

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 729**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/385** (2006.01)

**A61K 39/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2008** E 14160760 (6)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019** EP 2762164

54 Título: **Vectores y construcciones de liberación de antígenos de virus de la gripe**

30 Prioridad:

**31.08.2007 GB 0716992**

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

**12.02.2020**

73 Titular/es:

**ALTIMMUNE UK LIMITED (100.0%)  
Central Square 5th Floor, 29 Wellington Street  
Leeds LS1 4DL, GB**

72 Inventor/es:

**BONNET, DOMINIQUE;  
BROWN, CARLTON B.;  
GEORGES, BERTRAND y  
SIZER, PHILIP J.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 741 729 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Vectores y construcciones de liberación de antígenos de virus de la gripe

5 **Antecedentes de la invención**

La gripe es el término genérico para las enfermedades o infecciones causadas por el virus de la gripe. Los virus de la gripe son miembros de la familia *Orthomyxoviridae* de virus y comprenden dos géneros: virus de la gripe A y B, y virus de la gripe C. Los virus de la gripe A, B y C se distinguen sobre la base de su nucleoproteína interna y proteínas de la matriz que son específicas para cada tipo viral. Los virus de la gripe A son naturalmente capaces de infectar una amplia gama de especies animales, incluyendo seres humanos, cerdos, aves, focas y caballos. Los virus de la gripe B, sin embargo, infectan solo a seres humanos, mientras que el virus de la gripe C infecta a seres humanos y cerdos. Los virus de la gripe A se clasifican en subtipos que son determinados por la antigenicidad de las glicoproteínas de la superficie, la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N).

Históricamente, las infecciones humanas por gripe A han sido causadas por tres subtipos de hemaglutinina (H1, H2 y H3) y dos subtipos de neuraminidasa (N1 y N2); más recientemente, también se ha informado de infecciones humanas por los subtipos H5, H7 y H9 previamente restringidos a aves. Se han identificado hasta la fecha para la gripe A un total de 16 subtipos distintos de hemaglutinina y 9 subtipos de neuraminidasa; todos estos son prevalentes en aves. Los cerdos y los caballos, como los seres humanos, están limitados a un rango mucho más estrecho de subtipos.

Los viriones de la gripe A y B tienen estructura pleiomórfica, teniendo los ejemplos esféricos 80 - 120 nm de diámetro, mientras que las formas filamentosas pueden tener hasta 300 nm de longitud. Existen aproximadamente 500 glicoproteínas de la espiga de la superficie por partícula (generalmente a una razón de cuatro a cinco proteínas hemaglutinina por una neuraminidasa) que están integradas en una membrana de bicapa lipídica derivada del anfitrión. Dentro de la membrana está la proteína M2 del canal iónico transmembrana, mientras que la proteína estructural M1 subyace en la bicapa. Dentro del núcleo del virus, el ARN de sentido negativo de hebra sencilla se asocia con las otras seis proteínas virales expresadas a partir de su genoma: la nucleoproteína (NP), tres transcriptasas (PB2, PB1, y PA) y dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2). El genoma del virus de la gripe comprende ocho segmentos; una característica que permite la redistribución "recombinación genética". La hemaglutinina permite al virus unirse a los receptores de las células anfitrionas y facilita la entrada del virus a la célula donde se replicará. La proteína neuraminidasa escinde enzimáticamente residuos de ácido siálico terminales, y se cree que ayuda en el transporte del virus a través de la capa de mucina de las vías respiratorias, así como facilita el florecimiento de la progenie del virus lejos de la célula anfitriona. Los virus de la gripe C, que presentan mucho menos de un riesgo para la salud a los seres humanos poseen una sola proteína de superficie que combina la hemaglutinina, la actividad de fusión y la actividad destructora de receptores.

Como resultado de la tendencia al error de la enzima ARN polimerasa, tanto las proteínas hemaglutinina y neuraminidasa de virus de la gripe son susceptibles de mutaciones puntuales que no necesitan necesariamente afectar a la capacidad del virus para replicarse. Tal mutación (o mutaciones coincidentes) en uno de los sitios reconocidos por la respuesta de anticuerpos del anfitrión pueden dar como resultado el anticuerpo del anfitrión, inducido por la vacunación o una infección previa, siendo incapaz de unirse efectivamente a la "nueva" cepa del virus permitiendo así que persista una infección. Puesto que las cepas de la gripe humana están evolucionando continuamente a través de estas mutaciones puntuales, el virus es capaz de escapar del repertorio de anticuerpos limitado de la respuesta inmune humana y causar epidemias. Por tanto, los ataques regulares "estacionales" de infecciones de gripe son causadas por las cepas circulantes en la población sometidas a la deriva antigénica.

Durante las epidemias estacionales la gripe puede propagarse por todo el mundo rápidamente e inflige una carga económica significativa en términos de hospital y otros costes de atención médica y pérdida de productividad. El virus se transmite por gotitas en el aire de humano a humano y se dirige a las células epiteliales en la tráquea y los bronquios de las vías respiratorias superiores. Los virus de la gripe también pueden ser adquiridos de superficies contaminadas y pasados a la boca. La enfermedad se propaga muy rápidamente, especialmente en circunstancias de hacinamiento a través de la tos y los estornudos. La estabilidad del virus se ve favorecida por una humedad relativa baja y bajas temperaturas y, como consecuencia, las epidemias estacionales en las zonas templadas tienden a aparecer en invierno. La mayor morbilidad y mortalidad se observan con las cepas de gripe A, con la gripe B asociada por lo general con tasas de ataque más bajas y una enfermedad más leve. Ocasionalmente, sin embargo, la gripe B puede causar epidemias de la misma gravedad que los virus de tipo A. La gripe B es principalmente un patógeno de la infancia y no suele mostrar el mismo grado de variación antigénica que el tipo A.

La infección por gripe no complicada típica se caracteriza por un rápido comienzo de la enfermedad (dolor de cabeza, tos, escalofríos) seguido de fiebre, dolor de garganta, mialgias significativas, malestar y pérdida de apetito. Otros síntomas pueden incluir rinorrea, opresión retroesternal y síntomas oculares. La señal más prominente de la infección es la fiebre que se sitúa por lo general en el rango de temperatura de 38-40°C. Mientras que la mayoría de las personas se recupera de la infección de la gripe en el plazo de una o dos semanas sin necesidad de tratamiento médico, para ciertos miembros de la población la enfermedad puede representar un grave riesgo. Tales individuos incluyen los muy jóvenes, los ancianos y las personas que sufren de afecciones médicas tales como enfermedades pulmonares,

diabetes, cáncer, riñón o problemas cardíacos. En esta población "en riesgo", la infección puede conducir a complicaciones graves de enfermedades subyacentes, neumonía bacteriana, (causada por patógenos respiratorios tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus gripee* y *Staphylococcus aureus*) y muerte. Las características clínicas de la infección por gripe son similares en los niños, a pesar de que la fiebre puede ser más alta y se pueden producir convulsiones febriles. Además, los niños tienen una mayor incidencia de vómitos y dolor abdominal, así como las complicaciones de otitis media, crup y miositis.

La Organización Mundial de la Salud estima que en las epidemias anuales de gripe 5-15% de la población se ve afectada por infecciones de las vías respiratorias superiores. La hospitalización y las muertes se producen principalmente en los grupos de alto riesgo (ancianos y enfermos crónicos). Aunque es difícil de evaluar, se cree que estas epidemias anuales dan como resultado entre tres y cinco millones de casos de enfermedad grave y aproximadamente 250.000 y 500.000 muertes cada año en todo el mundo. Más del 90% de las muertes actualmente asociadas con la gripe en los países industrializados se producen entre las personas mayores de 65 años de edad. En los Estados Unidos, los CDC estiman que de promedio más de 200,000 personas son hospitalizadas cada año después de las complicaciones que resultan de la infección de gripe estacional, registrándose un exceso de alrededor de 36.000 muertes.

La respuesta inmunitaria del anfitrión que controla la recuperación de la infección de la gripe se confiere a través de una combinación de anticuerpos séricos dirigidos a las proteínas de la superficie, anticuerpos de IgA secretora de la mucosa y respuestas inmunitarias mediadas por células. Aproximadamente una a dos semanas después de una infección primaria, los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación neutralizantes (HAI), así como los anticuerpos contra la neuraminidasa son detectables en el suero, alcanzando un máximo a las aproximadamente tres a cuatro semanas. Después de la re-infección, la respuesta de anticuerpos es más rápida. Los anticuerpos de la gripe pueden persistir durante meses o años, aunque en algunos grupos de alto riesgo los niveles de anticuerpos pueden comenzar a disminuir en unos pocos meses después de la vacunación. Los anticuerpos de IgA secretora alcanzan un máximo aproximadamente 14 días después de la infección y se pueden detectar en la saliva, las secreciones nasales, el esputo y en los lavados traqueales. Antes de la aparición de células productoras de anticuerpos, aparecen los linfocitos T citotóxicos con especificidad para la gripe, y sirven para limitar la infección mediante la reducción de la carga viral máxima a la vez que median el aclaramiento viral más rápido a través de la inducción de citoquinas antivirales y la lisis de las células infectadas. Además, las células mononucleares se infiltran en las vías respiratorias infectadas proporcionando citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos contra las células infectadas con la gripe.

Hasta la fecha, los enfoques de vacunas contra infecciones por virus respiratorios tales como la gripe se basan esencialmente en la inducción de anticuerpos que protegen contra la infección viral mediante la neutralización de los viriones o el bloqueo de la entrada del virus a las células. Estas respuestas inmunitarias humorales eligen como diana proteínas externas de la superficie viral que se conservan para una cepa dada. Por lo tanto, la protección mediada por anticuerpos es eficaz contra las cepas virales homólogas pero insuficiente frente a cepas heterólogas con proteínas de superficie serológicamente distintas. Esta distinción tiene importancia ya que las proteínas de la superficie de muchos virus son susceptibles de mutación rápida; por ejemplo, una vacuna eficaz basada en la respuesta humoral contra una forma de virus de la gripe puede ser ineficaz contra la variante de la siguiente temporada.

Actualmente existen dos tipos principales de vacunas contra la gripe. Un grupo de vacunas contiene las proteínas de superficie hemaglutinina y neuraminidasa del virus como inmunógenos activos. Estas incluyen las vacunas de virus completo inactivado, vacunas de virus fraccionado que consisten en partículas de virus inactivados desorganizados por tratamiento con detergente, vacunas de subunidades que consisten esencialmente en proteínas de superficie purificadas de las cuales se retiraron otros componentes del virus y virosomas donde las proteínas de superficie se presentan en una superficie liposomal. El segundo grupo comprende las cepas de virus, adaptadas al frío, atenuadas. Para todas estas vacunas se requiere una mezcla de antígenos de superficie de por lo general tres o cuatro cepas de virus; las vacunas contra la gripe comerciales actuales contienen antígenos de dos subtipos A, H3N2 y H1N1 y un virus de tipo B. Cada año en Septiembre y Febrero, respectivamente, el Programa Mundial contra la Gripe de la OMS recomienda la composición de la vacuna contra la gripe para la siguiente temporada que comienza normalmente en Mayo y Junio en el hemisferio sur y en Noviembre y Diciembre en el hemisferio norte. La composición se basa en datos de vigilancia de la red mundial de centros nacionales de la gripe y los centros colaboradores e intenta cubrir las posibles cepas que van a circular nueve meses después. Por esta razón, los fabricantes están obligados a cambiar la composición de la vacuna contra la gripe una vez al año con el fin de garantizar que se logra una coincidencia exacta con las cepas virales circulantes.

Vacunas contra la gripe inactivadas más se administran a través de la vía intramuscular en el músculo deltoides, excepto en niños donde el sitio recomendado es el aspecto antero-lateral del muslo. Es apropiada una sola dosis de vacuna inactivada anualmente, excepto para los niños en edad preescolar no vacunados previamente con afecciones médicas pre-existentes que deben recibir dos dosis por lo menos con un mes de diferencia. La vacuna de la gripe viva atenuada (LAIV) se suministra por vía intranasal. Éstas han estado disponibles en Rusia durante algunos años y recientemente se han autorizado para su uso en los Estados Unidos en la población pediátrica.

Tales vacunas son capaces de provocar anticuerpos locales y respuestas inmunitarias mediadas por células en la

superficie del epitelio nasal. La vacuna de la gripe viva atenuada no se ha autorizado, sin embargo, para su uso en los Estados Unidos en la población de edad avanzada (mayores de 50 años).

Para mejorar la amplitud y la intensidad de la respuesta inmunitaria montada contra las proteínas de superficie del virus de la gripe, se han evaluado diferentes coadyuvantes y agentes inmuno-potenciadores alternativos para su inclusión en la formulación de la vacuna. Un coadyuvante en este contexto es un agente que es capaz de modular la respuesta inmunitaria dirigida a un antígeno co-administrado mientras que tiene pocos o ningún efecto directo cuando se administra por sí solo. Desarrollos autorizados recientes en el campo de las vacunas de la gripe incluyen MF-59, una emulsión de aceite en agua submicrónica. Algunos fabricantes también utilizan coadyuvantes que contienen aluminio. La intención de estos coadyuvantes es amplificar la respuesta de anticuerpos del suero resultante a los antígenos administrados.

Siempre haya una buena concordancia antigénica entre las cepas de la vacuna y las que circulan en la población general, las vacunas antigripales inactivadas previenen la enfermedad confirmada por laboratorio en aproximadamente 70% - 90% de los adultos sanos. Sin embargo, el CDC destaca que la eficacia de la vacuna en los ancianos (mayores de 65 años) puede ser tan baja como 30-40%. Tiene relevancia a este respecto la observación de que el envejecimiento en los seres humanos crea defectos en las respuestas de las células T de memoria que reducen la eficacia de la vacuna y aumenta el riesgo de infección natural. Por otra parte, un estudio clínico en un entorno basado en la comunidad demostró que la inmunidad mediada por células, y no la inmunidad humoral, se correlacionaba con la protección contra la enfermedad de la gripe en un grupo de más de 60 años de edad.

Además, las tasas de eficacia disminuyen significativamente si la cepa de la vacuna es antigénicamente diferente de las cepas circulantes. Estudios de variación antigénica han indicado que cuatro o más sustituciones de aminoácidos sobre al menos dos sitios antigénicos de la hemaglutinina de la gripe A dan como resultado una variante por deriva suficientemente discreta para socavar la eficacia de una vacuna (Jin H, Zhou H, Liu H, Chan W, Adhikary L, Mahmood K, et al. "Two residues in the hemagglutinin of A/Fujian/411/02-like influenza viruses are responsible for antigenic drift from A/Panama/2007/99." *Virology*. 2005;336:113-9).

En un estudio controlado de casos de adultos de 50 a 64 años con gripe confirmada por laboratorio durante la temporada 2003-04, cuando la vacuna y las cepas de A/H3N2 circulantes no fueron bien adaptadas, la eficacia de la vacuna se estimó en 52% entre los individuos sanos y 38% entre los que tenían una o más afecciones de alto riesgo, de acuerdo con los CDC. La probabilidad de inadecuación se eleva por la posibilidad limitada de fabricación; el momento desde la confirmación de la cepa, hasta la producción en semilla, la fabricación y la purificación de antígenos, y la mezcla trivalente y la carga del producto deben ocurrir típicamente en menos de seis meses.

De vez en cuando, una nueva cepa de la gripe emerge en la población con alta patogenicidad y novedad antigénica que da como resultado una pandemia mundial. La gripe pandémica es el resultado de un cambio antigénico en las proteínas de superficie y representa una grave amenaza para la salud mundial puesto que no se ha desarrollado ninguna inmunidad preexistente por los individuos. Las cepas pandémicas se caracterizan por su repentina aparición en la población y su novedad antigénica. Durante el siglo XX, se produjeron cuatro pandemias; en 1918 la cepa causante fue H1N1, en 1957 H2N2, en 1968 H3N2 y en 1977 H1N1.

Hay tres explicaciones alternativas para la aparición del cambio antigénico. En primer lugar, puesto que el genoma del virus de la gripe está segmentado, es posible que dos cepas de la gripe intercambien sus genes después de la infección simultánea de un único anfitrión, por ejemplo porcino, que conduce a la construcción de una progenie de replicación competente que porta información genética diferente de los virus parentales. Se cree que este proceso, conocido como recombinación genética, ha sido la causa de las pandemias de 1957 y 1968. La pandemia de 1968 surgió cuando el gen de la hemaglutinina H3 y otro gen interno de un donante aviar se recombinaron con la neuraminidasa N2 y otros cinco genes de la cepa H2N2 humana que había estado en circulación. En segundo lugar, una cepa de la gripe no humana adquiere la capacidad de infectar a los seres humanos. La pandemia de 1918 se produjo cuando una cepa H1N1 aviar mutó permitiendo su transferencia rápida y eficaz de ser humano a ser humano. En tercer lugar, una cepa que había causado previamente una epidemia puede permanecer secuestrada y sin alteraciones dentro de la población humana. El 1977 la cepa pandémica H1N1, por ejemplo, era esencialmente idéntica a una cepa que había causado una epidemia 27 años antes y no fue detectada en el reservorio humano y animal en los años intermedios.

Existe riesgo de una pandemia de gripe cuando se cumplen tres criterios principales:

1. Surge (o reaparece) un subtipo HA de virus de la gripe, no visto en la población humana durante al menos una generación.
2. El virus infecta y se replica de manera eficaz en los seres humanos, causando una enfermedad significativa.
3. El virus se transmite fácilmente y de manera sostenible entre los seres humanos.

Pandemias globales pueden afectar a entre 20% y 40% de la población mundial en un solo año. La pandemia de 1918-1919, por ejemplo, afectó a 200 millones de personas, matando a más de 30 millones en todo el mundo. En los Estados Unidos, murieron más de medio millón de individuos, lo que representó 0,5% de la población. Aunque la atención

sanitaria ha mejorado considerablemente desde entonces, con las vacunas y los tratamientos antivirales que se están desarrollando, los CDC estiman que una pandemia a día de hoy se traduciría en dos hasta siete millones de muertes a nivel mundial.

5 Desde 1999, tres cepas de subtipos diferentes de gripe A (H5N1, H7N7 y H9N2) han pasado de las especies de aves a los seres humanos, causando toda mortalidad humana. A partir del 14 de agosto de 2007 se habían registrado en todo el mundo un total de 320 casos humanos de infección por Virus de la Gripe Aviar Altamente Patógena (HPAIV en sus siglas inglesas) H5N1, con 193 muertes.

10 A diferencia de la gripe estacional normal, donde la infección causa síntomas respiratorios leves en la mayoría de las personas sanas, la enfermedad causada por el virus H5N1 sigue un curso clínico inusualmente agresivo, con rápido deterioro y alta letalidad. Son comunes neumonía viral primaria y fracaso multiorgánico. Es significativo que la mayoría de los casos han ocurrido en niños previamente sanos y adultos jóvenes. El HPAIV H5N1 se incubaba más tiempo que otros virus de la gripe humana antes de causar síntomas, hasta ocho días en algunos casos. En las agrupaciones familiares de casos, el tiempo entre los casos ha oscilado generalmente entre dos y cinco días, pero se ha informado que ha durado hasta 17 días.

15 Es probable que los síntomas iniciales de la infección por HPAIV H5N1 incluyan diarrea y pueden aparecer hasta una semana antes de que los síntomas respiratorios. Esta característica, combinada con la detección de ARN viral en muestras de heces, sugiere que el virus puede multiplicarse en el tracto gastrointestinal. Los síntomas del tracto respiratorio inferior, tales como falta de aliento aparecen temprano en el curso de la enfermedad, mientras que los síntomas del tracto respiratorio superior, tales como rinorrea son menos comunes.

20 El HPAIV H5N1 actualmente cumple dos de las condiciones necesarias para una pandemia; la hemaglutinina H5 representa un nuevo antígeno para los seres humanos. Nadie tendría inmunidad si emergiera un virus pandémico de tipo H5N1. Además, el virus ha infectado a más de 300 personas, con una tasa de mortalidad aparente de más del 60%.

25 Por tanto, se cumplen todos los requisitos previos para el comienzo de una pandemia salvo uno: la capacidad de transmisión eficiente y sostenida del virus de ser humano a ser humano. El riesgo de que el virus H5N1 adquiriera esta capacidad se mantendrá mientras exista la posibilidad de que se produzcan infecciones en seres humanos. Se cree que esto es una probabilidad realista, ya sea a través de mutación gradual o a través de recombinación genética con una cepa adaptada a seres humanos.

30 A nivel científico, son necesarios uno o más cambios en el fenotipo de virus antes de que la cepa del virus pueda lograr la transmisión rápida de ser humano a ser humano y comenzar una pandemia. Sin embargo, una serie de observaciones recientes incluyendo las mutaciones específicas detectadas en recientes productos aislados humanos de Turquía, la creciente patogenicidad para los mamíferos del virus circulante, la expansión de la gama de anfitriones de HPAIV H5N1 para incluir otros mamíferos, como tigres y gatos que se había considerado previamente que eran resistentes a la infección con el virus de la gripe aviar, indican en conjunto que el virus H5N1 sigue evolucionando capacidades que en última instancia pueden facilitar la transmisión de ser humano a ser humano.

35 Aún pueden surgir otros virus gripales posiblemente incluso con un mayor potencial pandémico. Estos incluyen algunas cepas de virus H9 y H7, que en los últimos años también se han transmitido a los seres humanos. Los virus H9 son ahora endémico en aves de corral en Asia y también han pasado de manera eficiente a poblaciones de cerdos en el Sudeste y el Este de China. Es preocupante el hecho de que las cepas H9N2 posean especificidad típica de receptor de tipo humano y tengan una amplia gama de anfitriones.

40 A principios de 2003, se produjo un brote de HPAIV H7N7 en aves de corral en los Países Bajos. La transmisión de ave a ser humano del virus H7N7 se produjo en al menos 82 casos. La conjuntivitis fue el síntoma más común de enfermedad en las personas infectadas con la cepa H7, presentando solo siete casos una enfermedad similar a la gripe típica. El virus no resultó altamente patógeno para el hombre y no se observó un solo caso fatal. Otros virus con potencial pandémico son los del subtipo H2, debido a su historia pasada como virus pandémico, y H6, debido a su alta incidencia en las especies de aves de corral en Asia y América del Norte.

45 Esto indica que la amenaza de una nueva pandemia de gripe humana no está vinculada únicamente a la aparición de la HPAI H5N1.

50 En preparación para una pandemia de gripe se han realizado una serie de pruebas clínicas con vacunas contra la gripe H5N1 candidato. Estas han demostrado consistentemente que con el fin de generar una respuesta de anticuerpos séricos que se pronostica que sea protectora, se requieren múltiples dosis de una cantidad mucho más alta de antígeno de hemaglutinina que la utilizada normalmente en una vacuna de temporada o la inclusión de un coadyuvante. Esto es un reflejo directo de la carencia de exposición previa del sistema inmunológico de la población a la hemaglutinina H5. En la actualidad, las únicas opciones disponibles para una vacuna contra la gripe pandémica son, por tanto, una con un muy alto contenido de HA, lo que limitaría severamente el número de dosis que se podrían producir, o el uso de un coadyuvante que no está autorizado actualmente en la mayoría de los países. También debe

apreciarse que una vacuna que coincida con la cepa pandémica tardaría muchos en fabricarse desde el momento en que se aisle por primera vez en seres humanos; una vacuna almacenada producida con anterioridad a la aparición de una pandemia es muy probable que no sea antigénicamente idéntica y, por tanto, proporcionaría una protección limitada, o ninguna en absoluto. La evidencia de la deriva antigénica es ya evidente en los brotes más recientes de H5N1.

En resumen, existe una clara necesidad de mejorar ambas vacunas contra la gripe estacional y pandémica:

1. Existen limitaciones obvias en su eficacia, en particular en los individuos no vacunados. Esto reviste un interés particular con respecto a las perspectivas de una pandemia de gripe derivada de cambio antigénico.
2. La dependencia de poder predecir con exactitud las cepas de la gripe que pueden estar circulando en las siguientes estaciones de otoño/invierno. Una falta de correspondencia entre las cepas de la vacuna y aquellas infecciones que causan en realidad hará que una proporción significativa de la población sea vulnerable a la gripe.
3. La necesidad de volver a vacunar a los grupos de riesgo sobre una base anual ya que el virus se somete a deriva antigénica.
4. Las limitaciones de capacidad, ya que solo hay un número limitado de posibles plantas de fabricación de agentes biológicos en todo el mundo.
5. La protección concedida al grupo de edad de personas de edad avanzada está limitada por las vacunas convencionales.

Una clase mejorada de la vacuna contra la gripe por lo tanto sería preferiblemente sintética, estable, eficaz contra todas las cepas de la gripe A (incluyendo potenciales cepas pandémicas) con una eficacia mejorada en los grupos de edad avanzada (en riesgo).

### **Papel de las células T en la protección contra la enfermedad de la gripe**

Si bien las tecnologías de vacunas de la gripe convencionales se han centrado principalmente en las respuestas de anticuerpos a las proteínas de la superficie viral, éstas están sujetas a cambio y deriva antigénicos que socavan la eficacia y crean las vulnerabilidades logísticas descritas. En contraste, las células T, que median las respuestas inmunitarias celulares, pueden dirigirse a las proteínas más altamente conservadas a través de las cepas y clados virales heterólogos. Esta propiedad comunica a las vacunas que inducen respuestas inmunitarias celulares protectoras el potencial de proteger contra las cepas y clados virales heterólogos (inmunidad heterosubtípica). Para el virus de la gripe, la conservación de las proteínas PB1, PB2, PA, NP, M1, M2, NS1 y NS2 y la persistencia de las células T CD4 + y CD8 + específicas de antígeno correspondientes convierte estas proteínas en dianas atractivas de vacunas.

La inmunidad mediada por células antiviral protectora consiste en la inducción de una respuesta de Tipo 1 apoyada por linfocitos T coadyuvantes CD4+ de Tipo 1 (Th1) que conduce a la activación de los mecanismos efectores inmunitarios incluyendo la inducción y el mantenimiento de los linfocitos T citotóxicos (CTL) así como citoquinas inmunoestimuladoras tales como IFN- $\gamma$  e IL-2. Las células T coadyuvantes CD4 + son las principales responsables de ayudar a otras células del sistema inmunológico a través de interacciones directas célula-célula o mediante la secreción de citoquinas después del reconocimiento de epítopos peptídicos de células T antigénicas unidos a moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Los linfocitos T citotóxicos (CTL) expresan típicamente CD8 e inducen la lisis o apoptosis de células en las que reconocen los antígenos foráneos presentados por moléculas de clase I del MHC, lo que proporciona una defensa contra patógenos intracelulares tales como virus. Esta asociación de fenotipo y función no es absoluta, ya que las células CD4+ pueden exhibir actividad citolítica, mientras que las células CD8+ secretan citoquinas antivirales, en particular interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral. De hecho, la actividad de los CTL CD4+ ha sido propuesta como otro mecanismo inmunológico para controlar la infección viral aguda y crónica en seres humanos. Los CTL CD4+ pueden controlar la propagación viral por el efecto citolítico antiviral directo y pueden desempeñar una actividad antiviral directa por medio de la producción de citoquinas antivirales tales como IFN- $\gamma$ . Se sabe que el IFN- $\gamma$  tiene un efecto inhibitorio y no citolítico directo sobre la producción de virus. Las células T coadyuvantes CD4 + también son esenciales para determinar la respuesta de anticuerpos de células B y el cambio de clase, y para maximizar la actividad bactericida de fagocitos tales como los macrófagos.

Se cree que las respuestas inmunitarias celulares que desempeñan un papel importante en el control de la infección por gripe, mejorando los signos de la enfermedad y promoviendo la recuperación de la enfermedad. La inmunidad celular específica de la gripe se provoca después de la infección natural y se han identificado varias proteínas virales como dianas para las respuestas de células T heterosubtípicas de memoria humanas, incluyendo la nucleoproteína (NP), la polimerasa (PB1, PB2, y PA), las proteínas M1 y M2, y la proteína-1 no estructural (NS1). También puede estar implicada NS2. Estas proteínas internas contienen regiones altamente conservadas e inmunodominantes haciéndolas dianas ideales de células T. En particular, los estudios experimentales han demostrado que la NP de la gripe A representa un antígeno diana importante para los CTL específicos de subtipo y de reacción cruzada en ratones y seres humanos. Esto contrasta con la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), que son dianas inadecuadas debido a su alta variabilidad de secuencia dentro y entre los subtipos de la gripe.

Más específicamente, la inmunidad mediada por células está fuertemente implicada en la protección contra la

enfermedad de la gripe incluyendo cepas altamente patógenas. Las células T CD4+ y CD8+ de memoria están presentes en las vías respiratorias pulmonares y existen pruebas de que estas células juegan un papel en la inmunidad pulmonar a la exposición a la gripe mediando la participación del patógeno en el sitio de la infección cuando las cargas de patógenos son bajas. El agotamiento de las células T CD8+ reduce la capacidad de los ratones vacunados para responder a la infección de la gripe, lo que significa un papel para las células T CD8+ en la respuesta secundaria de protección. Debido a que la replicación viral se limita a las células del epitelio respiratorio, las células T CD8+ ejercen sus funciones efectoras en este sitio, produciendo citoquinas antivirales y lisando las células diana que presentan los determinantes virales para los que portan un receptor de células T específico. La lisis de las células epiteliales infectadas está mediada por gránulos de exocitosis que contienen perforina y granzima, así como mecanismos Fas. (Thomas PG, Keating R, Hulse-Post DJ, Doherty PC. "Cell-mediated protection in influenza infection". *Emerg Infect Dis.* Enero de 2006; 12(1):48-54).

Se inician respuestas energéticas de las células T CD4+ a la gripe en el nódulo linfático de drenaje seguido del bazo y alcanzan su máximo en las secreciones pulmonares y broncoalveolares el día 6-7 después de la infección. Se ha demostrado que esta respuesta primaria de las células T CD4+ a la infección por gripe, aunque menor en magnitud que la respuesta de CD8, implica una expansión robusta de CD4+, diferenciación de Th-1 y su migración al sitio de la infección. Las células T coadyuvantes CD4+ también son necesarias para la memoria CD8 a largo plazo y eficaz para la infección por gripe. Las respuestas de las células T CD4+ efectoras y de memoria contribuyen a la inmunidad contra la gripe a través de múltiples mecanismos, incluyendo su contribución clásica como coadyuvantes durante la generación de respuestas de CTL CD8+ específicas de la gripe, su capacidad para conducir IgG2a para neutralizar las partículas virales infecciosas, y por medio de su actividad antiviral directa a través la secreción de IFN-gamma. Se ha demostrado que los epítomos de células T tanto CD4+ como CD8+ promueven el aclaramiento viral y confieren protección en ratones contra una exposición a la gripe.

Los modelos de ratón de virus de la gripe A proporcionan un sistema experimental para analizar la inmunidad mediada por células T. En particular, la respuesta inmunitaria de las células T a la infección por gripe ha sido bien caracterizada en ratones C57BL/6 (H2<sup>b</sup>) y BALB/c (H2<sup>d</sup>) y sus híbridos. Plotnicky *et al.* (Plotnicky H, Cyblat-Chanal D, Aubry JP, Derouet F, Klinguer-Hamour C, Beck A, Bonnefoy JY, Corva A "The immunodominant influenza matrix T cell epitope recognized in human induces influenza protection in HLA-A2/K(b) transgenic mice." *Virology.* 10 de Mayo de 2003; 309(2):320-9) demostraron la eficacia protectora del epítomo 58-66 de la proteína de la matriz de la gripe (M1) a la exposición murina transgénica letal. Protección estaba mediada por las células T ya que la protección fue abolida tras el agotamiento *in vivo* de las células T CD4+ y/o CD8+. La supervivencia de los ratones se correlacionó con las células T específicas de M1 en los pulmones, que eran directamente citotóxicas para las células infectadas con gripe después de la exposición a la gripe. Woodland *et al.* (Crowe SR, Miller SC, Woodland DL. "Identification of protective and non-protective T cell epitopes in influenza" *Vaccine.* 2006 23 de Enero; 24(4):452-6) también demostró que un único epítomo de células T CD4+ HA (211-225) podía conferir el control parcial de la infección viral en los ratones vacunados.

Mientras que las dianas de las células T tienden a ser propensas a mutación menos frecuente que los epítomos de células B de la proteína de superficie del virus de la gripe, los epítomos de células T CD8+ y CD4+ también mutarán bajo presión inmunitaria protectora a lo largo del tiempo (Berkhoff EG, de Wit E, Sr. Geelhoed-Mieras MM, Boon AC, Symons J, Fouchier RA, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF. "Fitness costs limit escape from cytotoxic T lymphocytes by influenza A viruses." *Vaccine.* 10 de Noviembre de 2006; 24(44-46):6594-6). Este escape es probablemente el resultado de la confrontación entre el virus y las proteínas del antígeno leucocitario humano altamente polimórfico (HLA) de clase I y II que determinan el procesamiento de antígenos y la presentación de epítomos para acoger las células T CD8+ y CD4+, respectivamente. Este mecanismo de escape viral ha sido más claramente establecido para el VIH y el VHC y se sabe que conforma la evolución del virus. Por lo tanto la selección de secuencias de péptidos altamente conservadas con baja variabilidad inherente (entropía) es un factor importante a considerar en el diseño de vacunas de células T que puedan contrarrestar específicamente el cambio y deriva antigénicos. Tales métodos han sido descritos por Berkhoff *et al.* (Berkhoff EG, de Wit E, Sr. Geelhoed-Mieras MM, Boon AC, Symons J, Fouchier RA, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF "Functional constraints of influenza A virus epitopes limit escape from cytotoxic T lymphocytes" *J Virol.* Septiembre de 2005; 79(17):11239-46).

Los adultos mayores de 65 años de edad representan actualmente alrededor del 90% de toda la mortalidad relacionada con la gripe. Este es también el grupo diana en el que las vacunas actuales son menos eficaces. En los seres humanos, el envejecimiento parece estar asociado con una disminución en la capacidad de generar efectores de células T a partir de sub-poblaciones de memoria. Se han observado un aumento de la frecuencia de células T CD4+ de memoria centrales y la disminución de la frecuencia de células T CD4+ de memoria efectoras después de la vacunación de sujetos de edad avanzada, que pueden estar relacionados con la disminución de los niveles en suero de IL-7. Los sujetos de edad avanzada también demuestran una respuesta de células T de tipo 1 roma a la vacunación de la gripe que se correlaciona directamente con las respuestas de IgG1. Además, los ratones también exhiben un deterioro relacionado con la edad de la actividad de CTL CD8+ específica de epítomo durante la infección primaria con gripe A. Esto se asocia con un defecto en la expansión de los CTL CD8+ en lugar de la actividad efectora de células T CD8+ específicas de la gripe. (Mbawuike IN, Acuna C, Caballero D, Pham Nguyen-K, Gilbert B, Petribon P, Harmon M. "Reversal of age-related deficient influenza virus-specific CTL responses and IFN-gamma production by monophosphoryl lipid A." *Cell Immunol.* 10 de Octubre de 1996; 173(1):64-78).

Puesto que un elemento importante de la respuesta de células T se dirige a la eliminación de las células infectadas, se puede usar una vacuna de células T de una manera profiláctica para generar la recuperación de la memoria, así como en un modo terapéutico, después de la infección, para mejorar la inmunidad mediada por células natural del anfitrión. La vacuna de células T también se puede utilizar combinada con una vacuna contra la gripe que genera anticuerpos convencionales (basados en la respuesta humoral), ya sea a través de la administración simultánea o mediante administración separada.

### Enfoques de vacunas de células T

Una revisión de los campos de vacunas de células T y de la gripe destaca una serie de dificultades críticas halladas en el diseño de una vacuna de células T de amplia protección cruzada. Una vacuna de células T debe ser capaz en primer lugar de inducir y reforzar las funciones de memoria y efectora de las células T HTL CD4+ y CTL CD8+ en un alto porcentaje de receptores de la vacuna. Tal vacuna también debe abordar la diversidad genética viral, y la mutación continuada, así como la diversidad genética humana manifestada a nivel de polimorfismo del alelo del MHC. La invención propuesta trata de abordar estas cuestiones de diseño mediante la combinación de un sistema de suministro de vacuna de fluoropéptido novedoso junto con los péptidos de la gripe altamente conservados. Los péptidos son preferiblemente antígenos conocidos por contener uno o más epítomos, en particular epítomos de células T.

Los enfoques tradicionales de vacunas de células T a base de péptidos se han basado en epítomos y se han centrado en un mínimo de epítomos de CTL (8-11aa) o T coadyuvantes (13aa) suministrados como epítomos individuales o hilos artificiales reconstituidos. Las secuencias no naturales pueden enfrentarse a restricciones de procesamiento de antígeno ineficientes, así como dar lugar a la formación potencial de neo-epítomos no relacionados. Las secuencias peptídicas conservadas naturales largas que contienen epítomos de células T solapantes, epítomos de células T agrupados o epítomos de células T promiscuos en una única secuencia peptídica permiten el procesamiento del antígeno natural a la vez que logran una amplia cobertura de la población.

Por otra parte, es probable que el uso de múltiples de estos péptidos naturales largos en la formulación de una vacuna ofrezca una mayor cobertura de la población. Los hechos demuestran que péptidos largos (30-35aa) que comprenden epítomos de células T CD4+ y CD8+ tienen la capacidad de inducir respuestas multiepitópicas en animales y seres humanos (Coutsinos Z, Villefroy P, Gras-Masse H, Guillet JG, Bourgault-Villada I, Gahery-Segard H, Pialoux G, S Figueiredo, Igea C, Surenaud M, Gaston J, Gras-Masse H, JP Levy, Guillet JG. "Long-term specific immune responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine: characterization of CD8+-T-cell epitopes recognized". *J Virol.* Octubre de 2003; 77(20):11220-31). Para una respuesta de CTL anti-viral eficaz (impulsada por células T CD8), se requiere un entorno apropiado de citoquinas Th-1 (asegurado por las células CD4), por lo tanto se pronostica la liberación simultánea de epítomos CD4 y CD8 para mejorar las respuestas celulares (Krowka, JF., Singh, B., Fotedar, A., Mosmann, T., Giedlin, MA., Pilarski, LM. "A requirement for physical linkage between determinants recognized by helper molecules and cytotoxic T cell precursors in the induction of cytotoxic T cell responses" *J. Immunol* 1986, 15 de Mayo; 136(10):3561-6).

El documento WO 2005/099752 desvela vectores de suministro de antígenos y construcciones. Wang M. *et al.* desvelan epítomos de CTL para la gripe A incluyendo la gripe aviar H5N1 y exploración de todo el genoma, patógeno y HLA (*Vaccines* abr 2007 12;25(15):2823-31). Jameson J *et al.* desvelan un repertorio de linfocitos T citotóxicos humanos para virus de la gripe A (*J Virol.* Nov 1998 72(11):8682-8689).

Las células T CD4+ y CD8+ reconocen péptidos cortos resultantes de la transformación extracelular e intracelular de proteínas foráneas y propias, presentadas unidas a moléculas de superficie celular específicas codificadas por el sistema del MHC. Existen dos clases diferenciadas de moléculas MHC: (i) el MHC de clase I presenta péptidos endógenos; y (ii) el MHC de clase II presenta péptidos exógenos. El proceso de presentación de antígenos del MHC de clase I implica la degradación de la proteína, el transporte de péptidos al retículo endoplásmico, la unión péptido-MHC y la exportación de los complejos de péptido-MHC a la superficie celular para el reconocimiento por las células T CD8+. Los péptidos están unidos dentro de una ranura de unión del MHC específica, cuyas forma y características dan como resultado la unión de subconjuntos específicos de péptidos que comparten un motivo de unión común. Las células T se activan cuando el receptor de la célula T reconoce un complejo de péptido-MHC específico, y de esta manera identifican las células infectadas por parásitos intracelulares o virus o células que contienen proteínas anormales (p. ej., células tumorales) y montan respuestas inmunitarias apropiadas contra ellos. Los péptidos implicados en los complejos de péptido-MHC específicos que activan el reconocimiento de las células T (epítomos de células T) son herramientas importantes para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades infecciosas, autoinmunitarias, alérgicas y neoplásicas. Debido a que los epítomos de células T son subconjuntos de péptidos de unión al MHC, la identificación precisa de las porciones de proteínas que se pueden unir a moléculas del MHC es importante para el diseño de vacunas y productos inmunoterapéuticos. El polimorfismo del MHC es muy alto en la población humana con 580 alelos HLA-A, 921 HLA-B, 312 HLA-C, 527 HLA-DR(beta), 127 HLA-DRQ(beta) y 86 HLA-DQ(beta) conocidos hasta la fecha. Esta situación es un reto cuanto se tiene que diseñar una vacuna basada en células T con amplia cobertura de la población. Los péptidos de unión al MHC contienen aminoácidos específicos de la posición que interactúan con la ranura de la molécula o moléculas del MHC, que contribuyen a la unión del péptido. Los aminoácidos preferidos en cada posición del motivo de unión pueden variar entre las variantes alélicas de las moléculas del MHC. Los modelos computacionales facilitan la identificación de los péptidos que se unen a varias

moléculas del MHC. Una variedad de métodos computacionales, análisis de unión al MHC, estudios de cristalografía de rayos X y otros numerosos métodos conocidos en la técnica permiten la identificación de los péptidos que se unen a las moléculas del MHC. Las nuevas metodologías de identificación de antígenos *in silico* la capacidad de procesar rápidamente las grandes cantidades de datos involucrados en el escrutinio de secuencias de péptidos para motivos de unión a HLA necesarios para delinear secuencias virales útiles para una vacuna de células T. Se han aplicado enfoques bioinformáticos basados en HLA con éxito en muchos campos de la inmunología y han hecho posible abordar cuestiones de diversidad genética humana, por ejemplo: Depil S, Morales O, Castelli FA, Delhem N, Francois V, Georges B, Dufosse F, Morschhauser F, J Hamner, Maillere B, C Auriault, Pancré V. "Determination of a HLA II promiscuous peptide cocktail as potential vaccine against EBV latency II malignancies.", *J Immunother* (1997). Feb-Mar de 2007; 30(2):215-26; Frahm N, Yusim K, Suscovich TJ, Adams S, Sidney J, hraber P, Hewitt SA, Linde CH, Kavanagh DG, Woodberry T, Henry LM, Faircloth K, Listgarten J, Kadie C, Jojic N, Sango K, Brown NV, Pae E, Zaman MT, Bihl F, Khatri A, John M, Mallal S, Marincola FM, Walker BD, Sette A, Heckerman D, Korber BT, Brander C. "Extensive HLA class I allele promiscuity among viral CTL epitopes." *Eur J Immunol*. 17 de Agosto de 2007; 37(9):2419-2433; Schulze zur Wiesch J, Lauer GM, Día CL, Kim AY, Ouchi K, Duncan JE, Wurcel AG, Timm J, Jones AM, Mothe B, Allen TM, McGovern B, Lewis-Ximenez L, J Sidney, Sette A, Chung RT, Walker BD. "Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled Hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes." *J Immunol*. 15 de Septiembre de 2005; 175(6):3603-13; Doolan DL, Southwood S, R Chesnut, Appella E, Gómez E, Richards A, Higashimoto YI, Maewal A, Sidney J, Gramzinski RA, Mason C, D Koech, Hoffman SL, Sette A. "HLA-DR-promiscuous T cell epitopes from Plasmodium falciparum pre-erythrocytic-stage antigens restricted by multiple HLA class II alleles." *J Immunol*. 15 de Julio de 2000; 165(2):1123-37).

Los péptidos que se unen más de una variante alélica del MHC ('péptidos promiscuos') son las principales dianas para la vacuna y el desarrollo de la inmunoterapia, ya que son relevantes para una mayor proporción de la población humana. También se informó de que epítomos promiscuos de células T CD4+ se unen a múltiples moléculas del MHC de clase II (Panina-Bordignon P, Tan A, Termijtelen A, Demotz S, Corradin G, Lanzavecchia A. Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur J Immunol*. Diciembre de 1989; 19(12):2237-42). Por otro lado, se ha descrito anteriormente que algunos epítomos de células T CD8+ promiscuos tiene la capacidad de unirse múltiples moléculas del MHC de clase I compartiendo características de unión y la formación de un denominado supertipo (Frahm N, Yusim K, Suscovich TJ, Adams S, Sidney J, Hraber P, Hewitt SA, Linde CH, Kavanagh DG, Woodberry T, Henry LM, Faircloth K, Listgarten J, Kadie C, Jojic N, Sango K, Brown NV, Pae E, Zaman MT, Bihl F, Khatri A, John M, Mallal S, Marincola FM, Walker BD, Sette A, Heckerman D, Korber BT, Brander C. "Extensive HLA class I allele promiscuity among viral CTL epitopes." *Eur J Immunol*. 17 de Agosto de 2007; 37(9):2419-2433; Sette A, Sidney J. 'HLA supertypes and supermotifs: a functional perspective on HLA polymorphism.' *Curr Opin Immunol*. Agosto de 1998; 10(4):478-82). La identificación de los epítomos promiscuos de células T CD4+ y CD8+ representa una estrategia importante en el diseño de vacunas con el fin de lograr una amplia cobertura de la población. El polimorfismo MHC también se aborda mediante la selección de péptidos que se sabe o se pronostica que contienen un motivo de unión al MHC relacionados con alelos MHC altamente frecuentes en un grupo étnico específico o a través de múltiples grupos étnicos.

Al seleccionar una combinación de secuencias que proporcionan una amplia cobertura de la población y se conservan a través de una variedad de cepas de la gripe (identificadas utilizando, por ejemplo, las bases de datos de secuencias de gripe del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI en sus siglas inglesas) o del Laboratorio Nacional de Los Alamos (LANL en sus siglas inglesas)) se es capaz de hacer frente a la diversidad genética del virus y lograr una protección contra la mayoría, si no todas, las cepas de gripe relevantes.

Históricamente, las principales deficiencias de las tecnologías de la vacuna de células T (vacunas de ADN y vectores virales) han sido el bajo porcentaje de sujetos vacunados que responden a las vacunas, a menudo bajos niveles de inmunogenicidad y su capacidad para lograr una amplificación de refuerzo de las respuestas de las células T de memoria y efectoras. El objetivo principal de una vacuna de células T contra la gripe eficaz es promover respuestas robustas de las células T de memoria de manera que en la reexposición al antígeno haya una rápida expansión de las funciones efectoras que controlan la carga viral y se promueva la eliminación del virus de los pulmones. Para lograr esto, se requieren robustas respuestas de memoria centrales y efectoras de células T CD4+ y CD8+ dirigidas por Th-1 específicas del virus. Para un producto viable, comercial esta respuesta debe ser obtenida en un alto porcentaje de los vacunados (>90%) y ser capaz de generar respuestas de memoria a largo plazo que serán necesarias para la recuperación de la memoria y la protección de la enfermedad después de una infección posterior. Sin embargo, para generar este tipo de inmunidad duradera una vacuna también debe lograr un robusto efecto amplificador de refuerzo con la exposición repetida a la vacuna.

Las estrategias inmunológicas actuales para mejorar la inmunidad celular inducida por las vacunas y productos inmunoterapéuticos incluyen el desarrollo de versiones vivas atenuadas del patógeno y el uso de vectores vivos para liberar los antígenos apropiados o el ADN que codifica tales antígenos. Estos enfoques, que invariablemente fracasan en la generación de una respuesta de refuerzo significativa en poblaciones no seleccionadas, han dado lugar a combinaciones de inducción-refuerzo enrevesadas y también están limitados por consideraciones de seguridad dentro de un entorno regulatorio cada vez más estricto. Además, las cuestiones derivadas de la flexibilidad de los procesos de fabricación y los costes prohibitivos a menudo limitan la viabilidad comercial de los productos de origen biológico. En este contexto, los péptidos sintéticos son antígenos muy atractivos, ya que están químicamente bien definidos, son

altamente estables y pueden ser diseñados para contener epítomos de células T y/o B.

Con el fin de estimular las respuestas de los linfocitos T *in vivo*, los péptidos sintéticos contenidos en una vacuna o un producto de inmunoterapia deberían ser internalizados preferiblemente por las células presentadoras de antígenos y especialmente por las células dendríticas. Las células dendríticas (CD) juegan un papel crucial en el inicio de las respuestas inmunitarias primarias mediadas por células T. Estas células existen en dos grandes fases de maduración asociadas con diferentes funciones. Las células dendríticas inmaduras (CDi) se encuentran en la mayoría de los tejidos o en la circulación y son reclutadas a los sitios inflamados en el cuerpo. Son células que capturan antígenos altamente especializadas, que expresan grandes cantidades de receptores implicados en la captación de antígenos y la fagocitosis. Después de la captura y el procesamiento de los antígenos, las CDi se mueven a ubicaciones de células T locales en los ganglios linfáticos o el bazo. Durante este proceso, las CD pierden su capacidad de captura de antígeno convirtiéndose en CD inmunoestimuladoras maduras (CDm).

Las células dendríticas son células presentadoras eficaces que inician la respuesta inmunitaria del anfitrión al antígeno peptídico asociado con las moléculas MHC de clase I y de clase II. Son capaces de inducir células T CD4 y CD8 no sometidas a tratamiento previo. De acuerdo con los modelos actuales de rutas de procesamiento y de presentación de antígenos, los antígenos exógenos son internalizados a los compartimentos endocíticos de las células presentadoras de antígenos donde son degradados a péptidos, algunos de los cuales se unen a las moléculas del MHC de clase II. A continuación, los complejos de MHC de clase II/péptido maduros se transportan a la superficie celular para la presentación a los linfocitos T CD4. En contraste, el antígeno endógeno se degrada en el citoplasma por la acción del proteosoma antes de ser transportado al citoplasma donde se une a moléculas nacientes del MHC de clase I. Las moléculas de MHC de clase I estables que forman complejos con los péptidos son transportadas a la superficie celular para estimular los CTL CD8. El antígeno exógeno también puede ser presentado en moléculas del MHC de clase I por CPA profesionales en un proceso denominado presentación cruzada. Los fagosomas que contienen el antígeno extracelular pueden fusionarse con el retículo endoplásmico y el antígeno pueden adquirir la maquinaria necesaria para cargar el péptido en las moléculas del MHC de clase I.

A lo largo de las últimas décadas se han evaluado numerosos métodos de liberación, incluyendo vectores tales como Penetratin, TAT y sus derivados, ADN, vectores virales, virosomas y liposomas. Sin embargo, estos sistemas, provocan respuestas de CTL muy débiles, no logran generar una amplificación de refuerzo sobre las respuestas de memoria, tienen problemas de toxicidad asociada o son complicados y costosos de fabricar a escala comercial.

Por tanto, existe una necesidad reconocida de vectores mejorados para dirigir la liberación intracelular de antígenos en el desarrollo de vacunas y medicamentos destinados a provocar una respuesta inmunitaria celular. Un vector en el contexto de los agentes inmunoterapéuticos o las vacunas es cualquier agente capaz de transportar o dirigir un antígeno a células sensibles inmunitarias en un anfitrión.

Se ha demostrado que los tensioactivos fluorados tienen bajas concentraciones micelares críticas y por lo tanto se auto-organizan en estructuras micelares multimoleculares a concentraciones bajas. Esta propiedad físico-química está relacionada con las fuertes interacciones hidrófobas y las bajas interacciones de Van der Waals asociadas con las cadenas fluoradas que aumentan drásticamente la tendencia de anfífilos fluorados a auto-ensamblarse en agua y recogerse en las interfaces. La formación de tales estructuras facilita su captación endocítica por las células, por ejemplo células presentadoras de antígeno (Reichel F. et al. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 7989-7997). Además la actividad hemolítica se reduce fuertemente y a menudo se suprime cuando las cadenas fluoradas se introducen en un agente tensioactivo (Riess, J. G.; Pace, S.; Zarif, L. Adv. Mater. 1991, 3, 249-251) lo que conduce a una reducción de la toxicidad celular.

Esta invención trata de superar el problema de la liberación de antígenos de la gripe a las células sensibles inmunitarias mediante el uso de un vector fluorocarbonado con el fin de aumentar su inmunogenicidad. El vector fluorocarbonado puede comprender una o más cadenas derivadas de radicales perfluorocarbonados o fluorocarburoados/hidrocarbonados mixtos, y puede ser saturado o insaturado, teniendo cada cadena de 3 a 30 átomos de carbono.

Con el fin de conectar el vector al antígeno a través de un enlace covalente, se incorpora un grupo reactivo, o ligando, como componente del vector, por ejemplo se incluye -CO-, -NH-, S, O o cualquier otro grupo adecuado; el uso de tales ligandos para lograr enlaces covalentes es bien conocido en la técnica. El grupo reactivo puede estar situado en cualquier posición en la molécula fluorocarbonada.

El acoplamiento del vector fluorocarbonado al antígeno se puede conseguir a través de grupos funcionales tales como -OH, -SH, -COOH, -NH<sub>2</sub> presentes de forma natural o introducidos en cualquier sitio del antígeno. Las conexiones adecuadas pueden contener un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, en forma lineal o cíclica. Los ejemplos de los enlaces formados por la conexión pueden incluir oxima, hidrazona, disulfuro o triazol o cualquier enlace covalente adecuado. En particular, la fracción fluorocarbonada podría ser introducida a través de un enlace tioéster para aumentar la inmunogenicidad del péptido (Beekman, N. J. C. M. et al. "Synthetic peptide vaccines: palmitoylation of peptide antigens by a thioester bond increases immunogenicity." J. Peptide Res. 1997, 50, 357-364). Opcionalmente, se puede incorporar un elemento separador (peptídico, pseudo-peptídico o no peptídico) para permitir la escisión del

antígeno del elemento fluorocarbonado para su procesamiento dentro de la célula presentadora de antígeno y para optimizar la presentación de antígenos, como se ha mostrado previamente para los lipopéptidos (Verheul, A. F. M.; Udhayakumar, V.; Jue, D. L.; Wohlhueter, R. M.; Lal, A. L. Monopalmitic acid-peptide conjugates induce cytotoxic T cell responses against malarial epitopes: importance of spacer amino acids. Journal of Immunological Methods 1995, volumen 182, págs. 219-226).

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una construcción de vector fluorocarbonado-antígeno que tiene una estructura química  $C_mF_n-C_yH_x-(Sp)-R$  o sus derivados, donde  $m = 3$  a  $30$ ,  $n \leq 2m + 1$ ,  $y = 0$  a  $15$ ,  $x \leq 2y$ ,  $(M + y) = 3 - 30$  y  $Sp$  es un radical espaciador químico opcional y  $R$  es un péptido inmunogénico del virus de la gripe seleccionado de:

DQVRESRNPNGAEIEDLIFLARSALILRGSVAHKS (SEQ ID NO: 32)  
 DLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTPSER (SEQ ID NO: 35)  
 VAYMLERELVRKTRFLPVAGGTSSVYIEVLHLTQG (SEQ ID NO: 4)  
 YITRNQPEWFRNVLSIAPIMFSNKMARLGKGYMFE (SEQ ID NO: 17)  
 APIMFSNKMARLGKGYMFESKRMKLRTQIPAEMLA (SEQ ID NO: 18)  
 SPGMMMGMFNLSTVLGVSILNLGQKKYKTTY (SEQ ID NO: 19)  
 KKKSYINKTGTFEFTSFFYRYGFVANFSMELPSFG (SEQ ID NO: 20)

y homólogos de los mismos que tienen al menos 90% de identidad con las SEQ ID NO: 32, 35, 4, 17, 18, 19 o 20.

La presente invención también proporciona la construcción de vector-antígeno de fluorocarburo de la invención en donde  $R$  es un péptido inmunogénico del virus de la gripe seleccionado de las SEQ ID NO: 32, 35, 4, 17, 18, 19 y 20.

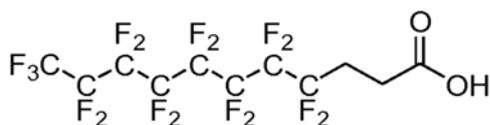
La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende la construcción de vector-antígeno de fluorocarburo de la invención, opcionalmente junto con uno o más vehículos, excipientes, diluyentes o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables.

La presente invención proporciona además un método para preparar un producto farmacéutico profiláctico o terapéutico que comprende combinar la construcción de fluorocarburo de la invención con uno o más vehículos, excipientes, diluyentes o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables.

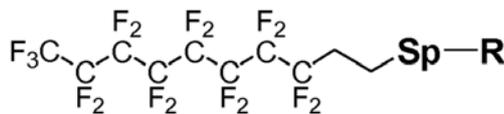
La presente invención proporciona además uso de la composición farmacéutica de una cualquiera de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la gripe o sus síntomas.

En el contexto de la presente invención "derivados" se refiere a modificaciones relativamente menores del compuesto fluorocarbonado de manera que el compuesto es todavía capaz de liberar el antígeno como se describe en la presente memoria. Así, por ejemplo, se pueden remplazar varios radicales flúor por otros radicales halógeno tales como cloro (Cl), bromo (Br) o yodo (I). Además, es posible reemplazar varios radicales flúor por grupos metilo y aún conservar las propiedades de la molécula como comentadas en la presente memoria.

En un ejemplo concreto de la fórmula anterior el vector puede ser ácido 2H, 2H, 3H, 3H-perfluoroundecanoico de la siguiente fórmula:



Así, en un segundo aspecto, la invención proporciona una construcción de vector fluorocarbonado-antígeno de estructura



donde  $Sp$  es un radical químico espaciador opcional y  $R$  es un antígeno derivado del virus de la gripe.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "antígeno" se refiere a una molécula que tiene la capacidad de ser reconocida por receptores inmunológicos tales como el receptor de células T (TCR) o el receptor de células B (BCR o anticuerpo). Los antígenos pueden ser proteínas, subunidades de proteínas, péptidos, hidratos de carbono, lípidos o combinaciones de los mismos, naturales o no naturales, siempre que presenten al menos un epítipo, por ejemplo un epítipo de células T y/o células B.

Tales antígenos se pueden obtener mediante purificación a partir de la proteína nativa o producir mediante tecnología recombinante o mediante síntesis química. Los métodos para la preparación de antígenos son bien conocidos en la técnica. Además, los antígenos también incluyen ADN o un oligonucleótido que codifica un péptido antigénico o proteína.

5 El antígeno asociado con el vector puede ser cualquier antígeno de la gripe capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un animal, incluyendo seres humanos. Preferiblemente, la respuesta inmunitaria tendrá un efecto beneficioso en el anfitrión.

10 El antígeno de la gripe puede contener uno o más epítomos de células T o uno o más epítomos de células B o combinaciones de epítomos de células T y B.

Los epítomos de células T pueden ser MHC de clase I o de clase II restringidos.

15 Según se utiliza en la presente memoria, el término "epítomo" incluye:

(i) Epítomos de células T CD4+ que son secuencias peptídicas que contienen un motivo de unión al MHC de clase II y que tienen la capacidad de ser presentadas en la superficie de las células presentadoras de antígenos por las moléculas del MHC de clase II, y

20 (ii) Epítomos de células T CD8+ que son secuencias peptídicas que contienen un motivo de unión al MHC de clase I y que tienen la capacidad de ser presentada por moléculas del MHC de clase I en la superficie de las células, y

(iii) Epítomos de células B que son secuencias peptídicas que tienen una afinidad de unión por un receptor de células B.

25 El antígeno puede comprender uno o más epítomos de una proteína de la gripe tipo A, una proteína de la gripe tipo B o una proteína de la gripe tipo C. Los ejemplos de las proteínas del virus de la gripe, tanto de los tipos A y B de la gripe, incluyen: hemaglutinina, neuraminidasa, proteínas de la matriz (M1), M2, nucleoproteína (NP), PA, PB1, PB2, NS1 o NS2 en cualquiera de tales combinaciones.

30 Por lo tanto, se describe en el presente documento una construcción de vector-antígeno donde el antígeno del virus de la gripe es una proteína, subunidad de proteína, péptido, carbohidrato o lípido o combinaciones de los mismos. Para que la construcción sea inmunológicamente activa el antígeno debe comprender uno o más epítomos. En las construcciones de vector-antígeno de la invención, el antígeno es una secuencia peptídica derivada de virus de la gripe. Los péptidos o proteínas de la invención contienen preferiblemente una secuencia de al menos siete, más preferiblemente entre 9 y 100 aminoácidos y lo más preferiblemente entre aproximadamente 15 y 40 aminoácidos. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del péptido que porta el epítomo o los epítomos se selecciona para aumentar la solubilidad de la molécula en disolventes acuosos. Además, el extremo del péptido que no se conjuga con el vector se puede alterar para promover la solubilidad de la construcción a través de la formación de estructuras multimoleculares tales como micelas, lamelas, túbulos o liposomas. Por ejemplo, se podría añadir al péptido un aminoácido cargado positivamente con el fin de promover el ensamblaje espontáneo de las micelas. Cualquiera de los extremos N-terminal o C-terminal del péptido se pueden acoplar al vector para crear la construcción. Para facilitar la síntesis a gran escala de la construcción, los residuos de aminoácidos N- o C-terminales del péptido se pueden modificar. Cuando el péptido deseado es particularmente sensible a la escisión por peptidasas, el enlace peptídico normal se puede reemplazar por un mimético peptídico no escindible; dichos enlaces y los métodos de síntesis son bien conocidos en la técnica.

También se pueden incorporar aminoácidos no naturales, no convencionales, en secuencias peptídicas, siempre que no interfieran con la capacidad del péptido para interactuar con moléculas de MHC y experimenten reacción cruzada con las células T que reconocen las secuencias naturales. Los aminoácidos no naturales se pueden utilizar para mejorar la resistencia del péptido a la proteasa o estabilidad química. Los ejemplos de los aminoácidos no naturales incluyen los D-aminoácidos y las modificaciones de cisteína.

55 Se pueden conectar entre sí más de un antígeno antes de la unión al vector fluorocarbonado. Uno de tales ejemplos es el uso de péptidos de fusión en donde un epítomo de T coadyuvante promiscuo se puede unir covalentemente a uno o múltiples epítomos de CTL o uno o múltiples epítomos de células B que pueden ser un péptido, un hidrato de carbono, o un ácido nucleico. Como ejemplo, la epítomo de T coadyuvante promiscuo podría ser el péptido PADRE, el péptido del toxoide tetánico (830-843) o la hemaglutinina de la gripe, HA (307-319). Alternativamente, la secuencia peptídica puede contener dos o más epítomos, que pueden ser solapantes creando de este modo una agrupación de epítomos multiespecíficos densamente empaquetados, o contiguos, o separados por un tramo de aminoácidos.

60 Así, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona una construcción de vector-antígeno donde R es más de un epítomo o antígeno unidos entre sí. Los epítomos también pueden ser solapantes lineales creando de este modo una agrupación de epítomos multiespecíficos densamente empaquetados.

65 Debido a las fuertes interacciones moleculares no covalentes característicos de los fluorocarburos, el antígeno también puede estar asociado no covalentemente con el vector y aún así lograr el objetivo de ser favorablemente absorbidos

por las células presentadoras de antígenos.

Los antígenos que portan uno o más epítomos de células B también se pueden unir al vector fluorocarbonado, ya sea con o sin uno o más epítomos de células T. Los epítomos de células B se pueden predecir utilizando enfoques *in silico* (Bublil EM, Freund NT, Mayrose I, Penn O, Roitburd-Berman A, Rubinstein ND, Pupko T, Gershoni JM. "Stepwise prediction of conformational discontinuous B-cell epitopes using the Mapitope algorithm." *Proteins*. 1 de Julio de 2007; 68(1):294-304. Greenbaum JA, Andersen PH, Blythe M, Bui HH, Cachau RE, Crowe J, Davies M, Kolaskar AS, Lund O, Morrison S, Mumey B, Ofra Y, Pellequer JL, Pinilla C, Ponomarenko JV, Raghava GP, van Regenmortel MH, Roggen EL, Sette A, Schlessinger A, Sollner J, Zand M, Peters B. "Towards a consensus on datasets and evaluation metrics for developing B-cell epitope prediction tools" *J Mol Recognit*. Marzo-Abril de 2007; 20(2):75-82).

La presente invención también proporciona vacunas y productos inmunoterapéuticos que comprenden una o más construcciones de vector fluorocarbonado-antígeno. Los productos multicomponente de este tipo son deseables ya que es probable que sean más eficaces en la obtención de respuestas inmunitarias apropiadas en un mayor número de individuos. Debido al polimorfismo extremo de los HLA en los seres humanos, es poco probable que un solo fluoropéptido induzca una respuesta inmunitaria multiepitópica en un alto porcentaje de una población dada. Por lo tanto, para que un producto de vacuna sea eficaz en una población puede ser necesario un número de fluoropéptidos en la formulación de vacuna con el fin de proporcionar una cobertura amplia. Por otra parte, la formulación óptima de una vacuna o agente inmunoterapéutico contra la gripe puede comprender varias secuencias peptídicas diferentes derivadas de diferentes antígenos de virus de la gripe. En este caso, los péptidos se pueden conectar entre sí anclados a un solo vector fluorocarbonado o cada antígeno péptido podría estar unido a un vector especializado.

Un producto multicomponente puede contener una o más construcciones de vector-antígeno, más preferiblemente de 2 a aproximadamente 20, más preferiblemente de 3 a aproximadamente 10. En realizaciones concretas la vacuna multicomponente puede contener 5, 6, 7 u 8 construcciones. Esto asegura que se genera una respuesta de células T multiepitópica con una amplia cobertura de la población (es decir, se dirige a la diversidad de HLA). Por ejemplo, una formulación de múltiples fluoropéptidos puede estar compuesta péptidos derivados de gripe A solos, péptidos derivados de gripe B solos o péptidos derivados de gripe C solos o combinaciones de los tipos de gripe, lo más preferiblemente gripe A y B.

En una realización, el producto comprende al menos dos construcciones de vector-antígeno, comprendiendo la primera construcción la secuencia del péptido de la gripe:

HMAIIKKYTSGRQEKNPSLRMKWMMAMKYPITADK

y comprendiendo la segunda construcción la secuencia del péptido de la gripe:

YITRNQPEWFRNVLSIAPIMFSNKMARLGKGYMFE

En una realización adicional, el producto comprende 8 construcciones de vector-antígeno que comprenden las siguientes secuencias de péptidos de la gripe:

Construcción 1 HMAIIKKYTSGRQEKNPSLRMKWMMAMKYPITADK

Construcción 2 VAYMLERELVRKTRFLPVAGGTSSVYIEVLHLTQG

Construcción 3 YITRNQPEWFRNVLSIAPIMFSNKMARLGKGYMFE

Construcción 4 APIMFSNKMARLGKGYMFESKRMKLRTQIPAEMLA

Construcción 5 SPGMMGMFNMLSTVLGVSILNLGQKKYTKTTY

Construcción 6 KKKSINKTGTFFFTSFFRYGFVANFSMELPSFG

Construcción 7 DQVRESRNPNGAEIEDLIFLARSALILRGSVAHKS

Construcción 8 DLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTPSER

Alternativamente, se pueden incorporar múltiples epítomos pueden ser incorporados a una formulación con el fin de conferir inmunidad contra una variedad de patógenos, uno de los cuales es el virus de la gripe. Por ejemplo, una vacuna contra la infección respiratoria puede contener antígenos de virus de la gripe y del virus sincitial respiratorio.

Las composiciones de la invención comprenden vectores de fluorocarburo asociados con antígenos opcionalmente junto con uno o más portadores y/o coadyuvantes. Tales coadyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables, serían capaces de potenciar adicionalmente la respuesta inmunitaria tanto en términos de magnitud y/o perfil de citoquinas, y pueden incluir, pero no se limitan a:

(1) refinamientos naturales o derivados sintéticamente de componentes naturales de bacterias, tales como coadyuvante de Freund y sus derivados, derivados de muramidipéptido (MDP), CpG, monofosforil lípido A;

- (2) otros agentes coadyuvantes o potenciadores conocidos, tales como saponinas, sales de aluminio y citoquinas;  
 (3) métodos de formulación de antígenos con o sin coadyuvantes extraños (véanse los apartados 1 y 2 anteriores) tales como coadyuvantes de aceite en agua, coadyuvantes de agua en aceite, complejo inmunoestimulador (ISCOM), liposomas, nano y micro-partículas formuladas;  
 (4) toxinas y toxoides bacterianos; y  
 (5) Otros coadyuvantes útiles bien conocidos por los expertos en la técnica.

La elección del portador, si se requiriera, con frecuencia está en función de la ruta de liberación de la composición. Dentro de esta invención, las composiciones se pueden formular para cualquier ruta y medios de administración adecuados. Los portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen los utilizados en las formulaciones adecuadas para la administración oral, ocular, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, transdérmica).

La formulación se puede administrar en cualquier forma adecuada, por ejemplo, como un líquido, sólido, aerosol, o gas. Por ejemplo, las formulaciones orales pueden adoptar la forma de emulsiones, jarabes o soluciones o comprimidos o cápsulas, que puede estar recubiertos entéricamente para proteger el componente activo de la degradación en el estómago. Las formulaciones nasales pueden ser aerosoles o soluciones. Las formulaciones transdérmicas se pueden adaptar para su sistema de liberación concreto y pueden comprender parches. Las formulaciones para inyectables pueden ser soluciones o suspensiones en agua destilada u otro disolvente o agente suspensor farmacéuticamente aceptable.

De este modo, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona una formulación profiláctica o terapéutica que comprende la construcción o las construcciones de vector-antígeno con o sin un portador y/o coadyuvante adecuado.

La dosificación apropiada de la vacuna o del agente inmunoterapéutico que se va a administrar a un paciente será determinada en la clínica. Sin embargo, como guía, una dosis adecuada para seres humanos, que puede ser dependiente de la vía de administración preferida, puede ser de 1 a 1000 µg. Pueden ser necesarias dosis múltiples para lograr un efecto inmunológico o clínico, que, si fuera necesario, se administran típicamente con 2 a 12 semanas de diferencia. Donde se requiere impulsar la respuesta inmunitaria durante períodos más largos, se puede aplicar dosis repetidas con 1 mes a 5 años de diferencia.

La formulación puede combinar la construcción de vector-antígeno con otro componente activo para efectuar la administración de más de una vacuna o fármaco. También se puede observar un efecto sinérgico a través de la administración simultánea de los dos o más ingredientes activos.

Se puede utilizar una formulación de vacuna de la invención, que comprende uno o más fluoropéptidos combinada con una vacuna contra la gripe basada en la respuesta humoral, tal como Fluzone®, Agrippal™, Begrivac™, Fluvax®, Enzira®, Fluarix™, Flulaval™, FluAd®, Influvac®, Fluvirin®, FluBlok® o cualquier vacuna contra la gripe que comprenda hemaglutinina como componente activo, o un virus de la gripe vivo atenuado, incluyendo las cepas adaptadas al frío tales como Flumist®. La administración puede ser en forma de una mezcla combinada o en forma de agentes de vacuna separados administrados simultáneamente o separados en el tiempo.

En un aspecto adicional, la formulación de la vacuna de la gripe se puede administrar combinada con una composición terapéutica anti-viral, incluyendo tratamientos inhibidores de la neuraminidasa, tales como amantadina, rimantidina, zanamivir o oseltamivir. La administración puede ser simultánea o separada en el tiempo.

En otros aspectos la invención proporciona:

- i) El uso de la construcción inmunogénica como se describe en este documento en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la gripe o de sus síntomas.
- ii) La composición farmacéutica de la invención para su uso en un método de tratamiento o inmunización contra la gripe o en un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un ser humano o animal.

La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos ponen de manifiesto la respuesta inmunitaria diferencial de células T obtenida por medio del anclaje de un vector fluorocarbonado a los antígenos en comparación con los antígenos no fluorados correspondientes. Los ocho (8) antígenos ilustrados se seleccionaron de la lista de secuencias de la gripe definidas en la presente memoria. Esta selección provisional utiliza un algoritmo de selección patentado que abarca una combinación de parámetros, incluyendo; selección inmunoinformática, análisis de unión in vitro, análisis de reestimulación ex vivo utilizando PBMC humanas infectadas previamente con gripe, parámetros de fabricación y formulación. Por último, la evaluación en ratones confirmó que los fluoropéptidos seleccionados de este modo ya sea individualmente o combinados fueron inmunogénicas y las respuestas obtenidas fueron superiores a las de los antígenos peptídicos nativos. El foco de selección del antígeno y el deseo de utilizar una combinación de antígenos para este prototipo de vacuna es tal que en este diseño racional de vacunas se abordan la diversidad viral genética y de los HLA humanos. Esta ha sido una de las principales deficiencias en el campo de las vacunas de péptidos. Si bien es posible utilizar un único antígeno en la vacuna de fluoropéptido,

esto limitaría el potencial de inmunogenicidad de la vacuna en una población humana consanguínea (u otra) y por lo tanto la selección de múltiples péptidos es esencial para una vacuna ampliamente eficaz.

5 Según se utiliza en la presente memoria, el término "fluoropéptidos" se refiere a vectores fluorocarbonados (cadenas) conjugados con antígenos basados en péptidos. Los ejemplos se refieren a las figuras en las que:

10 Figura 1: muestra una comparación de la inmunogenicidad de una vacuna de fluoropéptido multivalente frente a su equivalente de péptido nativo en ratones BALB/c y CBF6, después de la inducción o la inducción-refuerzo, evaluada mediante análisis ELISpot de IFN- $\gamma$  ex vivo. Se inmunizaron siete u ocho ratones por grupo por vía subcutánea con la vacuna de fluoropéptido (compuesta de 8 fluoropéptidos formulados a una dosis de 1 nmol por fluoropéptido en 100  $\mu$ l) o la equivalente de péptido nativo (compuestos de 8 péptidos nativos formulados a una dosis de 1 nmol por péptido en 100  $\mu$ l). El grupo de control recibió una formulación que contenía solo excipiente. Diez días después de la inyección final los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Se retiraron los bazo y se prepararon suspensiones de células de bazo individuales a partir de ratones individuales. Los análisis ELISpot de IFN- $\gamma$  murino (Mabtech, Suecia) se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células de bazo ( $5 \times 10^5$ ) se estimularon, por duplicado, con 8 péptidos individuales nativos a una concentración de 10  $\mu$ g/ml por péptido en medio de cultivo completo (RPMI con un suplemento de suero de ternera fetal al 10%) en un volumen total de 200  $\mu$ l durante 18 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Los puntos se contaron utilizando una unidad lectora de CTL Immunospot. Para cada ratón, el número total de puntos se acumuló para los 8 péptidos y el valor de los pocillos de control (solo la media) se restó 8 veces. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  desviación típica de las células formadoras de puntos (SFC en sus siglas inglesas) por millón de células de bazo introducidas.

25 Figura 2: Muestra una comparación de la inmunogenicidad de una vacuna de fluoropéptido multivalente frente su equivalente de péptido nativo en ratones BALB/c y CBF6, después de la inducción o la inducción-refuerzo, evaluada mediante analisis ELISpot de IFN- $\gamma$  ex vivo. Se inmunizaron siete u ocho ratones por grupo por vía subcutánea con la vacuna de fluoropéptido (compuesta de 8 fluoropéptidos formulados a una dosis de 1 nmol por fluoropéptido en 100  $\mu$ l) o la equivalente de péptido nativo (compuestos de 8 péptidos nativos formulados a una dosis de 1 nmol por péptido en 100  $\mu$ l). El grupo de control recibió una formulación que contenía solo excipiente. Diez días después de la inyección final los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Se retiraron los bazo y se prepararon suspensiones de células de bazo individuales a partir de ratones individuales. Los análisis ELISpot de IFN- $\gamma$  murino (Mabtech, Suecia) se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células de bazo ( $5 \times 10^5$ ) se estimularon, por duplicado, con una mezcla de 8 péptidos a una concentración de 10  $\mu$ g/ml por péptido en medio de cultivo completo (RPMI con un suplemento de suero de ternera fetal al 10%) en un volumen total de 200  $\mu$ l durante 18 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Los puntos se contaron utilizando una unidad lectora de CTL Immunospot. Para cada ratón, el número total de puntos se acumuló para los 8 péptidos y el valor de los pocillos de control (solo la media) se restó 8 veces. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  desviación típica de las células formadoras de puntos (SFC) por millón de células de bazo introducidas.

40 Figura 3: muestra una comparación de la inmunogenicidad del péptido individual de los fluoropéptidos frente a péptidos nativos en ratones BALB/cy CBF6 después de la inducción o la inducción-refuerzo evaluada mediante ELISPOT de IFN- $\gamma$  ex vivo. Se inmunizaron siete u ocho ratones por grupo por vía subcutánea con la vacuna de fluoropéptido (compuesta de 8 fluoropéptidos formulados a una dosis de 1 nmol por fluoropéptido en 100  $\mu$ l) o la equivalente de péptido nativo (compuestos de 8 péptidos nativos formulados a una dosis de 1 nmol por péptido en 100  $\mu$ l). El grupo de control recibió una formulación que contenía solo excipiente. Diez días después de la última inyección los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Se retiraron los bazo y se prepararon suspensiones de células individuales de bazo a partir de ratones individuales. Los análisis ELISpot de IFN- $\gamma$  murino (Mabtech, Suecia) se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células de bazo ( $5 \times 10^5$ ) se estimularon, por duplicado, con 8 péptidos nativos individuales a una concentración de 10  $\mu$ g/ml por péptido en medio de cultivo completo (RPMI con un suplemento de suero de ternera fetal al 10%) en un volumen total de 200  $\mu$ l durante 18 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Los puntos se contaron utilizando una unidad lectora de CTL Immunospot. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  desviación típica de las células formadoras de puntos (SFC) por millón de células de bazo introducidas.

55 Figura 4: Muestra una comparación de la inmunogenicidad de una vacuna de fluoropéptido multivalente frente su equivalente de péptido nativo en ratones BALB/c y CBF6, después de la inmunización de inducción-refuerzo; evaluación de los perfiles de citoquinas. Se inmunizaron ocho ratones por grupo por vía subcutánea con la vacuna de fluoropéptido (compuesta de 8 fluoropéptidos formulados a una dosis de 1 nmol por fluoropéptido en 100  $\mu$ l) o la equivalente de péptido nativo (compuestos de 8 péptidos nativos formulados a una dosis de 1 nmol por péptido en 100  $\mu$ l). A los grupos de control se les inyectó una formulación que contenía solo excipiente. Los ratones se inmunizaron con un intervalo de 15 días. Diez días después de la inyección final los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Se retiraron los bazo y se prepararon suspensiones de células de bazo individuales a partir de ratones individuales. Los esplenocitos se estimularon con una mezcla de 8 péptidos nativos a una concentración de 1  $\mu$ g/ml por péptido en medio de cultivo completo (RPMI con un suplemento de suero de ternera fetal al 10%) en un volumen total de 200  $\mu$ l durante 48 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. El análisis de las concentraciones de citoquinas (interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-5 (IL-5), interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), y Factor de Necrosis Tumoral (TNF)) de los sobrenadantes de cultivo de las células estimuladas se llevó

a cabo utilizando un kit de matrices de cuentas citométrico murino (CBA; BD Biosciences, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se analizó utilizando un citómetro de flujo FACSCanto II. Las curvas de calibración se determinaron para cada una de las citoquinas a partir de un intervalo de 210-2500 pg/ml. El límite inferior de detección para CBA, según el fabricante, es 2,5 a 3,2 pg/ml, dependiendo del analito. Los resultados corresponden a los valores medios y la desviación típica calculada para cada grupo de ratones para cada citoquina. Los resultados se expresan como la concentración de citoquinas en pg/ml.

Figura 5: Tanto las células T CD4<sup>+</sup> como las células T CD8<sup>+</sup> son estimuladas por la vacuna de fluoropéptido en ratones BALB/c. Se inmunizaron por vía subcutánea cuatro ratones por grupo con la vacuna de fluoropéptido (compuesta de 8 fluoropéptidos formulados a una dosis de 1 nmol por fluoropéptido en 100 µl). Los ratones recibieron 2 inyecciones (inducción-refuerzo) a un intervalo de 15 días. Diez días después de la última inyección, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se retiraron los bazo y se prepararon suspensiones de células individuales de bazo a partir de ratones individuales. Las células se volvieron a suspender a 0,5x10<sup>6</sup>/pocillo y se estimularon con medio solo o con una mezcla de 8 péptidos nativos (vacuna) durante 72 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Los cultivos de control positivos (PMA/I) recibieron 50 ng/ml de PMA y 0,5 µg/ml de ionomicina durante las últimas 5 horas de cultivo. Todos los cultivos recibieron 10 µl/ml de Brefeldina A durante las últimas 5 horas de cultivo. Las células se tiñeron extracelularmente para determinar CD4 y CD8, e intracelularmente para determinar IFN-γ, y se analizaron por medio de citometría de flujo utilizando un citómetro BD FACSCanto II. Los resultados para los ratones individuales se muestran en forma del porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> que expresan IFN-γ intracelular.

Figura 6: muestra una comparación de la inmunogenicidad de una vacuna de fluoropéptido multivalente frente a la vacuna emulsionada en CFA en ratones BALB/c después de una sola inmunización; evaluación de los perfiles de citoquinas. Se inmunizaron diez ratones por grupo por vía subcutánea con la vacuna de fluoropéptido (compuesta de 8 fluoropéptidos formulados en una dosis de 1 nmol por fluoropéptido en 100 µl) o vacuna de fluoropéptido emulsionado en coadyuvante completo de Freund (CFA). Al grupo de ratones de control se le inyectó con solo una formulación que contenía excipiente. Diez días después los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se retiraron los bazo y se prepararon suspensiones de células individuales de bazo a partir de ratones individuales. Los esplenocitos se estimularon con una mezcla de 8 péptidos nativos a una concentración de 1µg/ml por péptido en medio de cultivo completo (RPMI con un suplemento de suero de ternera fetal al 10%) en un volumen total de 200 µl durante 48 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. El análisis de las concentraciones de citoquinas (interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-5 (IL-5), interferón-γ (IFN-γ), y Factor de Necrosis Tumoral (TNF)) de los sobrenadantes de cultivo de las células estimuladas se llevó a cabo utilizando un kit de matrices de cuentas citométrico murino (CBA; BD Biosciences, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se analizó utilizando un citómetro de flujo FACSCanto II. Las curvas de calibración se determinaron para cada una de las citoquinas a partir de un intervalo de 2,5-2500 pg/ml. El límite inferior de detección para CBA, según el fabricante, es de 2,5 a 3,2 pg/ml, dependiendo del analito. Los resultados corresponden a los valores medios ± error típico calculados para cada grupo de ratones para cada citoquina. Los resultados se expresan como la concentración de citoquinas en pg/ml.

Figura 7: Muestra una comparación de rutas subcutánea frente intradérmica de la administración de la vacuna de fluoropéptido en ratones BALB/c después de una sola inmunización: análisis ELISpot de IFN-γ ex vivo. Se inmunizaron diez ratones por grupo por vía subcutánea (s.c.) o por vía intradérmica (i.d.) con la vacuna de fluoropéptido (compuesta de 8 fluoropéptidos formulados en una dosis de 1 nmol por fluoropéptido en 100 µl). El grupo de control recibió una formulación que contenía excipiente solo administrada por vía subcutánea. Diez días después los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se retiraron los bazo y se prepararon suspensiones de células individuales de bazo a partir de ratones individuales. Los análisis ELISpot de IFN-γ murino (Mabtech, Suecia) se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células de bazo (5x10<sup>5</sup>) Se estimularon, por duplicado, con 8 péptidos nativos individuales a una concentración de 10 µg/ml por péptido en medio de cultivo completo (RPMI con un suplemento de suero de ternera fetal al 10%) en un volumen total de 200 µl durante 18 horas a 37°C en un entorno de CO<sub>2</sub> al 5%. Los puntos se contaron utilizando una unidad lectora de CTL Immunospot. Para cada ratón, el número total de puntos se acumularon para los 8 péptidos y el valor de los pocillos de control (solo la media) se restó 8 veces. Los resultados corresponden a la media ± error típico de las células que forman puntos (SFC) por millón de células de bazo introducidas.

## Ejemplo 1

### Péptidos ejemplo

Los candidatos para conjugarse con un vector fluorocarbonado para su inclusión en una vacuna profiláctica o terapéutica para la gripe pueden incluir los siguientes uno o más péptidos o fragmentos de los mismos, u homólogos (incluyendo las secuencias de árboles ancestrales o centrales consenso correspondientes referidas en la base de datos de secuencia de la gripe del Laboratorio Nacional de Los Álamos (Macken, C., Lu, H., Goodman, J., y Boykin, L., "The value of a database in surveillance and vaccine selection." in Options for the Control of Influenza IV. A.D.M.E. Osterhaus, N. Cox & A.W. Hampson (Eds.) 2001, 103-106) o recursos de virus de la gripe en el NCBI) o variantes naturales y no naturales de los mismos, pero no necesariamente de forma exclusiva. A continuación se proporcionan

ejemplos específicos de los péptidos apropiados donde se ha utilizado el código de una letra convencional. Los homólogos tienen al menos una identidad del 50% en comparación con una secuencia de referencia. Preferiblemente un homólogo tiene una identidad de 80, 85, 90, 95, 98 o 99% con una secuencia de origen natural. El uso de aminoácidos no naturales no debe interferir en la capacidad del péptido para unirse a receptores del MHC de clase I o II. Los fragmentos de estas secuencias que contienen uno o más epítopos son también péptidos candidatos para el anclaje al vector fluorocarbonado.

Estas secuencias se seleccionaron entre secuencias consenso de la gripe A. Se especifican la proteína del virus de la gripe y la posición del péptido dentro de esa proteína. Las secuencias de proteínas se recogieron del recurso de virus de la gripe. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/>

SEQ ID NO 1  
**PB2 Posición 027 a 061**  
 HMAIIKKYTSGRQEKNPSLRMKWMMAMKYPITADK

SEQ ID NO 2  
**PB2 Posición 123 a 157**  
 ERLKHGTFGPVHFRNQVKIRRRVDINPGHADLSAK

SEQ ID NO 3  
**PB2 Posición 155 a 189**  
 SAKEAQDVIMEVFPNEVGARILTSESQTLITKEK

SEQ ID NO 4  
**PB2 Posición 203 a 237**  
 VAYMLERELVRKTRFLPVAGGTSSVYIEVLHLTQG

SEQ ID NO 5  
**PB2 Posición 249 a 283**  
 EVRNDQDQSLIIAARNIVRRAAVSADPLASLLEM

SEQ ID NO 6  
**PB2 Posición 358 a 392**  
 EGYEEFTMVGRRATAILRKATRRLIQLIVSGRDEQ

SEQ ID NO 7  
**PB2 Posición 370 a 404**  
 ATAILRKATRRLIQLIVSGRDEQSIAEAIIVAMVF

SEQ ID NO 8  
**PB2 Posición 415 a 449**  
 RGDLENFVNRANQRLNPMHQLLRHFQKDAKVLQFNW

SEQ ID NO 9  
**PB2 Posición 532 a 566**  
 SSSMMWEINGPESVLVNTYQWIIRNWETVKIQWSQ

SEQ ID NO 10  
**PB2 Posición 592 a 626**  
 YSGFVRTLFQQMRDVLGTFDTVQIIKLLPFAAAPP

SEQ ID NO 11  
**PB2 Posición 607 a 641**  
 LGTFDTVQIIKLLPFAAAPPEQSRMQFSSLTVNVR

SEQ ID NO 12  
**PB2 Posición 627 a 659**  
 QSRMQFSSLTVNVRGSGMRILVRGNSPVFNYNK

SEQ ID NO 13  
**PB1 Posición 012 a 046**  
 VPAQNAISTTFPYTGDPYSHGTGTGYTMDTVNRT

SEQ ID NO 14  
**PB1 Posición 114 a 148**  
 VQQTRVDKLTQGRQTYDWTLNRNQAATALANTIE

5  
SEQ ID NO 15  
**PB1 Posición 216 a 250**  
SYLIRALTLNMTKDAERGKLRRAIATPGMQIRG

10  
SEQ ID NO 16  
**PB1 Posición 267 a 301**  
EQSGLPVGNGNEKKAKLANVVRKMMTNSQDTELSFT

15  
SEQ ID NO 17  
**PB1 Posición 324 a 358**  
YITRNQPEWFRNVLSIAPIMFSNKMARLGKGYMFE

20  
SEQ ID NO 18  
**PB1 Posición 340 a 374**  
APIMFSNKMARLGKGYMFESKSMKLRTQIPAEMLA

25  
SEQ ID NO 19  
**PB1 Posición 404 a 436**  
SPGMMMGMFNMLSTVLGVSILNLGQKKYTKTTY

30  
SEQ ID NO 20  
**PB1 Posición 479 a 513**  
KKKSYINKTGTFFFTSFFYRYGFVANFSMELPSFG

35  
SEQ ID NO 21  
**PB1 Posición 486 a 520**  
KTGTFFFTSFFYRYGFVANFSMELPSFGVSGINES

40  
SEQ ID NO 22  
**PB1 Posición 526 a 560**  
GVTVIKNNMINNDLGPATAQMALQLFIKDYRYTYR

45  
SEQ ID NO 23  
**PB1 Posición 656 a 690**  
EYDAVATTHSWIPKRNRSILNTSQRGILEDEQMYQ

50  
SEQ ID NO 24  
**PB1 Posición 700 a 734**  
FPSSSYRRPVGISSMVEAMVSRARIDARIDFESGR

55  
SEQ ID NO 25  
**PA Posición 107 a 141**  
PDLYDYKENRFIEIGVTRREVHIYYLEKANKIKSE

60  
SEQ ID NO 26  
**PA Posición 122 a 156**  
VTRREVHIYYLEKANKIKSEKTHIHIFSFTGEEMA

65  
SEQ ID NO 27  
**PA Posición 145 a 179**  
IHIFSFTGEEMATKADYTLDEESRARIKTRLFTIR

SEQ ID NO 28  
**PA Posición 166 a 200**  
ESRARIKTRLFTIRQEMASRGLWDSFRQSERGEET

SEQ ID NO 29  
**PA Posición 495 a 529**  
RRKTNLGFIKGRSHLRNDTDVVNFVSMEFSLTD

SEQ ID NO 30  
**PA Posición 642 a 676**  
AKSVFNSLYASPQLEGFSAESRLLLLIVQALRDNL

SEQ ID NO 31

**PA Posición 173 a 207**  
 PRRSGAAGA AVKGVGTMVMELIRMIKRGINDRNFV

5  
 SEQ ID NO 32  
**NP Posición 240 a 274**  
 DQVRESRNP GNAEIEDLIFLARSALILRGSVAHKS

10  
 SEQ ID NO 33  
**M1 Posición 002 a 026**  
 SLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKN

15  
 SEQ ID NO 34  
**M1 Posición 023 a 057**  
 EIAQRLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTK

20  
 SEQ ID NO 35  
**M1 Posición 038 a 072**  
 DLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTPSER

25  
 SEQ ID NO 36  
**M1 Posición 055 a 089**  
 LTKGILGFVFTLTPSERGLQRRRFVQNALNGNGD

30  
 SEQ ID NO 37  
**M1 Posición 166 a 200**  
 ATTTNPLIRHENRMVLA STTAKAMEQMAGSSEQAA

35  
 SEQ ID NO 38  
**NS1 Posición 128 a 162**  
 IILKANFSVIFDRLET LILLRAFTEEGAIVGEISP

40  
 SEQ ID NO 39  
**NS2 Posición 026 a 060**  
 EDLNGMITQFESLKLYRDSLGEAVMRMGDLHSLQN

Las siguientes secuencias se seleccionaron entre secuencias consenso de la gripe B. Se especifican la proteína del virus de la gripe y la posición del péptido dentro de esa proteína. Las secuencias de proteínas se recogieron del recurso de virus de la gripe <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/>

45  
 SEQ ID NO 40  
**PB2 Posición 016 a 050**  
 NEAKTVLKQTTVDQYNIIRKFNTSRIEKNPSLRMK

50  
 SEQ ID NO 41  
**PB2 Posición 117 a 151**  
 YESFFLRKMRLDNATWGRITFGPVERVRKRVLLNP

55  
 SEQ ID NO 42  
**PB2 Posición 141 a 175**  
 ERVRKRVLLNPLTKEMPPDEASNVIMEILFPKEAG

60  
 SEQ ID NO 43  
**PB2 Posición 197 a 231**  
 GTMITPIVLAYMLERELVARRRFLPVAGATSAEFI

65  
 SEQ ID NO 44  
**PB2 Posición 311 a 345**  
 DIIRAALGLKIRQRQRFRLELKRISGRGFKNDEE

70  
 SEQ ID NO 45  
**PB2 Posición 404 a 438**  
 MVFSQDTRMFQGV RGEINFLNRAGQLLSPMYQLQR

75  
 SEQ ID NO 46  
**PB2 Posición 519 a 553**  
 VSELESQAQLMITYDTPKMWEMGTTKELVQNTYQW

5  
SEQ ID NO 47  
**PB2 Posición 537 a 571**  
MWEMGTTKELVQNTYQWVLKNLVTLKAQFLLGKED

10  
SEQ ID NO 48  
**PB2 Posición 572 a 606**  
MFQWDAFEAFESIIPQKMAGQYSGFARAVLKQMRD

15  
SEQ ID NO 49  
**PB2 Posición 717 a 751**  
LEKLPGEKANILLYQGKPVVVKRKRYSALSNDI

20  
SEQ ID NO 50  
**PB1 Posición 001 a 035**  
MNINPYFLFIDVPIQAAISTTFPYTGVPYSHGTG

25  
SEQ ID NO 5  
**PB1 Posición 097 a 131**  
EEHPGLFQAASQNAMEALMVTTVDKLTQGRQTFDW

30  
SEQ ID NO 52  
**PB1 Posición 227 a 261**  
MTKDAERGKLRRAIATAGIQIRGFVLVVENLAKN

35  
SEQ ID NO 53  
**PB1 Posición 393 a 427**  
KPFNFEEGTASLSPGMMMGMFNMLSTVLGVAALGI

40  
SEQ ID NO 54  
**PB1 Posición 616 a 650**  
DPEYKGRLLHPQNPVFGHLSIEGIKEADITPAHGP

45  
SEQ ID NO 55  
**PB1 Posición 701 a 735**  
SASYRKPVGQHSMLEAMAHRLRMDARLDYESGRMS

50  
SEQ ID NO 56  
**PA Posición 160 a 194**  
SSLDEEGKGRVLSRLTELQAELSLKNLWQVLIGEE

55  
SEQ ID NO 57  
**PA Posición 491 a 525**  
ESFDMLYGLAVKGQSHLRGDTDVTVVTFEFSSTD

60  
SEQ ID NO 58  
**PA Posición 696 a 723**  
VIQSAYWFNEWLGFKEGSKVLESVDEIMDE

65  
SEQ ID NO 59  
**NP Posición 173 a 207**  
FLKEEVKTMKYKTTMGSDGFSLNHIMIGHSQMNDV

SEQ ID NO 60  
**NP Posición 253 a 287**  
EAIRFIGRAMADRGLLRDIKAKTAYEKILLNLKNK

SEQ ID NO 61  
**NP Posición 308 a 342**  
IADIEDLTLLARSMVVVRPSVASKVVLPISIYAKI

SEQ ID NO 62  
**NP Posición 338 a 372**  
IYAKIPQLGFNVEEYSVMGYEAMALYNMATPVSIL

SEQ ID NO 63

**NP Posición 418 a 452**

GFHVPAKEQVEGMGAALMSIKLQFWAPMTRSGGNE

SEQ ID NO 64

**M1 Posición 166 a 300**

ARSSVPGVRREMVMVSAMNTAKTMNGMGKGEDVQK

SEQ ID NO 65

**M1 Posición 209 a 237**

IGVLRSLGASQKNGEGIAKDVMEVLKQSS

Los péptidos candidatos para su inclusión en una vacuna profiláctica o terapéutica para la gripe pueden ser péptidos de cualquiera de las proteínas virales hemaglutinina, neuraminidasa, proteína de la matrix (M1), M2, nucleoproteína (NP), PA, PB1, PB2, NS1 o NS2 en cualquiera de tales combinaciones.

**Síntesis de fluoropéptidos y péptidos nativos (péptidos no modificados)**

Se obtuvieron 8 péptidos nativos y 8 fluoropéptidos (seleccionados de la lista de péptidos contenida en la presente memoria; SEQ ID NO 1 a 65) mediante síntesis peptídica en fase sólida (SPPS en sus siglas en inglés). Todos los péptidos se sintetizaron sobre resina basada en PEG de amida de Rink utilizando la química de 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) convencional. La cadena peptídica se ensambló sobre la resina mediante la eliminación repetitiva del grupo protector Fmoc mediante tratamiento con piperidina al 20%/N,N-dimetilformamida durante 30 minutos y acoplamiento del aminoácido protegido utilizando 1,3-diisopropilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol/N-metilmorfolina durante 120 minutos. La prueba de la ninhidrina se realizó después de cada acoplamiento para verificar la eficacia del acoplamiento. Después de la adición del residuo de Lisinilo N-terminal, los bloques de resina se dividieron para permitir (1) sobre la primera mitad de la resina, la incorporación de la cadena fluorocarbonada del ácido 2H,2H,3H,3H-Perfluoroundecanoico (C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH) sobre la cadena Épsilon de la lisina N-terminal para obtener el fluoropéptido y (2) sobre la segunda mitad de la resina, la acetilación de la cadena Épsilon de la lisina N-terminal para obtener el péptido nativo. Las resinas se lavaron y se secaron, a continuación se trataron con reactivo K para la escisión y separación de los grupos protectores de la cadena lateral. Los péptidos brutos se hicieron precipitar en éter frío y se recogieron mediante filtración. La pureza se evaluó mediante RP-HPLC y fue superior a 92% para todos los péptidos. Se prepararon fluoropéptidos liofilizados en nitrógeno y se almacenaron a -20°C. La estabilidad de los fluoropéptidos en condiciones de almacenamiento ha sido confirmada mediante RP-HPLC y LC-MS a lo largo de 6 meses.

**Preparación de dosis de vacuna**

Se formularon 8 fluoropéptidos liofilizados (fluoropéptido 1, fluoropéptido 2, fluoropéptido 3, fluoropéptido 4, fluoropéptido 5, fluoropéptido 6, fluoropéptido 7 y fluoropéptido 8) u 8 péptidos nativos equivalentes liofilizados (péptido 1, péptido 2, péptido 3, péptido 4, péptido 5, péptido 6, péptido 7 y péptido 8) para crear una formulación isomolar que producía un pH ampliamente neutro para administración parenteral.

Las secuencias de las porciones del péptido de la gripe de las construcciones fueron las siguientes:

Fluoropéptido 1 HMAIIKKYTSGRQEKNPSLRMKWMMAMKYPITADK-NH<sub>2</sub>

Fluoropéptido 2 VAYMLERELVRKTRFLPVAGGTSSVYIEVLHLLTQG-NH<sub>2</sub>

Fluoropéptido 3 YITRNQPEWFRNVLSIAPIMFSNKMARLGKGYMFE-NH<sub>2</sub>

Fluoropéptido 4 APIMFSNKMARLGKGYMFESKRMKLRTQIPAEMLA-NH<sub>2</sub>

Fluoropéptido 5 SPGMMMGMFNMLSTVLGVSILNLGQKKYTKTTY-NH<sub>2</sub>

Fluoropéptido 6 KKKS YINKTGTFEFTSFFYRYGFVANFSMELPSFG-NH<sub>2</sub>

Fluoropéptido 7 DQVRESRNPNGNAEIEDLIFLARSALILRGSAVHKS-NH<sub>2</sub>

Fluoropéptido 8 DLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTVPSE-NH<sub>2</sub>

**Animales e inmunización**

Se adquirieron ratones BALB/c o CB6F1 (BALB/c x C57BL/6J) hembra, de 6-8 semanas de edad de Charles River (UK) y/o Harlan (UK). Se realizaron inyecciones subcutáneamente utilizando una jeringa de 1 ml y una aguja 22-G. Las inmunizaciones se llevaron a cabo de manera que los ratones recibieran una sola inmunización (inducción) o dos inmunizaciones (inducción/refuerzo). Las inmunizaciones se llevaron a cabo con un intervalo de 14 días entre cada

inyección.

**La vacuna de fluoropéptido es fuertemente inmunogénica y es superior a los péptidos nativos tanto en ratones BALB/c como CB6F1**

5 La inmunogenicidad de la vacuna de fluoropéptido (mezcla de 8 fluoropéptidos como antes) se comparó con la  
equivalente de péptido nativo (mezcla de 8 péptidos no modificados - denominados péptidos nativos como antes) en  
10 ratones BALB/c y CB6F1. El estudio también comparó la inmunogenicidad de ambas formulaciones utilizando un  
régimen de inducción o inducción-refuerzo. Ambas formulaciones se inyectaron subcutáneamente sin coadyuvantes  
15 en ratones BALB/c y CBF6. Los ratones se inmunizaron con una dosis de vacuna de fluoropéptido que contenía  
1nmol/fluoropéptido (8 nmol en total para ocho fluoropéptidos) o la equivalente vacuna de péptido nativo a  
1nmol/péptido (8 nmol en total para ocho péptidos nativos). Ninguna preparación de vacuna contenía ningún  
coadyuvante. Diez días después de la inmunización final, las células del bazo se volvieron a estimular con cada péptido  
20 nativo individual a 10 µg/ml y se evaluaron utilizando un análisis ELISpot de IFN-γ. De acuerdo con los análisis ELISpot  
de IFN-γ ex vivo (Figuras 1 y 2), la inmunogenicidad de la vacuna de fluoropéptido fue superior a la del excipiente solo  
y la equivalente vacuna de péptido nativo después de un régimen de inmunización de inducción-refuerzo (P<0,001).  
Los resultados también demostraron un fuerte aumento del número de células formadoras de puntos utilizando un  
régimen de inducción-refuerzo en comparación con una sola inmunización para el grupo de vacuna de fluoropéptido  
solo (Figura 1 y 2). Estos resultados demuestran la propiedad de ser auto-coadyuvante de la cadena fluorocarbonada  
conectada a una secuencia peptídica.

**La vacuna de fluoropéptido induce una respuesta de células T multiepitópica robusta en ratones tanto BALB/c como CB6F1**

25 La inmunogenicidad de la vacuna de fluoropéptido (mezcla de 8 fluoropéptidos como antes) se comparó con su  
equivalente de péptido nativo (mezcla de 8 péptidos no modificados - denominados 'péptidos nativos' como antes) en  
ratones BALB/c y CB6F1. El estudio también comparó la inmunogenicidad de ambas formulaciones utilizando un  
régimen de inducción e inducción-refuerzo. Ambas formulaciones se inyectaron subcutáneamente sin coadyuvantes  
30 en ratones BALB/c y CBF6. Los ratones se inmunizaron con una dosis de vacuna de fluoropéptido que contenía  
1nmol/fluoropéptido (8 nmol en total para ocho fluoropéptidos), la equivalente vacuna de péptido nativo a  
1nmol/péptido (8 nmol en total para ocho péptidos nativos). Ninguna preparación de vacuna contenía ningún  
coadyuvante. El grupo de control consistió en ratones inmunizados con excipiente solo. Diez días después de la  
inmunización final, las células del bazo se volvieron a estimular con cada péptido nativo individual a 10 µg/ml y se  
35 evaluaron utilizando un análisis ELISpot de IFN-γ. La vacuna de fluoropéptido induce respuestas específicas de  
péptidos dirigidas contra 5 de 8 péptidos en ratones BALB/c y 7 de 8 péptidos en ratones CB6F1 que es superior a la  
respuesta inducida por el equivalente de vacuna (péptidos no modificados). Esto demuestra que la vacunación con  
fluoropéptidos puede inducir una respuesta inmunológica que es cualitativamente y cuantitativamente superior a la de  
su equivalente de péptido nativo.

40 La vacuna de fluoropéptido induce un perfil de citoquina Th1 dependiendo de la cepa murina sometida a ensayo  
La inmunogenicidad de la vacuna de fluoropéptido (mezcla de 8 fluoropéptidos como antes) se comparó con la  
equivalente de péptido nativo (mezcla de 8 péptidos no modificados como antes) en ratones BALB/c y CB6F1. Las  
45 formulaciones se inyectaron por vía subcutánea sin coadyuvante en ratones BALB/c y CB6F1. Los ratones se  
inmunizaron con una dosis de la vacuna de fluoropéptido que contenía 1nmol/fluoropéptido (8 nmol en total para ocho  
fluoropéptidos), la equivalente vacuna de péptido nativo a 1 nmol/péptido (8 nmol en total para ocho péptidos nativos).  
Ninguna preparación de la vacuna contenía ningún coadyuvante. 10 días después de la última inmunización, las  
células del bazo se volvieron a estimular con una mezcla de 8 péptidos nativos a 1 µg/ml por péptido. Después de 48  
50 horas de estimulación los sobrenadantes de cultivo se evaluaron para determinar las citoquinas por medio de un  
ensayo de cuentas multiplexado (CBA). Los resultados demuestran que el perfil de citoquinas en ratones CBF6 está  
dominado por la producción de IFN-γ y producción significativa de TNF-α resaltando un perfil de Th1 (Figura 4). Este  
perfil de citoquinas dominado por Th1 fue más pronunciado en comparación con los ratones BALB/c, debido a una  
menor intensidad de estas respuestas Th1 en comparación con los ratones CB6F1 (como también se observa  
55 mediante el ELISPOT de IFN-γ - remitirse a las Figuras 1 y 2) y aumenta en las citoquinas Th2. Sin embargo, se  
observó una respuesta Th1 mejorada en ratones BALB/c inmunizados con fluoropéptidos en comparación con su  
equivalente de péptido nativo.

**La vacuna de fluoropéptido estimula las células T CD4+ y CD8+ específicas de péptido que producen IFN-γ**

60 Se utilizó tinción de citoquinas intracelular para IFN-γ para proporcionar información sobre la frecuencia de las células  
T CD4+ y CD8+ específicas de péptido que producen productoras IFN-γ. Los ratones se inmunizaron con la vacuna  
de fluoropéptido (mezcla de 8 fluoropéptidos como antes) y los esplenocitos CD4+ o CD8+ se evaluaron para la tinción  
intracelular de citoquinas mediante citometría de flujo después de un corto periodo de estimulación con una mezcla  
de 8 péptidos nativos (vacuna). Los resultados demuestran que la inmunización de ratones con la vacuna de  
65 fluoropéptido era capaz de provocar tanto en células T CD4+ y CD8+ específicas de péptido que producen IFN-γ a  
una frecuencia de 0,5 a 2,6% (Figura 5). Esto valida que los fluoropéptidos involucran péptidos de procesamiento de  
antígenos del MHC de clase I y II si los péptidos contienen epítomos del MHC de clase I y II relevantes.

**Ejemplo 2 Las respuestas inmunitarias inducidas por la vacunación de fluoropéptido se refuerzan por la combinación con coadyuvante**

5 La inmunogenicidad de la vacuna fluoropéptido (mezcla de 8 fluoropéptidos como antes) se comparó con la inmunogenicidad de la vacuna de fluoropéptido en presencia de un coadyuvante, coadyuvante completo de Freund (FCA en sus siglas en inglés). Se utilizó vacuna de fluoropéptido (1 nmol/péptido) o vacuna de fluoropéptido (1 nmol/péptido) emulsionada en CFA para inmunizar ratones BALB/c. Diez días después de la inmunización, los esplenocitos se estimularon con péptidos individuales a 10µg/ml. Cuarenta y ocho horas más tarde los sobrenadantes de cultivo se recogieron y se sometieron a ensayo para determinar las citoquinas utilizando un análisis de citoquinas múltiplex (CBA). Los resultados muestran que el uso de un CFA como coadyuvante adicional puede aumentar significativamente la producción de citoquinas Th1 (IFN-γ e IL-2) sin afectar a la producción de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5) (Figura 6). Por lo tanto las respuestas de Th1 inducidas por la vacunación de fluoropéptido son reforzadas preferiblemente mediante la combinación con coadyuvante durante la inmunización.

15 **Las rutas subcutánea e intradérmica de administración de la vacuna de fluoropéptido pueden inducir respuestas inmunitarias**

20 La inmunogenicidad de la vacuna de fluoropéptido (mezcla de 8 fluoropéptidos como antes) se comparó utilizando las rutas de administración intradérmica o subcutánea en ratones BALB/c. 10 días después de la inmunización, los esplenocitos se estimularon con péptidos individuales a 10 µg/ml y se evaluaron ex vivo para determinar la producción de IFN-γ por medio de ELISPOT. Los resultados muestran que tanto las rutas subcutánea e intradérmica de administración de fluoropéptido son adecuadas para inducir robustas respuestas específicas del antígeno (Figura 7).

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una construcción de vector fluorocarbonado-antígeno de estructura  $C_mF_n-C_yH_x-(Sp)-R$ , donde  $m = 3$  a  $30$ ,  $n \leq 2m + 1$ ,  $y = 0$  a  $15$ ,  $x \leq 2y$ ,  $(m + y) = 3-30$ ,  $Sp$  es un resto espaciador químico opcional y  $R$  es un péptido del virus de la gripe inmunogénico seleccionado de:
- 10 DQVRESRNPNGAEIEDLIFLARSALILRGSVAHKS (SEQ ID NO: 32)  
 DLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTPSER (SEQ ID NO: 35)  
 VAYMLERELVRKTRFLPVAGGTSSVYIEVLHLTQG (SEQ ID NO: 4)  
 YITRNQPEWFRNVLSIAPIMFSNKMARLGKGYMFE (SEQ ID NO: 17)  
 APIMFSNKMARLGKGYMFESKRMKLRTQIPAEMLA (SEQ ID NO: 18)  
 SPGMMMGMFNMLSTVLGVSILNLGQKKYTKTTY (SEQ ID NO: 19)  
 KKKSYINKTGTFEFTSFFYRYGFVANFSMELPSFG (SEQ ID NO: 20)
- 15 y homólogos de los mismos que tiene al menos 90 % de identidad con las SEQ ID NO: 32, 35, 4, 17, 18, 19 o 20.
2. La construcción de vector fluorocarbonado-antígeno de la reivindicación en donde  $R$  es un péptido del virus de la gripe inmunogénico seleccionado de las SEQ ID NO: 32, 35, 4, 17, 18, 19 y 20.
- 20 3. Una composición farmacéutica que comprende la construcción de vector fluorocarbonado-antígeno de la reivindicación 1 o 2 opcionalmente junto con uno o más vehículos, excipientes, diluyentes o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables.
- 25 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, formulada para administración parenteral, oral, ocular, rectal, nasal, transdérmica, tópica o vaginal.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, que adopta la forma de un líquido, emulsión, sólido, aerosol o gas.
- 30 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, que comprende un coadyuvante en donde dicho coadyuvante se selecciona entre:
- 35 (1) refinamientos obtenidos natural o sintéticamente de los componentes naturales de bacterias, tales como coadyuvante de Freund y sus derivados, derivados de muramildipéptido (MDP), CpG, monofosforil lípido A;  
 (2) agentes coadyuvantes o potenciadores tales como saponinas, sales de aluminio y citoquinas;  
 (3) coadyuvantes de aceite en agua, coadyuvantes de agua en aceite, complejos inmunoestimuladores (ISCOM), liposomas, nano y micro-partículas formuladas; y  
 (4) toxinas y toxoides bacterianos.
- 40 7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, que comprende más construcciones de vector fluorocarbonado-antígeno de estructura  $C_mF_n-C_yH_x-(Sp)-R$  o sus derivados, donde  $m = 3$  a  $30$ ,  $n \leq 2m + 1$ ,  $y = 0$  a  $15$ ,  $x \leq 2y$ ,  $(m + y) = 3-30$ ,  $Sp$  es un radical espaciador químico opcional y  $R$  es un péptido de virus de la gripe inmunogénico.
- 45 8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, que comprende de 2 a 20 de dichas construcciones de vector-antígeno.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 7 u 8, que comprende 5, 6, 7 u 8 de dichas construcciones de vector-antígeno.
- 50 10. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, para su uso en un método de tratamiento de o inmunización contra la gripe.
- 55 11. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, para su uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria en un ser humano o animal.
- 60 12. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10 u 11 en combinación con terapia contra la gripe o combinada con una vacuna contra la gripe que contiene hemaglutinina mediante administración simultánea o separada.
- 65 13. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en donde la terapia contra la gripe es un inhibidor de la neuraminidasa.
14. Un método de preparación de un producto farmacéutico profiláctico o terapéutico que comprende combinar la construcción de fluorocarburo de la reivindicación 1 o 2 con uno o más portadores, excipientes, diluyentes o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables.

15. Uso de la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la gripe o de sus síntomas.

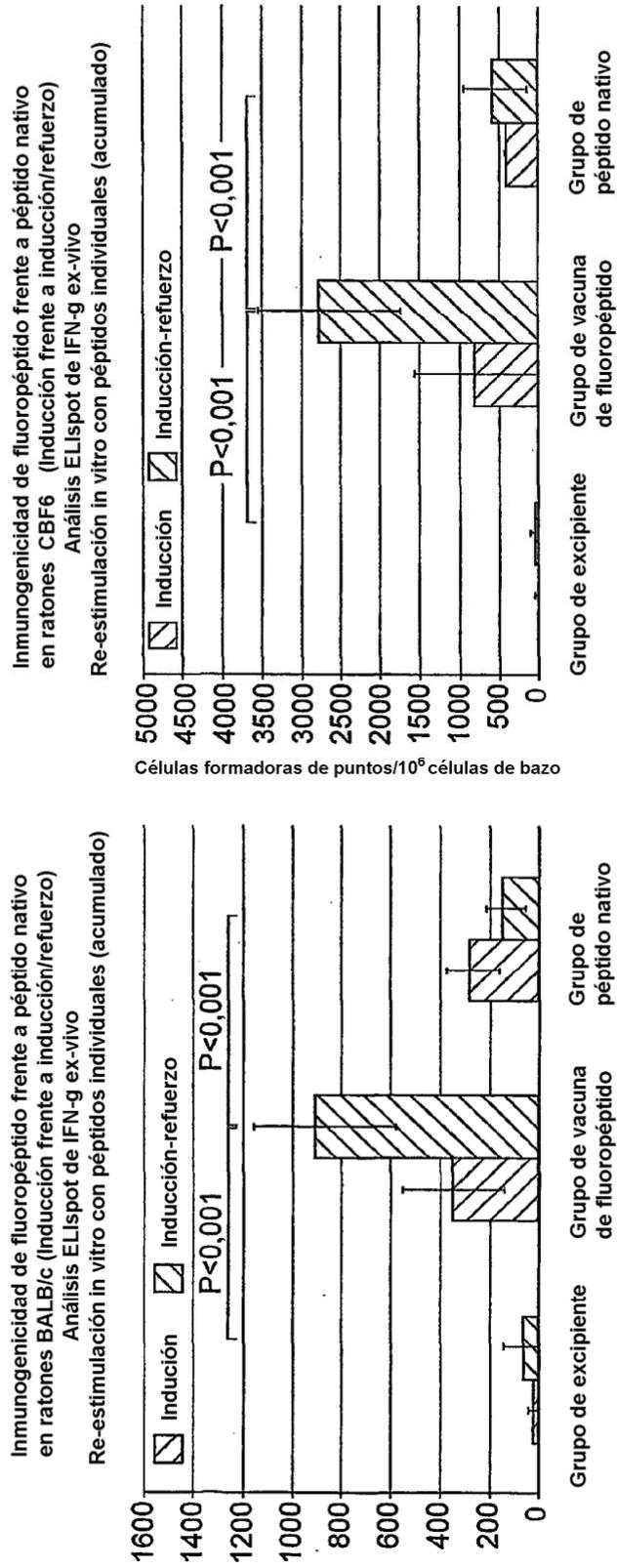


FIG. 1

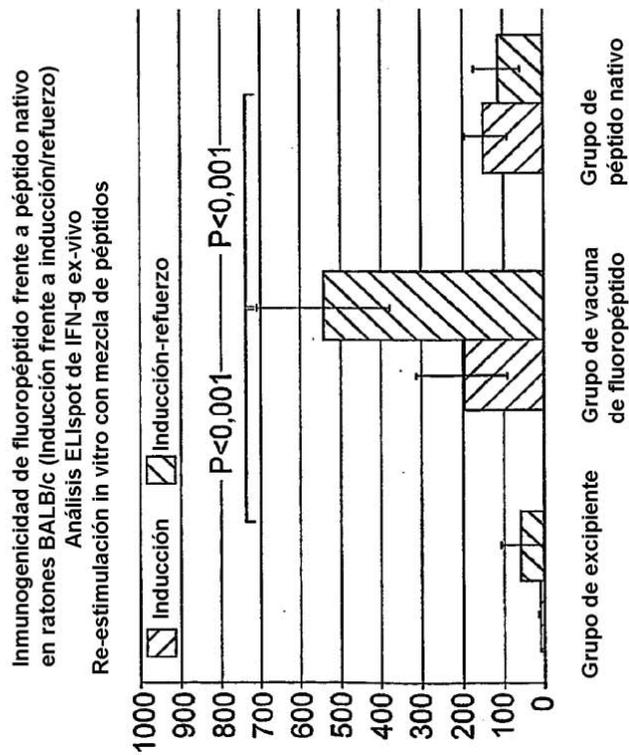
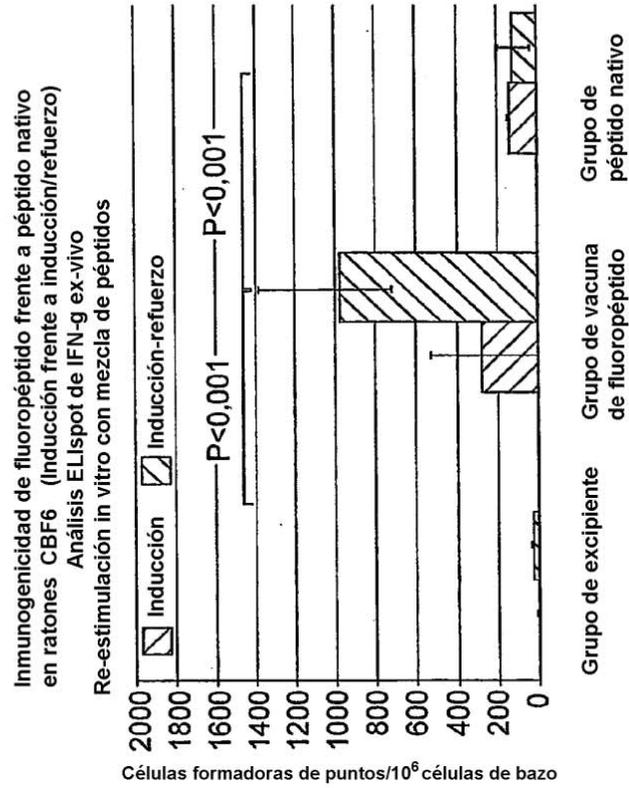


FIG. 2

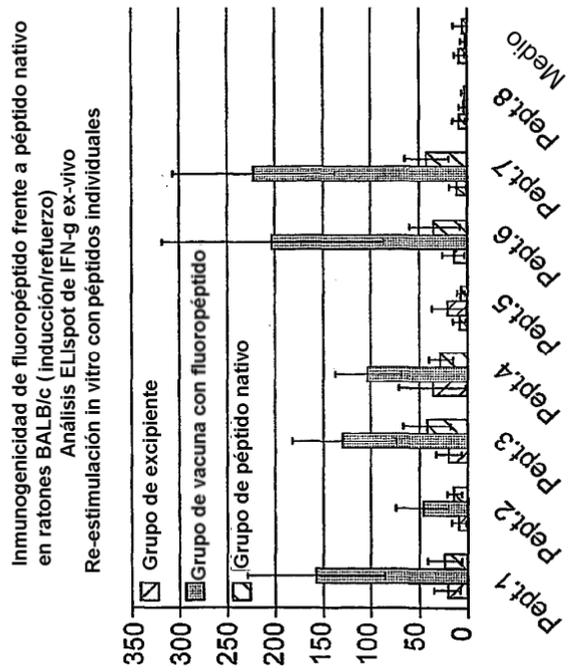
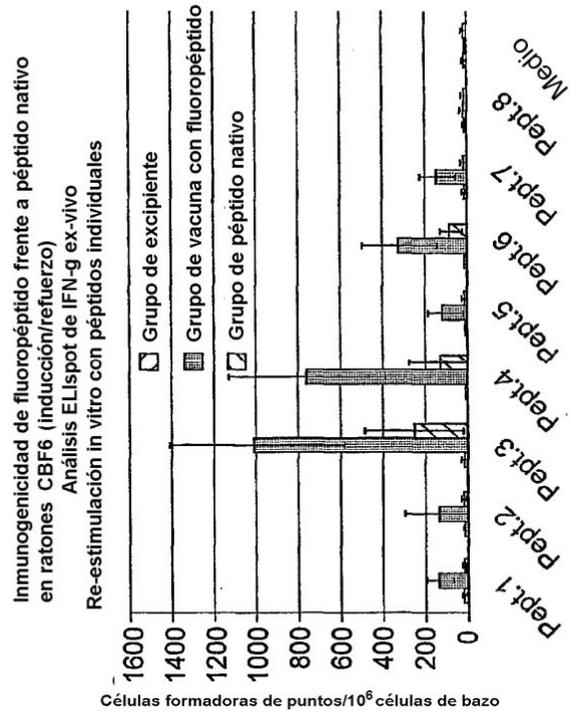


FIG. 3

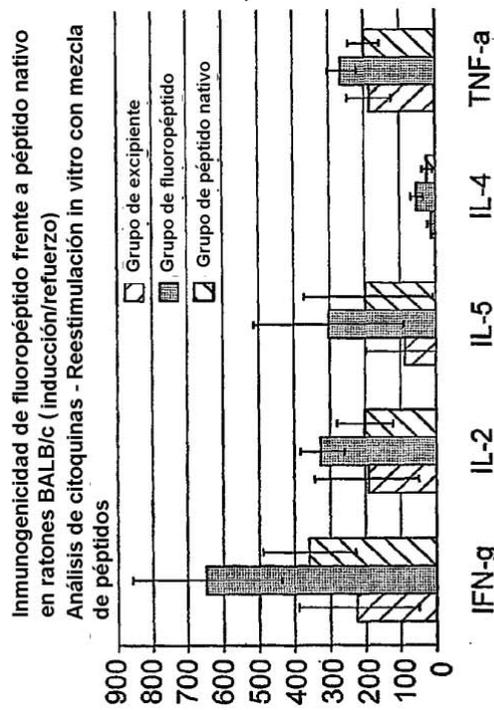
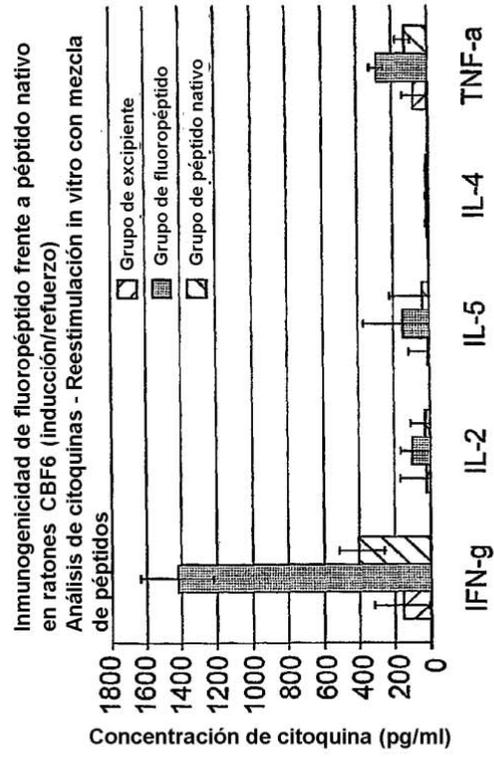


FIG. 4

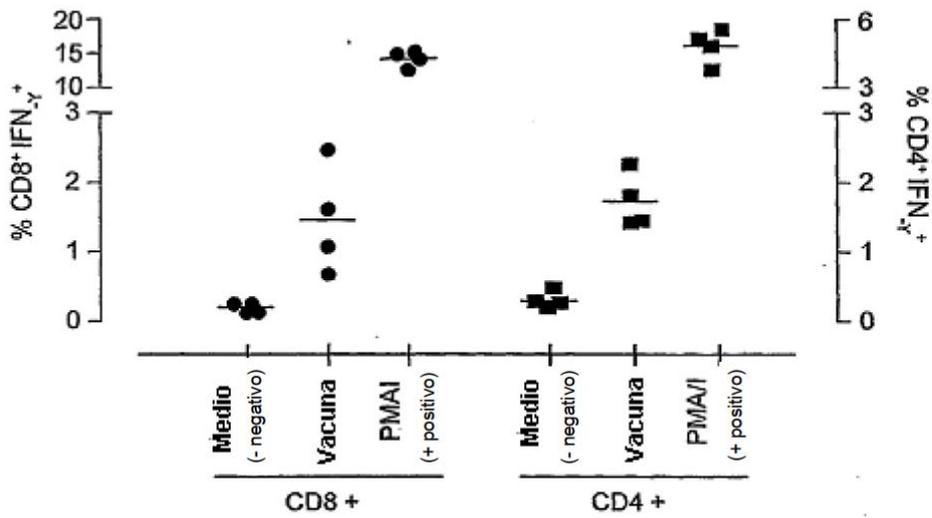


FIG. 5

**Inmunogenicidad de fluoropéptido vs fluoropéptido emulsionado en CFA en ratones BALB/c (solo inducción)**  
**Análisis citoquina - reestimulación in vitro con mezcla de péptido**

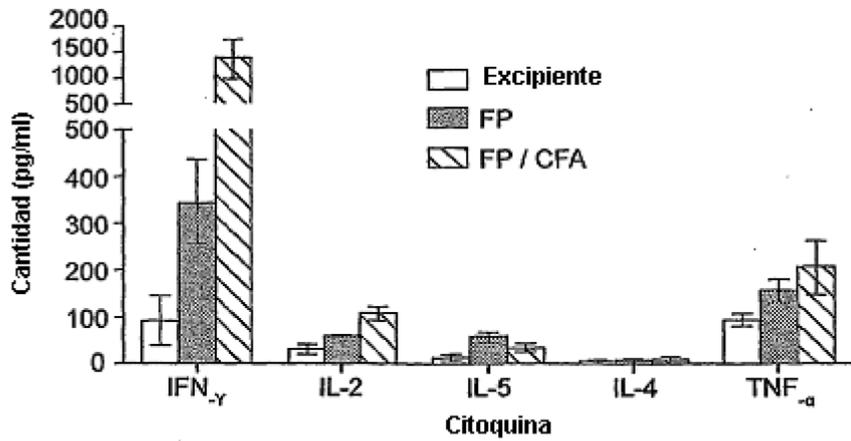


FIG. 6

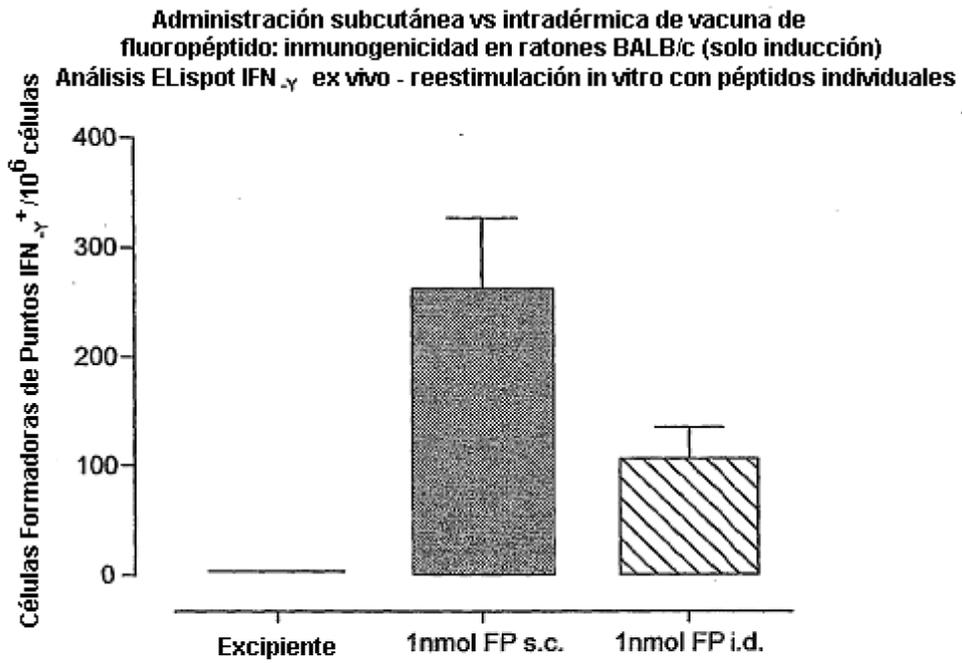


FIG. 7