobacterium tuberculosis* (28);
- 55 iii) el autoantígeno GnRH;
- iv) el antígeno de *Cryptosporidium* Cp15;
- 60 v) la nucleoproteína de la gripe.

Una proteína de fusión específica según la invención es la proteína IMX313P (SEC ID nº 42) en la que el péptido GRRRRRS (SEC ID nº 36) está unido al dominio de superhélice de IMX313, y la proteína modificada se fusiona con la proteína Proteína A de *Staphylococcus aureus*.

65 Otra proteína de fusión específica según la invención es la proteína IMX313P (SEC ID nº 42) en la que el péptido GRRRRRS (SEC ID nº 36) está unido al dominio de superhélice de IMX313, y la proteína modificada se fusiona

con la proteína 85A.

Una proteína modificada específica preferida según la invención es la proteína IMX313 (SEC ID nº 6) en la que el péptido SPRRRRS (SEC ID nº 2) está unido al dominio de superhélice de IMX313, y la proteína modificada se fusiona con la proteína Proteína A de *Staphylococcus aureus*.

Otra proteína modificada específica preferida según la invención es la proteína IMX313 (SEC ID nº 6) en la que el péptido SPRRRRS (SEC ID nº 2) está unido al dominio de superhélice de IMX313, y la proteína modificada se fusiona con la proteína 85A.

Tal como se muestra en los ejemplos, se utilizaron estos dos antígenos modelo para demostrar que la modificación de las superhélices mejoró su inmunogenicidad. Las respuestas tanto de células B como de células T se mejoraron. Además, las superhélices modificadas fueron más inmunógenas cuando se administraron como proteínas o como ácidos nucleicos.

La invención se refiere asimismo a una composición inmunógena que comprende una proteína del tipo de superhélice modificada tal como se ha descrito anteriormente, o una proteína de fusión tal como se ha descrito anteriormente, y ligandos de ácidos nucleicos para TLR intracelulares. Estos ligandos de ácidos nucleicos para TLR se complejan preferentemente con una proteína transportadora modificada. Ventajosamente, los ligandos de ácidos nucleicos están unidos a la proteína modificada, aunque la proteína transportadora no modificada correspondiente no pudo unirse significativamente a estos ligandos de ácidos nucleicos para TLR.

La invención se refiere asimismo a una composición inmunógena que comprende una proteína del tipo de superhélice modificada tal como se ha descrito anteriormente, o una proteína de fusión tal como se ha descrito anteriormente, y heparina. La heparina está complejada preferentemente con una proteína transportadora modificada. Ventajosamente, la heparina está unida a la proteína modificada, aunque la proteína transportadora no modificada correspondiente no pudo unirse significativamente a la heparina. La descripción se refiere asimismo a un soporte sólido que porta una proteína modificada, estando unida dicha proteína al soporte con el péptido. De hecho, la abundancia de cargas en el péptido es suficiente para unir fuertemente la proteína modificada a la superficie.

La divulgación se refiere asimismo a un procedimiento para aumentar la capacidad de unión a un soporte de una proteína que comprende un dominio de superhélice, que comprende la unión de por lo menos un péptido ZXBBBBZ al dominio de superhélice, en el que:

- Z es cualquier aminoácido, o está ausente,
- X es cualquier aminoácido;
- B es una arginina (R) o una lisina (K).

En particular, el soporte es una columna de cromatografía. Todas las proteínas de superhélices modificadas solubles pueden unirse a dichas columnas, utilizando el péptido cargado positivamente como una etiqueta de afinidad. El operador puede modificar el número de residuos de arginina en el péptido de secuencia general ZXBBBBZ para fortalecer o atenuar la unión. Alternativamente, el operador puede modificar el número de péptidos de la secuencia general ZXBBBBZ para fortalecer la unión. Cuanto menor sea el número de cadenas de proteína en el oligómero, mayor será el número de argininas en el péptido o péptidos que deberán utilizarse. Así, por ejemplo, con una superhélice trimérica, deberán usarse preferentemente nueve o más argininas por cadena para asegurar una purificación similar en heparina-sefarosa.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento para aumentar la inmunogenicidad de una proteína transportadora o de un antígeno que comprende un dominio de superhélice, que comprende la unión de por lo menos un péptido cargado positivamente directamente al dominio de superhélice de dicha proteína para obtener una proteína modificada tal como se establece en la SEC ID nº 42 (IMX313P) o en la SEC ID nº 7 (IMX313T) o la unión directa de la secuencia SEC ID nº 37 (SPRRRRRRRRRS) en la que la proteína tiene un dominio de superhélice trimérica.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento para aumentar la inmunogenicidad de un antígeno que comprende:

- preparar una proteína transportadora modificada tal como se ha descrito anteriormente; y
- asociar dicho antígeno a dicha proteína transportadora modificada y a ligandos de ácidos nucleicos para TLR intracelulares o heparina.

La invención se refiere en particular a un procedimiento para aumentar la inmunogenicidad Th1 de un antígeno, caracterizado por proporciones muy altas de IgG2a con respecto a IgG1, tal como se ejemplifica a continuación, que comprende:

- preparar una proteína transportadora modificada tal como se ha descrito anteriormente; y
- asociar dicho antígeno a dicha proteína transportadora modificada y a ligandos de ácidos nucleicos para TLR intracelulares o heparina.

La invención se refiere asimismo a un antígeno modificado según la invención, o a una proteína de fusión según la invención, para su uso como vacuna.

La presente invención se refiere asimismo a una proteína de fusión tal como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento y la prevención de infecciones estafilocócicas, o para su uso en el tratamiento y la prevención de la gripe.

La invención se refiere asimismo a moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas modificadas y proteínas de fusión, tal como se ha descrito anteriormente.

Además, la presente invención se refiere a una composición de vacuna que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico tal como se ha descrito anteriormente. Las composiciones de vacunas que comprenden moléculas de ácidos nucleicos son bien conocidas por el experto en la materia, y se describen en particular en la solicitud de patente WO2008/122817.

Dichos ácidos nucleicos pueden utilizarse como tales o pueden administrarse en vectores víricos que asimismo se describen en la solicitud de patente WO2008/122817. Algunos vectores víricos se han modificado para producir ácidos nucleicos que posteriormente podrían unirse a los antígenos modificados que están codificados en vectores víricos. La modificación de los vectores víricos para producir ácidos nucleicos se describe en el documento WO 2007/100908.

La presente divulgación se refiere asimismo a un procedimiento para purificar proteínas del tipo de superhélice modificadas, tal como se han descrito anteriormente, que comprende las etapas sucesivas siguientes:

- cargar una columna de cromatografía de heparina-sefarosa con la proteína modificada,
- y eluir dicha proteína con una concentración de sal superior a 500 mM.

### Descripción de los dibujos

Figura 1. Cromatograma de IMX313T purificado en una columna Hi Trap heparin HP. Una columna de heparina-sefarosa separa claramente los contaminantes (picos A y B) de la proteína IMX313T en su mayor parte pura (pico C). La línea de puntos muestra el gradiente de sal utilizado para eluir la proteína modificada.

Figura 2. Ligandos de TLR 9 y la proteína IMX497 (PAm-IMX313T) - Electroforesis en gel de agarosa (0.8% en tampón TAE). La posición en el gel al que migra el oligonucleótido es observable bajo luz ultravioleta cuando el gel se tiñe con bromuro de etidio.

Figura 3. Ligandos de TLR7 y TLR3 y la proteína IMX497 (PAm-IMX313T) - Electroforesis en gel de agarosa (0.8% en tampón TAE).

Figura 4. Ligandos de TLR7 y las proteínas IMX495 (PAm), IMX494 (PAm-IMX313) e IMX497 (PAm-IMX313T) - Electroforesis en gel de agarosa (0.8% en tampón TAE).

Figura 5. Grupos de ratones BALB/C hembra (n = 5) se inmunizaron por vía subcutánea dos veces, en un intervalo de catorce días, con PAm, PAm-IMX313, PAm-IMX313T o PAm formulados en primer lugar en CFA y después en IFA. Veintiocho días después de la primera inmunización, se determinaron los títulos de IgG específicos de PAm en sueros usando un ELISA en el que las placas se recubrieron con PAm. Los resultados se expresan como la DO de muestras medidas a 405 nm + SEM. Las diferencias significativas entre las medias de diferentes grupos se determinaron mediante ANOVA de una vía seguido del ensayo de comparación múltiple de Tukey. Un valor de p < 0.05 se consideró estadísticamente significativo y está representado por diferentes \*, mientras que \*\*\* representa p < 0.001 y \*\* representa p < 0.01.

Figura 6. Niveles de expresión de IFN- $\gamma$  en poblaciones de células T totales. Respuestas inmunitarias mediadas por célula específicas de 85A en ratones inmunizados por vía intramuscular. Grupos de ratones BALB/c hembra (n = 5) se inmunizaron dos veces, con un intervalo de 14 días, con plásmidos que expresan: 85A, 85A-IR14, 85A-TL18, 85A-IMX313 o 85A-IMX313T. Dos semanas después de la última inmunización, los ratones se sacrificaron y se purificaron las células T del bazo. Las células se cocultivaron con proteína 85A recombinante. Las diferencias significativas entre las medias de diferentes grupos se determinaron mediante ANOVA de una vía seguido del ensayo de comparación múltiple de Tukey. Un valor de p < 0.05 se

consideró estadísticamente significativo. Las respuestas de IFN- $\gamma$  en sobrenadantes del cocultivo se expresan como células que secretan IFN- $\gamma$ /millón de células.

5 Figura 7. Niveles de expresión de IFN- $\gamma$  en poblaciones de células T CD8+. Respuestas inmunitarias mediadas por células específicas de 85A en ratones inmunizados por vía intramuscular. Grupos de ratones BALB/c hembra (n = 5) se inmunizaron dos veces, con un intervalo de 14 días, con plásmidos que expresan: 85A, 85A-IR14, 85A-TL18, 85A-IMX313 o 85A-IMX313T. Dos semanas después de la última inmunización, los ratones se sacrificaron y se purificaron células T CD8+ del bazo. Las células se cocultivaron con el péptido 85A p11. Las diferencias significativas entre las medias de los diferentes grupos se determinaron mediante ANOVA de una vía seguido del ensayo de comparación múltiple de Tukey. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. Las respuestas de IFN- $\gamma$  en sobrenadantes del cocultivo se expresaron como células que secretan IFN- $\gamma$ /millón de células.

15 Figura 8. Niveles de expresión de IFN- $\gamma$  en poblaciones de células T CD4+. Respuestas inmunitarias mediadas por células específicas de 85A en ratones inmunizados por vía intramuscular. Grupos de ratones BALB/c hembra (n = 5) se inmunizaron dos veces, con un intervalo de 14 días, con plásmidos que expresan: 85A, 85A-IR14, 85A-TL18, 85A-IMX313 o 85A-IMX313T. Dos semanas después de la última inmunización, los ratones se sacrificaron y se purificaron células T CD8+ del bazo. Las células se cocultivaron con el péptido 85A p15. Las diferencias significativas entre las medias de diferentes grupos se determinaron mediante ANOVA de una vía seguido del ensayo de comparación múltiple de Tukey. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. Las respuestas de IFN- $\gamma$  en sobrenadantes del cocultivo se expresaron como células que secretan IFN- $\gamma$ /millón de células.

25 Figura 9. Grupos de ratones BALB/C hembras (n = 5) se inmunizaron por vía intramuscular dos veces, con 14 días de diferencia, con el plásmido 85A-IMX313, el plásmido 85A-IMX313T y las secuencias más cortas 85AIR14 y 85A-TL18. Veintiocho días después de la primera inmunización, se determinaron los niveles de IgG específicos de 85A en sueros utilizando un ELISA específico de 85A. Los resultados se expresan como la DO de muestras medidas a 405 nm + SEM. Las diferencias significativas entre las medias de diferentes grupos se determinaron mediante ANOVA de una vía seguido del ensayo de comparación múltiple de Tukey. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. NS significa no significativo; los valores de significación se muestran con asteriscos: \*\*\* ( $p < 0.001$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), \* ( $p < 0.05$ )

35 Figura 10: Mapa del plásmido parental pcDNA3-NP: este plásmido y sus derivados, construidos tal como se describe en los ejemplos, se utilizaron para la vacunación con ADN.

Figura 11: Comparación de células T totales que secretan IFN- $\gamma$  en respuesta a la inmunización con un plásmidos que codifican NP, en NP fusionada a IMX313.

40 Figura 12: Comparación de células T CD8 y CD4 que secretan IFN- $\gamma$  en respuesta a la inmunización con un plásmido que codifica NP o un plásmido que codifica NP fusionada a IMX313.

Figura 13: Comparación de respuestas de anticuerpos IgG a NP recombinante inducidas por plásmidos de ADN que codifican NP o NP fusionada a IMX313

45 Figura 14: Comparación de respuestas de subclases de anticuerpos IgG a NP recombinante inducidas por plásmidos de ADN que codifican NP o NP fusionada a IMX313.

50 Figura 15: Comparación de respuestas de células T totales a plásmidos que codifican NP, NP monomérica (NP-M), NP monomérica fusionada a IMX313 (NP-M-IMX313) y NP monomérica fusionada a IMX313T (NP-M-IMX313T).

55 Figura 16: Comparación de respuestas de células T CD8+ y CD4+ a plásmidos que codifican NP, NP monomérica (NP-M), NP monomérica fusionada a IMX313 (NP-M-IMX313) y NP monomérica fusionada a IMX313T (NP-M-IMX313T).

Figura 17: Comparación de respuestas de anticuerpos IgG, medidas por ELISA utilizando NP recombinante, a plásmidos que codifican NP, NP monomérica (NP-M), NP monomérica fusionada a IMX313 y NP monomérica fusionada a IMX313T.

60 Figura 18: Comparación de respuestas de subclases de anticuerpos IgG, medidas utilizando NP recombinante, a plásmidos que codifican NP, NP monomérica (NP-M), NP monomérica fusionada a IMX313 y NP monomérica fusionada a IMX313T.

65 Figura 19: Influencia de la secreción, por el péptido señal tPA, de las diversas proteínas de fusión NP. Las células T totales se midieron mediante ELISpot de IFN $\gamma$  comparando NP, NP secretada (tPA-NP), NP monomérica secretada (tPA-NP-M), NP secretada fusionada a IMX313 (tPA-NP-IMX313), NP monomérica

secretada fusionada a IMX313 y NP monomérica secretada fusionada a IMX313T (tPA-NP-M-IMX313T).

Figura 20: Influencia de la secreción, por el péptido señal tPA, sobre las respuestas de CD8+ y CD4+ a diversas proteínas de fusión NP, medidas por ELISpot de IFN $\gamma$  comparando: NP, NP secretada (tPA-NP), NP monomérica secretada (tPA-NP-M), NP secretada fusionada a IMX313 (tPA-NP-IMX313), NP monomérica secretada fusionada a IMX313 y NP monomérica secretada fusionada a IMX313T (tPA-NP-M-IMX313T).

Figura 21: Influencia de la secreción, por el péptido señal tPA, de las respuestas de IgG a diversas proteínas de fusión NP, medidas por ELISA comparando: NP, NP secretada (tPA-NP), NP monomérica secretada (tPA-NP-M), NP secretada fusionada a IMX313 (tPA-NP-IMX313), NP monomérica secretada fusionada a IMX313 y NP monomérica secretada fusionada a IMX313T (tPA-NP-M-IMX313T).

Figura 22: Influencia de la secreción, por el péptido señal de tPA, sobre las respuestas de subclases de IgG a diversas proteínas de fusión NP, medidas por ELISA comparando: NP, NP secretada (tPA-NP), NP monomérica secretada (tPA-NP-M), NP secretada fusionada a IMX313 (tPA-NP-IMX313), NP monomérica secretada fusionada a IMX313 y NP monomérica secretada fusionada a IMX313T (tPA-NP-M-IMX313T).

Figura 23: Esta figura muestra que la proteína IMX743 se une fuertemente a un oligonucleótido de ADN ODN1826, mientras que el IMX744 se une solo débilmente al mismo oligonucleótido. La electroforesis en gel de agarosa se llevó a cabo en el 0.8% en tampón TAE. La posición en el gel al que migra el oligonucleótido es observable bajo luz ultravioleta cuando el gel se tiñe con bromuro de etidio. Se prepararon diferentes combinaciones del ligando de TLR9 ODN1826 y las proteínas IMX744 e IMX743, tal como se describe en la tabla sobre el gel, y se analizó la formación del complejo mediante electroforesis en gel de agarosa. La formación del complejo fue claramente detectable porque los complejos migraron mucho más lentamente que el ligando sin complejar. A medida que disminuía la concentración de la proteína, los complejos observados se hacían más difusos y se hacía visible una banda de ligando de TLR no unido. El gel muestra que el cambio de gel es reproducible con IMX743 (compárense los carriles 6 y 12), pero que IMX744 (carriles 3-5) produce un cambio que es casi imperceptible en el gel.

## Ejemplos

### 1. Producción de las proteínas IMX313, IMX313T e IMX313P

Se produjo IMX313 mediante clonación de este dominio de oligomerización en un vector de expresión basado en T7 utilizando procedimientos estándar. El producto de PCR contenía un sitio NdeI en el extremo N-terminal y un sitio HindIII que se superponía al segundo codón de detención. La secuencia de nucleótidos es:

SEC ID nº 8:

```
CATATGTCAAAGAAGCAAGGTGATGCTGATGTGTGCGGAGAGGTTGCTTATATTCAGAGCGTCGCTCCGA
TTGCCACGTGCCTACAGCGGAAGTGCCTACTGCTGGAATAACGAAAACCTTCTCTGGAGATTCAAAACT
GAAGGTGGAATTGCAAGGACTGAGCAAGGAGTAATAAGCTT
```

Este gen codifica la secuencia proteica siguiente (SEC ID nº 9):  
MSKKQGDADVCGEVAYIQSWSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLVLELQGLSKE\*\*

Los asteriscos representan codones de detención. La serina de la segunda posición permitió la eliminación completa de la metionina inicial, determinada mediante espectrometría de masas.

Se expresó IMX313 en la cepa de *Escherichia coli* C43 (DE3). Las células transformadas se cultivaron en medio Terrific Broth a 37°C hasta una DO600 de aproximadamente 0.6, luego se indujo la expresión con IPTG a una concentración de 1 mM y el cultivo se cultivó durante la noche a 37°C. Las bacterias recogidas se lisaron por sonicación en un tampón que contenía fosfato sódico 50 mM, pH 7.4, y se centrifugaron a 18,000 rpm durante 30 minutos a 4°C. La proteína IMX313 se encontraba en la fracción soluble.

Se generó IMX313T reemplazando los últimos cinco aminoácidos C-terminales (GLSKE) de IMX313 por el péptido cargado positivamente (SPRRRRS) de la forma siguiente: se creó un sitio de restricción de PstI (CTGCAG: que codifica los aminoácidos leucina y glutamina) mediante mutagénesis dirigida al sitio inmediatamente anterior a los aminoácidos que se van a sustituir (GLSKE). Esto permite la sustitución de los últimos cinco aminoácidos de IMX313 por cualquiera de los aminoácidos codificados por dos oligonucleótidos complementarios que pueden hibridarse y ligarse al sitio PstI y al sitio Hind III justo cadena abajo de los codones de detención.

Los siguientes oligonucleótidos fosforilados reemplazaron la secuencia que codifica LQGLSKE\*\* (SEC ID nº 10) por LQSPRRRRS\*\* (SEC ID nº 11, en la que \* representa un codón de detención), cuando se hibrida y se clona



interactúan con el ADN o el ARN, incluidas polimerasas, ligasas, quinasas y proteínas ribosómicas. en la presente memoria mostramos que la modificación de superhélices mediante la fusión de un péptido cargado positivamente (tal como una cola de poliarginina), confiere la capacidad útil de unirse a la columna de heparina sefarosa cargada negativamente, lo que simplifica enormemente la purificación.

Esto fue inesperado, porque cuando Stempfer *et al.* (19,20) utilizaron seis residuos de arginina fusionados a una enzima para inmovilizar la enzima en heparina-sefarosa, la enzima pudo eluirse de la columna con NaCl que era solo 0.35 M. A esta concentración de sal, otras proteínas de los extractos celulares asimismo se eluirán tal como se muestra en el ejemplo 4, y existe una ventaja significativa al poder eluir la gran mayoría de las proteínas que se unen a la columna con concentraciones de sal inferiores a NaCl 500 mM, y después eluir la proteína de fusión de superhélice modificada con concentraciones incluso mayores de sal en una forma sustancialmente pura. Esto permite realizar un gradiente de etapas o purificaciones por lotes. Por lo tanto, las columnas de heparina-sefarosa se pueden utilizar como columnas de afinidad para proteínas fusionadas a IMX313T, y otras superhélices modificadas de la forma descrita en la presente memoria.

En comparación con columnas de intercambio catiónico tales como Hi Trap SP FF, las columnas de heparina-sefarosa son más útiles porque son más específicas para superhélices modificadas. En nuestro estudio, la proteína IMX313T que se eluyó de la columna de intercambio catiónico (Hi Trap SP FF; pH 7.4) no era totalmente pura. Cuando esta proteína purificada por SP FF y S75 se cargó en una columna de heparina-sefarosa (HiTrap Heparin HP), se eliminaron los trazas de contaminantes en el flujo y la proteína IMX313T se eluyó con una pureza > 98% que muestra que la columna de heparina es más específica que SP FF para la superhélice modificada mediante la adición del péptido SPRRRRS, aunque la proteína se eluyera de ambas columnas a concentraciones similares de NaCl.

#### 4. La heparina sefarosa actúa como una columna de afinidad para superhélices modificadas

Se produjo IMX313 tal como se ha descrito en el ejemplo 1. La fracción soluble se obtuvo después de la sonicación del lisado bacteriano en un tampón que contenía Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5 y centrifugación a 18,000 rpm durante 30 minutos a 4°C en un rotor Sorvall SS34.

El sobrenadante que contenía la proteína de fusión se cargó en una columna Hi Trap heparin HP equilibrada con Tris-HCl 10 mM y NaCl 150 mM, pH 7.5. La elución se llevó a cabo con un gradiente de sal: NaCl 2 M en el mismo tampón. Casi todos los contaminantes se eliminaron en el flujo a través, o con baja concentración de sal; y la proteína IMX313T se eluyó posteriormente con NaCl aproximadamente 1 M con una pureza muy alta (aproximadamente el 95%) en una única etapa cromatográfica. La purificación adicional por filtración en gel produce una proteína esencialmente pura. Los resultados se presentan en la figura 1.

#### 5. Otros péptidos cortos cargados positivamente fusionados a IMX313

Se realizaron otras tres modificaciones de IMX313T para comparar diferentes enlazadores (glicina frente a serina y prolina) o para comparar arginina con lisina. El plásmido que expresa IMX313T se mutó mediante amplificación con los oligonucleótidos:

IMX206: 5' GGAGATTCAAAAAGTGAAGGTGGAAGGTCGCCGTCGCCGTTAATAAGCTTGATCCGGC 3' (SEC ID nº 46) o

IMX207: 5' CTGAAGGTGGAATCTCCGaaaagaaaagTAATAAGCTTGATCCGGCTG 3' (SEC ID nº 47) o

IMX208: GGAGATTCAAAAAGTGAAGGTGGAAGGTAAAAAGAAAAAGTAATAAGCTTGATCCGGC 3' (SEC ID nº 48) y

IMX139 5 'GGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC 3' (SEC ID nº 49)

y el producto de PCR se insertó mediante el procedimiento de Geiser (29) en un vector T7 que expresa la proteína IMX313T.

Los plásmidos resultantes, denominados pIMX427, pIMX428 y pIMX429 codifican las proteínas:

IMX427: MSKKQGDADVCGEVAYIQSWSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVEGRRRR\* (SEC ID nº 50)

IMX428: MSKKQGDADVCGEVAYIQSVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVESPKKKK\* (SEC ID nº 51)

IMX429: MSKKQGDADVCGEVAYIQSVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVEGKKKK\* (SEC ID nº 52)

Estos se purificaron como IMX313P y después se examinó su comportamiento en una columna de 5 ml de heparina-sefarosa en comparación con IMX313T e IMX313P.

	Ve (ml)	NaCl (mM)	C-terminal	pl
--	---------	-----------	------------	----

IMX428	34.4	786	SPKKKK	8.88
IMX429	37.38	817	GKKKK	8.88
IMX313T	41.18	901	SPRRRRS	9.18
IMX427	44.24	968	GRRRR	9.02
IMX313P	48.38	1058	GRRRRRS	9.41

Las condiciones fueron las siguientes: Tampón cargado Tris 20 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM. Después se llevó a cabo una elución en gradiente utilizando un segundo tampón. El segundo tampón fue Tris 20 mM, pH 7.5, y NaCl 2 M.

5

Estos resultados pueden compararse con los experimentos de Fromm y sus colegas (47), que mostraron que un péptido de siete argininas se eluyó a partir de heparina sefarosa a una concentración de NaCl 820 mM, y un péptido de siete lisinas se eluyó a una concentración 640 mM de NaCl. Claramente, la fusión de péptidos cargados positivamente a una superhélice mejora su unión a la heparina.

10

**6. Producción y purificación del antígeno PAm y de las proteínas de fusión PAm-IMX313 y PAm-IMX313T.**

Para producir el antígeno PAm fusionado a IMX313, la proteína A del marco de lectura abierto de *Staphylococcus aureus* se amplificó a partir del plásmido pEZZ18 (Amersham Pharmacia) utilizando los oligonucleótidos:

15

SEC ID nº 15 - IMX1078: 5' CTTTAAGAAGGAGATATACATATGgctgatgcaacaaaataac 3' y  
SEC ID nº 16 - IMX1079: 5' CCGCACACatcagcatcacctgtcttttggctgctgagcatcatttagc 3'

20

y el producto de PCR de ~233 pb (pares de bases) se insertó mediante el procedimiento de Geiser (29) en un vector T7 que expresa la proteína IMX313. El marco de lectura de la proteína A se mutó después utilizando los oligonucleótidos:

25

SEC ID nº 17 - IMX1080: 5' cttcaacaagaAaaaAaGunaUNAcgccttctatg 3' y  
SEC ID nº 18 - IMX1081: 5' gcgcttggctggagccgctttaagcttgg 3'

para introducir las mutaciones descritas por Kim *et al.* (27), creando el vector de expresión pIMX494, que tiene el siguiente casete de expresión (SEC ID nº 19):

30

atggctgatgcaacaaaataactcaacaaaggaagaaagaaacgccttctatgaatc  
ttgaatagcctaacttaaacgaagaacaacgaatggtttcatcceaagcttaaaagcg  
gctccaagcceaagcgctaacttttagcagaagctaaaagctaaatgatgctcaagca  
caaaaagcaaggtgatgctgatgtgtgaggagagggtgcttatattcagagcgtcgtc  
tccgattgccacgtgcttacagcggaactgcgtactctgctggaatacgaaaactcttc  
ctggagattcaaaaactgaaggtggaattgcaataataa

Este codifica la proteína siguiente (SEC ID nº 20):

35

MADAQQNNFNKGGKNAFYEILNMPNLNEEQNRNGFIQSLKAAPSQSANLLAEAKKLNDAQPKKQGDADVCGEVAY  
IQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVELQ\*\*

40

Debe apreciarse que esta versión de IMX313 carece de los últimos cinco aminoácidos (GLSKE) encontrados en la versión de cincuenta y cinco aminoácidos para facilitar la interpretación de las inmunizaciones planificadas. La proteína de fusión IMX494 (PAm-IMX313) se expresó en la cepa C43 (DE3) en inducción con IPTG. El sedimento celular se lisó por sonicación en Tris-HCl 20 mM, pH 7, y se centrifugó a 18,000 rpm durante quince minutos a 4°C. La proteína de fusión se encontró en el sedimento que después se sonicó en un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM, urea 3 M, pH 7.4, y se centrifugó nuevamente a 18 000 rpm. Esta vez, la proteína de fusión se encontraba en el sobrenadante, que se cargó en una columna Hi Trap Q FF de 5 ml y la columna se desarrolló con un gradiente de NaCl 1 M.

45

Las fracciones que contenían la proteína IMX494 se dializaron agrupadas frente a PBS y se purificaron adicionalmente mediante filtración en gel en una columna Hi Load 26/60 Superdex 75.

50

Para producir el antígeno PAm no fusionado a la proteína transportadora, la secuencia codificante de IMX313 se eliminó del vector pIMX494 utilizando los oligonucleótidos:

SEC ID nº 21 - IMX1279 5' gcagccggatcaagcttatttttggcttgagcatc 3' y SEC ID nº 22 - T7 directo: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'. El producto de PCR se insertó (27) en el vector parental creando el plásmido pIMX495.

5 Se indujo un cultivo de 500 ml de pIMX495 en la cepa C43 (DE3) con IPTG 1 mM y se cultivó durante la noche. Las bacterias recogidas se lisaron por sonicación en el tampón: fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4, y se centrifugaron a 18,000 rpm durante 15 minutos a 4°C en un rotor Sorvall SS34. La proteína IMX495 (PAm sin su metionina N-terminal) se encontró en el sobrenadante y se purificó calentando el sobrenadante a 76°C durante quince minutos, operación seguida de una segunda centrifugación a 18k durante 15 minutos. De nuevo, se encontró IMX495 en el sobrenadante, que se dializó frente a un tampón de MES 50 mM, pH 6. El sobrenadante se cargó en una columna Hi Trap SP FF de 5 ml y se eluyó con un gradiente de NaCl. Finalmente, la proteína IMX495 se refinó mediante filtración en gel en PBS en una columna Hi prep 26/60 sephacryl S-100 HR.

15 Para producir el vector pIMX497 que codifica la proteína de fusión PAm-IMX313T, el vector pIMX494 se modificó mediante mutación de forma sinónima de la secuencia que codifica los dos últimos aminoácidos leucina y glutamina de TTGCAA a CTGCAG, y luego se clonó entre el sitio Pst I recién creado y el sitio Hind III superponiendo al segundo codón de detención los oligonucleótidos;

20 SEC ID nº 23- 5' GTCTCCGCGTCGCCGTCGCTCCTAATA 3' y  
SEC ID nº 24- 5' AGCTTATTAGGAGCGACGGCGACGCGGAGACTGCA 3'

cambiando el extremo C-terminal de IMX313 de LQ\*\* a LQSPRRRRS\*\* (SEC ID nº 11).

25 La proteína IMX497 codificada se expresó luego en la cepa C43 (DE3) y se purificó lisando el sedimento bacteriano en fosfato sódico 50 mM, pH 7.4, y centrifugando a 18k rpm. La proteína de fusión se encontró en el sedimento y se resuspendió por sonicación en fosfato de sodio 50 mM, urea 8 M, pH 7.4. Después de una centrifugación adicional, el sobrenadante se dializó frente a fosfato de sodio 50 mM a pH 7.4 y el dializado se centrifugó. El sobrenadante se calentó a 75°C durante quince minutos y después se centrifugó de nuevo. El sobrenadante se purificó en una columna Hi Trap SP FF desarrollada con un gradiente de NaCl a 2 M, y las fracciones que contenían la proteína de fusión IMX497 se agruparon, se dializaron frente a PBS y se pulieron por filtración en gel en una columna Hi Load 26/60 Superdex 75.

## 7. Unión de ligandos de TLR intracelulares

35 Para determinar si estas proteínas podrían unirse a ligandos de TLR intracelulares, se llevaron a cabo ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA).

Se prepararon diferentes combinaciones de ligandos de TLR intracelulares y la proteína IMX497 (PAm-IMX313T), y se analizó la formación de complejos mediante electroforesis en gel de agarosa.

40 Los ligandos de TLR utilizados fueron los siguientes:

45 Para TLR3: poli I:C que es un dúplex de un polinucleótido de ácido polinosínico hibridado a ácido policitidílico, un análogo de ARN bicatenario. La longitud de la cadena era de veinte nucleótidos para cada hebra.

Para TLR7: un oligonucleótido, denominado ssRNA40, con la secuencia 5' GsCsCsCsGsUsCsUsGsUsGsUsGsUsGsAsCsUsC 3' en la que "s" representa un enlace fosfotioato (SEC ID nº 25);

50 Para TLR9: un oligonucleótido denominado ODN1826 con la secuencia: 5' tccatgacgttctctgacgtt 3' (SEC ID nº 26).

Para los ligandos de TLR9, los resultados se presentan en la figura 2. De izquierda a derecha:

55 Carril 1: escalera de masa molecular baja (NEB);  
Carril 2: proteína IMX497 (1 mg/ml);  
Carril 3: ODN CpG - FITC (Eurogentec) 10 µM;  
Carril 4: proteína IMX497 (1 mg/ml) y ODN CpG - FITC 10 µM;  
Carril 5: proteína IMX497 (0.5 mg/ml) y ODN CpG - FITC 10 µM;  
60 Carril 6: proteína IMX497 (0.25 mg/ml) y ODN CpG - FITC 10 µM;  
Carril 7: proteína IMX497 (0.125 mg/ml) y ODN CpG - FITC 10 µM.

65 La formación del complejo fue claramente detectable, debido a que los complejos migraron mucho más lentamente que el ligando sin complejar, "desplazando", por lo tanto, el ligando en el gel. A medida que disminuía la concentración de la proteína, los complejos observados se hacían más difusos, y se volvía visible una banda de ligando de TLR no unido (migraba a la misma distancia que la muestra que contenía solo el ligando de TLR

utilizada como control).

Las combinaciones de la proteína IMX497 con los ligandos de TLR7 y TLR3 se muestran en la figura 3; estos ácidos nucleicos asimismo formaron complejos que fueron fácilmente detectados por los EMSA.

5

Leyenda de la figura 3 (ligandos de TLR7 o ligandos de TLR3 + IMX497):

- 10 Carril 1: escalera de baja masa (NEB);  
 Carril 2: proteína IMX497 (1 mg/ml);  
 Carril 3: ARNmc - FITC (Eurogentec) 10  $\mu$ M;  
 Carril 4: proteína IMX497 (1.5 mg/ml)/ARNmc - FITC 10  $\mu$ M;  
 Carril 5: proteína IMX497 (1 mg/ml)/ARNmc - FITC 10  $\mu$ M;  
 Carril 6: proteína IMX497 (0.5 mg/ml)/ARNmc - FITC 10  $\mu$ M;  
 Carril 7: proteína IMX497 (0.25 mg/ml)/ARNmc - FITC 10  $\mu$ M;  
 15 Carril 8: proteína IMX497 (0.125 mg/ml)/ARNmc - FITC 10  $\mu$ M;  
 Carril 9: ARNmc - FITC 10  $\mu$ M;  
 Carril 10: control negativo;  
 Carril 11: poli (I:C) (R&D TOCRIS Bioscience) 0.5 mg/ml;  
 Carril 12: proteína IMX497 (1.5 mg/ml)/Poli (I:C) 0.5 mg/ml;  
 20 Carril 13: proteína IMX497 (1 mg/ml)/Poli (I:C) 0.5 mg/ml;  
 Carril 14: proteína IMX497 (1 mg/ml)/Poli (I:C) 0.25 mg/ml;  
 Carril 15: proteína IMX497 (0.5 mg/ml)/Poli (I:C) 0.5 mg/ml;  
 Carril 16: proteína IMX497 (0.5 mg/ml)/Poli (I:C) 0.25 mg/ml  
 Carril 17: proteína IMX497 (0.25 mg/ml)/Poli (I:C) 0.5 mg/ml

25

Se examina asimismo si IMX494 (PAm-IMX313) e IMX495 (PAm) asimismo podrían producir tales cambios de gel con el oligonucleótido de CpG (ligandos TLR9). Los resultados se muestran en la figura 4.

Leyenda de la figura 4:

30

- Carril 1: escalera de masa molecular baja (NEB);  
 Carril 2: proteína IMX497 (1 mg/ml);  
 Carril 3: proteína IMX494 (1 mg/ml)  
 Carril 4: proteína IMX495 (1 mg/ml)  
 35 Carril 5: ODN CpG - FITC (Eurogentec) 10  $\mu$ M;  
 Carril 6: proteína IMX497 (1.5 mg/ml) y ODN CpG - FITC 10  $\mu$ M;  
 Carril 7: proteína IMX497 (1 mg/ml) y ODN CpG - FITC 10  $\mu$ M;  
 Carril 8: proteína IMX497 (0.5 mg/ml) y ODN CpG - FITC 10  $\mu$ M;  
 Carril 9: proteína IMX497 (0.25 mg/ml) y ODN CpG - FITC 10  $\mu$ M;  
 40 Carril 10: proteína IMX494 (1 mg/ml) y ODN CpG - FITC 10  $\mu$ M;  
 Carril 11: proteína IMX494 (0.5 mg/ml) y ODN CpG - FITC 10  $\mu$ M;  
 Carril 12: proteína IMX494 (0.25 mg/ml) y ODN CpG - FITC 10  $\mu$ M;  
 Carril 13: proteína IMX495 (1 mg/ml) y ODN CpG - FITC 10  $\mu$ M;  
 Carril 14: proteína IMX495 (0.5 mg/ml) y ODN CpG - FITC 10  $\mu$ M;  
 45 Carril 15: Proteína IMX495 (0.25 mg/ml) y ODN CpG - FITC 10  $\mu$ M

El gel de la figura 4 muestra que el cambio de gel es reproducible con IMX497, pero que IMX495 (carriles 13-15) no produce cambio de gel detectable y que los cambios de gel observados con IMX494 (carriles 10-12) son apenas detectables, y mucho menos marcados que los observados con IMX497.

50

La diferencia entre IMX494 e IMX497 es la presencia de la secuencia SPRRRRS presente en IMX497, fusionada al extremo C-terminal de la superhélice de la proteína.

Conclusión: sin el péptido, la proteína de fusión IMX313 y el antígeno PAM son incapaces de unirse a los ligandos de ácido nucleico para receptores TLR.

55

### 8. Inmunogenicidad de antígenos asociados con IMX313T

Después se realizaron inmunizaciones de ratones para determinar la inmunogenicidad de PAm, ya sea solo o fusionado a IMX313 o IMX313T, y con o sin formulación con los ligandos de TLR intracelulares. Se utilizó como control PAm formulado con adyuvante completo o incompleto de Freund (CFA/IFA).

60

Con este fin, se inmunizaron ratones BALB/C hembra por vía subcutánea dos veces, con un intervalo de 14 días, utilizando 2 nanomoles de cada proteína por inyección, con PAm, PAm-IMX313, PAm-IMX313T o PAm formulados en primer lugar en CFA y después en IFA. Veintiocho días después de la primera inmunización, se determinaron los títulos de IgG específicos de PAm en sueros utilizando un ELISA en el que las placas se

65

recubrieron con PAm.

Los resultados se expresan como la DO de muestras medidas a 405 nm + SEM. Las diferencias significativas entre las medias de los diferentes grupos se determinaron mediante ANOVA de una vía seguido del ensayo de comparación múltiple de Tukey. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo y se representa por diferentes \*, mientras que \*\*\* representa  $p < 0.001$  y \*\* representa  $p < 0.01$ . Los resultados se muestran en la figura 5. Los ratones inmunizados con PAm solo tenían niveles muy bajos de anticuerpos IgG anti-PAM en su suero o carecían de los mismos. Los ratones inmunizados con PAm-IMX313 o PAm-IMX313T, por otra parte, mostraron niveles elevados de respuestas sistémicas de anticuerpos IgG específicos de PAm; sin embargo, los ratones inmunizados con PAm-IMX313T tuvieron respuestas de anticuerpos IgG significativamente más altas ( $p < 0.001$ ) en comparación con las de los ratones inmunizados con PAm-IMX313; se obtuvieron respuestas similares a PAm-IMX313T con PAm + CFA/IFA como adyuvantes.

Esto muestra que la adición del péptido SPRRRRS confiere una inmunogenicidad significativamente mejorada al antígeno en comparación con la secuencia parental IMX313.

Cuando el antígeno PAm se formuló con los ligandos de TLR intracelulares (ya sea de ADN o ARN monocatenarios o ARN bicatenario), su inmunogenicidad se mejoró sustancialmente, y se observaron mejoras similares cuando el antígeno se fusionó a IMX313 antes de su formulación. Sin embargo, se observaron claramente los mejores resultados cuando el antígeno se fusionó a IMX313T antes de formularse con los ligandos de TLR.

Los resultados se tabulan en la presente memoria y se muestran esquemáticamente a continuación.

Tabla 1: Títulos de dilución de punto final de IgG frente a PAm

	PAm	PAm-IMX313	PAm-IMX313T
Sin adyuvante	0	800	1600
Con Poli I:C	100	3200	12800
Con ODN CpG	100	3200	6400
Con ARNmc	0	2400	6400
Con CFA/IFA	1600	-	-

Una cuestión interesante es si estas mejoras modifican los tipos de respuestas inmunitarias obtenidas contra el antígeno, en este caso PAm. ¿Se mejoran selectivamente las respuestas de Th1 o Th2? Para responder a esto, comparamos las respuestas de IgG1 con las respuestas de IgG2a, ya que los títulos de IgG1 son representativos de las respuestas de tipo Th2, mientras que IgG2a representa las respuestas de tipo Th1. Los resultados se presentan en la tabla 2.

Se evidencia que PAm por sí mismo induce respuestas Th1 y Th2 casi igualmente, pero su formulación con adyuvante de Freund cambia esto drásticamente, siendo la respuesta Th2 (IgG1) ahora predominante. La fusión de PAm a IMX313 muestra que tanto las respuestas Th1 como Th2 aumentan, y no hay ningún cambio significativo en el tipo de respuesta. Con IMX313T, la respuesta Th1 (IgG2a) comienza a predominar, pero el efecto es mucho menos marcado que con adyuvante de Freund y en la dirección opuesta. El consenso entre los inmunólogos es que las respuestas Th1 son preferibles a las respuestas Th2.

Continuando con este análisis, examinamos si la formulación con ligandos de TLR intracelulares podría utilizarse para redirigir al sistema inmunitario para que produzca respuestas Th1 o Th2. Se utilizaron datos de isotipos de anticuerpos IgG para evaluar el tipo de respuesta Th, con un predominio de anticuerpos IgG2a o IgG1 que indican una respuesta tipo Th1 o Th2, respectivamente. Las respuestas de tipo Th1 tenían relaciones muy altas de IgG2a con respecto a IgG1, de forma que la media del grupo asimismo era alta. La relación IgG2a/IgG1 se usó como indicador de una respuesta predominantemente de Th1 (IgG2a > IgG1), predominantemente de Th2 (IgG1 > IgG2a), o una respuesta mixta de Th1/Th2 (Th0, IgG1 = IgG2a).

Los resultados se muestran en la tabla 2 siguiente:

Composicion inmunógena	IgG1 específico de PAm	IgG2a específico de PAm	Relación IgG2a/IgG1	Respuesta TH
PAm	0.147	0.150	1.02	Th0
PAm-CFA/IFA	0.530	0.241	0.45	Th2
PAm-IMX313	0.387	0.497	1.28	Th1
PAm-IMX313T	0.436	0.686	1.57	Th1
PAm-IMX313T + ligandos de TLR9	0.301	0.896	2.97	Th1
PAm-IMX313T + ligandos de TLR7	0.391	0.71	1.81	Th1
PAm-IMX313T + ligandos de TLR3	0.424	1.28	3.25	Th1



se incubó durante 15 minutos. Después de un lavado adicional, se contaron las manchas rojas bajo el microscopio.

Las células T CD4+, T CD8+ y T totales de bazo purificadas aisladas a partir de los ratones inmunizados con 85A-IMX313, 85A-IR14 o 85A-TL18 o 85A-IMX313T mostraron respuestas de IFN- $\gamma$  significativamente mayores en comparación con las de los ratones inmunizados con 85A, y confirmaron la capacidad de IMX313 y las otras secuencias modificadas para aumentar las respuestas de las células T. Además, las células T CD4+, CD8+ y totales de bazo de los ratones vacunados con 85A-IMX313T produjeron significativamente más IFN- $\gamma$  que las de cualquiera de los otros grupos inmunizados ( $p < 0.001$ ) (figuras 6, 7, 8).

Las células T CD8+ mostraron un perfil de citoquinas diferente en comparación con células T CD4+; la población predominante productora de citoquinas observada fue células T CD8+ que produjeron IFN- $\gamma$  (figuras 7 y 8).

Cabe destacar que las respuestas de células T específicas de antígeno tanto CD4+ como CD8+ se mejoran cuando IMX313 se reemplaza por IMX313T.

En conclusión, las respuestas de las células T al antígeno 85A, que se mejoran con IMX313 se mejoran adicionalmente al utilizar IMX313T en su lugar.

## 10. Respuestas de células B inducidas por vacunación con ADN

Los títulos de anticuerpos para el antígeno 85A se midieron mediante ELISA en los sueros de los ratones que se inmunizaron con vacunas de ADN (figura 9).

Los ratones inmunizados con el plásmido 85A-IMX313, el plásmido 85A-IMX313T y las versiones más cortas de IMX313 (IR14 y TL18) desarrollaron títulos de IgG totales específicos de antígeno significativamente más elevados (figura 9) que los inmunizados con el plásmido que expresa 85A. El grupo inmunizado con 85A-IMX313T mostró las respuestas más altas de IgG ( $p < 0.001$ ). Los ratones inmunizados con 85A solo tenían niveles muy bajos de anticuerpo IgG anti-85A en sus sueros.

La redirección de respuestas inmunitarias hacia Th1 cuando se añade el péptido corto cargado positivamente SPRRRRS asimismo se observó cuando se utiliza ADN para la vacunación. Medimos los isotipos de IgG específicos para la proteína 85A en ELISA (tabla 3). El isotipo IgG2a está asociado con una Th1 y el isotipo IgG1 está asociado con una respuesta inmunitaria de tipo Th2 en ratones BALB/c.

Cabe destacar que el uso de IMX313 o IMX 313T condujo a un cambio hacia el tipo 1 de T colaboradora (Th1) asociada a IgG específicas de antígeno, con niveles significativamente elevados de IgG2a y niveles reducidos de IgG1 en comparación con el antígeno 85A solo (tabla 3) y estos resultados constituyen una evidencia directa de una polarización de Th1; estos resultados son coherentes con los resultados observados con las respuestas inmunitarias celulares.

Tabla 3. Se inmunizaron grupos de ratones BALB/C hembra ( $n = 5$ ) por vía intramuscular dos veces, con 14 días de diferencia, con plásmidos que expresan 85A-IMX313, 85A-IMX313T, las secuencias más cortas de IMX313 85AIR14 y 85A-TL18, y 85A solo. Veintiocho días después de la primera inmunización, se determinaron los niveles de IgG1 e IgG2a específicos de 85A en sueros utilizando un ELISA específico de 85A. Los resultados se expresan como la DO de muestras medidas a 405 nm + SEM. Cuando analizamos como anteriormente los mismos datos para clasificar estos datos de isotipo observamos:

Tabla 3:

	Relación IgG2a/IgG1	Respuesta TH
85A	0.8	Th2
85A-IR14	1.6	Th1
85A-TL18	1.47	Th1
85A-IMX313	1.73	Th1
85A-IMX313T	2.57	Th1

Claramente, todas las versiones de IMX313 tienden a aumentar preferentemente las respuestas Th1, y el efecto es más marcado con la versión de IMX313T que tiene el péptido corto cargado positivamente fusionado a la superhélice.

## 11. Uso de un antígeno de la proteína de fusión IMX313T + nucleoproteína (NP) de la gripe

Para las vacunaciones de ADN, el plásmido parental pcDNA3-NP, tal como se muestra en la figura 10, se modificó tal como se describe en el ejemplo siguiente.

11.1 - Inserción de IMX313 en plásmidos que codifican NP

La secuencia codificante de IMX313 se amplificó a partir del plásmido pIMX494 utilizando los cebadores oligonucleotídicos IMX1289 5' caatgcagaggagtagcacaatgatccaagaagcaaggtagtgctgatg 3' (SEC ID n° 53) e IMX1290 5' GTAGAAACAAGGGTATTTTTCTTtattactccttgctcagtccttgc 3' (SEC ID n° 54) y se insertó en el plásmido pcDNA3-NP tal como se describe por Geiser (29).

11.2 - Inserción del péptido señal tPA

El péptido señal tPA se amplificó a partir del vector pSG2-85A (28) utilizando los oligonucleótidos IMX1305 5' cactgagtgacatcaaaatcatgGATGCAATGAAGAGAGGGC 3' (SEC ID n° 55) e IMX1306 5' cgtaagaccgtttgtgctccttgtagctcttctgaatcgggatggattcc 3' (SEC ID n° 56) y se insertó en marco con el extremo N-terminal de la secuencia de codificación de NP en una serie de plásmidos tal como se describe por Geiser (29).

11.3 - Creación de dos mutaciones puntuales de NP para hacerla monomérica

Se utilizaron los cebadores oligonucleotídicos IMX1287 5' ccattctgccgcatttgCagatctaagag 3' (SEC ID n° 57) e IMX1288 5' CAAAAGGGAGATTTGCCTGTACTGAGAAC 3' (SEC ID n° 58) para amplificar un fragmento interno del gen NP y el producto de PCR resultante se insertó en plásmidos que codifican NP tal como se describe por Geiser. Debido a que ambos oligonucleótidos se emparejaron de forma imperfecta con el gen NP, la inserción del producto de PCR generó dos mutaciones puntuales. El cebador IMX1287 creó la mutación E339A (GAA a GCA), mientras que el cebador IMX1288 creó la mutación R416A en el gen NP (AGA a GCA).

11.4 - Inserción de IMX313T

La secuencia de codificación IMX313T se amplificó a partir del plásmido pIMX497 utilizando los cebadores oligonucleotídicos IMX1289 (SEC ID n° 53) e IMX051 5' GTAGAAACAAGGGTATTTTTCTTtattaggagcgcagcgacgc 3' (SEC ID n° 59) y se insertaron en los diversos plásmidos derivados de pcDNA3-NP tal como se describe por Geiser.

11.5 - Inmunizaciones de ADN con los ácidos nucleicos según la invención

11.5.1. Protocolo

Se inmunizaron grupos de cinco ratones BALB/C hembra por vía intramuscular dos veces, con un intervalo de 14 días, con varios ADN de plásmidos, utilizando 20 µg de cada plásmido por inyección. Las respuestas inmunitarias se midieron el día 28, para determinar la influencia de varias modificaciones: +/- IMX313 o IMX313T; +/- el péptido señal tPA; +/- las mutaciones monomerizantes.

Las respuestas de células T específicas de antígeno se midieron mediante ELISPOT, utilizando esplenocitos, el día 28. Se cocultivaron células T CD4+, CD8+ y totales de bazo purificadas aisladas de los ratones inmunizados con NP-péptido A de la gripe (aminoácidos 366-374) adquirido de Eurogentec.

Ensayos ELISPOT: Se recubrieron placas de nitrocelulosa de 96 pocillos de fondo plano (Millititer; Millipore) con mAb IFN-γ (15 µg/ml; MABTECH, Estocolmo) y se incubaron durante la noche a 4°C. Después de lavar con PBS, las placas se bloquearon con suero fetal bovino al 10% durante una hora a 37°C. Se estimularon 2 x 10<sup>6</sup> células por pocillo con péptidos relevantes a una concentración final de 2 µg/ml (NP-péptido A de la gripe) en membranas de IPVH recubiertas con 15 µg/ml de IFN-γ antihumano y se incubaron durante 20 horas. Después de la incubación, las placas se lavaron a fondo con PBS para retirar las células y se añadió a cada pocillo mAb IFN-γ (1 µg/ml de biotina, MABTECH). Después de la incubación durante 2 horas a 37°C, las placas se lavaron y se desarrollaron con estreptavidina-HRP (1 µg/ml; MABTECH) durante una hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se añadió el sustrato (3-amino-9-etilcarbazol (Sigma)) y se incubó durante 15 minutos. Después de un lavado adicional, se contaron las manchas rojas bajo el microscopio.

Para estudiar las respuestas inmunitarias humorales, evaluamos los niveles de anticuerpos por ELISA específicos para IgG total, y por separado para IgG1 e IgG2a para evaluar las proporciones relativas de Th1 y Th2. Los ratones BALB/c responden normalmente a las vacunas contra la gripe con una respuesta inmunitaria de tipo Th2, que está asociada con la estimulación de anticuerpos IgG1. Sin embargo, el principal isotipo de anticuerpo presente en los sueros de ratones que sobreviven a las infecciones víricas es IgG2a, que se estimula durante las respuestas inmunitarias de tipo Th1 (32). La estimulación de anticuerpos IgG2a se ha asociado con una mayor eficacia de la vacunación contra la gripe.

Para los ELISA, los antígenos se diluyeron a una concentración de 5 mg/ml en carbonato/bicarbonato de sodio 0.1 M (pH 9.6) y después se utilizaron para recubrir los pocillos de placas MaxiSorb (Nunc-Immulon, Dinamarca). Se agregaron dos diluciones seriadas de los sueros de ensayo a los pocillos y, después del lavado, se

detectaron anticuerpos unidos con IgG anti-ratón, o IgG1 anti-ratón o IgG2a anti-ratón (Sigma) conjugados con peroxidasa de rábano picante. Se determinó la absorbancia a 490 nm después de añadir o-fenilendiamina (Sigma) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; las reacciones se detuvieron con ácido sulfúrico 1 M.

5 Los resultados se muestran en las figuras 11 a 14.

11.5.2. En experimentos preliminares, analizamos las respuestas de células T totales a NP inducidas por vacunas de ADN que codifican o bien NP o bien NP fusionada a IMX313. Las células T totales aisladas de los ratones inmunizados con NP-IMX313 mostraron respuestas de IFN- $\gamma$  significativamente más altas en comparación con las de los ratones inmunizados con NP y confirmaron la capacidad de IMX313 para aumentar las respuestas de las células T.

La figura 11 muestra que la fusión del gen del antígeno NP parental con el gen IMX313 mejora las respuestas de las células T a NP.

11.5.3. Para determinar si el IFN- $\gamma$  detectado en los ELISPOT era producido por células T CD4 o CD8, purificamos células T CD4+ y CD8+ del bazo de los ratones inmunizados, y estas se cocultivaron con un péptido NP-A de la gripe. Se detectó un aumento significativo en la producción de IFN- $\gamma$  a partir de células T CD8+ en el grupo inmunizado con NP-IMX313. El porcentaje de células CD8+ específicas de antígeno que producen IFN- $\gamma$  fue mayor que la población correspondiente de T CD4+ (figura 12).

La figura 12 muestra que la fusión del gen del antígeno NP con el gen IMX313 mejora las respuestas tanto de CD4+ como de CD8+ al antígeno NP.

11.5.4. A continuación examinamos la respuesta de anticuerpos a NP después de la inmunización y 14 días después de la última inmunización; las respuestas de Ab (anticuerpo) IgG específicas de NP se midieron en sueros. Los ratones de control NP y los ratones a los que se les administró NP-IMX313 mostraron Ab IgG específicos de NP moderados (figura 13), que eran más altos en el grupo inmunizado con NP-IMX313.

La figura 13 muestra que la fusión del gen NP con el gen IMX313 mejora las respuestas de los anticuerpos IgG al antígeno NP.

11.5.5. Asimismo se examinaron los sueros para determinar la presencia de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos de NP (representativos de los tipos de respuesta Th2 y Th1 en ratones Balb/C, respectivamente). Se detectaron isotipos de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos de NP en los sueros de los ratones inmunizados con NP-IMX313; sin embargo, las muestras de suero de ratones que recibieron NP solo mostraron niveles bajos de Ab IgG1 e IgG2a (figura 14).

La figura 14 muestra las distribuciones de subclases de los anticuerpos inducidos contra el antígeno NP. La fusión con el gen IMX313 mejoró la respuesta IgG2A más que la respuesta IgG1, convirtiendo una respuesta sesgada a Th2 contra NP en una respuesta sesgada a Th1 contra NP-IMX313.

#### 11.6 - Producción de proteína NP-M-IMX313T recombinante

Se sintetizó un gen sintético que codifica la proteína NP-M-IMX313T con codones optimizados para la expresión en Escherichia coli. Este gen sintético se clonó en un vector de expresión basado en T7 pIMX04 (este es el vector pRsetC de Invitrogen en el que el origen f1 se ha reemplazado por el locus *par* del plásmido pSC101). La expresión se indujo en varios medios estándar (LB, medio de autoinducción de Studier) y la proteína sobreexpresada se purificó inicialmente tal como se describe por Ye (30) y Tarus (31) para las etapas de clarificación e intercambio iónico, pero en una etapa final la proteína de fusión se purificó por afinidad en heparina sefarosa, tal como se ha descrito anteriormente.

11.7. La proteína recombinante NP-M-IMX313T se usa para inmunizaciones de la forma siguiente:

Se inmunizan grupos de cinco ratones BALB/C hembra por vía intramuscular dos veces, con 14 días de diferencia, con varias preparaciones de proteínas (con o sin formulación con ligandos de TLR), utilizando 2 nanomoles de proteína por inyección. Las respuestas inmunitarias se miden el día 28, para determinar las respuestas de células T específicas de antígeno (medidas por ELISPOT), utilizando esplenocitos. Las respuestas de anticuerpos preinmunitarios y del día 28 se midieron mediante ELISA con NP como antígeno.

#### Resultados:

La figura 15 muestra que la monomerización de NP mejora ligeramente su inmunogenicidad, que esta se mejora adicionalmente mediante la fusión con el gen IMX313, pero que la mayor mejora se obtiene fusionando el NP monomérico con el gen IMX313T.

La figura 16 muestra que, en el análisis de las respuestas de CD4+ y CD8+, se observa el mismo orden de clasificación que en la figura 6: la monomerización de NP mejora ligeramente la inmunogenicidad de las NP; esta se mejora adicionalmente mediante fusión con el gen IMX313, pero la mayor mejora se obtiene fusionando la NP monomérica con el gen IMX313T.

5

La figura 17 muestra que se observó el mismo orden de clasificación para respuestas de células B que el que se observó para respuestas de células T (tanto CD4+ como CD8+) en las figuras 6 y 7. Las respuestas totales de IgG contra NP fueron mayores con IMX313T que con IMX313.

10

La figura 18 muestra las distribuciones de subclases de los anticuerpos inducidos contra el antígeno NP monomérico. Al igual que con NP, la fusión con el gen IMX313 aumentó la respuesta de IgG2A más que la respuesta de IgG1, convirtiendo una respuesta sesgada a Th2 contra NP en una respuesta sesgada a Th1 contra NP-IMX313. De particular interés, esta inversión de un sesgo a Th2 a un sesgo a Th1 se amplificó por fusión con IMX313T más que con IMX313. La expresión de los anticuerpos IgG2a en las vacunas contra la gripe se correlaciona con la clarificación del virus y el aumento de la protección contra el desafío letal de la gripe. El aumento de la inducción de ambos isotipos de anticuerpos medidos por ELISA fue una mejor correlación para la eficacia de la vacuna que la neutralización sola (32).

15

#### 11.8 - La secreción del antígeno NP mejoró su inmunogenicidad

20

Se produjo una serie de constructos de vacunas de ADN de NP que contenían la secuencia de señal secretora del activador del plasminógeno tisular (tPA): tPA-NP, tPA-NP-M, tPA-NP-M-IMX313 y tPA-NP-M-IMX313T. Se analizaron los efectos de la fusión de tPA con NP sobre las respuestas inmunitarias humorales y celulares de los animales inmunizados.

25

Los ratones inmunizados con constructos que contenían tPA mostraron respuestas de IFN- $\gamma$  significativamente mayores en comparación con las de los ratones inmunizados con NP y confirmaron la capacidad de IMX313T y las mutaciones monomerizantes para aumentar las respuestas de las células T.

30

La figura 19 muestra que forzar la secreción del antígeno NP mejoró su inmunogenicidad (NP frente a tPA-NP), ya sea este monomérico o no (tPA-NP frente a tPA-NP-M). Sin embargo, la fusión a IMX313 mostró que el uso de una versión monomérica de NP era más inmunógeno que el uso del antígeno sin modificar (tPA-NP-IMX313 frente a tPA-NP-M-IMX313). Y la sustitución de IMX313 por IMX313T mejoró adicionalmente la inmunogenicidad de NP (tPA-NP-M-IMX313 frente a tPA-NP-M-IMX313T).

35

La figura 20 muestra las respuestas de CD8+ y CD4+ a las diferentes versiones secretadas de NP. Se observa el mismo orden de clasificación que en la figura 19, y la utilidad de monomerización del antígeno es una vez más pronunciada cuando se añade IMX313. Como en las figuras anteriores, las mayores respuestas inmunitarias se observan cuando se utiliza IMX313T en lugar de IMX313.

40

La figura 21 muestra las respuestas de IgG totales al antígeno NP e invita a las mismas conclusiones que la figura 20 para las respuestas de células T: las mayores respuestas se observan cuando se utiliza IMX313T, pero la secreción (NP frente a tPA-NP) y la monomerización (tPA-NP-IMX313 frente a tPA-NP-M-IMX313) asimismo son contribuciones importantes.

45

Los ratones inmunizados con NP solo tenían niveles muy bajos, o no tenían ninguno, de anticuerpos IgG anti-NP en sus sueros (figura 21). Los ratones inmunizados con NP-M-IMX313, tPA-NP-M-IMX313, NP-M-IMX313T o tPA-NP-M-IMX313T, por otra parte, mostraron niveles elevados de respuestas sistémicas de anticuerpos IgG específicos de NP; sin embargo, los ratones inmunizados con tPA-NP-M-IMX313T tuvieron respuestas de anticuerpos IgG significativamente mayores ( $p < 0.001$ ) en comparación con todos los grupos de ratones inmunizados. Esto muestra que la combinación de todas las modificaciones (mutaciones monomerizantes, tPA e IMX313T) confiere una inmunogenicidad significativamente mejorada al antígeno en comparación con la secuencia parental u otras combinaciones.

50

La figura 22 muestra el análisis de subclases de las respuestas de las células B a NP, e ilustra que el sesgo a Th2 inicial con únicamente NP se invierte mediante IMX313 e IMX313T. Si bien la secreción tiene poco efecto por sí misma (NP frente a tPA-NP), la monomerización (tPA-NP-IMX313 frente a tPA-NP-M-IMX313) y después la sustitución de IMX313 por IMX313T (tPA-NP-M-IMX313 frente a tPA-NP-M-IMX313T) contribuyen todas a las respuestas mejoradas de Th1 (IgG2a) frente a Th2 (IgG1).

60

Es muy importante que el tPA-NP-M-IMX313T por sí mismo mejore las respuestas Th1 y Th2 de forma casi equivalente. La fusión de NP a IMX313 muestra que las respuestas tanto Th1 como Th2 aumentan, y no hay un cambio significativo en el tipo de respuesta. Pero con IMX313T y las mutaciones monomerizantes, la respuesta Th1 (IgG2a) comienza a predominar. El consenso entre los inmunólogos es que las respuestas Th1 son preferibles a las respuestas Th2 (figura 22).

65

11.9 – El IMX313T no se degrada por proteasas en el paso a través de vías de secreción

5 Los resultados obtenidos por las inmunizaciones de ADN con plásmidos que contienen IMX313T sugieren fuertemente que la cola de la molécula no es escindida por proteasas cuando pasa a través de la ruta de secreción, en la que las proteasas son abundantes. Para examinar esta cuestión más directamente, se realizó la transfección de células CHO K1 con el plásmido utilizado para expresar NP-M-IMX313T *in vivo*. La transfección se realizó tal como se ha descrito (33).

10 De dieciocho a veinticuatro horas más tarde, los sobrenadantes de las células transfectadas se recuperaron mediante centrifugación y se filtraron antes de cargarlos en una columna de heparina sefarosa, tal como se ha descrito anteriormente.

15 Se observó un pequeño "pico C" que demostró en SDS-PAGE e inmunotransferencia Western que contenía la proteína NP-M-IMX313T.

**12 Modificación de una superhélice trimérica**

20 Para determinar si la modificación de una superhélice trimérica podría mejorar la inmunogenicidad del antígeno, se construyeron dos plásmidos utilizando un gen HA2 sintético que codifica la superhélice trimérica de la hemaglutinina de la gripe.

El primer plásmido fue pIMX743, en el que la superhélice de HA2 se modificó mediante la fusión de un péptido: SPRRRRRRRRRS (SEC ID nº 37)

25 El siguiente fragmento de restricción Nde I a HindIII se clonó en un vector de expresión T7:

CATATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATCATGGTAGTGGTTATGCAGCCGATCAGAAAAGCAGC  
 CAAAATGCGATTAACGGCATTACCAACAAAGTCAATTCTGTGATCGAAAAGATGAATATCCAGTTTACTGCT  
 GTAGGCAAAGAGTTCAACAACTGGAGAAACGCATGGAAAACCTGAACAAGAAAGTGGATGATGGGTTTCT  
 GGATATTTGGACCTATAACGCGGAATTACTTGTGCTCTTAGAAAACGAACGGACATTGGACTTCCATGATTC  
 GAACGTCAAGAACCTGTATGAGAAAGTGAAAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCTCACCACGTCGCCGTCGTC  
 GCCGTCGCCGTCGCGAGTTAATAAGCTT (SEC ID NO 60)

30 La secuencia de proteínas codificada fue:

MRGSHHHHHHHGSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNIQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWT  
 YNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNASPRRRRRRRRS\*\* (SEC ID NO 61)

El plásmido de control pIMX744 se creó eliminando el péptido utilizando los cebadores oligonucleotídicos

35 IMX203: 5' GTTAGCAGCCGGATCAAGCTTATTAGGCATTGTTCTTCAGCTGGC 3' (SEC ID nº 62) y T7F para amplificar el inserto HA2 que después se reinsertó en el plásmido parental.

La secuencia de nucleótidos fue:

40 CATATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTAGTGGTTATGCAGCCGATCAGAAAAGCAGCAAAAT  
 GCGATTAACGGCATTACCAACAAAGTCAATTCTGTGATCGAAAAGATGAATATCCAGTTTACTGCTGTAGGC  
 AAAGAGTTCAACAACTGGAGAAACGCATGGAAAACCTGAACAAGAAAGTGGATGATGGGTTTCTGGATAT  
 TTGGACCTATAACGCGGAATTACTTGTGCTCTTAGAAAACGAACGGACATTGGACTTCCATGATTGCAACGT  
 CAAGAACCTGTATGAGAAAGTGAAAAGCCAGCTGAAGAACAATGCCTAATAAGCTT (SEC ID NO 63)

Y la secuencia de proteínas codificada fue:

45 MRGSHHHHHHHGSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNIQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYN  
 AELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNNA\*\* (SEC ID NO 64)

Ambas proteínas se purificaron después en primer lugar en una columna de afinidad IMAC, y después en una columna de heparina sefarosa. La proteína IMX743 se eluyó a una concentración de sal (NaCl) más alta que la proteína IMX744: la proteína IMX743 se eluyó a una concentración de sal de 1.4 M (sic) mientras que la proteína IMX744 se eluyó a una concentración de sal de 600 mM.

5 Ambas proteínas se utilizaron para inmunizar cuatro grupos de ratones BALB/c hembra de 5-6 semanas de edad, los días 0 y 14, con 20 µg por inyección. Los sueros y los bazos se recogieron para ELISA y ELISPOT el día 21. Dos grupos recibieron la proteína en el adyuvante Addavax, mientras que los otros dos grupos se inmunizaron sin un adyuvante. La proteína IMX744 se utilizó como antígeno ELISA y asimismo para estimular las células de bazo.

Los resultados se muestran en la tabla 4 siguiente:

Inmunógeno	Adyuvante	Respuesta de IgG Dilución seriada	Patrón de Th	Respuesta celular de INFγ por ELISPOT (x 10 <sup>6</sup> esplenocitos)
744	ninguno	100	Th2	115
744	MF59	900	Th1 = Th2	417
743	ninguno	500	Th1	305
743	MF59	8000	Th1	733

10 Los resultados muestran claramente que el péptido cargado positivamente (SEC ID nº 37), presente solo en la proteína IMX743, hace que la proteína IMX743 sea mucho más inmunógena que la proteína IMX744 idéntica, tanto si se utiliza un adyuvante como si no. Además, el uso de un adyuvante mejora adicionalmente la inmunogenicidad de la superhélice que contiene antígeno.

15 **13. Modificación del dominio de oligomerización de C4bp murino IMX108**

La superhélice de la proteína de fusión DsbA-IMX108, descrita en la referencia 16, se modificó para determinar si asimismo adquiriría propiedades mejoradas conferidas a IMX313. Para modificarla se amplificó el gen DsbA-IMX108 con el oligonucleótido IMX212: 5' GGAGCGACGCGACGCGGAGActggagctgtagtagtcaacctcc 3' (SEC ID nº 65) y T7F, y se insertó (29) en el plásmido que expresa IMX313T, en lugar de IMX313. La proteína se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico y después en una columna de heparina-sefarosa, a la que se unió, mientras que el constructo parental DsbA-IMX108 no lo hizo.

25 La secuencia IMX108 parental (SEC ID nº 66) se hibrida en este caso con la secuencia IMX108T (SEC ID nº 67);

IMX108: EASEDLKPALTGNKTMQYVPNSHDVKMALEIYKLTLEVELLQLIQKEKHTEAH\*  
 IMX108T: EASEDLKPALTGNKTMQYVPNSHDVKMALEIYKLTLEVELLQLQSPRRRRS\*

30 La proteína IMX108 modificada es útil para la inmunización de aves de corral, en la que deberán evitarse posibles efectos autoinmunitarios del uso de proteínas de fusión IMX313 modificadas (16). Otros dominios de oligomerización de C4bp de mamíferos (enumerados en la referencia 16 y el documento WO 2007/062819) asimismo se puede modificar tal como se describe en la presente memoria para este propósito.

35 **14. Proteínas de fusión que comprenden el extremo N de la hemolisina alfa estafilocócica y las proteínas IMX313 modificadas**

Para demostrar que la fusión con las proteínas IMX313 modificadas podría mejorar la inmunogenicidad del dominio N-terminal de la toxina estafilocócica hemolisina alfa (Hla), el gen de hemolisina truncado se amplificó a partir del ADN genómico de la cepa Newman y se clonó en un vector de expresión T7. Los oligonucleótidos utilizados fueron:

45 IMX056: 5' GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAcatatggcagattctgatattaatattaaaaccgg 3' (SEC ID nº 68) y  
 IMX057: 5' GTTAGCAGCCGGATCAAGCTTATTAatcattttatcttctgaagaacgatctgtc 3' (SEC ID nº 69).

Para fusionar los sesenta y tres aminoácidos N-terminales de la toxina madura con una proteína IMX313 modificada, se amplificó IMX313T con los cebadores:

50 IMX110: 5' AGAACGAAAGGTACCATTGCTGGATCCAAGAAGCAAGGTGATGCT 3' (SEC ID nº 70) y

IMX139: 5' GGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC 3' (SEC ID nº 44) del plásmido de expresión IMX313T y el producto de PCR se utilizó para truncar adicionalmente el gen de la toxina Hla, mientras se fusionaba el aminoácido 63 al gen IMX313 modificado. El plásmido resultante expresa la proteína de fusión, denominada Hla63-IMX313T, que tiene la siguiente secuencia de proteínas:

55 ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTDGLVYTDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGSKKQGDADVCG  
 EVA YIQSWSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLVQLQSPRRRRS (SEC ID nº 71) y está codificada por la secuencia de nucleótidos siguiente:

ATGGCAGATTCTGATATTAATATTTAAAACCGGTACTIONACAGATATTGGAAGCAATACTACAGTAAAAACAGGT  
 GATTTAGTCACTTATGATAAAGAAAATGGCATGCACAAAAAAGTATTTTATAGTTTTATCGATGATAAAAAATC  
 ATAATAAAAACTGCTAGTTATTAGAACGAAAGGTACCATTGCTGGATCCAAGAAGCAAGGTGATGCTGATG  
 TGTGCGGAGAGTTGCTTATATTACAGAGCGTCTCCGATTGCCACGTGCCTACAGCGGAACTGCGTACT  
 CTGCTGGAATACGAAAACCTCTTCTGGAGATTCAAAAACCTGAAGGTGGAAGTGCAGTCTCCGCGTCGCCG  
 TCGCTCCTAA (SEC ID NO 72).

5 Para producir esta proteína, se indujo un cultivo de 500 ml de la cepa C43 (DE3) con IPTG 1 mM y se cultivó durante la noche. Las bacterias recogidas se lisaron por sonicación y la proteína insoluble se resuspendió en Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM y urea 6 M (tampón A). Se cargó en una columna Hi-Trap SP FF y se eluyó con tampón A que contenía NaCl 1 M. La proteína parcialmente purificada se dializó frente al tampón Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, y se cargó en una columna de heparina sefarosa, a partir de la cual se eluyó con un gradiente de NaCl (Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 1 M). La proteína eluida se dializó frente a PBS y se purificó adicionalmente mediante filtración en gel.

10 El fragmento N-terminal (que carece de IMX313T) se modificó clonando una etiqueta de 6 His C-terminal, y se purificó por cromatografía de afinidad a níquel IMAC y filtración en gel.

15 Ambas proteínas purificadas se utilizaron después para inmunizar ratones, en presencia y en ausencia de un adyuvante.

20 Se inmunizaron cuatro grupos de cinco ratones BALB/c hembra de 5-6 semanas con 5 mmoles de la proteína Hla63 o el mismo antígeno fusionado con IMX313T los días 0 y 14. El día 28, se recogieron sueros y bazos para ELISA y ELISPOT. La proteína 63 Hla 6 His se utilizó como antígeno ELISA y asimismo para estimular las células esplénicas.

Los resultados se muestran en la tabla 5:

Inmunógeno	Adyuvante	Respuesta de IgG Dilución seriada	Respuesta celular de INF $\gamma$ por ELISPOT (x 10 <sup>6</sup> esplenocitos)
63 HLA	Ninguna	-	17
63 HLA	ISA 51	100	68
63 HLA-IMX313T	ninguna	100	47
63 HLA-IMX313T	ISA 51	600	128

25 Los resultados muestran claramente que el extremo N-terminal de la hemolisina alfa (HLA) es más inmunógeno cuando se fusiona con la proteína IMX313T, tanto si se utiliza un adyuvante como si no.

**15. Proteína estafilocócica de longitud completa fusionada con proteínas modificadas IMX313**

30 Para determinar si IMX313T e IMX313P podrían mejorar la inmunogenicidad del antígeno de proteína A estafilocócica de longitud completa (SpA), se clonó un gen sintético que codifica los cinco dominios homólogos (mutados tal como se describe en la referencia 44) como un fragmento Nde I-Hind III en un vector de expresión T7. La secuencia de nucleótidos fue la siguiente:

35

CATATGGCGCAACACGATGAAGCTCAAGCGAATGCATTCTACCAGGTTCTGAACATGCCGAATTTGAATGCG  
 GACCAACGTAATGGCTTTATTCAATCCCTGAAGGACGCACCGTCCCAAAGCGCAAACGTTCTGGGTGAAGC  
 GCAAAAAGTGAATGATAGCCAGGCCCGAAAGCCGATGCCAGCAGAAACAAGTTCAATAAGGATCAGGCCT  
 CTGCGTTCTATGAGATTTTGAATATGCCGAACCTTGAATGAGGAGCAACGCAACGGCTTTATCCAAAGCCTGA  
 AAGATGCACCAAGCCAAAGCACGAACGTCCTGGGTGAGGCAAAGAACTGAACGAGAGCCAGGCGCCGAAA  
 GCGGACAACAATTTCAATAAAGAGCAAGCGAACGCCTTTTACGAAATTCTGAATATGCCTAACCTGAACGAA  
 GAACAACGTAACGGCTTCATCCAGAGCTTGAAGGACGCGCCGTCGCAAAGCGCGAATCTGCTGGCCGAGGC  
 GAAAAAGCTGAATGAGAGCCAAGCGCCGAAGGCGGACAATAAGTTTAAACAAGAAGAGGCGAACGCATTCT  
 ATGAAATCCTGCATCTGCCGAATCTGAATGAAGAAGCAGCGCAATGGTTTTATCCAGAGCCTGAAGGATGCG  
 CCAAGCCAGAGCGCAAACCTGTTGGCTGAGGCCAAGAAGCTGAACGATGCGCAGGCTCCGAAAGCTGACAA  
 CAAATTAACAAAGAGCAGGCCAACGCTTTTTACGAGATTCTGCACTTGCCGAACCTGACCGAAGAAGCAGCG  
 TAATGGTTTCATCCAGTCTCTGAAAGACGCACCGAGCGTGAGCAAAGAGATTCTGGCAGAGGCGAAGAAGT  
 TGAACGACGCGCAGGCACCGAAAGGATCCCATCACCACCACCATCACTAATAAGCTT (SEC ID NO 73)

Y la secuencia de proteína codificada fue:

MAQHDEAQANAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKDAPSQSANVLEAQKLNSQAPKADAQQNKFNKDQASAFY  
 EILNMPNLNEEQRNGFIQSLKDAPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEQANAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQS  
 LKDAPSQSANLLAEAKKLNESQAPKADNKFNKEQANAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDAPSQSANLLAEAKKLN  
 DAQAPKADNKFNKEQANAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDAPSVSKEILAEAKKLNDAPKGSHHHHHH\*

5 (SEC ID NO 74)

Para fusionar el antígeno a las proteínas IMX313T e IMX313P, el fragmento BamH I-Hind III que codifica la etiqueta His C-terminal se reemplazó por fragmentos BamH I-Hind III que codifican las proteínas 313.

10 Las proteínas se purificaron de la forma siguiente: se produjo SpA-6His en la cepa bacteriana BLR, y el sedimento bacteriano se lisó en tampón A (1 x PBS, NaCl 1 M, imidazol 20 mM, PMSF 1 mM), el lisado bacteriano se calentó a 75°C durante 15 minutos, y después se clarificó por centrifugación antes de cargarse en una columna de afinidad a níquel IMAC. La proteína se eluyó con un gradiente de imidazol en tampón B (1 x PBS, imidazol 500 mM). La proteína se purificó adicionalmente por filtración en gel.

15 Asimismo se expresaron SpA-IMX313T y SpA-IMX313P en la cepa BLR, y los lisados bacterianos se calentaron a 75°C durante 15 minutos y se clarificaron por centrifugación. Ambas proteínas se purificaron luego en una columna de intercambio iónico SP, y después en una columna de heparina sefarosa.

20 Estas tres proteínas se utilizaron para inmunizar seis grupos de ratones hembra Balb/c de 5-6 semanas de edad los días 0 y 14. Se utilizaron 5 mmoles de cada proteína por inmunización, con o sin el adyuvante AddaVax. El día 28, se recogieron sueros y bazos para ELISA y ELISPOT. La proteína SpA-6His se utilizó como antígeno ELISA y asimismo para estimular las células esplénicas.

25 Los resultados se muestran en la tabla 6 siguiente. El antígeno SpA fusionado a IMX313T o P es claramente más inmunógeno que el antígeno no fusionado, y la versión IMX313P es ligeramente más inmunógena que la versión IMX313T.

Tabla 6

30

Inmunógeno	Adyuvante	Respuesta de Dilución seriada	Patrón de Th	Respuesta celular de INFγ por ELISPOT (x 10 <sup>6</sup> esplenocitos)
Spa	Ninguno	100	Th1 = Th2	15
Spa	AddaVax	1,300	Th1 = Th2	29
SpA-IMX313T	Ninguno	1,200	Th1	77
SpA-IMX313T	AddaVax	7,800	Th1	150
SpA-IMX313P	Ninguno	2,700	Th1	117
SpA-IMX313P	AddaVax	12,800	Th1	207

**16. Proteínas de fusión de ClfB y proteínas modificadas IMX313**

Para mejorar la inmunogenicidad del antígeno estafilocócico ClfB, los dominios N2N3 se amplificaron con los

siguientes oligos:

IMX239: 5' CATCATCATCATCATCACggtGCTGAACCGGTAGTAAATGCTGCTGATGCTAAAGG 3' (SEC ID nº 75) y

IMX240: 5' cccaaggggtatgctagtaATTTACTGCTGAATCACCATCagcacttccaccacc 3' (SEC ID nº 76) y el producto de PCR se clonó en un vector de expresión T7 con una etiqueta His N-terminal (27).

La secuencia de nucleótidos del fragmento N2N3 es:

ATGCGGGTTCATCATCATCATCATCATCATCATGGTgctgaaccggtagtaaatgctgctgatgctaaaggtacaaat  
gtaaatgataaagttacggcaagtaattcaagttagaaaagactacatttgaccctaatcaaagtggaacacatttatggcggcaaatt  
ttacagtgcagataaagtgaatcaggggattattttacagcgaagttaccagatagtttaactggaatggagacgtggattattcta  
tcaaataatcagatccaattgcagacattaaagtacgaatggcagttgtagctaaagcaacatatgatacttgactaagacgtata  
catttgccttacagattatgtaataataaagaaaatattaacggacaattttcattacctttatttacagaccgagcaaaagccacataa  
tcaggaacatatgatcgcaatattaatattcgcatgaaatgtttaataataaaattacttataactatagttcgcaattgcaggaattga  
taaccaaatggcgcgaacatttcttctcaaatattggtgtagatcacagcttcaggtcaaacacatacaagcaaacagtatttgttaac  
cctaagcaacgagtttaggtaaacgtgggtgtatattaaggctaccaagataaaatcgagaaagtagcggtaaagtaagtgtaca  
gatacaaaactgagaattttgaagtgaatgatacctaattatcagatagctactatgcagatccaatgactctaaccctaaagaag  
taacagaccaatttaaaatagaatcattatgagcatccaatgtagctagattaaatttgggtgatattactaaaacatatgtagtatta  
gtagaagggcattaccagaataacaggaacttaaaactcaggtattcaagaaaatggtgatcctgtaacaaatagagactacagt  
attttcggttgaataatgagaatgtgtacgttatggtggtggaagtgctgatggtgattcagcagtaaatata (SEC ID NO 77)

y la secuencia de proteínas es:

MRGSHHHHHHHGAEPVVNAADAKGTNVNDKVTASNFKLEKTTDFPNQSGNTFMAANFTVTDKVKSGDYFTAK  
LPDSLTLGNGDVDYSNSNNTMPIADIKSTNGDVVAKATYDILTKTYTFVFTDYVNNKENINGQFSLPLFTDRAKAPKS  
GTYDANINIADEMFNKITYNYSSPIAGIDKPNGANISSQIIGVDTASGQNTYKQTVFVNPQRVLGNTWVYIKGYQ  
DKIEESSGKVSATDTKLRIFEVNDTSKLSDSYYADPNDSNLKEVTDQFKNRIYYEHPNVASIKFGDITKTYVVLVEGHY  
DNTGKNLKTQVIQENVPVTRNDRYSIFGWNNENVVRYGGGSADGDSAVN\* (SEC ID NO 78)

Subsiguientemente, los dominios IMX313T e IMX313P se amplificaron con los oligonucleótidos: IMX248: 5' gctgatggtgattcagcagtaaatggatccaagaagcaaggtgatgctgatg 3' (SEC ID nº 79) e IMX139 y se clonaron de forma C-terminal al dominio N3. Los dominios N2N3 no modificados y las proteínas de fusión N2N3-IMX313T e IMX313P se expresan de la forma siguiente:

Se indujeron cultivos de 500 ml de de la cepa C43 (DE3) con IPTG 1 mM y después de la inducción durante la noche, los sedimentos bacterianos se lisaron en tampón A (1 x PBS, NaCl 1 M, imidazol 20 mM, PMSF 1 mM) y después se clarificaron por centrifugación antes de cargarlos en una columna de afinidad a níquel IMAC. La proteína se eluyó con un gradiente de imidazol en tampón B (1 x PBS, imidazol 500 mM). Las proteínas de fusión se purifican adicionalmente mediante cromatografía de afinidad en heparina-sefarosa, operación seguida de filtración en gel de Sephacryl S-300 HR, mientras que la proteína no fusionada se purifica adicionalmente mediante filtración en gel en una columna de filtración en gel S-75.

**17. Proteínas de fusión de sortasa a y proteínas imx313 modificadas**

Para mejorar la inmunogenicidad de la proteasa estafilocócica conocida como sortasa A, o SrtA, se clonó una versión inactivada en marco a IMX313, IMX313T e IMX313P de la forma siguiente: el gen de sortasa A de tipo silvestre se amplificó a partir del ADN genómico de la cepa Newman con el oligonucleótido

IMX005 5' GTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATatataCAACCTAACCTCAAATTCC 3' (SEC ID nº 80) y

IMX1275 5' GTTAGCAGCCGGATCAAGCTTATTATTTGACTTCTGTAGCTACAA 3' (SEC ID nº 81) y se clonó en un vector de expresión T7. El residuo de cisteína del sitio activo se mutó después a serina con el oligonucleótido IMX215: 5' GATAAAACAATTAACATTAATTAATTACTTCTGATGATTACAATGAAAAGACAGGCG 3' (SEC ID nº 82).

Los genes IMX313, 313T y 313P se amplificaron después con los olinucleótidos IMX006: 5'

TTGTAGCTACAGAAGTCAAAAAGAAGCAAGGTGATGCTGATG 3' (SEC ID nº 83) and IMX139: 5' GGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC 3' (SEC ID nº 44) a partir de los vectores respectivos, y se insertaron en marco con el gen de proteasa inactivado (29).

- 5 Las proteínas de fusión IMX313T e IMX313P se purificaron mediante intercambio iónico en una columna SP, y después en una columna de heparina sefarosa.

**18. Inmunización de adn de cp15**

- 10 Para determinar si las proteínas IMX313 modificadas podrían mejorar aún más la inmunogenicidad del antígeno de *Cryptosporidium* CP15, más allá de la mejora obtenida utilizando el propio IMX313, se utilizaron tres plásmidos diseñados para expresar Cp15, Cp15-IMX313 e IMX313T en *Escherichia coli* para preparar vectores pcDNA3 como vacunas de ADN. Los cebadores utilizados para amplificar los tres genes a partir de los vectores de expresión T7 para la inserción en pcDNA3 cadena abajo del péptido señal de tPA fueron:

15 IMX092: 5' ggaaatccatgccccgattcagaaga GCGCGTGTCTGATCAAAGAGAAGC 3' (SEC ID nº 84) e  
 IMX093: 5' gccagtgtgatggatggcggtagttattgctcagcggtag 3' (SEC ID nº 85).

- 20 Los tres productos de la PCR se insertaron por separado en un vector pcDNA3, que contenía un péptido de señal tPA N-terminal.

Las tres secuencias codificantes fueron:

Para Cp15:

25 ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCAGCCA  
 ggaaatccatgccccgattcagaagaGCGCGTGTCTGATCAAAGAGAAGCAGAATATGGGCAATCTCAAAGCTGT  
 TGTTCCCTTTGCTGACGAACACTCATTGACCAGCACTCAACTGGTTGTAGGAAATGGCTCTGGTGCCTCTGAA  
 ACCGCAAGCAATCATCCACAGGAAGAAGTGAACGACATTAACACGTTTAACGTGAAACTGATCATGCAAGAT  
 CGCTCCAAACTGGATTGTGAGGTCGTCTTTGACAGTACCAGCATCAGTCTGAGTGGTATGGCAAATGCCG  
 CAATATCGCGTTAGACGAGATTACCAGCTTCTGTATTGGAAGGAGGAATTAAGCCGTGTGGAATCTTCAG  
 CTGGGATTTCCGATAGCGATAACTGCGTAGCCATTACCTGAAAGAATCGGGTAACTGCATTCCGTTGTTCT  
 TCAACAATTCGACAGATAAAGAACGCTTTGTGGCAACAGCGAATAAGTTCAAACCGAACTTTAACCATCATC  
 ACCATCATCATTAA (SEC ID NO 86)

Para Cp15-IMX313:

30 ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCAGCCA  
 ggaaatccatgccccgattcagaagaGCGCGTGTCTGATCAAAGAGAAGCAGAATATGGGCAATCTCAAAGCTGT  
 TGTTCCCTTTGCTGACGAACACTCATTGACCAGCACTCAACTGGTTGTAGGAAATGGCTCTGGTGCCTCTGAA  
 ACCGCAAGCAATCATCCACAGGAAGAAGTGAACGACATTAACACGTTTAACGTGAAACTGATCATGCAAGAT  
 CGCTCCAAACTGGATTGTGAGGTCGTCTTTGACAGTACCAGCATCAGTCTGAGTGGTATGGCAAATGCCG  
 CAATATCGCGTTAGACGAGATTACCAGCTTCTGTATTGGAAGGAGGAATTAAGCCGTGTGGAATCTTCAG  
 CTGGGATTTCCGATAGCGATAACTGCGTAGCCATTACCTGAAAGAATCGGGTAACTGCATTCCGTTGTTCT  
 TCAACAATTCGACAGATAAAGAACGCTTTGTGGCAACAGCGAATAAGTTCAAACCGAACTTTAACGGATCCA  
 AGAAGCAAGGTGATGCTGATGTGTGCGGAGAGGTTGCTTATATTCAGAGCGTCGTCTCCGATTGCCACGTG  
 CCTACAGCGGAACTGCGTACTCTGCTGAAATACGAAACTCTTCTGGAGATTCAAAAAGTGAAGGTGCAC  
 CATCACCATTAA (SEC ID NO 87)

Y para CP15-IMX313T:

35

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGCTGTTGGAGCAGTCTTCGTTTTGCCAGCCA  
 ggaatccatgcccattcagaagaGCGCGTGTCTGATCAAAGAGAAGCAGAATATGGGCAATCTCAAAAGCTGT  
 TGTTCTTTGCTGACGAACACTCATTGACCAGCACTCAACTGGTTGTAGGAAATGGCTCTGGTGCCTCTGAA  
 ACCGCAAGCAATCATCCACAGGAAGAAGTGAACGACATTAACACGTTTAACTGAAACTGATCATGCAAGAT  
 CGCTCCAAACTGGATTGTGAGGTCGTCTTTGACAGTACCAGCATCAGTCTGAGTGGTATGGCAAATGCCG  
 CAATATCGCGTTAGACGAGATTACCAGCTTCTGTATTGGAAGGAGGAATTAAGCCGTGTGGAATCTTACG  
 CTGGGATTTCCGATAGCGATAACTGCGTAGCCATTCACTGAAAGAATCGGGTAACTGCATTCCGTTGTTCT  
 TCAACAATTCGAGGATAAAGAACGCTTTGTGGCAACAGCGAATAAGTTCAAACCGAACTTTAACGGATCCA  
 AGAAGCAAGGTGATGCTGATGTGTGCGGAGAGGTTGCTTATATTAGAGCGTCGTCTCCGATTGCCACGTG  
 CCTACAGCGAACTGCGTACTCTGCTGAAATACGAAACTCTTCTGGAGATTCAAAAAGTGAAGGTGGAA  
 CTGCAGTCTCCGCTCGCCGTCGCTCCTAA (SEC ID NO 88)

El vector pcDNA3 sin ningún inserto se utilizó como plásmido de control. Estos cuatro plásmidos se utilizaron para inmunizar cuatro grupos de ratones hembra Balb/c de 5-6 semanas de edad los días 0 y 14. Se inyectaron por vía intramuscular veinticinco microgramos de cada plásmido para cada inmunización. El día 28 se recogieron sueros y bazos para ELISA y ELISPOT. La proteína Cp15-6His, purificada a partir de *Escherichia coli* se utilizó como antígeno ELISA, y asimismo para estimular las células esplénicas.

Los resultados de los ELISA y los ELISPOT se muestran en la tabla 7, a continuación.

Inmunógeno	Densidad óptica de respuesta a IgG (405)	Patrón TH	Respuesta celular de INF $\gamma$ por ELISPOT (x 10 <sup>6</sup> esplenocitos)
Cp15	0.159	Th1 = Th2	35
Cp15-IMX313	0.358	Th1 = Th2	117
Cp15-IMX313T	0.697	Th1 = Th2	175
Vector vacío	0.087	-	12

Estos resultados muestran que IMX313 mejora tanto los títulos de anticuerpos como las respuestas de interferón y al antígeno Cp15, pero estas respuestas se mejoran adicionalmente mediante el uso de IMX313T en lugar de IMX313.

### 19. Inmunización con autoantígenos y fusiones de proteínas IMX313 modificadas: GnRH-IMX313T

Para mejorar adicionalmente las respuestas de anticuerpos inducidas por el autoantígeno GnRH cuando se fusiona a IMX313, se preparó la proteína GnRH-IMX313T. La secuencia de codificación de la proteína fue: ATGGAACATTGGAGCTATGGCCTGCGTCCGGGCGGATCCAAGAAGCAAGGTGATGCTGATGTGTGCGGAG AGGTTGCTTATATTAGAGCGTCTGCTCCGATTGCCACGTGCCTACAGCGGAACTGCGTACTCTGCTGGAA ATACGAAAACCTTTCTGGAGATTCAAAAAGTGAAGGTGGAAGTGCAGTCTCCGCGTCCGCGTCCGCTCCTAA TAA (SEC ID n° 89) y la secuencia de la proteína fue: MEHWSYGLRPGGSKKQGDADVCGEVAYIQSWSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLVQLQSPRRRRS\*\* (SEC ID n° 90)

### 20. Sinergia de adyuvantes con proteínas modificadas IMX313 y antígenos

Para determinar si la inmunogenicidad mejorada obtenida mediante el uso de proteínas IMX313 modificadas podría mejorarse adicionalmente mediante el uso de un adyuvante clásico y, de hecho, mediante el uso de dos adyuvantes, se formularon las siguientes proteínas: PAm, PAm-IMX313 y PAm-IMX313T (preparadas tal como se describe en el ejemplo 6 anterior), como se indica en la columna "Adyuvante" en la tabla siguiente. Las proteínas formuladas se utilizaron para inmunizar siete grupos de ratones Balb/c hembra de 5-6 semanas de edad los días 0 y 14. Se utilizaron 5 mmoles de cada proteína por inmunización, con o sin el adyuvante AddaVax, y con o sin el ligando de TLR poli I:C. En el séptimo grupo, el ligando de TLR poli I:C se formuló primero con la proteína PAm-IMX313T, y después con el adyuvante AddaVax.

El día 28 se recogieron sueros y bazos para ELISA y ELISPOT. La proteína PAm se utilizó como antígeno ELISA y asimismo para estimular las células esplénicas.

Los resultados se tabulan a continuación (tabla 8).

Inmunógeno	Adyuvante	Respuesta de IgG Dilución en serie	Respuesta celular de INF $\gamma$ por ELISPOT (x 10 <sup>6</sup> esplenocitos)
PAm	Ninguno		15

Inmunógeno	Adyuvante	Respuesta de IgG Dilución en serie	Respuesta celular de INF $\gamma$ por ELISPOT (x 10 <sup>6</sup> esplenocitos)
PAm	Addavax	100	28
PAm-IMX313	Ninguno	400	63
PAm-IMX313	Hadabas	900	177
PAm- IMX313T	Ninguno	800	105
PAm- IMX313T	Addavax	6400	307
PAm- IMX313T	Addavax + poli I:C	6000	395

Claramente, existe una ventaja al usar un adyuvante con la proteína IMX313 modificada, y la inmunogenicidad se puede mejorar adicionalmente utilizando un segundo adyuvante, poli I:C.

## 5 REFERENCIAS

- 1) Odgren PR, Harvie LW Jr, Fey EG. 1996. Phylogenetic occurrence of coiled coil proteins: implications for tissue structure in metazoan via coiled coil tissue matrix. *Proteins* 24:467-484.
- 10 2) Rose A, Schraegle SJ, Stahlberg EA, Meier I. 2005. Coiled-coil protein composition of 22 proteomes--differences and common themes in subcellular infrastructure and traffic control. *BMC Evol Biol.* 5:66.
- 3) Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV. 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* 11:82-88.
- 15 4) Tavano R, Capecchi B, Montanari P, Franzoso S, Marin O, Sztukowska M, Cecchini P, Segat D, Scarselli M, Aricò B, Papini E. 2011. Mapping of the *Neisseria meningitidis* NadA cell-binding site: relevance of predicted {alpha}-helices in the NH2-terminal and dimeric coiled-coil regions. *J Bacteriol.* 193:107-115.
- 20 5) El Tahir Y, & Skurnik M. 2001. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int. J. Med. Microbiol.* 291:209-218.
- 6) Cotter SE, Surana NK, St. Geme III JW. 2005. Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* 13:199-205.
- 25 7) Szczesny P, Linke D, Ursinus A, Bär K, Schwarz H, Riess TM, Kempf VA, Lupas AN, Martin J, Zeth K. 2008. Structure of the head of the *Bartonella* adhesin BadA. *PLoS Pathog.* 4:e1000119.
- 8) Serruto D, Spadafina T, Scarselli M, Bambini S, Comanducci M, Höhle S, Kilian M, Veiga E, Cossart P, Oggioni MR, Savino S, Ferlenghi I, Taddei AR, Rappuoli R, Pizza M, Massignani V, Aricò B. 2009. HadA is an atypical new multifunctional trimeric coiled-coil adhesin of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius, which promotes entry into host cells. *Cell Microbiol.* 11:1044-1063.
- 30 9) Chen J, Wharton SA, Weissenhorn W, Calder LJ, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC. 1995. A soluble domain of the membrane-anchoring chain of influenza virus hemagglutinin (HA2) folds in *Escherichia coli* into the low-pH-induced conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:12205-12209.
- 35 10) Swanson KA, Settembre EC, Shaw CA, Dey AK, Rappuoli R, Mandl CW, Dormitzer PR, Carfi A. 2011. Structural basis for immunization with postfusion respiratory syncytial virus fusion F glycoprotein (RSV F) to elicit high neutralizing antibody titers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:9619-9624.
- 40 11) Tan K, Liu J, Wang J, Shen S, Lu M. 1997. Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:12303-12308.
- 12) Chen YH, Christiansen A, Böck G, Dierich MP. 1995. HIV-2 transmembrane protein gp36 like HIV-1 gp41 binds to human lymphocytes and monocytes. *AIDS* 9:1193-1194.
- 45 13) Lee JE, Fusco ML, Hessell AJ, Oswald WB, Burton DR, Saphire EO. 2008. Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor. *Nature* 454:177-182.
- 14) Yuan P, Swanson KA, Leser GP, Paterson RG, Lamb RA, Jardetzky TS. 2011. Structure of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase (HN) ectodomain reveals a four-helix bundle stalk. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:14920-14925.
- 50 15) Chambers RS, Johnston SA. (2003) High-level generation of polyclonal antibodies by genetic

immunization. *Nat Biotechnol.* 21:1088-1092.

5 16) Ogun SA, Dumon-Seignovert L, Marchand JB, Holder AA, Hill F. 2008. The oligomerization domain of C4-binding protein (C4bp) acts as an adjuvant, and the fusion protein comprised of the 19-kilodalton merozoite surface protein 1 fused with the murine C4bp domain protects mice against malaria. *Infect Immun.* 76:2817-3823.

10 17) Sassenfeld HM & Brewer SJ. 1984. A polypeptide fusion designed for the purification of recombinant proteins. *Biotechnology.* 2:76-81.

18) Smith JC, Derbyshire RB, Cook E, Dunthorne L, Viney J, Brewer SJ, Sassenfeld HM, Bell LD. 1984. Chemical synthesis and cloning of a poly(arginine)-coding gene fragment designed to aid polypeptide purification. *Gene.* 32:321-327.

15 19) Stempfer G, Holl-Neugebauer B, Rudolph R. 1996. Improved refolding of an immobilized fusion protein. *Nat Biotechnol.* 14:329-334.

20 20) Stempfer G, Höll-Neugebauer B, Kopetzki E, Rudolph R. 1996. A fusion protein designed for noncovalent immobilization: stability, enzymatic activity, and use in an enzyme reactor. *Nat Biotechnol.* 14:481-484.

21) Suzuki M. 1989. SPKK, a new nucleic acid-binding unit of protein found in histone. *EMBO J.* 8:797-804.

22) Fuchs SM & Raines RT. 2005. Polyarginine as a multifunctional fusion tag. *Protein Science* 14:1538-1544.

25 23) Blasius AL & Beutler B. 2010. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity* 32:305-315.

24) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.

30 25) Ewald SE, Lee BL, Lau L, Wickliffe KE, Shi GP, Chapman HA, Barton GM. 2008. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 456:658-662.

26) Mendlowski B, Field AK, Tytell AA, Hilleman MR. 1975. Safety assessment of poly I:C in NZB/NZW mice. *Proc Soc Exp Biol Med.* 148:476-483.

35 27) Kim HK, Cheng AG, Kim HY, Missiakas DM, Schneewind O. 2010. Nontoxic protein A vaccine for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in mice. *J Exp Med.* 207: 1863-1870.

40 28) Spencer AJ, Hill F, Honeycutt JD, Cottingham MG, Bregu M, Rollier CS, Furze J, Draper SJ, Søgaard KC, Gilbert SC, Wyllie DH,. 2012. Fusion of the *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85A to an oligomerization domain enhances its immunogenicity in both mice and non-human primates. *PLoS One* 7:e33555.

29) Geiser M, Cèbe R; Drewello D, Schmitz R. 2001. Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase. *Biotechniques* 31:88-92.

45 30) Ye Q, Krug RM, Tao YJ. (2006) The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature.*444:1078-1082.

50 31) Tarus B, Bakowicz O, Chenavas S, Duchemin L, Estrozi LF, Bourdieu C, Lejal N, Bernard J, Moudjou M, Chevalier C, Delmas B, Ruigrok RW, Di Primo C, Slama-Schwok A. (2012) Oligomerization paths of the nucleoprotein of influenza A virus. *Biochimie.* 94:776-785.

55 32) Huber VC, McKeon RM, Brackin MN, Miller L, Keating R, Brown SA, Makarova N, Perez DR, MacDonald GH, McCullers JA. 2006 Distinct Contributions of Vaccine-Induced Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a Antibodies to Protective Immunity against Influenza. *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY* 13: 981-990.

33) Krammer F, Pontiller J, Tauer C, Palmberger D, Maccani A, Baumann M, Grabherr R. (2010) Evaluation of the influenza A replicon for transient expression of recombinant proteins in mammalian cells. *PLoS One.* 5:e13265.

60 34) Yang Y, Ringler P, Muller SA, Burkhard P. (2012) Optimizing the refolding conditions of self-assembling polypeptide nanoparticles that serve as repetitive antigen display systems. *J Struct Biol.* 177:168-176.

65 35) Parry DA, Fraser RD, Squire JM. (2008) Fifty years of coiled-coils and alpha-helical bundles: a close relationship between sequence and structure. *J Struct Biol.* 163:258-269.

36) Bommakanti G, Citron MP, Hepler RW, Callahan C, Heidecker GJ, Najjar TA, Lu X, Joyce JG, Shiver JW,

- Casimiro DR, ter Meulen J, Liang X, Varadarajan R. (2010) Design of an HA2-based Escherichia coli expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:13701-13706.
- 5 37) Bommakanti G, Lu X, Citron MP, Najjar TA, Heidecker GJ, ter Meulen J, Varadarajan R, Liang X. (2012) Design of Escherichia coli-expressed stalk domain immunogens of H1N1 hemagglutinin that protect mice from lethal challenge. *J Virol*. 86:13434-13444.
- 10 38) Birnbaum F, Nassal M. (1990) Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. *J Virol*. 64:3319-3330.
- 15 39) Mulcahy ME, Geoghegan JA, Monk IR, O'Keeffe KM, Walsh EJ, Foster TJ, McLoughlin RM. (2012) Nasal colonisation by Staphylococcus aureus depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein loricrin. *PLoS Pathog*. 8(12):e1003092.
- 20 40) Shibagaki N, Okamoto T, Mitsui H, Inozume T, Kanzaki M, Shimada S. (2010) Novel immunotherapeutic approaches to skin cancer treatments using protein transduction technology. *J Dermatol Sci*. 61:153-161.
- 41) Mitsui H, Okamoto T, Kanzaki M, Inozume T, Shibagaki N, Shimada S. (2010) Intradermal injections of polyarginine-containing immunogenic antigens preferentially elicit Tc1 and Th1 activation and antitumor immunity. *Br J Dermatol*. 162:29-41
- 25 42) Mitsui H, Inozume T, Kitamura R, Shibagaki N, Shimada S. (2006) Polyarginine-mediated protein delivery to dendritic cells presents antigen more efficiently onto MHC class I and class II and elicits superior antitumor immunity. *J Invest Dermatol*. 126:1804-1812.
- 43) Shibagaki N, Udey MC. (2002) Dendritic cells transduced with protein antigens induce cytotoxic lymphocytes and elicit antitumor immunity. *J Immunol*. 168:2393-2401.
- 30 44) O'Seaghdha M, van Schooten CJ, Kerrigan SW, Emsley J, Silverman GJ, Cox D, Lenting PJ, Foster TJ. (2006) Staphylococcus aureus protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. *FEBS J*. 273:4831-4841.
- 35 45) Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J. (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif*. 48:1-13.
- 40 46) Fromm JR, Hileman RE, Caldwell EE, Weiler JM, Linhardt RJ. (1995) Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor. *Arch Biochem Biophys*. 323:279-287.
- 47) Chudasama SL, Espinasse B, Hwang F, Qi R, Joglekar M, Afonina G, Wiesner MR, Welsby IJ, Ortel TL, Arepally GM. (2010) Heparin modifies the immunogenicity of positively charged proteins. *Blood*. 116:6046-6053.

#### 45 Referencias de patentes

- Documento WO 2007/062819  
 Documento WO 2007/100908  
 Documento WO 2011/045612  
 Documento WO 2008/122817

#### Listado de secuencias

- <110> IMAXIO
- 55 <120> PROTEÍNAS DE TIPO SUPERHÉLICE MODIFICADAS QUE PRESENTAN UNAS PROPIEDADES MEJORADAS
- <130> 364155D31038
- 60 <150> EP12306560.9  
 <151> 2012-12-11
- <150> US06/802.836  
 65 <151> 2013-03-18

<160> 90

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> artificial

10 <220>  
<223> Péptido cargado positivamente

<220>  
<221> misc\_feature  
15 <222> (1)..(1)  
<223> X es cualquier aminoácido o está ausente

<220>  
<221> misc\_feature  
20 <222> (2)..(2)  
<223> X es cualquier aminoácido

<220>  
<221> misc\_feature  
25 <222> (3)..(6)  
<223> X es una arginina (R) o una lisina (K)

<220>  
<221> misc\_feature  
30 <222> (7)..(7)  
<223> X es cualquier aminoácido o está ausente

<400> 1  
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

35 <210> 2  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> artificial

40 <220>  
<223> Péptido cargado positivamente

<400> 2  
Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser  
45 1 5

<210> 3  
<211> 5  
<212> PRT  
50 <213> artificial

<220>  
<223> Péptido cargado positivamente

55 <400> 3  
Gly Arg Arg Arg Arg  
1 5

<210> 4  
<211> 6  
60 <212> PRT  
<213> artificial

<220>

ES 2 719 256 T3

<223> Péptido cargado positivamente

<400> 4  
 Ser Pro Lys Lys Lys Lys  
 1 5

5

<210> 5  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10

<220>  
 <223> Péptido cargado positivamente

<400> 5  
 Gly Lys Lys Lys Lys  
 1 5

15

<210> 6  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 <213> Gallus gallus

20

<400> 6  
 Lys Lys Gln Gly Asp Ala Asp Val Cys Gly Glu Val Ala Tyr Ile Gln  
 1 5 10 15

Ser Val Val Ser Asp Cys His Val Pro Thr Ala Glu Leu Arg Thr Leu  
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Lys Leu Phe Leu Glu Ile Gln Lys Leu Lys Val Glu  
 35 40 45

Leu Gln Gly Leu Ser Lys Glu  
 50 55

25

<210> 7  
 <211> 57  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30

<220>  
 <223> Proteína IMX313T modificada

35

<400> 7  
 Lys Lys Gln Gly Asp Ala Asp Val Cys Gly Glu Val Ala Tyr Ile Gln  
 1 5 10 15

Ser Val Val Ser Asp Cys His Val Pro Thr Ala Glu Leu Arg Thr Leu  
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Lys Leu Phe Leu Glu Ile Gln Lys Leu Lys Val Glu  
 35 40 45

Leu Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser  
 50 55

<210> 8  
 <211> 184  
 <212> ADN  
 <213> artificial

40

<220>

ES 2 719 256 T3

<223> Oligonucleótido

<400> 8  
 catatgtcaa agaagcaagg tgatgctgat gtgtgctgag aggttgctta tattcagagc 60  
 gtcgtctccg attgccacgt gcctacagcg gaactgcgta ctctgctgga aatacgaata 120  
 ctcttctctgg agattcaaaa actgaagtg gaattgcaag gactgagcaa ggagtaataa 180  
 gctt 184

5  
 <210> 9  
 <211> 57  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10  
 <220>  
 <223> IMX313 antes de la extracción de Met y Ser

<400> 9  
 Met Ser Lys Lys Gln Gly Asp Ala Asp Val Cys Gly Glu Val Ala Tyr  
 1 5 10 15  
 Ile Gln Ser Val Val Ser Asp Cys His Val Pro Thr Ala Glu Leu Arg  
 20 25 30  
 Thr Leu Leu Glu Ile Arg Lys Leu Phe Leu Glu Ile Gln Lys Leu Lys  
 35 40 45  
 Val Glu Leu Gln Gly Leu Ser Lys Glu  
 50 55

20  
 <210> 10  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> artificial

25  
 <220>  
 <223> secuencia de extremo C sustituida en IMX313

<400> 10  
 Leu Gln Gly Leu Ser Lys Glu  
 1 5

30  
 <210> 11  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> artificial

35  
 <220>  
 <223> Péptido cargado positivamente

<400> 11  
 Leu Gln Ser Pro Arg Arg Arg Ser  
 1 5

40  
 <210> 12  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> artificial

45  
 <220>  
 <223> oligonucleótido

<400> 12

# ES 2 719 256 T3

	gtctccgct cgccgtcgct cctaata	27
5	<210> 13 <211> 35 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido	
	<400> 13 agcttattag gagcgacggc gacgcgagaga ctgca	35
15	<210> 14 <211> 183 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> IMX313T	
	<400> 14 atgtcaaaga agcaaggtga tgctgatgtg tgcggagagg ttgcttatat tcagagcgtc	60
	gtctccgatt gccacgtgcc tacagcggaa ctgcgtactc tgctggaaat acgaaaactc	120
	ttctcggaga ttcaaaaact gaaggtggaa ctgcagtctc cgcgtcgccg tcgctcctaa	180
	taa	183
25	<210> 15 <211> 45 <212> ADN <213> artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido	
35	<400> 15 cttaagaag gagatataca tatggctgat gcgcaacaaa ataac	45
40	<210> 16 <211> 51 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
45	<400> 16 ccgcacacat cagcatcacc ttgctttt ggtgcttgag catcattag c	51
50	<210> 17 <211> 32 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
55	<400> 17 ctcaacaaa gaaaaaaga acgccttcta tg	32
60	<210> 18 <211> 33 <212> ADN	

ES 2 719 256 T3

<213> artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido

5 <400> 18  
gcgcttggc ttggagccgc tttaagctt tgg 33

10 <210> 19  
<211> 339  
<212> ADN  
<213> artificial

15 <220>  
<223> Proteína A mutada

<400> 19  
atggctgatg cgcaacaaaa taacttcaac aaaggaaaa agaacgcctt ctatgaaatc 60  
ttgaatatgc ctaacttaaa cgaagaacaa cgcaatgggt tcatccaaag cttaaaagcg 120  
gctccaagcc aaagcgctaa ccttttagca gaagctaaaa agctaaatga tgctcaagca 180  
ccaaaaaagc aaggtgatgc tgatgtgtgc ggagaggttg cttatattca gagcgtcgtc 240  
tccgattgcc acgtgcctac agcggaactg cgtactctgc tggaaatagc aaaactcttc 300  
ctggagattc aaaaactgaa ggtggaattg caataataa 339

20 <210> 20  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> artificial

25 <220>  
<223> proteína mutada A fusionada a IMX313

<400> 20  
Met Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Gly Lys Lys Asn Ala  
1 5 10 15  
Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn  
20 25 30  
Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu  
35 40 45  
Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Gln  
50 55 60  
Gly Asp Ala Asp Val Cys Gly Glu Val Ala Tyr Ile Gln Ser Val Val  
65 70 75 80  
Ser Asp Cys His Val Pro Thr Ala Glu Leu Arg Thr Leu Leu Glu Ile  
85 90 95  
Arg Lys Leu Phe Leu Glu Ile Gln Lys Leu Lys Val Glu Leu Gln  
100 105 110

30 <210> 21  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> artificial

	<220> <223> Oligonucleótido	
5	<400> 21 gcagccggat caagcttatt atttggtgc ttgagcatc	39
10	<210> 22 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 22 taatacgact cactataggg	20
20	<210> 23 <211> 27 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 23 gtctccgcgt cgccgtcgt cctaata	27
30	<210> 24 <211> 35 <212> ADN <213> artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido	
40	<400> 24 agcttattag gagcgacggc gacgcggaga ctgca	35
45	<210> 25 <211> 13 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> ssRNA40	
50	<220> <221> misc_binding <222> (1)..(13) <223> los nucleótidos están unidos por fosfotioato	
55	<400> 25 gcccgcgggg acc	13
60	<210> 26 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> ODN1826	
65	<400> 26 tccatgacgt tctgacgtt	20

ES 2 719 256 T3

<210> 27  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 5 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> variante de IMX313  
  
 10 <400> 27  
 Ile Arg Lys Leu Phe Leu Glu Ile Gln Lys Leu Lys Val Glu  
 1 5 10  
  
 <210> 28  
 <211> 18  
 15 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> variante de IMX313  
  
 20 <400> 28  
 Thr Leu Leu Glu Ile Arg Lys Leu Phe Leu Glu Ile Gln Lys Leu Lys  
 1 5 10 15  
 Val Glu  
  
 25 <210> 29  
 <211> 47  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido  
  
 <400> 29  
 35 gaagcccgac ctgcaacgtg gatccatacg aaaactcttc ctggaga 47  
  
 <210> 30  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido  
  
 <400> 30  
 45 gaagcccgac ctgcaacgtg gatccactct gctggaaata cga 43  
  
 <210> 31  
 <211> 56  
 <212> ADN  
 50 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido  
  
 55 <400> 31  
 agggccctct agatgcatgc tcgagcggcc gcttattatt ccacctcag tttttg 56  
  
 <210> 32  
 <211> 24  
 60 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido

	<400> 32 cagaatagaa tgacacctac tcag	24
5	<210> 33 <211> 42 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido	
15	<400> 33 gaagcccgac ctgcaacggt aataagcggc cgctcgagca tg	42
20	<210> 34 <211> 52 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido	
30	<400> 34 gtgcctacag aggacgtgaa aatgctgctg gaaatacgaa aactcttct gg	52
35	<210> 35 <211> 59 <212> ADN <213> artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido	
45	<400> 35 agggccctct agatgcatgc tcgagcggcc gcttattagg agcgacggcg acgcggaga	59
50	<210> 36 <211> 7 <212> PRT <213> artificial	
55	<220> <223> Péptido cargado positivamente	
60	<400> 36 Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser 1                      5	
65	<210> 37 <211> 12 <212> PRT <213> artificial	
70	<220> <223> Péptido cargado positivamente	
75	<400> 37 Ser Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Ser 1                      5                      10	
80	<210> 38 <211> 6 <212> PRT <213> artificial	

ES 2 719 256 T3

<220>  
 <223> Péptido cargado positivamente

<400> 38  
 Ser Pro Arg Arg Arg Arg  
 5 1 5

<210> 39  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 10 <213> artificial

<220>  
 <223> Péptido cargado positivamente

15 <400> 39  
 Arg Arg Arg Arg Arg Ser  
 1 5

<210> 40  
 <211> 12  
 20 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> Péptido cargado positivamente

25 <400> 40  
 Gly Arg Ser  
 1 5 10

<210> 41  
 30 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 35 <223> Péptido cargado positivamente

<400> 41  
 Gly Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5

40 <210> 42  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 <213> artificial

45 <220>  
 <223> IMX313P

<400> 42  
 Lys Lys Gln Gly Asp Ala Asp Val Cys Gly Glu Val Ala Tyr Ile Gln  
 1 5 10 15

Ser Val Val Ser Asp Cys His Val Pro Thr Ala Glu Leu Arg Thr Leu  
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Lys Leu Phe Leu Glu Ile Gln Lys Leu Lys Val Glu  
 35 40 45

Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser  
 50 55

50

# ES 2 719 256 T3

5	<210> 43 <211> 46 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> oligonucleótido IMX205	
10	<400> 43 ggagattcaa aactgaagg tgaaggtcg ccgctgccgt cgctcc	46
	<210> 44 <211> 25 <212> ADN <213> artificial	
15	<220> <223> oligonucleótido IMX139	
20	<400> 44 gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgc	25
	<210> 45 <211> 174 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> IMX313P	
30	<400> 45 atgtcaaaga agcaaggtga tgctgatgtg tgcggagagg ttgcttatat tcagagcgtc gtctccgatt gccacgtgcc tacagcggaa ctgcgtactc tgctggaaat acgaaaactc ttcctggaga ttcaaaaact gaaggtggaa ggtcgcgcgtc gccgtcgcctc ctaa	60 120 174
	<210> 46 <211> 58 <212> ADN <213> artificial	
35	<220> <223> Cebador IMX206	
40	<400> 46 ggagattcaa aactgaagg tgaaggtcg ccgctgccgt taataagctt gatccggc	58
	<210> 47 <211> 50 <212> ADN <213> artificial	
45	<220> <223> Cebador IMX207	
50	<400> 47 ctgaaggtgg aatctccgaa aaagaaaaag taataagctt gatccggctg	50
	<210> 48 <211> 58 <212> ADN <213> artificial	
55	<220> <223> Cebador IMX208	
60		

ES 2 719 256 T3

<400> 48  
 ggagattcaa aaactgaagg tggaaggtaa aaagaaaaag taataagctt gatccggc 58

5 <210> 49  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> Cebador IMX139

<400> 49  
 gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgc 25

15 <210> 50  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> IMX427

<400> 50  
 Met Ser Lys Lys Gln Gly Asp Ala Asp Val Cys Gly Glu Val Ala Tyr  
 1 5 10 15  
 Ile Gln Ser Val Val Ser Asp Cys His Val Pro Thr Ala Glu Leu Arg  
 20 25 30  
 Thr Leu Leu Glu Ile Arg Lys Leu Phe Leu Glu Ile Gln Lys Leu Lys  
 35 40 45  
 Val Glu Gly Arg Arg Arg Arg  
 50 55

25 <210> 51  
 <211> 56  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> IMX428

35 <400> 51  
 Met Ser Lys Lys Gln Gly Asp Ala Asp Val Cys Gly Glu Val Ala Tyr  
 1 5 10 15  
 Ile Gln Ser Val Val Ser Asp Cys His Val Pro Thr Ala Glu Leu Arg  
 20 25 30  
 Thr Leu Leu Glu Ile Arg Lys Leu Phe Leu Glu Ile Gln Lys Leu Lys  
 35 40 45  
 Val Glu Ser Pro Lys Lys Lys Lys  
 50 55

40 <210> 52  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>

ES 2 719 256 T3

<223> IMX429

<400> 52

Met Ser Lys Lys Gln Gly Asp Ala Asp Val Cys Gly Glu Val Ala Tyr  
 1 5 10 15

Ile Gln Ser Val Val Ser Asp Cys His Val Pro Thr Ala Glu Leu Arg  
 20 25 30

Thr Leu Leu Glu Ile Arg Lys Leu Phe Leu Glu Ile Gln Lys Leu Lys  
 35 40 45

Val Glu Gly Lys Lys Lys Lys  
 50 55

5

<210> 53

<211> 50

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Cebador IMX1289

<400> 53

15 caatgcagag gagtacgaca atggatccaa gaagcaaggt gatgctgatg

50

<210> 54

<211> 47

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador IMX1290

<400> 54

25 gtagaacaa gggatTTTT ctttattact ccttgctcag tccttgc

47

<210> 55

<211> 42

30 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador IMX1305

35

<400> 55

cactgagtga catcaaaatc atggatgcaa tgaagagagg gc

42

<210> 56

40 <211> 53

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

45 <223> Cebador IMX1306

<400> 56

cgtaagaccg ttggcgctc ttgctagctc ttctgaatcg ggcattgatt tcc

53

50 <210> 57

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

# ES 2 719 256 T3

	<220>	
	<223> Cebador IMX1287	
	<400> 57	
5	ccattctgcc gcattgcag atctaagag	29
	<210> 58	
	<211> 29	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador IMX1288	
	<400> 58	
15	caaaaggag attgcctgt actgagaac	29
	<210> 59	
	<211> 44	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador IMX051	
25	<400> 59	
	gtagaaacaa gggatTTTT cttattagg agcgacggcg acgc	44
	<210> 60	
30	<211> 385	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> vector de expresión T7	
	<400> 60	
	catatgcggg gttctcatca tcatcatcat catcatcatg gtagtgggta tgcagccgat	60
	cagaaaagca cgaaaatgc gattaacggc attaccaaca aagtcaattc tgtgatcgaa	120
	aagatgaata tccagtttac tgctgtaggc aaagagttca acaaactgga gaaacgcatg	180
	gaaaacctga acaagaaagt ggatgatggg tttctggata tttggacctg taacgcggaa	240
	ttacttgtgc tcttagaaaa cgaacggaca ttggacttcc atgattcgaa cgtcaagaac	300
	ctgtatgaga aagtgaaaag ccagctgaag aacaatgcct caccacgtcg ccgtcgtcgc	360
40	cgtcgccgtc gcagttaata agctt	385
	<210> 61	
	<211> 124	
	<212> PRT	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> vector de expresión T7	
50	<400> 61	

ES 2 719 256 T3

Met Arg Gly Ser His His His His His His His His Gly Ser Gly Tyr  
1 5 10 15

Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn  
20 25 30

Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Ile Gln Phe Thr Ala Val  
35 40 45

Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys  
50 55 60

Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu  
65 70 75 80

Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn  
85 90 95

Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala  
100 105 110

Ser Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Ser  
115 120

<210> 62  
<211> 45  
5 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Cebador IMX203

<400> 62  
gtagcagcc ggatcaagct tattaggcat tgttctcag ctggc 45

<210> 63  
15 <211> 343  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
20 <223> inserto de HA2

<400> 63  
catatgcggg gttctcatca tcatcatcat catggtagtg gttatgcagc cgatcagaaa 60  
agcacgcaaa atgcgattaa cggcattacc aacaaagtca attctgtgat cgaaaagatg 120  
aatatccagt ttactgctgt aggcaaagag ttcaacaaac tggagaaacg catggaaaac 180  
ctgaacaaga aagtggatga tgggtttctg gatatttggga cctataacgc ggaattactt 240  
gtgctcttag aaaacgaacg gacattggac ttccatgatt cgaacgtcaa gaacctgtat 300  
gagaaagtga aaagccagct gaagaacaat gcctaataag ctt 343

<210> 64  
25 <211> 110  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>

ES 2 719 256 T3

<223> inserto de HA2

<400> 64

Met Arg Gly Ser His His His His His Gly Ser Gly Tyr Ala Ala  
1 5 10 15

Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val  
20 25 30

Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Ile Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys  
35 40 45

Glu Phe Asn Lys Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val  
50 55 60

Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val  
65 70 75 80

Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys  
85 90 95

Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala  
100 105 110

5

<210> 65

<211> 46

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Cebador IMX212

<400> 65

ggagcgcacgg cgacgcggag actggagctg tagtagtca acctcc

46

<210> 66

<211> 54

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> IMX108

25 <400> 66

Glu Ala Ser Glu Asp Leu Lys Pro Ala Leu Thr Gly Asn Lys Thr Met  
1 5 10 15

Gln Tyr Val Pro Asn Ser His Asp Val Lys Met Ala Leu Glu Ile Tyr  
20 25 30

Lys Leu Thr Leu Glu Val Glu Leu Leu Gln Leu Gln Ile Gln Lys Glu  
35 40 45

Lys His Thr Glu Ala His  
50

<210> 67

<211> 51

30 <212> PRT

<213> Artificial

ES 2 719 256 T3

<220>  
 <223> IMX108T

5 <400> 67  
 Glu Ala Ser Glu Asp Leu Lys Pro Ala Leu Thr Gly Asn Lys Thr Met  
 1 5 10 15

Gln Tyr Val Pro Asn Ser His Asp Val Lys Met Ala Leu Glu Ile Tyr  
 20 25 30

Lys Leu Thr Leu Glu Val Glu Leu Leu Gln Leu Gln Ser Pro Arg Arg  
 35 40 45

Arg Arg Ser  
 50

<210> 68  
 <211> 59  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> IMX056

15 <400> 68  
 gtttaacttt aagaaggaga tatacatatg gcagattctg atattaatat taaaaccgg 59

<210> 69  
 <211> 59  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> IMX057

25 <400> 69  
 gtttagcagcc ggatcaagct tattaatcga ttttatatct ttctgaagaa cgatctgtc 59

<210> 70  
 <211> 45  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador IMX110

<400> 70  
 40 agaacgaaag gtaccattgc tggatccaag aagcaaggtg atgct 45

<210> 71  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Proteína de fusión Hla63-IMX313T

<400> 71

ES 2 719 256 T3

Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly Ser  
 1 5 10 15

Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu Asn  
 20 25 30

Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn His  
 35 40 45

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

Lys Lys Gln Gly Asp Ala Asp Val Cys Gly Glu Val Ala Tyr Ile Gln  
 65 70 75 80

Ser Val Val Ser Asp Cys His Val Pro Thr Ala Glu Leu Arg Thr Leu  
 85 90 95

Leu Glu Ile Arg Lys Leu Phe Leu Glu Ile Gln Lys Leu Lys Val Glu  
 100 105 110

Leu Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser  
 115 120

5 <210> 72  
 <211> 369  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Proteína de fusión Hla63-IMX313T

<400> 72  
 atggcagatt ctgatattaa tattaacc ggtactacag atattggaag caatactaca 60  
 gtaaaaaacag gtgatttagt cacttatgat aaagaaatg gcatgcacaa aaaagtattt 120  
 tatagtttta tcgatgataa aaatcataat aaaaaactgc tagttattag aacgaaaggt 180  
 accattgctg gatccaagaa gcaaggtgat gctgatgtgt gcggagaggt tgcttatatt 240  
 cagagcgtcg tctccgattg ccacgtgcct acagcggaac tgcgtactct gctgaaata 300  
 cgaaaaactct tcctggagat tcaaaaaactg aaggtggaac tgcagtctcc gcgtcgccgt 360  
 cgctcctaa 369

15 <210> 73  
 <211> 913  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Gen sintético que codifica los 5 dominios homólogos de SpA

<400> 73

## ES 2 719 256 T3

```

catatggcgc aacacgatga agctcaagcg aatgcattct accaggttct gaacatgccg      60
aatttgaatg cggaccaacg taatggcttt attcaatccc tgaaggacgc accgtcccaa      120
agcgcaaacg ttctgggtga agcgcaaaaa ctgaatgata gccaggcccc gaaagccgat      180
gccagcaga acaagttcaa taaggatcag gcctctgcgt tctatgagat tttgaatatg      240
ccgaacttga atgaggagca acgcaacggc tttatccaaa gcctgaaaga tgcaccaagc      300
caaagcacga acgtcctggg tgaggcaaaag aaactgaacg agagccaggc gccgaaagcg      360
gacaacaatt tcaataaaga gcaagcgaac gccttttacg aaattctgaa tatgcctaac      420
ctgaacgaag aacaacgtaa cggcttcacg cagagcttga aggacgcgcc gtcgcaaagc      480
gcgaatctgc tggccgaggc gaaaaagctg aatgagagcc aagcgccgaa ggcggacaat      540
aagttaaca aagaacaggc gaacgcattc tatgaaatcc tgcactctgcc gaatctgaat      600
gaagaacagc gcaatgggtt tatccagagc ctgaaggatg cgccaagcca gagcgcaaac      660
ctgttggtg aggccaaaga gctgaacgat gcgcaggctc cgaaagctga caacaaattc      720
aacaagagc aggccaacgc tttttacgag attctgcact tgccgaacct gaccgaagaa      780
cagcgtaatg gtttcatcca gtctctgaaa gacgcaccga gcgtgagcaa agagattctg      840
gcagaggcga agaagttgaa cgacgcgcag gcaccgaaag gatcccatca ccaccacat      900
cactaataag ctt                                                                 913

```

5 <210> 74  
 <211> 300  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Proteína sintética que comprende los 5 dominios homólogos de SpA  
 <400> 74

ES 2 719 256 T3

Met Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Ala Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu  
 1 5 10 15

Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser  
 20 25 30

Leu Lys Asp Ala Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln  
 35 40 45

Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Ala Gln Gln Asn Lys  
 50 55 60

Phe Asn Lys Asp Gln Ala Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro  
 65 70 75 80

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
 85 90 95

Ala Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
 100 105 110

Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Ala  
 115 120 125

Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln  
 130 135 140

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

Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
 165 170 175

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Ala Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
 180 185 190

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
 195 200 205

Ser Leu Lys Asp Ala Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
 210 215 220

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn  
 225 230 235 240

Lys Glu Gln Ala Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu  
 245 250 255

Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Ala Pro  
 260 265 270

Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala  
 275 280 285

Gln Ala Pro Lys Gly Ser His His His His His His  
 290 295 300

<210> 75

5 <211> 56

ES 2 719 256 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador IMX239	
	<400> 75	
	catcatcatc atcatcacgg tgctgaaccg gtagtaaatg ctgctgatgc taaagg	56
10	<210> 76	
	<211> 58	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador IMX240	
	<400> 76	
20	ccccaagggg ttatgctagt taattfactg ctgaatcacc atcagcactt ccaccacc	58
	<210> 77	
	<211> 1068	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Fragmento N2N3	
	<400> 77	
	atgcgggggtt ctcatcatca tcatcatcat catcatgggtg ctgaaccggt agtaaatgct	60
	gctgatgcta aaggtacaaa tgtaaatgat aaagttacgg caagtaattt caagttagaa	120
	aagactacat ttgaccctaa tcaaagtggg aacacattta tggcggcaaa ttttacagtg	180
	acagataaag tgaatcagg ggattathtt acagcgaagt taccagatag tttactggt	240
	aatggagacg tggattattc taattcaaat aatcagatgc caattgcaga cattaanaag	300
	acgaatggcg atgtttagc taaagcaaca tatgatattc tgactaagac gtatacattt	360
	gtctttacag attatgtaaa taataaagaa aatattaacg gacaattttc attaccttta	420
	tttacagacc gagcaaggc acctaaatca ggaacatatg atgcgaatat taatattgcg	480
	gatgaaatgt ttaataataa aattacttat aactatagtt cgccaattgc aggaattgat	540
	aaaccaaagc gcgcgaacat ttcttctcaa attattggtg tagatacagc ttcaggtcaa	600
	aacacataca agcaaacagt atttgttaac cctaagcaac gagtttttagg taatacgtgg	660
	gtgtatatta aaggctacca agataaaatc gaagaaagta gcggtaaagt aagtgtaca	720
	gatacaaaac tgagaatttt tgaagtgaat gatacatcta aattatcaga tagctactat	780
	gcagatccaa atgactctaa ccttaagaa gtaacagacc aatttaaaaa tagaatctat	840
	tatgagcatc caaatgtagc tagtattaaa tttggtgata ttactaaaac atatgtagta	900
	ttagtagaag ggcattacga caatacaggt aagaacttaa aaactcaggt tattcaagaa	960
	aatgttgatc ctgtaacaaa tagagactac agtattttcg gttggaataa tgagaatggt	1020
30	gtacgttatg gtgggtggaag tgctgatggg gattcagcag taaattaa	1068
	<210> 78	
	<211> 355	
	<212> PRT	
35	<213> Artificial	

ES 2 719 256 T3

<220>

<223> Fragmento N2N3

5

<400> 78

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

ES 2 719 256 T3

Asp Gln Phe Lys Asn Arg Ile Tyr Tyr Glu His Pro Asn Val Ala Ser  
 275 280 285

Ile Lys Phe Gly Asp Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly  
 290 295 300

His Tyr Asp Asn Thr Gly Lys Asn Leu Lys Thr Gln Val Ile Gln Glu  
 305 310 315 320

Asn Val Asp Pro Val Thr Asn Arg Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn  
 325 330 335

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

Ala Val Asn  
 355

- 5 <210> 79  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
  
- 10 <220>  
 <223> Cebador IMX248  
  
 <400> 79  
 gctgatggtg attcagcagt aaatggatcc aagaagcaag gtgatgctga tg 52
  
- 15 <210> 80  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
  
- 20 <220>  
 <223> Cebador IMX005  
  
 <400> 80  
 gtttaacttt aagaaggaga tatacatatg caagctaaac ctcaaattcc 50
  
- 25 <210> 81  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
  
- 30 <220>  
 <223> Cebador IMX1275  
  
 <400> 81  
 gtagcagcc ggatcaagct tattattga cttctgtagc taaa 45
  
- 35 <210> 82  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
  
- 40 <220>  
 <223> Cebador IMX215  
  
 <400> 82  
 gataaacaat taacattaat tacttctgat gattacaatg aaaagacagg cg 52
  
- 45 <210> 83

ES 2 719 256 T3

<211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Cebador IMX006

<400> 83  
 ttgtagctac agaagtcaaa aagaagcaag gtgatgctga tg 42

10 <210> 84  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Cebador IMX092

<400> 84  
 20 ggaaatccat gcccgattca gaagagcgcg tgttctgac aaagagaagc 50

<210> 85  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador IMX093

<400> 85  
 30 gccagtgta tggatggcgg tagttattgc tcagcggtag 40

<210> 86  
 <211> 591  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cp15

<400> 86  
 atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60  
 tcgcccagcc aggaaatcca tgcccgatcc agaagagcgc gtgttctgat caaagagaag 120  
 cagaatatgg gcaatctcaa aagctgttgt tcctttgctg acgaacactc attgaccagc 180  
 actcaactgg ttgtaggaaa tggctctggt gcctctgaaa ccgcaagcaa tcatccacag 240  
 gaagaagtga acgacattaa cacgtttaac gtgaaactga tcatgcaaga tcgctccaaa 300  
 ctggattgtg aggtcgtcctt tgacagtacc agcatcagtc tgagtgggta tggcaaatgc 360  
 cgcaatatcg cgttagacga gattcaccag cttctgtatt cgaaggagga attaagccgt 420  
 gtggaatcct cagctgggat ttccgatagc gataactgcg tagccattca cctgaaagaa 480  
 tcgggtaact gcattccggt gttcttcaac aattcgcagg ataaagaacg ctttgtggca 540  
 acagcgaata agttcaaacc gaactttaac catcatcacc atcatcatta a 591

45 <210> 87  
 <211> 732  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

50 <220>

ES 2 719 256 T3

<223> Cp15-IMx313

<400> 87

```

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt      60
tcgcccagcc aggaaatcca tgcccgattc agaagagcgc gtgttctgat caaagagaag      120
cagaatatgg gcaatctcaa aagctgttgt tcctttgctg acgaacactc attgaccagc      180
actcaactgg ttgtaggaaa tggctctggt gcctctgaaa ccgcaagcaa tcatccacag      240
gaagaagtga acgacattaa cacgtttaac gtgaaactga tcatgcaaga tcgctccaaa      300
ctggattgtg aggtcgtcct tgacagtacc agcatcagtc tgagtgggtga tggcaaatgc      360
cgcaatatcg cgttagacga gattcaccag cttctgtatt cgaaggagga attaagccgt      420
gtggaatctt cagctgggat ttccgatagc gataactgcg tagccattca cctgaaagaa      480
tcgggtaact gcattccggt gttcttcaac aattcgcagg ataaagaacg ctttgtggca      540
acagcgaata agttcaaacc gaactttaac ggatccaaga agcaaggtga tgctgatgtg      600
tgcggagagg ttgcttatat tcagagcgtc gtctccgatt gccacgtgcc tacagcggaa      660
ctgcgtactc tgctggaaat acgaaaactc ttcttgagga ttcaaaaact gaaggtgcac      720
catcaccatt aa                                                                732

```

5

<210> 88

<211> 750

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> CP15-IMX313T

<400> 88

```

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt      60
tcgcccagcc aggaaatcca tgcccgattc agaagagcgc gtgttctgat caaagagaag      120
cagaatatgg gcaatctcaa aagctgttgt tcctttgctg acgaacactc attgaccagc      180
actcaactgg ttgtaggaaa tggctctggt gcctctgaaa ccgcaagcaa tcatccacag      240
gaagaagtga acgacattaa cacgtttaac gtgaaactga tcatgcaaga tcgctccaaa      300
ctggattgtg aggtcgtcct tgacagtacc agcatcagtc tgagtgggtga tggcaaatgc      360
cgcaatatcg cgttagacga gattcaccag cttctgtatt cgaaggagga attaagccgt      420
gtggaatctt cagctgggat ttccgatagc gataactgcg tagccattca cctgaaagaa      480
tcgggtaact gcattccggt gttcttcaac aattcgcagg ataaagaacg ctttgtggca      540
acagcgaata agttcaaacc gaactttaac ggatccaaga agcaaggtga tgctgatgtg      600
tgcggagagg ttgcttatat tcagagcgtc gtctccgatt gccacgtgcc tacagcggaa      660
ctgcgtactc tgctggaaat acgaaaactc ttcttgagga ttcaaaaact gaaggtggaa      720
ctgcagtctc cgcgtcgccg tcgctcctaa                                          750

```

15

<210> 89

<211> 216

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

ES 2 719 256 T3

<223> GnRH-IMX313T

<400> 89

atggaacatt ggagctatgg cctgcgtccg ggcggatcca agaagcaagg tgatgctgat 60  
 gtgtgcggag aggttgctta tattcagagc gtcgtctccg attgccacgt gcctacagcg 120  
 gaactgcgta ctctgctgga aatacgaata ctcttctctg agattcaaaa actgaaggtg 180  
 gaactgcagt ctccgcgtcg ccgtcgtctcc taataa 216

5

<210> 90

<211> 70

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> GnRH-IMX313T

<400> 90

Met Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gly Ser Lys Lys Gln  
 1 5 10 15

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

15

Ser Asp Cys His Val Pro Thr Ala Glu Leu Arg Thr Leu Leu Glu Ile  
 35 40 45

Arg Lys Leu Phe Leu Glu Ile Gln Lys Leu Lys Val Glu Leu Gln Ser  
 50 55 60

Pro Arg Arg Arg Arg Ser  
 65 70

## REIVINDICACIONES

1. Proteína modificada que comprende:

5 (i) una proteína que presenta un dominio de superhélice y por lo menos un péptido cargado positivamente unido directamente al dominio de superhélice, en la que dicha proteína modificada es como se expone en la SEC ID nº 42 (IMX313P) o en la SEC ID nº 7 (IMX313T) o

10 (ii) una proteína que presenta un dominio de superhélice trimérica unido directamente a un péptido de secuencia SEC ID nº 37 (SPRRRRRRRRRS).

2. Proteína modificada según la reivindicación 1, en la que la proteína que presenta el dominio de superhélice es un antígeno.

15 3. Proteína modificada según la reivindicación 2, en la que el antígeno se selecciona de entre el grupo que consiste en:

20 proteína hemaglutinina de la gripe HA2, la glucoproteína F del virus sincitial respiratorio, las glucoproteínas gp41 de VIH-1, las glucoproteínas gp41 de VIH-2, gp1,2 del virus del Ébola, NadA de Neisseria meningitidis, YadA de Yersinia enterocolitica, UspA2 de Moraxella catarrhalis, BadA de Bartonella henselae y HadA de Haemophilus influenza.

25 4. Proteína de fusión que comprende uno o más antígenos y una proteína modificada según la reivindicación 1(i), en la que la proteína que presenta el dominio de superhélice presenta una función de proteína transportadora.

5. Proteína de fusión según la reivindicación 4, en la que el antígeno se selecciona de entre el grupo que consiste en la proteína A de *Staphylococcus aureus*, el antígeno micobacteriano 85A y el antígeno nucleoproteínico de la gripe.

30 6. Proteína de fusión según la reivindicación 4, en la que comprende uno o más antígenos estafilocócicos fusionados a una proteína modificada como se define en la reivindicación 1(i), seleccionándose los uno o más antígenos estafilocócicos preferentemente de entre el grupo que consiste en SpA, Hla, ClfB y sortasa A.

35 7. Proteína de fusión según la reivindicación 4, en la que comprende uno o más antígenos de la gripe, tales como nucleoproteína de la gripe, fusionados a una proteína modificada definida en la reivindicación 1(i).

8. Proteína de fusión según la reivindicación 4, en la que comprende uno o más autoantígenos, tales como GnRH, fusionados a una proteína modificada como se define en la reivindicación 1(i).

40 9. Composición inmunógena que comprende la proteína modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la proteína de fusión según las reivindicaciones 4 a 8, y ligandos de ácido nucleico para TLR intracelulares.

45 10. Procedimiento para aumentar la inmunogenicidad de un antígeno o una proteína transportadora que comprende un dominio de superhélice, que comprende la unión de por lo menos un péptido cargado positivamente directamente al dominio de superhélice de la proteína, para obtener una proteína modificada como se expone en la SEC ID nº 42 (IMX313P) o en la SEC ID nº 7 (IMX313T) o que comprende la unión directa de la secuencia SEC ID nº 37 (SPRRRRRRRRRS), presentando la proteína un dominio de superhélice trimérica.

50 11. Procedimiento para aumentar la inmunogenicidad de un antígeno, en particular la inmunogenicidad de Th1, que comprende:

- preparar una proteína transportadora modificada según el procedimiento según la reivindicación 10; y
  - asociar dicho antígeno a dicha proteína transportadora modificada, y a polímeros cargados negativamente tales como ligandos de ácido nucleico para TLR intracelulares o heparina.
- 55

60 12. Proteína modificada como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o proteína de fusión como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, o composición inmunógena como se define en la reivindicación 9, para su utilización como una vacuna.

65 13. Moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas modificadas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o que codifican la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8.

14. Composición vacunal que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 13.

15. Proteína de fusión como se define en la reivindicación 6 para su utilización en el tratamiento y la prevención de infecciones estafilocócicas.

5 16. Proteína de fusión como se define en la reivindicación 7 para su utilización en el tratamiento y la prevención de la gripe.

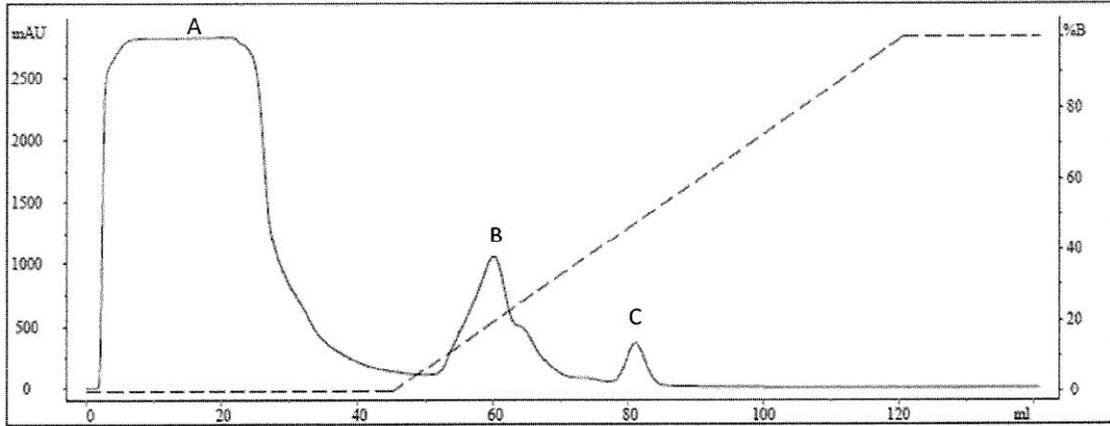


Figura 1

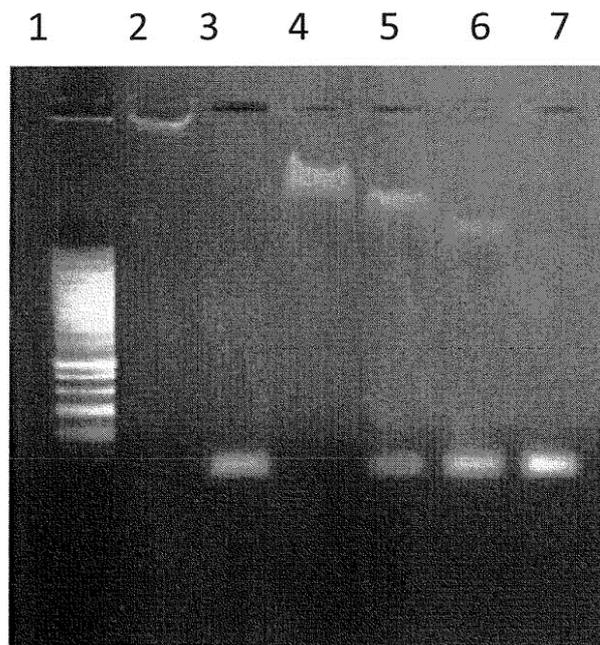


Figura 2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

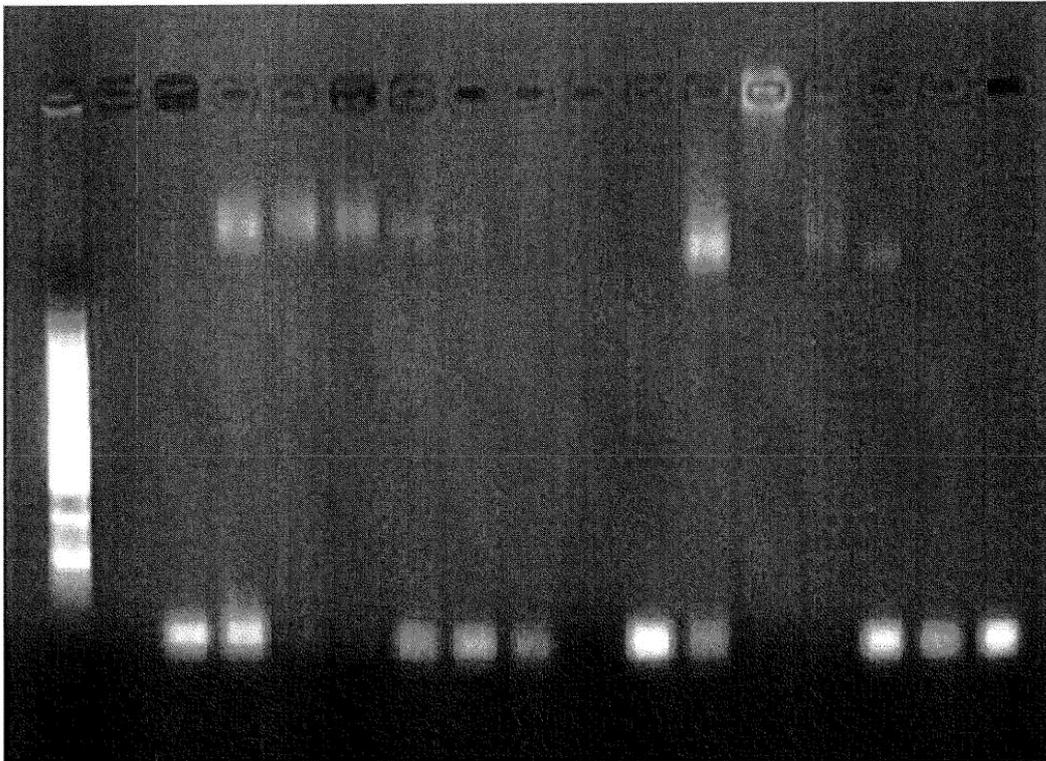


Figura 3

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

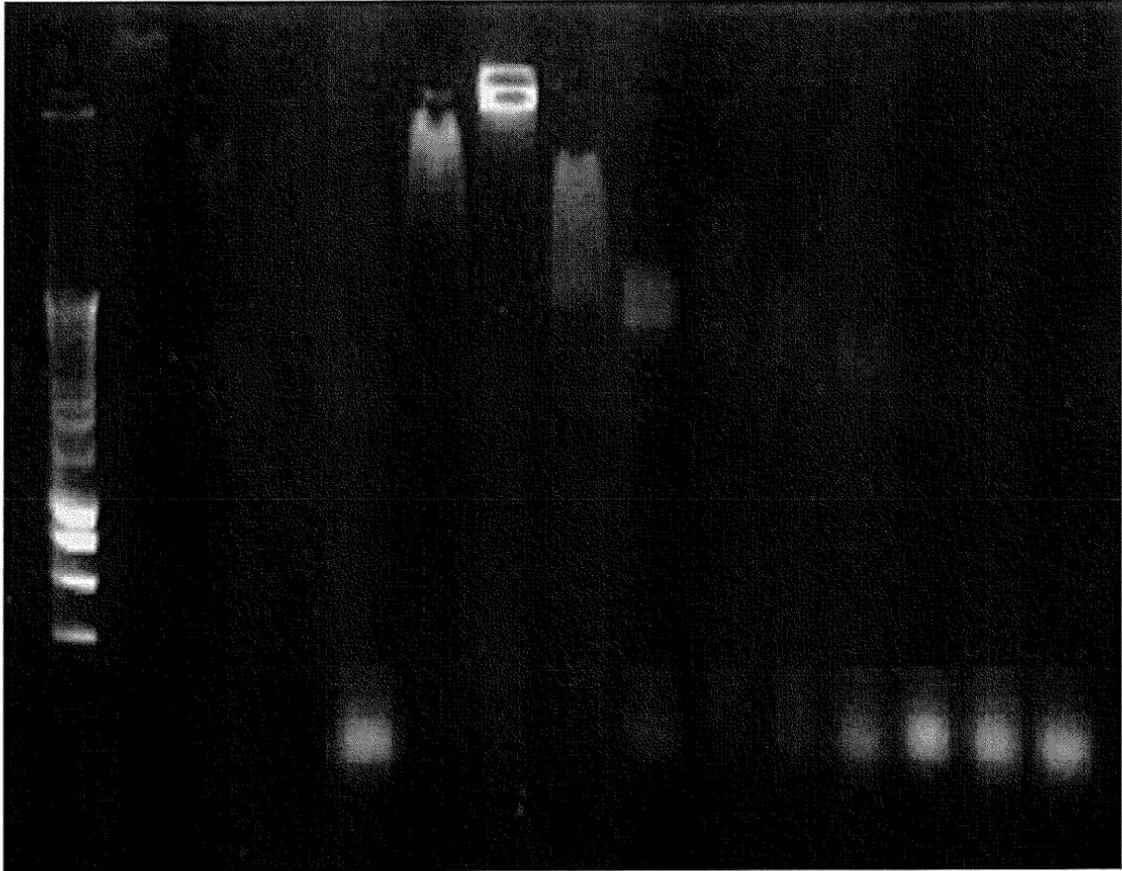


Figura 4

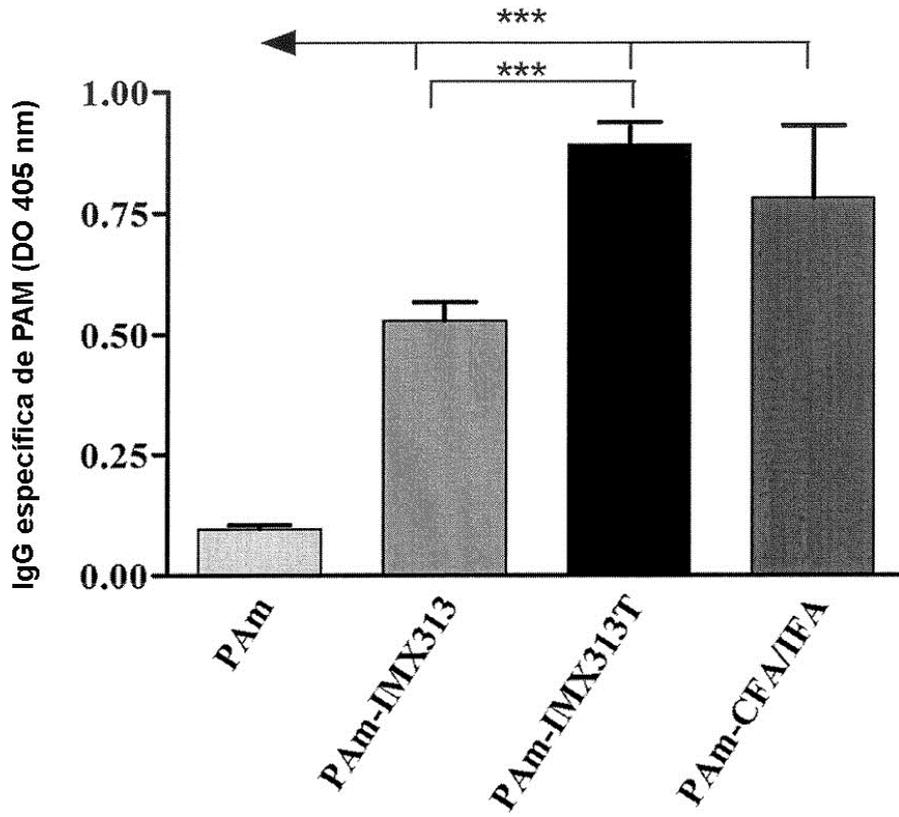


Figura 5

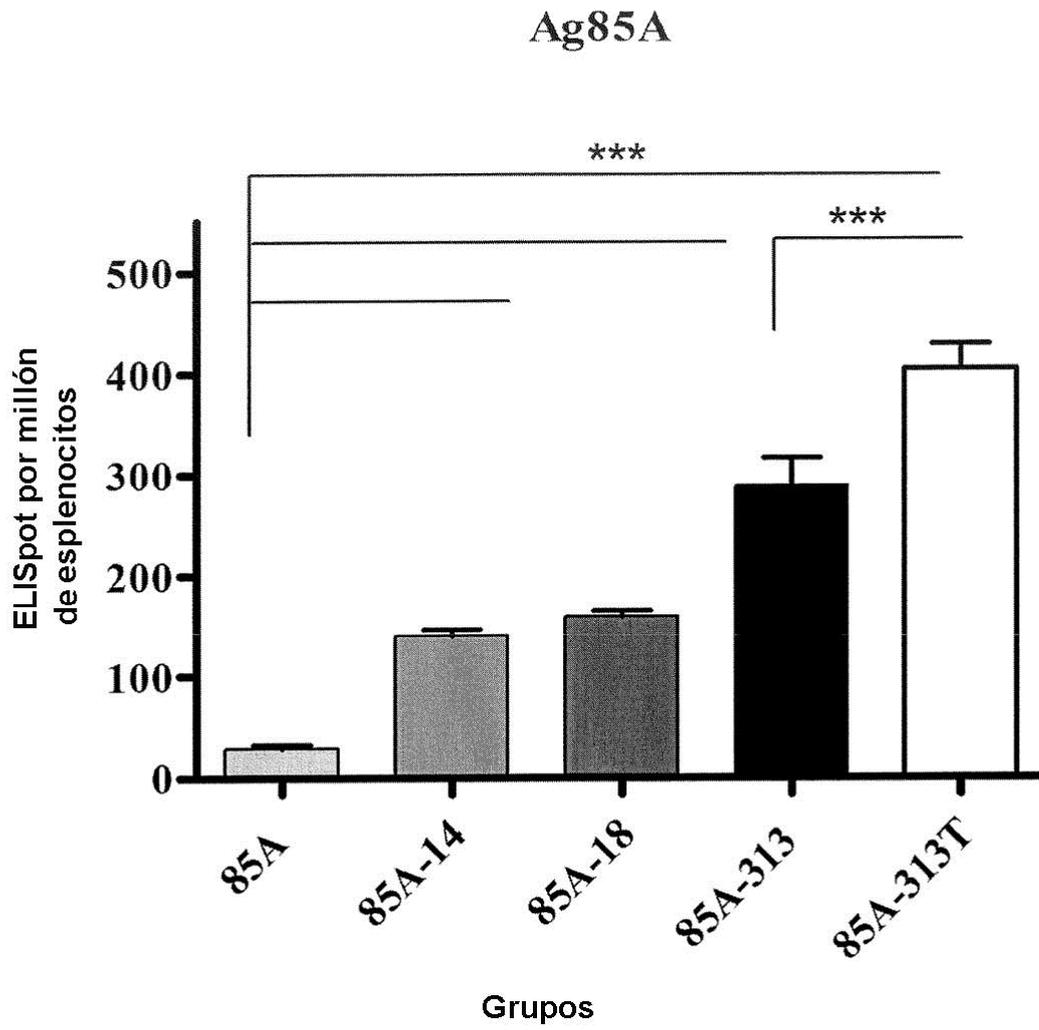


Figura 6

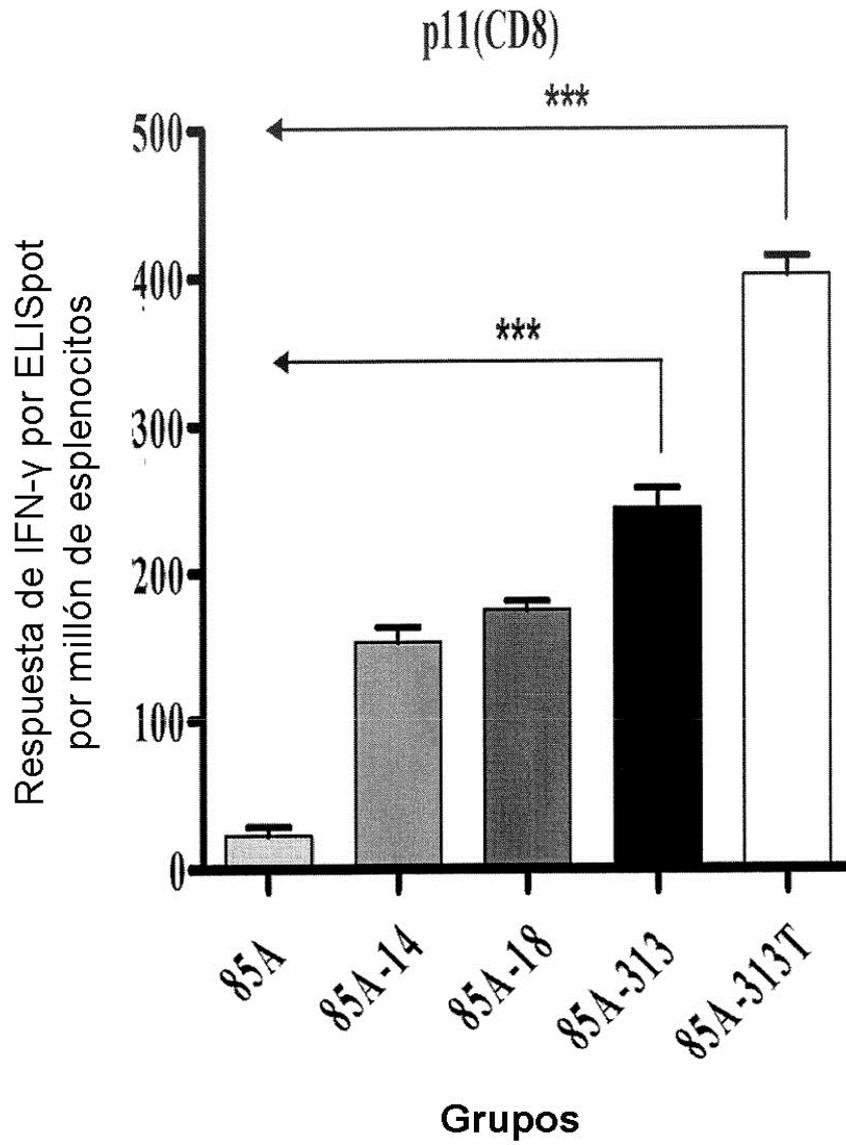


Figura 7

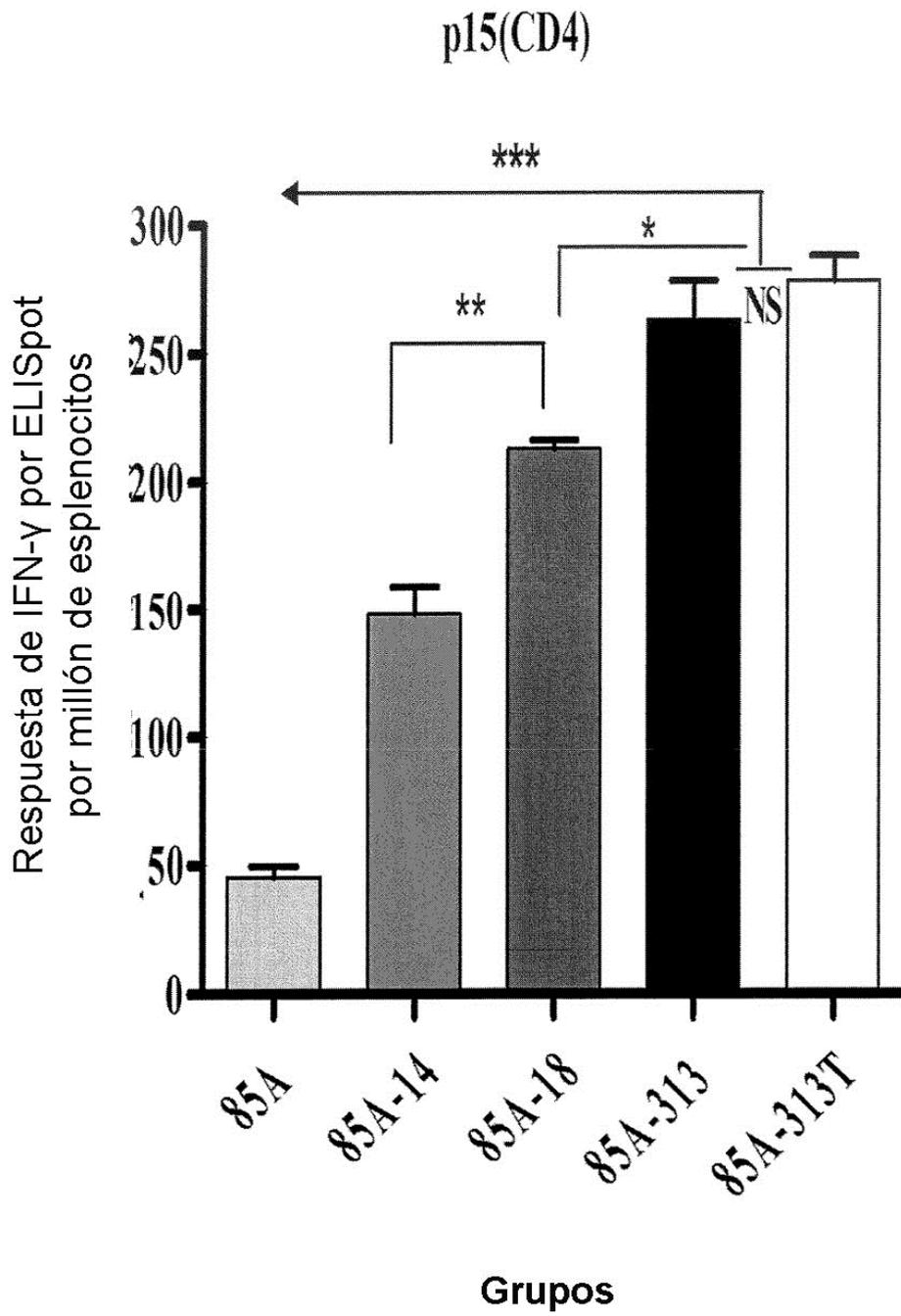


Figura 8

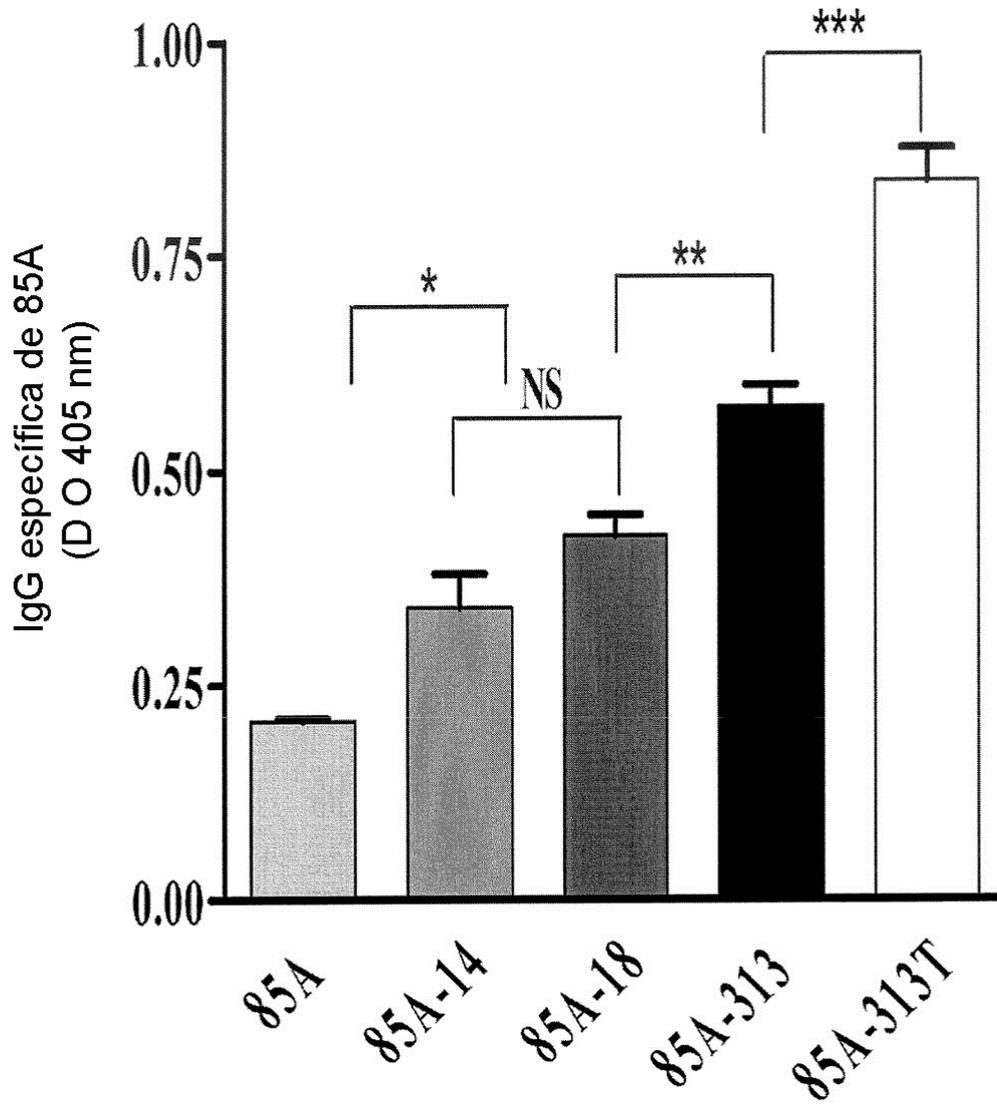


Figura 9

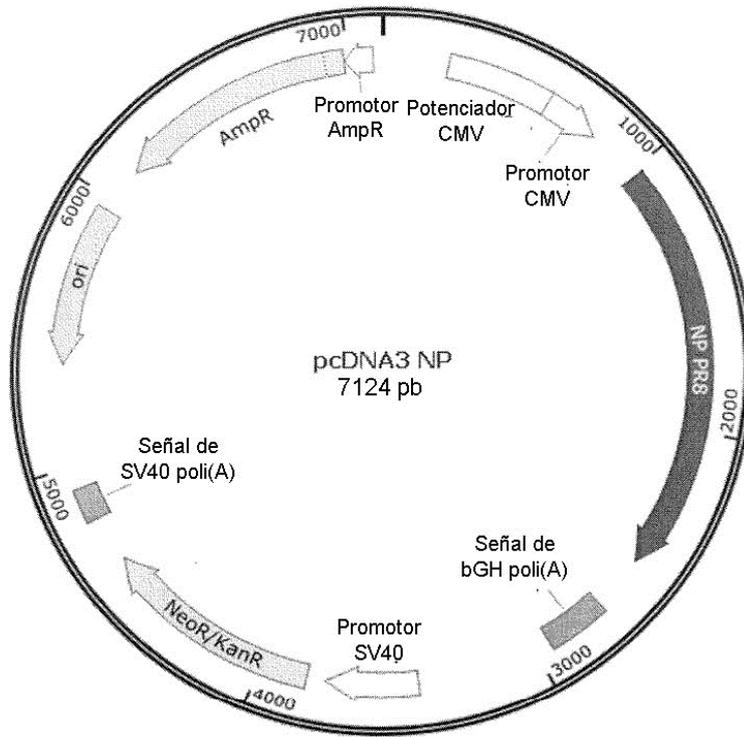


Figura 10

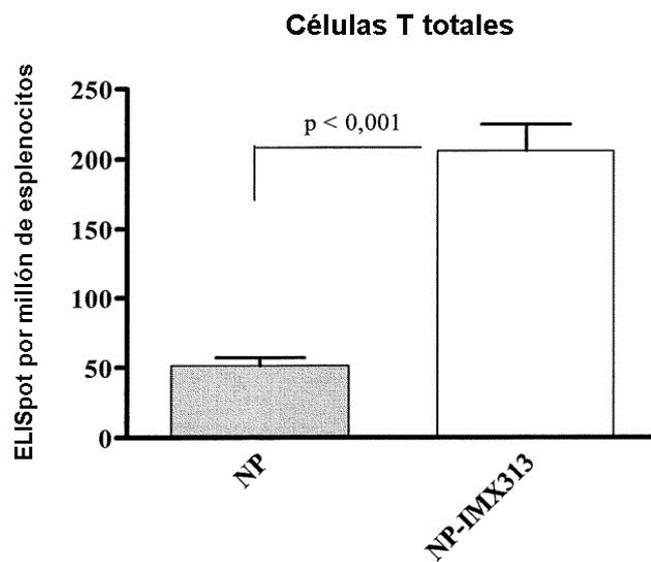


Figura 11

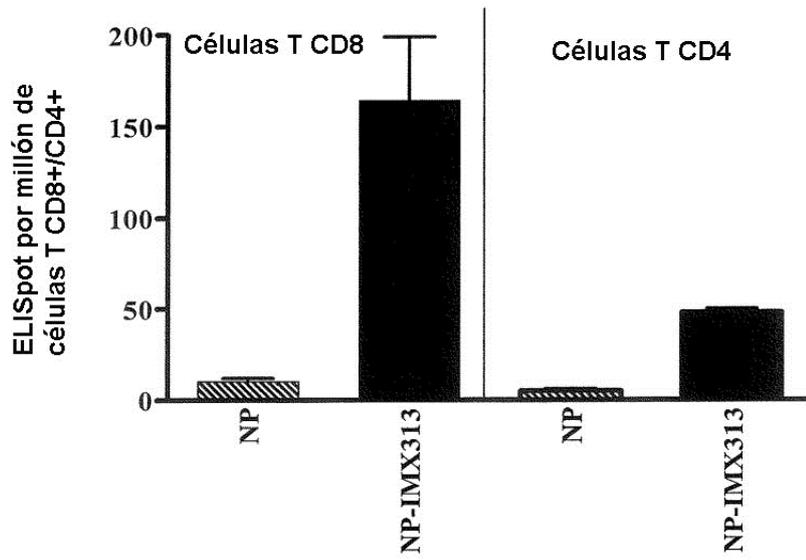


Figura 12

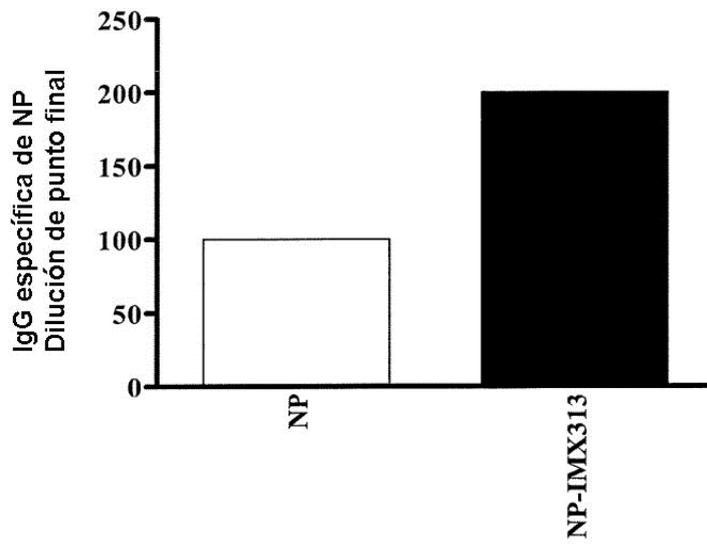


Figura 13

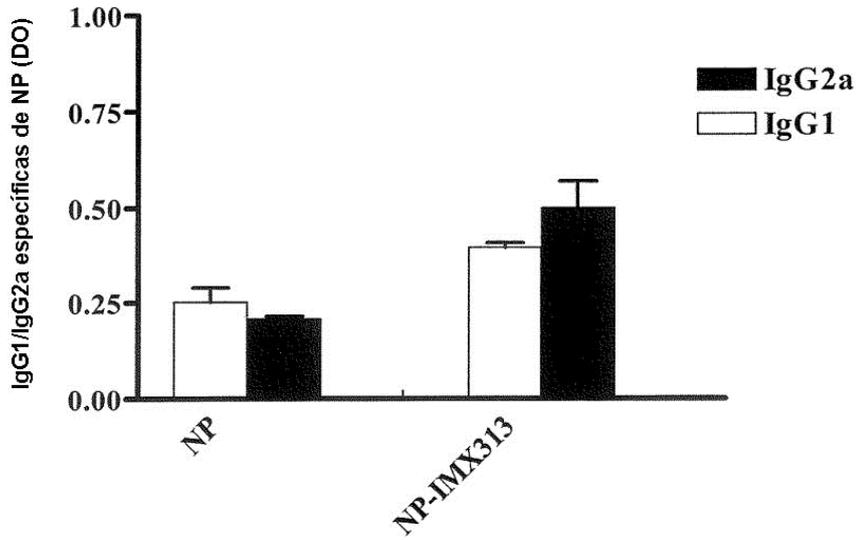


Figura 14

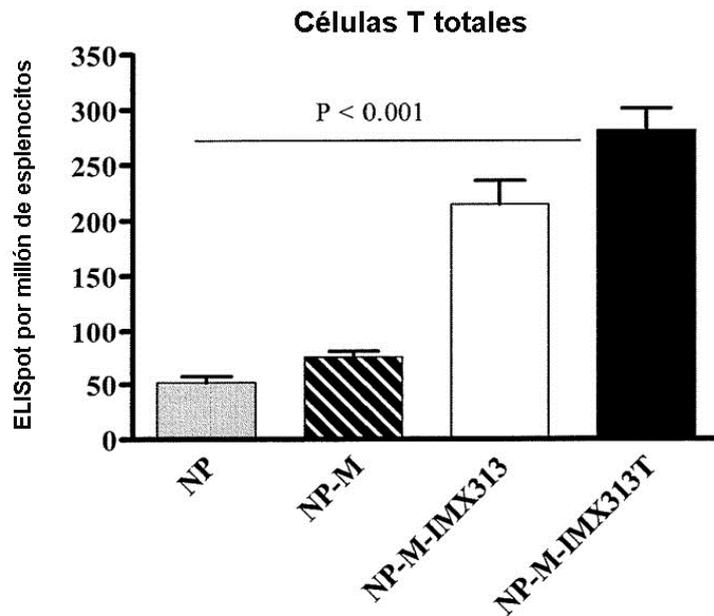


Figura 15

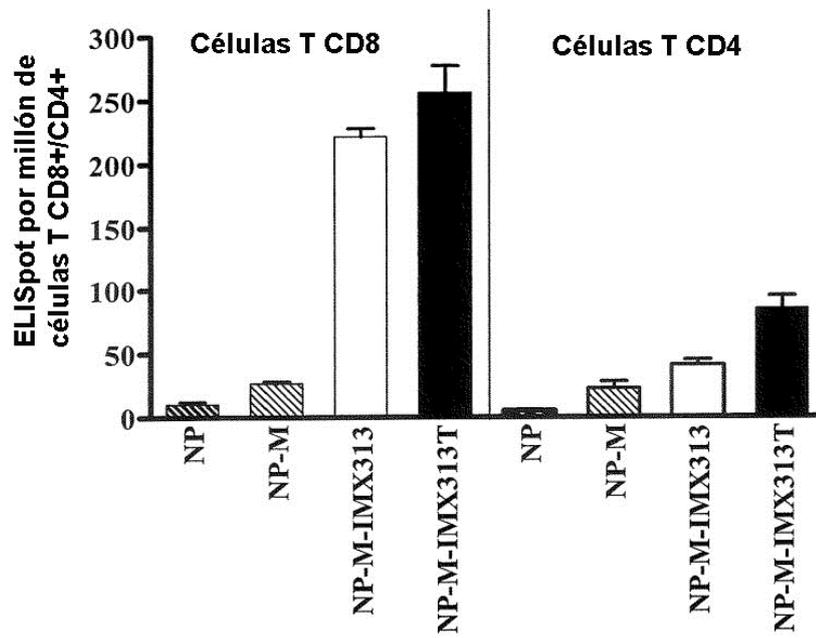


Figura 16

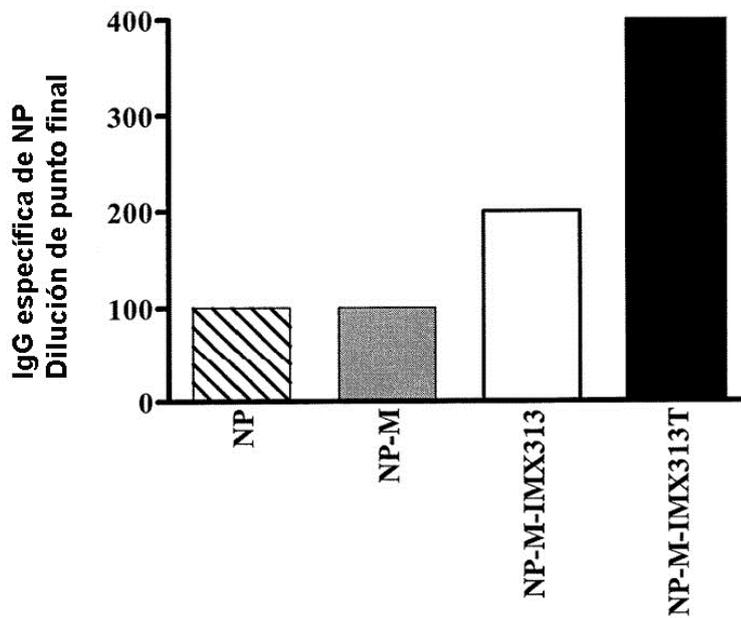


Figura 17

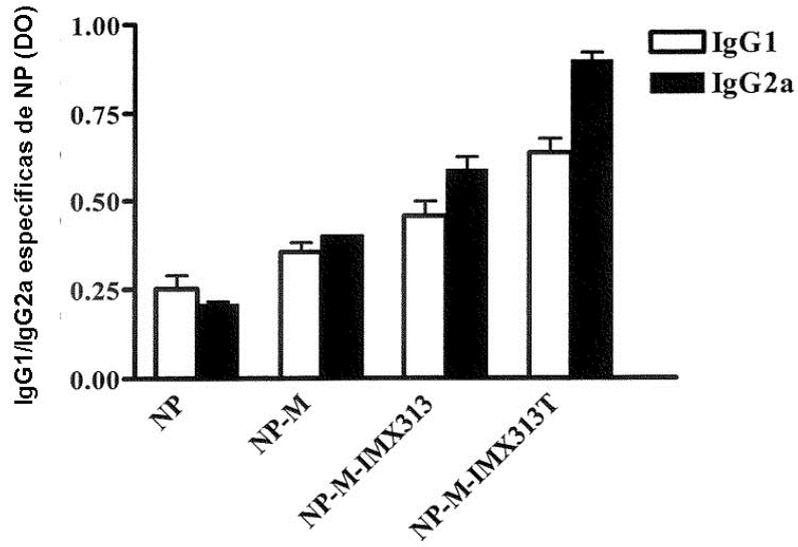


Figura 18

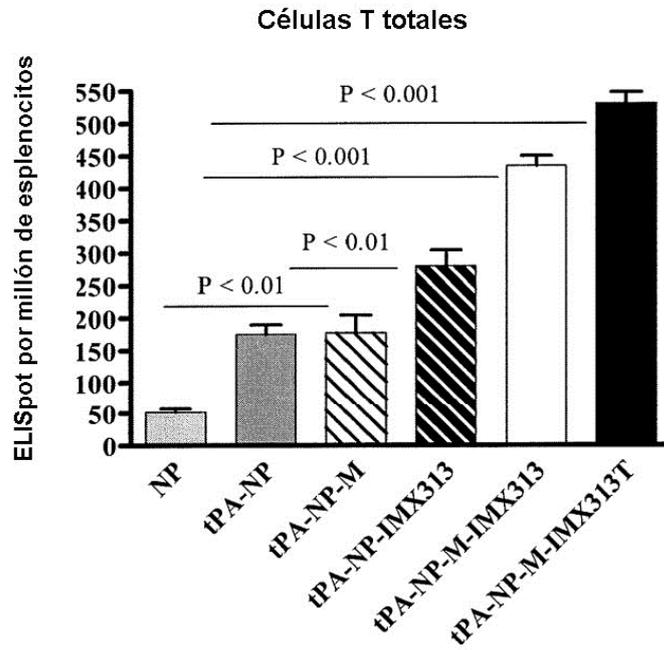


Figura 19

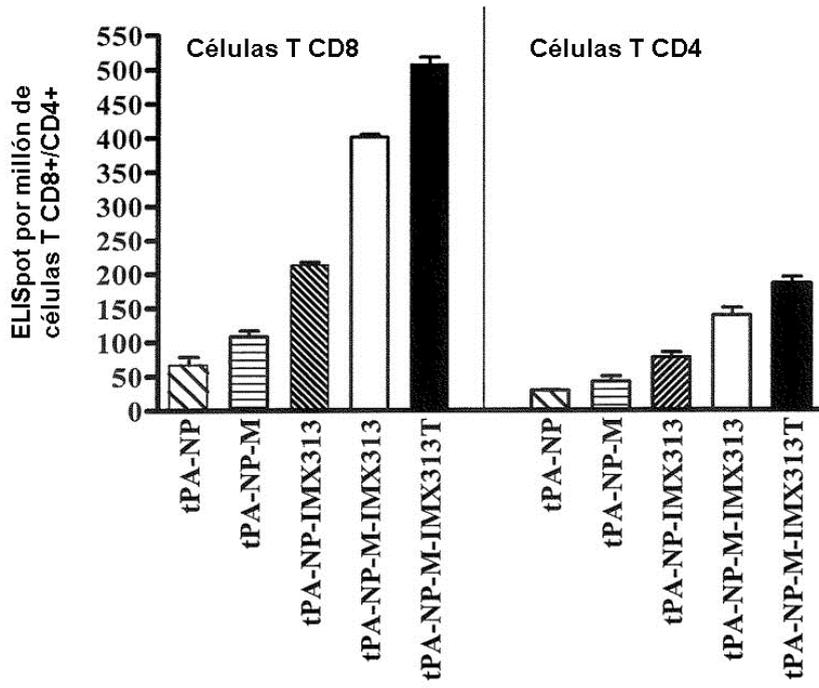


Figura 20

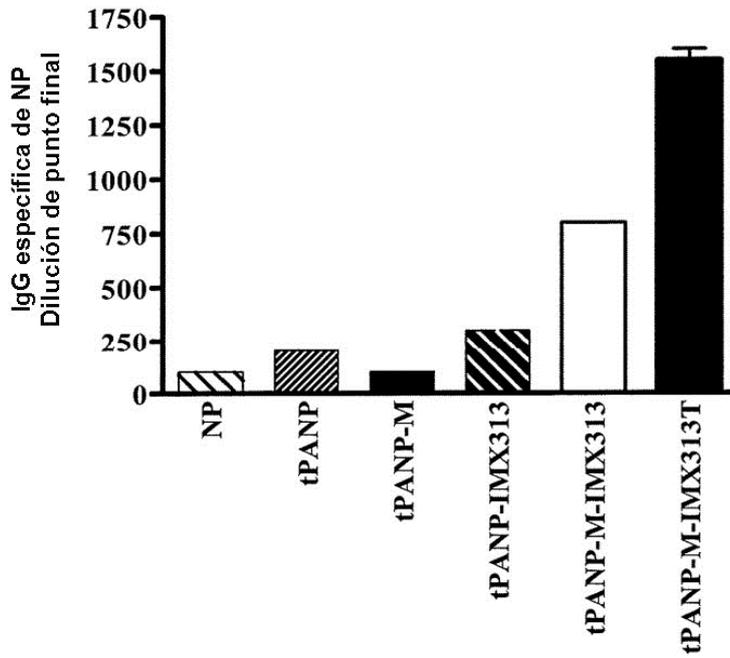


Figura 21

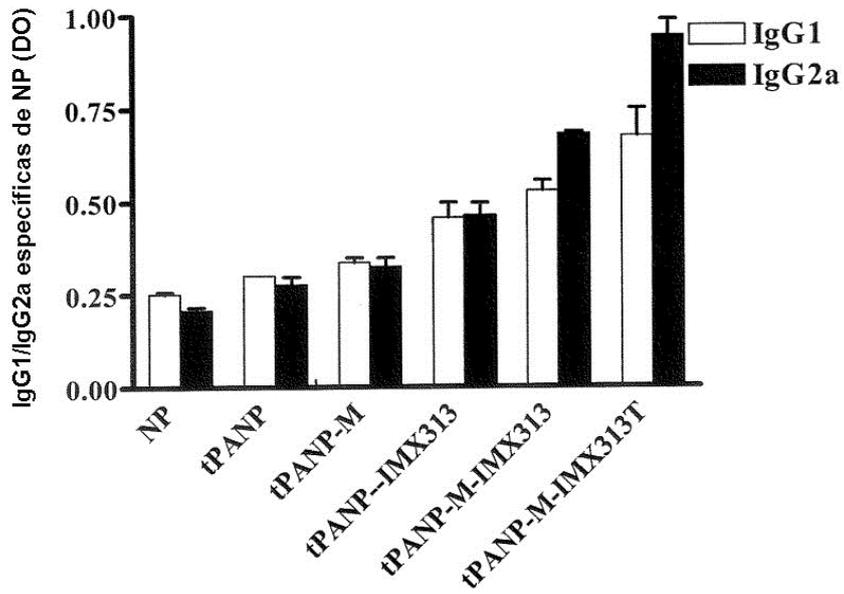


Figura 22

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Carril
	5	5	5	5	5	5	5	-	5	5	5	ODN CpG 1826 $\mu$ M
		1	0.5	0.25				-		1		IMX744 mg
					1	0.5	0.25	-			1	IMX743 mg
	1								1			IMX313T

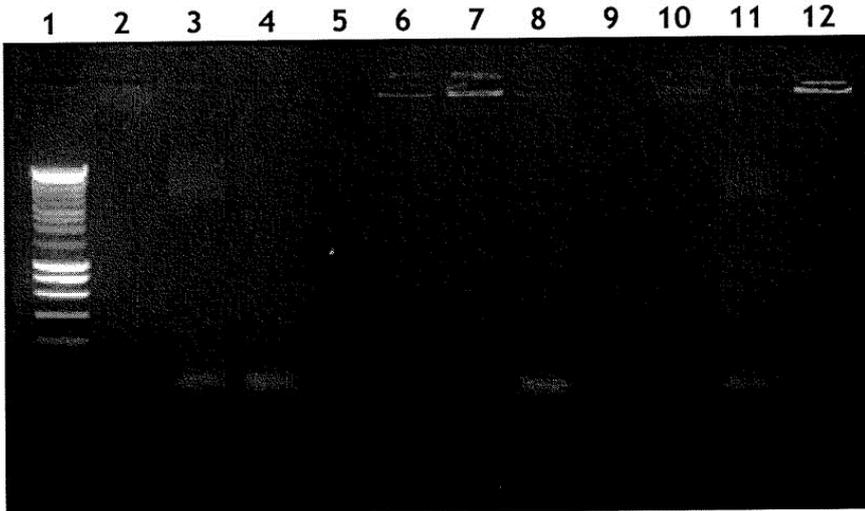


Figura 23