

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 760 536**

51 Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/116 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2015 PCT/US2015/030037**
87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015 WO15175355**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2015 E 15792765 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3142695**

54 Título: **Composiciones y métodos para mejorar la inmunogenicidad de los conjugados de polisacárido-proteína**

30 Prioridad:
11.05.2014 CN 201410198533

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.05.2020

73 Titular/es:
**KANVAX BIOPHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)
Galaxy Bay Building 3, Suite 2816, Wujin
Economic Development Zone of West Taihu Lake,
Wujin District
Changzhou Jiangsu 213100, CN**

72 Inventor/es:
LI, JIANPING

74 Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 760 536 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

Composiciones y métodos para mejorar la inmunogenicidad de los conjugados de polisacárido-proteína

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los campos de inmunología y vacunología, y en particular, métodos y composiciones para mejorar la inmunogenicidad de los conjugados de polisacárido-proteína.

10 **Antecedentes de la invención**

La conjugación covalente de un polisacárido a una proteína transportadora puede transformar el polisacárido de un hapteno a un inmunógeno (por ejemplo, en niños), potenciando la inmunogenicidad del polisacárido. Las vacunas basadas en tales conjugados de polisacárido-proteína se han usado ampliamente entre los niños para prevenir infecciones bacterianas por *Streptococcus pneumoniae* (Pn), *Neisseria meningitidis* (Men), y *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib).

Se han usado varios tipos de proteínas transportadoras para preparar conjugados de polisacárido-proteína, incluyendo toxoide tetánico, toxoide diftérico, un mutante no tóxico de toxina de difteria CRM197 y la proteína de superficie recombinante D de Hib. Sin embargo, Debido a las diversas propiedades inmunológicas de las diferentes proteínas transportadoras, el mismo polisacárido conjugado con diferentes proteínas transportadoras puede mostrar diversos grados de inmunogenicidad en animales inmunizados. Por tanto, las proteínas transportadoras producidas usando diferentes tecnologías pueden dar lugar a vacunas conjugadas de polisacárido-proteína de diferentes propiedades inmunogénicas.

En inmunología está bien establecido que al entrar al cuerpo de un animal, las células presentadoras de antígenos (APC) procesan un inmunógeno en epítomos dentro de las APC, que se incorporan en los principales complejos de histocompatibilidad (MHC) y se muestran en la superficie de los APC para que los linfocitos T los reconozcan. Tres factores contribuyen a la inmunogenicidad de un epítomo dado: (1) producción del epítomo apropiado; (2) expresión de las moléculas de MHC que se unirán al epítomo; (3) expresión del receptor de linfocitos T para reconocer el complejo MHC-epítomo. La ausencia de cualquiera de estos tres factores resulta en deficiencia o pérdida de la respuesta inmune al inmunógeno.

Los experimentos en ratones han revelado que la falta de un complejo MHC-epítomo adecuado es la razón más común para la pérdida de la respuesta inmune a un inmunógeno. Las moléculas de MHC exhiben un alto grado de polimorfismo. Cada epítomo puede ser capaz de formar un complejo con uno o algunos alelos de una molécula de MHC, pero un epítomo rara vez puede formar un complejo con todos los alelos de una molécula de MHC. Además, el procesamiento inadecuado de los inmunógenos o la falta de tolerancia de los linfocitos T puede provocar la pérdida de la respuesta inmune.

Los experimentos han demostrado que dos de los tres epítomos en el toxoide tetánico, es decir, los epítomos QYIKANSKFIGITEL (denominado P2) y FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (denominado P30), así como el epítomo ISQAVHAAHAEINE-AGR (denominado OVAp) de ovoalbúmina, pueden unirse a una multitud de diferentes moléculas de MHC de clase II (Panina-Bordignon P *et al.* (1989) "Universally immunogenic T cell epitopes promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells". Eur. J. Immunol. 19: 2237-2242). Estos epítomos pueden ser reconocidos por los linfocitos T y demuestran propiedades inmunogénicas ubicuas. Por tanto, estos epítomos se denominan epítomos universales.

Los epítomos universales pueden unirse a muchos isotipos y aleotipos de moléculas de MHC de clase II humana. Las propiedades ubicuas de unión al MHC de tales epítomos universales pueden explotarse para desarrollar vacunas que sean capaces de inducir una respuesta inmune en la mayoría de los individuos de una población.

La investigación ha demostrado que el epítomo P2 consiste en los aminoácidos 830-844 del toxoide tetánico (QYIKANSKFIGITE (SEQ ID NO: 1)). El epítomo P30 consta de los aminoácidos 947-967 del toxoide tetánico (FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 2)). El epítomo OVAp consiste en los aminoácidos 323-339 de ovoalbúmina (ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 3)). Tras la admisión por los APC, las proteínas que tienen estas secuencias de epítomos se degradan, pero los epítomos se conservan y se unen a las moléculas de MHC para que se muestren en la superficie de las APC y sean reconocidas por los linfocitos T. Estos epítomos universales pueden interactuar con múltiples tipos de HLA-DR a través del mismo mecanismo.

Las moléculas de MHC son receptores para inmunógenos procesados, y su función principal es mostrar epítomos derivados de inmunógenos durante la inducción de tolerancia inmune y respuesta inmune periférica contra inmunógenos exógenos en el timo. Por un lado, si las moléculas de MHC muestran una gran cantidad de cierto epítomo, se espera un mayor nivel de reconocimiento de linfocitos T del inmunógeno, pero a expensas de agotar una gran fracción del reservorio de linfocitos T, conduciendo a tolerancia inmune. Por otro lado, si las moléculas de MHC solo muestran una pequeña cantidad de cierto epítomo, el depósito de linfocitos T se conserva, pero solo una

pequeña cantidad del inmunógeno exógeno puede representarse eficazmente para desencadenar una respuesta inmune periférica. Por tanto, un epítipo eficaz de un inmunógeno exógeno debe permitir que las moléculas de MHC logren un equilibrio en la cantidad de epítipos que se muestran.

5 Existen inmunógenos que tienen un pequeño número de epítipos representativos, que tras ser procesados por las APC, preservan la integridad de la secuencia alta, y puede desencadenar una cierta cantidad de linfocitos T para establecer la memoria inmune sin agotar demasiadas linfocitos T para resultar en tolerancia inmune. Los inmunógenos que tienen tales epítipos tienen una fuerte inmunogenicidad, y este fenómeno explica por qué el toxoide tetánico tiene una inmunogenicidad muy fuerte.

10 Los epítipos de linfocitos T más conocidos actualmente tienen funciones inmunogénicas limitadas con haplotipos no específicos de MHC de clase II. Diferentes individuos conservan y muestran diferentes secuencias de epítipos dentro de los mismos inmunógenos para desencadenar sus linfocitos T. Dicha limitación genética de la mayoría de los epítipos para inducir linfocitos T en una población con diversos haplotipos de MHC de clase II dificulta
15 severamente el desarrollo de vacunas sintéticas. El descubrimiento de epítipos que pueden desencadenar individuos con diversos haplotipos de MHC de clase II (como en ratones y/o humanos) promete una estrategia universal para activar los linfocitos T. Epítipos universales, como P2, P30, OVAp etc., se pueden incorporar en inmunógenos proteicos naturales. La entidad fusionada se conoce como un grupo de antígeno de linfocitos T, que puede ser reconocido por las moléculas MHC de clase II en la mayoría de los individuos. Dichos grupos de
20 antígenos de linfocitos T se pueden usar directamente para inducir linfocitos T, o para facilitar la producción de anticuerpos por los linfocitos B contra inmunógenos débiles, mejorando así la respuesta inmune.

Las bacterias patógenas generalmente expresan polisacáridos capsulares (CP) de alto peso molecular que encapsulan la superficie celular bacteriana. Los polisacáridos capsulares son excelentes inmunógenos para adultos
25 y pueden usarse para preparar vacunas eficaces. Sin embargo, para niños, especialmente niños menores de 2 años de edad, los CP se consideran antígenos independientes de linfocitos T. Los experimentos han revelado que los CP pueden inducir la producción de anticuerpos IgM específicos de CP en ratones de tipo salvaje y de linfocitos T deficientes. Sin embargo, los CP no pueden inducir la conversión de anticuerpos IgM en anticuerpos IgG. Los datos de humanos también demuestran que los PC pueden inducir la producción de anticuerpos protectores en adultos, pero los PC no pueden inducir una respuesta inmune en bebés y niños pequeños. Específicamente, después de la
30 vacunación repetida de niños con antígenos CP, no hay una respuesta mejorada a la segunda vacunación, tampoco es la memoria persistente de linfocitos T inducida por dicha vacunación.

Los experimentos inmunológicos han establecido que las vacunas basadas en conjugados de polisacárido-proteína tienen ventajas sobre las vacunas basadas en polisacáridos puros debido a la respuesta inmune humoral inducida
35 asociada con los conjugados de polisacárido-proteína. Los antígenos CP independientes de linfocitos T pueden unirse covalentemente a una proteína transportadora para obtener un conjugado de polisacárido-proteína. La inmunización de mamíferos usando dicho conjugado de polisacárido-proteína puede inducir linfocitos T para facilitar la producción de anticuerpos IgG específicos de CP por los linfocitos B. El conjugado de polisacárido-proteína puede
40 inducir la conversión de IgM específica de CP en IgG, diferenciación de los linfocitos B de memoria y establecimiento de memoria de linfocitos T de larga duración.

Las vacunas basadas en conjugados de polisacáridos han desempeñado un papel importante en la prevención de infecciones graves, como *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae*, y *Neisseria meningitidis*. Sin
45 embargo, las vacunas actuales basadas en conjugados de polisacárido-proteína están sujetas a un alto grado de variabilidad en su inmunogenicidad debido a variaciones en las estructuras de los polisacáridos específicos y las proteínas transportadoras inmunogénicas. En ciertas poblaciones de alto riesgo, como niños, ancianos e individuos inmunocomprometidos, los conjugados proteicos de polisacáridos con inmunogenicidad débil generalmente no son eficaces, y sus efectos protectores son bastante limitados. Por tanto, el desarrollo de vacunas basadas en
50 conjugados de polisacárido-proteína que tienen una inmunogenicidad más fuerte sigue siendo un área muy necesaria en el campo.

Breve resumen de la invención

55 En el presente documento se describen composiciones y métodos para mejorar la inmunogenicidad de los antígenos de polisacárido usando proteínas transportadoras quiméricas que comprenden un epítipo universal. Además se describen composiciones inmunogénicas y vacunas basadas en los conjugados polisacáridos-proteína transportadora quimérica, métodos para tratar infecciones bacterianas, y métodos para preparar los conjugados de polisacárido-proteína transportadora quimérica.

60 La presente invención proporciona un conjugado de polisacárido-proteína que comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epítipo universal, en donde el antígeno polisacárido se conjuga covalentemente con la proteína transportadora quimérica, y en donde la proteína transportadora quimérica comprende la secuencia de
65 aminoácidos de una cualquiera seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 8-32, 39-44, y 51-56.

La presente invención además proporciona:

- una composición inmunogénica que comprende el conjugado de polisacárido-proteína;
- una vacuna que comprende la composición inmunogénica y un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- 5 • la composición inmunogénica o la vacuna para usar en un método de inmunización de un individuo contra una enfermedad causada por una bacteria, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la composición inmunogénica o la vacuna, en donde el antígeno polisacárido es un polisacárido expresado en la superficie de la bacteria o un derivado de la misma; y
- 10 • un método para preparar el conjugado de polisacárido-proteína, que comprende conjugar el antígeno polisacárido con la proteína transportadora quimérica.

En el presente documento se describe un conjugado de polisacárido-proteína que comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epítipo universal, y en donde el antígeno polisacárido se conjuga covalentemente con la proteína transportadora quimérica. En algunos aspectos, la proteína transportadora quimérica comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 3 copias del epítipo universal.

En algunos aspectos de acuerdo con cualquiera de los conjugados de polisacárido-proteína descritos anteriormente, la proteína transportadora quimérica comprende al menos dos epítopos universales de diferentes secuencias de aminoácidos.

En algunos aspectos de acuerdo con cualquiera de los conjugados de polisacárido-proteína descritos anteriormente, el epítipo universal tiene una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 aminoácidos.

En algunos aspectos de acuerdo con cualquiera de los conjugados de polisacárido-proteína descritos anteriormente, el epítipo universal se fusiona covalentemente al extremo N, el extremo C, o tanto el extremo N como el extremo C de la proteína transportadora.

En algunos aspectos de acuerdo con cualquiera de los conjugados de polisacárido-proteína descritos anteriormente, el epítipo universal comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3.

En algunos aspectos de acuerdo con cualquiera de los conjugados de polisacárido-proteína descritos anteriormente, la proteína transportadora se deriva del toxoide tetánico, toxoide diftérico, materiales de reacción cruzada (CRM) de toxina diftérica, proteína de la cápside del rotavirus VP8, complejo de membrana externa meningocócica, o proteína D de *Haemophilus influenzae*. En algunos aspectos, la proteína transportadora se deriva de la cadena A de CRM197 de la toxina diftérica. En algunas realizaciones, la proteína transportadora comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 4-6.

En algunos aspectos de acuerdo con cualquiera de los conjugados de polisacárido-proteína descritos anteriormente, el epítipo universal se fusiona covalentemente a la proteína transportadora mediante un enlazador peptídico dispuesto entre ellos. En algunos aspectos, el péptido enlazador es un enlazador flexible seleccionado entre el grupo que consiste en un polímero de glicina, un polímero de glicina-serina, un polímero de glicina-alanina, o un polímero de alanina-serina. En algunos aspectos, el enlazador peptídico tiene una longitud entre 1 y 20 restos de aminoácido.

En algunos aspectos, el enlazador peptídico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los conjugados de polisacárido-proteína descritos anteriormente, la proteína transportadora quimérica comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los seleccionados entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 8-32.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los conjugados de polisacárido-proteína descritos anteriormente, la proteína transportadora quimérica comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los seleccionados entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 39-44.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los conjugados de polisacárido-proteína descritos anteriormente, la proteína transportadora quimérica comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los seleccionados entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 51-56.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los conjugados de polisacárido-proteína descritos anteriormente, la relación de peso a peso del antígeno polisacárido a la proteína transportadora quimérica es de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2 (tal como aproximadamente cualquiera de 0,8-0,9, 0,9-1,0, 1,0-1,1 o 1,1-1,2).

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los conjugados de polisacárido-proteína descritos anteriormente, el antígeno polisacárido tiene un peso molecular promedio entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 1000 kDa (como aproximadamente cualquiera de 10 kDa-100 kDa, 100 kDa-500 kDa, o 500 kDa-

1000 kDa).

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los conjugados de polisacárido-proteína descritos anteriormente, el antígeno polisacárido se deriva de un polisacárido capsular.

5 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los conjugados de polisacárido-proteína descritos anteriormente, el antígeno polisacárido se deriva de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (Pn), o *Neisseria meningitidis* (Men). En algunas realizaciones, el polisacárido capsular se deriva de *Streptococcus pneumoniae* de un serotipo seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 10
10 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. En algunas realizaciones, el polisacárido capsular se deriva de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib). En algunas realizaciones, el polisacárido capsular se deriva de *Neisseria meningitidis* de un serotipo seleccionado entre el grupo que consiste en A, C, Y, y W-135.

15 En un aspecto de la presente solicitud, se proporciona una composición inmunogénica que comprende cualquiera o cualquiera de las combinaciones de los conjugados de polisacárido-proteína descritos anteriormente. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende una pluralidad de los conjugados de polisacárido-proteína, en donde al menos dos de los conjugados de polisacárido-proteína comprenden una proteína transportadora que es diferente de uno a otro.

20 En algunas realizaciones de acuerdo con una cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento, la composición inmunogénica comprende una pluralidad de los conjugados de polisacárido-proteína, en donde al menos dos de los conjugados de polisacárido-proteína comprenden un antígeno polisacárido que se deriva de una especie bacteriana que es diferente entre sí.

25 En algunas realizaciones de acuerdo con una cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento, la composición inmunogénica comprende una pluralidad de los conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende un antígeno polisacárido derivado de una bacteria de un serotipo distinto de la misma especie. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende 13 conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende
30 un polisacárido capsular derivado de *Streptococcus pneumoniae* de un serotipo diferente seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, y 23F. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende 24 conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende un polisacárido capsular derivado de *Streptococcus pneumoniae* de un serotipo diferente seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11 A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C,
35 19 A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende 4 conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende un polisacárido capsular derivado de *Neisseria meningitidis* de un serotipo diferente seleccionado entre el grupo que consiste en A, C, Y, y W-135.

40 En algunas realizaciones de acuerdo con una cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente, la composición inmunogénica además comprende un adyuvante. En algunas realizaciones, el adyuvante es fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

45 En un aspecto de la presente solicitud, se proporciona una vacuna que comprende una cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto de la presente solicitud, se proporciona una cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente o cualquiera de las vacunas descritas anteriormente para su uso en un método de
50 inmunización de un individuo contra una enfermedad causada por una bacteria, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente o cualquiera de las vacunas descritas anteriormente, en donde el antígeno polisacárido es un polisacárido expresado en la superficie de la bacteria o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica o la vacuna se administran al individuo en al menos dos dosis. En algunas realizaciones, la enfermedad es neumonía, infección del oído, infección sinusal, meningitis, o bacteriemia causada por *Streptococcus pneumoniae*. En algunas
55 realizaciones, la enfermedad es meningitis, neumonía, epiglotitis, celulitis, artritis o infección del oído causada por *Haemophilus influenzae* tipo b. En algunas realizaciones, la enfermedad es meningitis o meningococemia causada por *Neisseria meningitidis*.

60 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos de inmunización descritos anteriormente, el individuo tiene una respuesta inmune pobre al antígeno polisacárido.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos de inmunización descritos anteriormente, el individuo es un niño menor de aproximadamente 2 años de edad, una persona de edad avanzada (como un individuo mayor de aproximadamente 65 años) o un individuo inmunocomprometido.

65 En el presente documento se describe el uso de cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas

anteriormente o cualquiera de las vacunas descritas anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad causada por una bacteria, en donde el antígeno polisacárido es un polisacárido expresado en la superficie de la bacteria o un derivado de la misma.

- 5 Además en un aspecto de la presente solicitud, se proporciona un método para preparar cualquiera de los conjugados de polisacárido-proteína descritos anteriormente, que comprende conjugar el antígeno polisacárido con la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se prepara cultivando una bacteria que comprende el antígeno polisacárido y recuperando el antígeno polisacárido del cultivo.
- 10 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos de preparación descritos anteriormente, el método comprende además preparar el antígeno polisacárido antes de conjugar el antígeno polisacárido con la proteína transportadora quimérica.
- 15 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos de preparación descritos anteriormente, la proteína transportadora quimérica se prepara cultivando una célula hospedadora transformada con un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína transportadora quimérica en condiciones que permiten la expresión de la proteína transportadora quimérica y recuperando la proteína transportadora quimérica expresada del cultivo. En algunas realizaciones, el vector comprende la secuencia de ácidos nucleicos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 34-38. En algunas realizaciones, el vector comprende la
- 20 secuencia de ácidos nucleicos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 46-50. En algunas realizaciones, el vector comprende la secuencia de ácidos nucleicos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-63.
- 25 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos de preparación descritos anteriormente, la célula hospedadora es *Escherichia coli* o levadura.
- 30 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos de preparación descritos anteriormente, el método comprende además preparar la proteína transportadora quimérica antes de conjugar el antígeno polisacárido con la proteína transportadora quimérica.
- 35 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos de preparación descritos anteriormente, el antígeno polisacárido se conjuga con la proteína transportadora quimérica por aminación reductora, conjugación de cianilación, o una reacción de carbodiimida. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se activa por tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamoniopiridinio (CDAP). En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se conjuga con la proteína transportadora quimérica a través de un enlazador de dihidrazida de ácido adípico (ADH).
- 40 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos de preparación descritos anteriormente, el método comprende además aislar la proteína transportadora quimérica conjugada y el antígeno polisacárido para obtener el conjugado de polisacárido-proteína.
- 45 En el presente documento también se describen composiciones farmacéuticas, kits y artículos de fabricación de cualquiera de los conjugados de polisacárido-proteína, o cualquiera de las composiciones inmunogénicas, o cualquiera de las vacunas descritas anteriormente.
- 50 Estos y otros aspectos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada posterior y las reivindicaciones adjuntas. Se entenderá que una, algunas, o todas las propiedades de las diversas realizaciones descritas en el presente documento pueden combinarse para formar otras realizaciones de la presente invención.
- 55 Los términos se usan en el presente documento como generalmente se usan en la técnica, a menos que se defina lo contrario.
- Se entiende que los aspectos y realizaciones de la invención descritos en el presente documento incluyen "que consiste" y/o "que consiste esencialmente en" aspectos y realizaciones.
- 60 La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) variaciones que se dirigen a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".
- 65 Como se usa en el presente documento, la referencia a "no" un valor o parámetro generalmente significa y describe "distinto de" un valor o parámetro. Por ejemplo, el método no se usa para tratar el cáncer de tipo X significa que se usa para tratar el cáncer de tipos que no sean X.
- El término "aproximadamente XY" usado el presente documento tiene el mismo significado que "aproximadamente X a aproximadamente Y".

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "a", "o", y "el" incluye referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Descripción detallada de la invención

5 En el presente documento se describen proteínas transportadoras quiméricas, así como conjugados de polisacárido-proteína que comprenden una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido. La proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora inmunogénica y un epítipo universal. Se describen adicionalmente composiciones inmunogénicas y vacunas que comprenden los conjugados de polisacárido-proteína y métodos para producir los conjugados de polisacárido-proteína. En comparación con los conjugados correspondientes del mismo antígeno polisacárido a proteínas transportadoras sin los epítopos universales, los conjugados de polisacárido-proteína descritos en el presente documento tienen una inmunogenicidad aumentada de al menos aproximadamente 3 a 5 veces. Los conjugados de polisacárido-proteína son útiles como vacunas para proporcionar protección contra infecciones bacterianas entre individuos, especialmente niños pequeños, ancianos y otras personas con un sistema inmunitario comprometido.

20 Así, en un aspecto, se proporciona una proteína transportadora quimérica que comprende una proteína transportadora y un epítipo universal. En algunas realizaciones, el epítipo universal comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3.

25 En otro aspecto, se describe un conjugado de polisacárido-proteína que comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epítipo universal, y en donde el antígeno polisacárido se conjuga covalentemente con la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el epítipo universal comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3.

Conjugados de polisacárido-proteína

30 En el presente documento se describe un conjugado de polisacárido-proteína con inmunogenicidad mejorada que comprende una proteína transportadora quimérica que comprende uno o más epítopos universales.

35 Por tanto, en el presente documento se describe un conjugado de polisacárido-proteína que comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epítipo universal, y en donde el antígeno polisacárido se conjuga (por ejemplo, conjugado covalentemente) a la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el epítipo universal comprende (incluyendo consiste esencialmente en o consiste en) la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3. En algunas realizaciones, la proteína transportadora se deriva del toxoide tetánico, toxoide diftérico, materiales de reacción cruzada (CRM) de toxina diftérica, proteína de la cápside del rotavirus VP8, complejo de membrana externa meningocócica, o proteína D de *Haemophilus influenzae*. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de un polisacárido capsular. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (Pn), o *Neisseria meningitidis* (Men). En algunas realizaciones, la relación de peso a peso del antígeno polisacárido a la proteína transportadora quimérica es de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2 (tal como aproximadamente cualquiera de 0,8-0,9, 0,9-1,0, 1,0-1,1 o 1,1-1,2).

45 En el presente documento se describe un conjugado de polisacárido-proteína que comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epítipo universal, en donde el epítipo universal comprende (incluyendo consiste esencialmente en o consiste en) la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3, y en donde el antígeno polisacárido está conjugado (por ejemplo, conjugado covalentemente) con la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, la proteína transportadora se deriva del toxoide tetánico, toxoide diftérico, materiales de reacción cruzada (CRM) de toxina diftérica, proteína de la cápside del rotavirus VP8, complejo de membrana externa meningocócica, o proteína D de *Haemophilus influenzae*. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de un polisacárido capsular. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (Pn), o *Neisseria meningitidis* (Men). En algunas realizaciones, la relación de peso a peso del antígeno polisacárido a la proteína transportadora quimérica es de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2 (tal como aproximadamente cualquiera de 0,8-0,9, 0,9-1,0, 1,0-1,1 o 1,1-1,2).

60 También se describe un conjugado de polisacárido-proteína que comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epítipo universal, en donde el epítipo universal comprende (incluyendo consiste esencialmente en o consiste en) la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3, en donde la proteína transportadora se deriva del toxoide tetánico, toxoide diftérico, materiales de reacción cruzada (CRM) de toxina diftérica, proteína de la cápside del rotavirus VP8, complejo de membrana externa meningocócica, o proteína D de *Haemophilus influenzae*, y en donde el antígeno polisacárido está conjugado (por ejemplo, conjugado

covalentemente) con la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de un polisacárido capsular. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (Pn), o *Neisseria meningitidis* (Men). En algunas realizaciones, la relación de peso a peso del antígeno polisacárido a la proteína transportadora quimérica es de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2 (tal como aproximadamente cualquiera de 0,8-0,9, 0,9-1,0, 1,0-1,1 o 1,1-1,2).

También se describe un conjugado de polisacárido-proteína que comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epítipo universal, en donde el epítipo universal comprende (incluyendo consiste esencialmente en o consiste en) la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3, en donde la proteína transportadora comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 4-6, y en donde el antígeno polisacárido está conjugado (por ejemplo, conjugado covalentemente) con la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de un polisacárido capsular. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (Pn), o *Neisseria meningitidis* (Men). En algunas realizaciones, la relación de peso a peso del antígeno polisacárido a la proteína transportadora quimérica es de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2 (tal como aproximadamente cualquiera de 0,8-0,9, 0,9-1,0, 1,0-1,1 o 1,1-1,2).

En el presente documento también se describe un conjugado de polisacárido-proteína que comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epítipo universal, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 8-32, 39-44, y 51-56, y en donde el antígeno polisacárido está conjugado (por ejemplo, conjugado covalentemente) con la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de un polisacárido capsular. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (Pn), o *Neisseria meningitidis* (Men). En algunas realizaciones, la relación de peso a peso del antígeno polisacárido a la proteína transportadora quimérica es de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2 (tal como aproximadamente cualquiera de 0,8-0,9, 0,9-1,0, 1,0-1,1 o 1,1-1,2).

Los conjugados de polisacárido-proteína descritos en el presente documento comprenden un antígeno polisacárido. El término "polisacárido" se refiere a una molécula de carbohidrato polimérico compuesta de un gran número (por ejemplo, más de aproximadamente 9) de unidades de monosacáridos (por ejemplo, repetitivas) que están unidas covalentemente por enlaces glucosídicos. La hidrólisis de los enlaces glucosídicos en un polisacárido por químicos o bioquímicos (por ejemplo, reacciones de digestión enzimática) pueden producir los monosacáridos u oligosacáridos constituyentes. Los monosacáridos son moléculas de azúcar simple, incluyendo moléculas con una fórmula química de $C_x(H_2O)_y$, en donde en x e y son enteros que son típicamente al menos aproximadamente 3 y no más de aproximadamente 10, así como moléculas modificadas de los mismos, como los amino azúcares (por ejemplo, galactosamina, glucosamina, N-acetilglucosamina). Los oligosacáridos son polímeros que contienen una pequeña cantidad (por ejemplo, aproximadamente 3 a aproximadamente 9) de monosacáridos. Como se usa en el presente documento, "polisacárido", "PS" puede referirse a una molécula de polisacárido de longitud completa natural, una mezcla de cualquier combinación de productos de hidrólisis (incluidas especies de monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos) de una molécula de polisacárido de longitud completa, cualquier derivado químicamente modificado o funcionalizado de la molécula de polisacárido de longitud completa o su producto de hidrólisis, o cualquier combinación de los mismos. El polisacárido puede ser lineal o ramificado, una sola especie química o una mezcla de especies químicas relacionadas (como moléculas con las mismas unidades básicas de monosacáridos, pero diferente número de repeticiones).

La expresión "antígeno polisacárido" o "antígeno PS" se refiere a un polisacárido (que incluye una mezcla de especies de polisacárido relacionadas derivadas de la misma molécula de polisacárido) que puede desencadenar una respuesta inmune, como producción de anticuerpos específicos de PS. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido solo puede desencadenar una respuesta inmune independiente de linfocitos T, o una respuesta inmune sin memoria inmune. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido por sí solo no desencadena una respuesta inmune fuerte (con un alto título de anticuerpos anti-PS y/o una alta afinidad de anticuerpos con el antígeno PS) o duradera (como individuos inmunocomprometidos, niños pequeños, o ancianos) inmunizados con el antígeno PS. "Fuerte", "alto" y "duradero" se refieren a un nivel o una cantidad que es suficiente para proporcionar protección hasta cierto punto en el individuo para prevenir, recuperar, ralentizar o retrasar una infección y/o uno o más síntomas asociados con la infección causada por un agente (como una bacteria) que porta el antígeno PS. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido tiene un peso molecular promedio de al menos aproximadamente 10 kDa, 50 kDa, 100 kDa, 150 kDa, 200 kDa, 250 kDa, 300 kDa, 400 kDa, 500 kDa, 600 kDa, 700 kDa, 800 kDa, 900 kDa, 1000 kDa o más. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido tiene un peso molecular promedio de aproximadamente cualquiera de 10 kDa-50 kDa, 50 kDa-100 kDa, 100 kDa-150 kDa, 150 kDa-200 kDa, 200 kDa-250 kDa, 250 kDa-300 kDa, 300 kDa-400 kDa, 400 kDa-500 kDa, 500 kDa-600 kDa, 600 kDa-700 kDa, 700 kDa-800 kDa, 800 kDa-900 kDa, 900 kDa-1000 kDa, 10 kDa-100 kDa, 10 kDa-250 kDa, 10 kDa-500 kDa, 100 kDa-250 kDa, 100 kDa-500 kDa, 10 kDa-750 kDa, 500 kDa-750 kDa, 500 kDa-1000 kDa, 250 kDa-750 kDa, o 10 kDa-1000 kDa. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 10000 kDa (como aproximadamente cualquiera de 10 kDa-100 kDa, 100 kDa-500 kDa, o

500 kDa-1000 kDa).

En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido es un polisacárido capsular. "Polisacárido capsular" o "CP", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de polisacárido producidas por una especie de bacteria u otro microbio (como un hongo o un alga) que envuelven la superficie de la bacteria o microbio. Cada especie bacteriana o microbiana puede incluir subespecies, cada una de las cuales puede producir un CP de una estructura y/o composición química única (como monosacáridos y/o enlaces entre monosacáridos), que puede desencadenar una respuesta inmune específica. En la presente divulgación, "polisacárido" o "PS" pueden usarse para referirse a "polisacárido capsular" o "CP", pero los derivados de polisacárido o polisacárido (tales como los conjugados de polisacárido-proteína) descritos en el presente documento no se limitan a polisacárido capsular o derivados de CP del mismo. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido comprende unidades repetidas de monosacárido u oligosacárido derivadas de un polisacárido capsular. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido comprende CP o fragmentos químicamente modificados (tales como unidades repetitivas de monosacárido u oligosacárido) del mismo.

En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido es un polisacárido capsular derivado de una bacteria patógena. Las bacterias patógenas pueden incluir, pero sin limitación, *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (Pn), y *Neisseria meningitidis* (Men), incluyendo todas las subespecies, serotipos, tipos, grupos, cepas y variaciones de las mismas. Por ejemplo, más de 90 serotipos de *Streptococcus pneumoniae* y al menos 12 serotipos de *Neisseria meningitidis* han sido identificados, y cada serotipo está asociado con un polisacárido capsular único. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido es un polisacárido capsular derivado de *Streptococcus pneumoniae* de un serotipo seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11 A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19 A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido es un polisacárido capsular derivado de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib). En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido es un polisacárido capsular derivado de *Neisseria meningitidis* de un serotipo seleccionado entre el grupo que consiste en A, C, Y, y W- 135. En algunas realizaciones, el conjugado de polisacárido-proteína comprende más de uno (como al menos cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) diferentes antígenos de polisacárido, tales como antígenos de polisacáridos de diferentes serotipos de la misma especie de bacteria.

El antígeno polisacárido puede conjugarse covalentemente o unirse a cualquier resto de aminoácido de la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido está unido covalentemente a los grupos amino (como las cadenas laterales de lisinas) o grupos sulfhidrilo (como las cadenas laterales de restos de cisteína). En algunas realizaciones, se dispone un enlazador orgánico flexible entre el antígeno polisacárido y la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, uno o más restos (como cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5 o más) de la proteína transportadora quimérica están unidos covalentemente a una molécula de antígeno polisacárido. La relación relativa (peso a peso) del antígeno polisacárido (es decir, las moléculas de antígeno polisacárido total) a la proteína transportadora quimérica puede ser importante para lograr la eficacia inmunogénica deseable. En algunas realizaciones, la relación de peso a peso del antígeno polisacárido a la proteína transportadora quimérica es aproximadamente cualquiera de 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,2, 1,4, 1,5, 1,75, 2 o más. En algunas realizaciones, la relación de peso a peso del antígeno polisacárido a la proteína transportadora quimérica es aproximadamente cualquiera de 0,2-0,5, 0,5-0,8, 0,8-0,9, 0,9-1,0, 1,0-1,1, 1,1-1,2, 0,6-1,0, 1,0-1,2, 1,2-1,5, 1,5-2, 1,0-1,4, 0,8-1,2, 0,6-1,5, 0,2-1,0 o 1,0-2,0. En algunas realizaciones, la relación peso a peso del antígeno polisacárido a la proteína transportadora quimérica es aproximadamente 0,8-1,0. En algunas realizaciones, el porcentaje de peso del antígeno polisacárido en el conjugado de polisacárido-proteína es aproximadamente del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 42 %, 44 %, 46 %, 48 %, 50 %, 52 %, 54 %, 56 %, 58 %, 60 %, 70 %, 80 % o más. En algunas realizaciones, el porcentaje de peso del antígeno polisacárido en el conjugado de polisacárido-proteína es aproximadamente cualquiera del 10 %-30 %, 30 %-40 %, 40 %-44 %, 44 %-46 %, 46 %-48 %, 48 %-50 %, 50 %-52 %, 52 %-54 %, 54 %-60 %, 60 %-80 %, 44 %-49 %, 49 %-54 %, o 44 %-54 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de peso de la proteína transportadora quimérica en el conjugado de polisacárido-proteína es aproximadamente del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 42 %, 44 %, 46 %, 48 %, 50 %, 52 %, 54 %, 56 %, 58 %, 60 %, 70 %, 80 % o más. En algunas realizaciones, El porcentaje de peso de la proteína transportadora quimérica en el conjugado de polisacárido-proteína es aproximadamente del 10 %-30 %, 30 %-40 %, 40 %-46 %, 46 %-48 %, 48 %-50 %, 50 %-52 %, 52 %-54 %, 54 %-56 %, 56 %-60 %, 60 %-80 %, 46 %-51 %, 51 %-56 %, o 46 %-56 %.

El conjugado de polisacárido-proteína descrito en el presente documento puede incluir una sola especie de molécula de conjugado de polisacárido-proteína, o una mezcla de especies de moléculas de conjugado de polisacárido-proteína relacionadas, en donde las especies conjugadas de proteína PS relacionadas comprenden la misma proteína transportadora quimérica y el antígeno PS derivado de la misma fuente (tal como la misma especie de bacteria, el mismo polisacárido capsular, etc.), pero la estructura química exacta del antígeno PS (incluida la longitud, la naturaleza química de la unidad repetitiva, número de unidades repetidas en cada molécula de antígeno PS, etc.), la posición o posiciones de enlace en la proteína transportadora quimérica y/o el número de moléculas de antígeno PS en la proteína transportadora quimérica pueden diferir entre las diferentes moléculas del conjugado de polisacárido-proteína. Por tanto, Las propiedades del conjugado de polisacárido-proteína descrito anteriormente pueden referirse al valor promedio de las moléculas conjugadas de proteína PS.

Proteína transportadora quimérica

Los conjugados de polisacárido-proteína descritos en el presente documento comprenden una proteína transportadora quimérica, que comprende una proteína transportadora y un epítipo universal.

5 En el presente documento también se describen proteínas transportadoras quiméricas, que puede conjugarse con un antígeno (tal como un antígeno polisacárido) para formar un conjugado antígeno-proteína con inmunogenicidad mejorada.

10 En un aspecto, Se describe una proteína transportadora quimérica para mejorar la respuesta inmune de un antígeno polisacárido, que comprende una proteína transportadora y un epítipo universal. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 3 copias del epítipo universal. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende al menos dos epítipos universales de diferentes secuencias de aminoácidos. En algunas realizaciones, el epítipo universal se fusiona covalentemente al extremo N, el extremo C, o tanto el extremo N como el extremo C de la proteína transportadora.

15 En algunas realizaciones, el epítipo universal comprende (incluyendo consiste esencialmente en o consiste en) la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3. En algunas realizaciones, la proteína transportadora se deriva del toxoide tetánico, toxoide diftérico, materiales de reacción cruzada (CRM) de toxina diftérica, proteína de la cápside del rotavirus VP8, complejo de membrana externa meningocócica, o proteína D de *Haemophilus influenzae*. En algunas realizaciones, la proteína transportadora comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 4-6. En algunas realizaciones, el epítipo universal se fusiona covalentemente a la proteína transportadora mediante un enlazador peptídico dispuesto entre ellos.

25 También se describe una proteína transportadora quimérica para mejorar la respuesta inmune de un antígeno polisacárido, que comprende una proteína transportadora y un epítipo universal, en donde el epítipo universal comprende (incluyendo consiste esencialmente en o consiste en) la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 3 copias del epítipo universal. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende al menos dos epítipos universales de diferentes secuencias de aminoácidos. En algunas realizaciones, el epítipo universal se fusiona covalentemente al extremo N, el extremo C, o tanto el extremo N como el extremo C de la proteína transportadora. En algunas realizaciones, la proteína transportadora se deriva del toxoide tetánico, toxoide diftérico, materiales de reacción cruzada (CRM) de toxina diftérica, proteína de la cápside del rotavirus VP8, complejo de membrana externa meningocócica, o proteína D de *Haemophilus influenzae*. En algunas realizaciones, la proteína transportadora comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 4-6. En algunas realizaciones, el epítipo universal se fusiona covalentemente a la proteína transportadora mediante un enlazador peptídico dispuesto entre ellos.

40 También se describe una proteína transportadora quimérica para mejorar la respuesta inmune de un antígeno polisacárido, que comprende una proteína transportadora y un epítipo universal, en donde el epítipo universal comprende (incluyendo consiste esencialmente en o consiste en) la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3, y en donde la proteína transportadora se deriva del toxoide tetánico, toxoide diftérico, materiales de reacción cruzada (CRM) de toxina diftérica, proteína de la cápside del rotavirus VP8, complejo de membrana externa meningocócica, o proteína D de *Haemophilus influenzae*. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 3 copias del epítipo universal. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende al menos dos epítipos universales de diferentes secuencias de aminoácidos. En algunas realizaciones, el epítipo universal se fusiona covalentemente al extremo N, el extremo C, o tanto el extremo N como el extremo C de la proteína transportadora. En algunas realizaciones, la proteína transportadora comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 4-6. En algunas realizaciones, el epítipo universal se fusiona covalentemente a la proteína transportadora mediante un enlazador peptídico dispuesto entre ellos.

55 En algunos aspectos, Se describe una proteína transportadora quimérica para mejorar la respuesta inmune de un antígeno polisacárido, que comprende una proteína transportadora y un epítipo universal, en donde el epítipo universal comprende (incluyendo consiste esencialmente en o consiste en) la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3, y en donde la proteína transportadora comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4-6. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 3 copias del epítipo universal. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende al menos dos epítipos universales de diferentes secuencias de aminoácidos. En algunas realizaciones, el epítipo universal se fusiona covalentemente al extremo N, el extremo C, o tanto el extremo N como el extremo C de la proteína transportadora. En algunas realizaciones, el epítipo universal se fusiona covalentemente a la proteína transportadora mediante un enlazador peptídico dispuesto entre ellos.

65 Como se usa en el presente documento, la proteína transportadora quimérica comprende una molécula de fusión, es

decir, un polímero de aminoácidos hecho mediante la fusión de al menos dos moléculas de polipéptidos constituyentes o secuencias de aminoácidos que no se derivan naturalmente de la misma molécula o proteína de polipéptido. La proteína transportadora quimérica contemplada en el presente documento puede tener una única cadena larga de aminoácidos (por ejemplo, al menos 30 aminoácidos de longitud), o puede tener múltiples cadenas largas de aminoácidos que pueden tener la misma secuencia o secuencias diferentes. La(s) cadena(s) de la proteína transportadora quimérica puede plegarse en una sola entidad estructural. Al menos una de las cadenas en la proteína transportadora quimérica comprende la molécula de fusión, en donde las al menos dos moléculas de polipéptidos constituyentes pueden estar unidas covalentemente entre sí a través de un enlace peptídico, un enlace que involucra los grupos de la cadena lateral (como un enlace disulfuro), y/o un enlace mediado por un enlazador orgánico (como un enlace sin impedimento estérico significativo). En algunas realizaciones, se puede disponer un enlazador entre dos moléculas de polipéptido constituyente adyacentes o secuencias de aminoácidos dentro de la proteína quimérica, uniendo así las moléculas de polipéptido constituyente adyacentes o secuencias de aminoácidos. "Conector", como se usa en el presente documento, puede referirse a un péptido corto (tal como que comprende de 1-30 aminoácidos) que se une o se une por enlaces peptídicos a dos secuencias de aminoácidos constituyentes o moléculas de polipéptido dentro de la proteína quimérica. En algunas realizaciones, el enlazador no afecta o afecta significativamente el pliegue, conformación y/o bioactividad de las moléculas de polipéptidos constituyentes. La proteína quimérica se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante, producir por síntesis química, o por unión covalente (como por medio de una reacción química) al menos dos moléculas de polipéptidos, que pueden derivarse de fuentes naturales o prepararse mediante técnicas de ADN recombinante o síntesis química. La proteína quimérica a la que se hace referencia en el presente documento también puede incluir polímero(s) de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o por intervención, tal como formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación. Dentro de este término también se incluyen, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. La expresión "proteína transportadora quimérica" y "proteína quimérica" se pueden usar indistintamente en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epítipo universal. Como se usa en el presente documento, "proteína transportadora" se refiere a una proteína de origen natural o derivado de la misma (tal como proteína mutante, modificada química o naturalmente, o similar) que puede proporcionar epítopos antigénicos para el reconocimiento por los linfocitos T (como los linfocitos T auxiliares), y puede conjugarse a un antígeno no relacionado (como el antígeno polisacárido) para mejorar la inmunogenicidad del antígeno no relacionado. Muchas proteínas transportadoras son conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, materiales de reacción cruzada (CRM) de toxina diftérica, toxoide tetánico, complejo de proteína de membrana externa meningocócica (OMPC), toxoide diftérico, proteína D de *Haemophilus influenzae*, así como fragmentos, mutantes, y otras variaciones de los mismos. Por ejemplo, los materiales de reacción cruzada (CRM, como CRM197) son una variante de la toxina diftérica aislada de cultivos de *Cornebacterium diphtheria* C7 (β 197), que tienen baja o ninguna toxicidad celular, pero preserva las propiedades inmunogénicas de la toxina diftérica. Cualquiera de los CRM o versiones genéticamente modificadas de los mismos (como CRM197) puede ser una proteína transportadora adecuada en la proteína quimérica de la presente invención. La cadena A de CRM197 se ha usado previamente como proteína transportadora en vacunas conjugadas de polisacárido-proteína (véase la publicación de solicitud de patente china N.º CN103495161A). Cualquiera de la cadena A de CRM197 y sus derivados (como fragmentos, mutantes o variantes modificadas, incluyendo CRM197A con SEQ ID NO: 4) puede usarse como la proteína transportadora en la proteína transportadora quimérica de la presente solicitud. Cualquiera de los mutantes no tóxicos de la toxina diftérica que tiene su histidina del resto de aminoácido 21 reemplazado por una glicina y sus derivados (como fragmentos, mutantes o variantes modificadas, incluyendo CRM197A con SEQ ID NO: 6) también se puede usar en proteínas transportadoras quiméricas de la presente invención. Además, proteínas bacterianas o virales (incluidas proteínas de superficie, proteínas de la cápside y similares) y derivados de las mismas (como fragmentos, mutantes o variantes modificadas) que pueden desencadenar la respuesta de los linfocitos T sin inducir toxicidad celular pueden usarse como la proteína transportadora en la presente invención. Por ejemplo, cualquiera de la proteína de la cápside del rotavirus VP8 o sus derivados (como fragmentos, mutantes o variantes modificadas, incluyendo el fragmento CoreVP8 con SEQ ID NO: 5) puede usarse como la proteína transportadora en la proteína transportadora quimérica de la presente invención. En algunas realizaciones, la proteína transportadora se deriva del toxoide tetánico, toxoide diftérico, materiales de reacción cruzada (CRM) de toxina diftérica, proteína de la cápside del rotavirus VP8, complejo de membrana externa meningocócica, o proteína D de *Haemophilus influenzae*. En algunas realizaciones, la proteína transportadora se deriva de la cadena A de CRM197 de la toxina diftérica. En algunas realizaciones, la proteína transportadora comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 4-6. En algunas realizaciones, la proteína transportadora comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la proteína transportadora comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína transportadora comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

Como se usa en el presente documento, "epítipo universal" se refiere a un polímero de aminoácidos de no más de aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, que comprende un epítipo que puede unirse y representarse por una molécula MHC de clase I y/o una molécula MHC de clase II y reconocerse por un receptor de linfocitos T. El epítipo universal descrito en el presente documento puede tener las siguientes propiedades cuando se incorpora como parte

de una proteína quimérica: (1) tras la exposición y la absorción de una célula presentadora de antígeno (APC), se conserva la integridad de al menos la parte del epítipo del epítipo universal, es decir, el APC no escinde ni degrada la porción de epítipo del epítipo universal dentro de una proteína quimérica; y (2) el epítipo puede mejorar la respuesta inmune contra la proteína transportadora en la proteína quimérica, en comparación con la porción de proteína transportadora de la proteína quimérica sin el epítipo universal. Se puede usar una variedad de técnicas conocidas en la técnica para medir la respuesta inmune, incluyendo, pero sin limitación, ensayos de ELISA que determinan los títulos de anticuerpos. El epítipo universal puede exhibir las propiedades anteriores en múltiples construcciones de proteínas quiméricas (como cuando se fusionan con diferentes secuencias de proteínas), en uno o una variedad de tipos de células APC, y/o en APC de diferentes individuos (incluyendo individuos que tienen diferentes alelos polimórficos de moléculas de MHC). La secuencia de aminoácidos del epítipo universal puede derivarse de una proteína o polipéptido natural, diseñado artificialmente, o identificado a través de una pantalla de una biblioteca de péptidos aleatorios. El epítipo universal puede derivarse de una fuente natural, producido por técnicas de ADN recombinante, o producido por síntesis química. El epítipo universal contemplado en el presente documento puede incluir péptidos lineales o ramificados, péptidos con aminoácidos modificados, y/o péptidos interrumpidos por no aminoácidos. Por ejemplo, el epítipo universal puede abarcar un polímero de aminoácidos que ha sido modificado de forma natural o por intervención tal como formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación. Dentro de este término también se incluyen, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende al menos aproximadamente cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5 o más epítopos universales. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende un solo tipo de epítipo universal que tiene las mismas secuencias de aminoácidos. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende aproximadamente cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5 o más copias del epítipo universal. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 3 copias del epítipo universal. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende al menos aproximadamente cualquiera de 1, 2 o 3 tipos de epítopos universales, en donde cada tipo de epítopos universales tiene una secuencia de aminoácidos única. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende aproximadamente una cualquiera de 1, 2, 3, 4 o 5 copias del mismo epítipo universal. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende al menos dos epítopos universales de diferentes secuencias de aminoácidos. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 3 copias de cada tipo de epítipo universal. En algunas realizaciones, el epítipo universal comprende aproximadamente cualquiera de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más aminoácidos. En algunas realizaciones, el epítipo universal tiene una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 aminoácidos (como aproximadamente cualquiera de 8-10, 10-12, 12-14, 14-16, 16-18, 18-20, 8-12, 12-15, 10-15 o 15-20). En algunas realizaciones, el epítipo universal se deriva del toxoide tetánico, ovoalbúmina u otras proteínas inmunogénicas de origen natural (por ejemplo, véase Panina-Bordignon *P et al.* (1989) "Universally immunogenic T cell epitopes promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells". *Eur. J. Immunol.* 19: 2237-2242). En algunas realizaciones, el epítipo universal se une a una pluralidad (como al menos cualquiera de 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 o más) de moléculas MHC de clase II codificadas por diferentes alelos polimórficos. En algunas realizaciones, el epítipo universal se selecciona entre P2 (SEQ ID NO: 1), P30 (SEQ ID NO: 2), y OVAp (SEQ ID NO: 3). En algunas realizaciones, el epítipo universal comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3. En algunas realizaciones, el epítipo universal comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el epítipo universal comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el epítipo universal comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

El epítipo universal puede fusionarse a cualquier posición en la proteína transportadora, que no afecta o afecta significativamente el plegado, conformación y/o inmunogenicidad de la proteína transportadora. En algunas realizaciones, el epítipo universal se fusiona covalentemente con el extremo N, o el extremo C de la proteína transportadora. En algunas realizaciones, un primer epítipo universal se fusiona covalentemente con el extremo N de la proteína transportadora, y un segundo epítipo universal se fusiona covalentemente con el extremo C de la proteína transportadora, en donde el primer epítipo universal y el segundo epítipo universal pueden tener la misma secuencia de aminoácidos, o diferentes secuencias de aminoácidos. En algunas realizaciones, el epítipo universal se inserta dentro de una posición interna de la proteína transportadora, tal como dentro de un bucle flexible de la proteína transportadora. En algunas realizaciones, un primer epítipo universal se fusiona con un segundo epítipo universal para proporcionar un epítipo universal de fusión, y el epítipo universal de fusión se fusiona covalentemente al extremo N, extremo C, o una posición interna en la proteína transportadora, en donde el primer epítipo universal y el segundo epítipo universal pueden tener la misma secuencia de aminoácidos o diferentes secuencias de aminoácidos, y el primer epítipo universal o el segundo epítipo universal puede ser un epítipo universal de fusión que tiene al menos dos secuencias de epítipo universales fusionadas entre sí con o sin un enlazador dispuesto entre ellos.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende aproximadamente cualquiera de 1, 2 o 3 copias de un epítipo universal fusionado al extremo N de una proteína transportadora. En

universal, en donde el epítipo de fusión universal comprende SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, la proteína transportadora comprende SEQ ID NO: 6, y el epítipo universal comprende SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende un epítipo de fusión universal fusionado al extremo N de una proteína transportadora, en donde el extremo C de la proteína transportadora se fusiona con un epítipo universal, en donde el epítipo de fusión universal comprende SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3, la proteína transportadora comprende SEQ ID NO: 6, y el epítipo universal comprende SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende un epítipo de fusión universal fusionado al extremo N de una proteína transportadora, en donde el extremo C de la proteína transportadora se fusiona con un epítipo universal, en donde el epítipo de fusión universal comprende SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, la proteína transportadora comprende SEQ ID NO: 6, y el epítipo universal comprende SEQ ID NO: 1.

Cualquiera de las proteínas transportadoras quiméricas descritas anteriormente puede o no comprender secuencias adicionales entre epítipos universales adyacentes, y/o entre cada epítipo universal y la proteína transportadora. En algunas realizaciones, el epítipo universal (incluido el epítipo universal de fusión) se fusiona covalentemente a un segundo epítipo universal (incluido el epítipo universal de fusión) o la proteína transportadora mediante un enlazador peptídico dispuesto entre ellos. En algunas realizaciones, el epítipo universal se fusiona directamente a la proteína transportadora sin tener un enlazador peptídico dispuesto entre ellos. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende un epítipo universal de fusión que comprende un primer epítipo universal a un segundo epítipo universal con un enlazador peptídico dispuesto entre ellos, en donde el primer epítipo universal y el segundo epítipo universal pueden tener la misma secuencia de aminoácidos, o diferentes secuencias de aminoácidos. Los enlazadores adecuados pueden seleccionarse fácilmente y pueden tener cualquier longitud adecuada, como aproximadamente cualquiera de 1 aminoácido (por ejemplo, Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, incluyendo de 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, de 5 aminoácidos a 9 aminoácidos, de 6 aminoácidos a 8 aminoácidos, o de 7 aminoácidos a 8 aminoácidos, y pueden ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos. Los enlazadores flexibles ejemplares incluyen polímeros de glicina (G)_n, polímeros de glicina-serina (incluyendo, por ejemplo, (GS)_n, (GSGSG)_n (SEQ ID NO: 7), (GSGGS)_n y (GGGS)_n, en donde n es un entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles conocidos e la técnica. Los polímeros de glicina y glicina serina están relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden servir como un enlace neutro entre los componentes. Los enlazadores flexibles ejemplares incluyen, pero no se limitan a GGSG, GSGSG (SEQ ID NO: 7), GGGGSGGGGSGGGGS, GGGGSG, GGSGG, GSGGG, GGGSG, GSSSG, y similares. En algunas realizaciones, el enlazador peptídico tiene una longitud entre 1 y 20 restos de aminoácido. En algunas realizaciones, el conector peptídico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

Cualquiera de las proteínas transportadoras descritas anteriormente puede combinarse con una o más copias (como 1, 2, 3 o más) de cualquiera o combinaciones de los epítipos universales descritos anteriormente, y opcionalmente combinarse con cualquiera de los enlazadores descritos anterior para proporcionar la proteína transportadora quimérica de la presente solicitud. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y uno o más epítipos universales seleccionados entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 4-6. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 4-6, y uno o más epítipos universales seleccionados entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los seleccionados entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 8-32. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los seleccionados entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 39-44. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los seleccionados entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 51-56.

Los conjugados de polisacárido-proteína descritos en la sección anterior pueden comprender cualquiera de las proteínas transportadoras quiméricas descritas anteriormente en esta sección en combinación con cualquiera de los antígenos de polisacárido descritos en la sección anterior. Cualquiera de los antígenos de polisacárido y cualquiera de las proteínas transportadoras quiméricas también pueden usarse en los métodos de preparación descritos en la sección a continuación.

Métodos de preparación

En el presente documento también se describen métodos para preparar cualquiera de las proteínas transportadoras quiméricas y los conjugados de polisacárido-proteína descritos en el presente documento.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar el conjugado de polisacárido-proteína, que comprende conjugar el antígeno polisacárido con la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el método comprende además preparar el antígeno polisacárido antes de conjugar el antígeno polisacárido con la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el método comprende además preparar la proteína transportadora quimérica antes de conjugar el antígeno polisacárido con la proteína

transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se prepara cultivando una bacteria que comprende el antígeno polisacárido y recuperando el antígeno polisacárido del cultivo. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica se prepara cultivando una célula hospedadora transformada con un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína transportadora quimérica en condiciones que permiten la expresión de la proteína transportadora quimérica y recuperando la proteína transportadora quimérica expresada del cultivo.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para preparar el conjugado de polisacárido-proteína, que comprende preparar el antígeno polisacárido y conjugar el antígeno polisacárido con la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se prepara cultivando una bacteria que comprende el antígeno polisacárido y recuperando el antígeno polisacárido del cultivo. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica se prepara cultivando una célula hospedadora transformada con un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína transportadora quimérica en condiciones que permiten la expresión de la proteína transportadora quimérica y recuperando la proteína transportadora quimérica expresada del cultivo.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para preparar el conjugado de polisacárido-proteína, que comprende preparar la proteína transportadora quimérica y conjugar el antígeno polisacárido con la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se prepara cultivando una bacteria que comprende el antígeno polisacárido y recuperando el antígeno polisacárido del cultivo. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica se prepara cultivando una célula hospedadora transformada con un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína transportadora quimérica en condiciones que permiten la expresión de la proteína transportadora quimérica y recuperando la proteína transportadora quimérica expresada del cultivo.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para preparar el conjugado de polisacárido-proteína, que comprende preparar el antígeno polisacárido, preparar la proteína transportadora quimérica y conjugar el antígeno polisacárido con la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se prepara cultivando una bacteria que comprende el antígeno polisacárido y recuperando el antígeno polisacárido del cultivo. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica se prepara cultivando una célula hospedadora transformada con un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína transportadora quimérica en condiciones que permiten la expresión de la proteína transportadora quimérica y recuperando la proteína transportadora quimérica expresada del cultivo.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para preparar el conjugado de polisacárido-proteína, que comprende:

i) cultivar una bacteria que comprende un antígeno polisacárido;

ii) recuperar el antígeno polisacárido del cultivo;

iii) cultivar una célula hospedadora transformada con un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína transportadora quimérica en condiciones que permiten la expresión de la proteína transportadora quimérica;

iv) recuperar la proteína transportadora quimérica expresada del cultivo; y

v) conjugar el antígeno polisacárido con la proteína transportadora quimérica.

En un aspecto de la presente solicitud, se proporciona un método para preparar una proteína transportadora quimérica, que comprende cultivar una célula hospedadora transformada con un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína transportadora quimérica en condiciones que permiten la expresión de la proteína transportadora quimérica y recuperar la proteína transportadora quimérica expresada del cultivo. En algunas realizaciones, el vector comprende la secuencia de ácidos nucleicos de una cualquiera seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 34-38. En algunas realizaciones, el vector comprende la secuencia de ácidos nucleicos de una cualquiera seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 46-50. En algunas realizaciones, el vector comprende la secuencia de ácidos nucleicos de una cualquiera seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 58-63.

La presente invención puede usar cualquiera de los muchos métodos conocidos en la técnica para conjugar o unir covalentemente polisacáridos a proteínas, por ejemplo, véase Hermanson, Greg T. "Bioconjugate techniques". Academic press, 2013. Por ejemplo, comúnmente se aplican tres métodos para conjugar polisacáridos con proteínas, incluyendo: 1) aminación reductora, en donde el grupo aldehído o cetona en un componente de la reacción reacciona con el grupo amino o hidrazida en el otro componente, y el doble enlace C=N formado se reduce posteriormente a enlace simple C-N mediante un agente reductor; 2) conjugación de cianilación, en donde el polisacárido se activa por bromuro de cianógenos (CNBr) o por tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamonio-piridinio

(CDAP) para introducir un grupo cianato en el grupo hidroxilo, que forma un enlace covalente al grupo amino o hidrazida tras la adición del componente proteico; y 3) una reacción de carbodiimida, en donde la carbodiimida (tal como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida o EDC) activa el grupo carboxilo en un componente de la reacción de conjugación, y el grupo carbonilo activado reacciona con el grupo amino o hidrazida en el otro componente. Estas reacciones también se emplean con frecuencia para activar los componentes del conjugado antes de la reacción de conjugación. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se conjuga con la proteína transportadora quimérica por aminación reductora, conjugación de cianilación, o una reacción de carbodiimida. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se activa por tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamonioimpiridinio (CDAP). En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se conjuga con la proteína transportadora quimérica a través de un enlazador de dihidrazida de ácido adípico (ADH). En algunas realizaciones, el conjugado de polisacárido-proteína sintetizado se purifica adicionalmente por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, tales como cromatografía, electroforesis, ultrafiltración, diálisis, etc. El conjugado de polisacárido-proteína puede caracterizarse y cuantificarse usando métodos conocidos en la técnica, tales como cromatografía, espectroscopía de masas, etc. En algunas realizaciones, el conjugado de polisacárido-proteína tiene una pureza de aproximadamente cualquiera de más del 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o más.

El antígeno polisacárido se puede preparar por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, síntesis química y aislamiento de fuentes naturales, como aislamiento de un cultivo bacteriano. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se prepara cultivando la bacteria que comprende el antígeno polisacárido y recuperando el antígeno polisacárido del cultivo. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se extrae de la fracción soluble de bacterias lisadas en un cultivo bacteriano. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido extraído se purifica adicionalmente, por ejemplo, eliminando ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido extraído y opcionalmente purificado se procesa adicionalmente (tal como hidrolizado, escindido o digerido bioquímica o químicamente) para obtener un antígeno polisacárido de un intervalo de peso molecular apropiado y/o peso molecular medio. Pueden usarse etapas de purificación adicionales, tales como cromatografía, diálisis, ultrafiltración, electroforesis, precipitación diferencial, etc., para preparar el antígeno polisacárido. El antígeno polisacárido preparado puede caracterizarse usando una variedad de métodos conocidos en la técnica, como espectroscopía de masas, FTIR, ensayos colorimétricos, electroforesis, etc., para cuantificar y/o confirmar químicos, propiedades físicas y/o estructurales del antígeno polisacárido. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se activa y/u oxida adicionalmente para obtener un derivado de antígeno polisacárido que se puede conjugar fácilmente con la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el derivado del antígeno polisacárido tiene un grupo aldehído que puede unirse covalentemente a un resto de aminoácido en la proteína transportadora quimérica, tal como a través de un enlazador orgánico.

La proteína transportadora quimérica se puede preparar por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, síntesis química, técnicas de ADN recombinante y expresión de proteínas, y conjugación del epítipo universal a la proteína transportadora por métodos químicos o bioquímicos conocidos en la técnica, en donde el epítipo universal y/o la proteína transportadora pueden prepararse mediante síntesis química o técnicas de ADN recombinante y expresión de proteínas. Las técnicas de ADN recombinante comúnmente usadas, transformación celular, técnicas de expresión y purificación de proteínas, y otras técnicas relacionadas con la preparación o caracterización de proteínas se describen en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3^a edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica se prepara cultivando una célula hospedadora transformada con un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína transportadora quimérica en condiciones que permiten la expresión de la proteína transportadora quimérica y recuperando la proteína transportadora quimérica expresada del cultivo. La célula hospedadora adecuada para expresar la proteína transportadora quimérica incluye, pero no se limita a, bacterias, levadura, células de mamíferos, y células de insectos. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae*. En algunas realizaciones, la célula hospedadora está genéticamente modificada para mejorar la expresión de proteínas. Los parámetros apropiados para la expresión de proteínas, tal como temperatura, medios, duración, tiempo de inducción, etc., pueden ser elegidos y optimizados por una persona experta en la materia en función de la naturaleza del sistema de expresión de proteínas (incluyendo célula hospedadora, tamaño, rendimiento, solubilidad y otras propiedades físicas de la proteína transportadora quimérica, etc.). En algunas realizaciones, la célula hospedadora no tiene vías de glicosilación de proteínas. En algunas realizaciones, el vector es un plásmido. En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de ácidos nucleicos optimizada (por ejemplo, basada en la frecuencia de codones nativos de la célula hospedadora y/o con secuencias reguladoras de adición) que codifica la proteína transportadora quimérica, en donde la secuencia de ácidos nucleicos optimizada se puede transcribir y/o traducir con alta eficacia. En algunas realizaciones, el vector comprende la secuencia de ácidos nucleicos de una cualquiera seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 34-38. En algunas realizaciones, el vector comprende la secuencia de ácidos nucleicos de una cualquiera seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 46-50. En algunas realizaciones, el vector comprende la secuencia de ácidos nucleicos de una cualquiera seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 58-63. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica expresada se aísla de la fracción soluble del cultivo. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica expresada se aísla del cuerpo de inclusión del cultivo bacteriano. En algunas realizaciones, la proteína quimérica expresada se repliega. En algunas realizaciones, la proteína quimérica expresada se purifica.

adicionalmente usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, tales como, cromatografía y diálisis. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica tiene una pureza de aproximadamente cualquiera de más del 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o más.

- 5 Se pretende que cualquiera de las etapas y parámetros descritos en el presente documento para preparar la proteína transportadora quimérica, para preparar el antígeno polisacárido y para conjugar el antígeno polisacárido con la proteína transportadora quimérica se pueden combinar entre sí para preparar los conjugados de polisacárido-proteína, como si todas y cada una de las combinaciones se describieran individualmente. Además en el presente documento se describen proteínas transportadoras quiméricas y conjugados de polisacárido-proteína preparados por
10 cualquiera de los métodos de preparación como se describe en el presente documento.

Composiciones inmunogénicas

- 15 En el presente documento también se describen composiciones (que incluyen composiciones inmunogénicas, composiciones farmacéuticas, y vacunas) que comprenden uno cualquiera o cualquier combinación de los conjugados de polisacárido-proteína descritos anteriormente.

20 Por tanto, en el presente documento se describe una composición inmunogénica que comprende uno o más conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada uno de los uno o más conjugados de polisacárido-proteína comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epítipo universal, y en donde el antígeno polisacárido se conjuga covalentemente con la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el epítipo universal comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3. En algunas realizaciones, la proteína transportadora se deriva del toxoide tetánico, toxoide diftérico, materiales de reacción cruzada (CRM) de toxina diftérica, proteína de la cápside del rotavirus VP8, complejo de membrana externa meningocócica, o proteína D de *Haemophilus influenzae*. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de un polisacárido capsular. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (Pn) o *Neisseria meningitidis* (Men). En algunas realizaciones, la relación de peso a peso del antígeno polisacárido a la proteína transportadora quimérica es de aproximadamente 0,8
25 a aproximadamente 1,2 (tal como).
30

También se describe una composición inmunogénica que comprende uno o más conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada uno de los uno o más conjugados de polisacárido-proteína comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una
35 proteína transportadora y un epítipo universal, en donde el epítipo universal comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-3, y en donde el antígeno polisacárido se conjuga covalentemente con la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, la proteína transportadora se deriva del toxoide tetánico, toxoide diftérico, materiales de reacción cruzada (CRM) de toxina diftérica, proteína de la cápside del rotavirus VP8, complejo de membrana externa meningocócica, o proteína D de *Haemophilus influenzae*. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de un polisacárido capsular. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (Pn) o *Neisseria meningitidis* (Men). En algunas realizaciones, la relación de peso a peso del antígeno polisacárido a la proteína transportadora quimérica es de aproximadamente 0,8 a aproximadamente
40 1,2.
45

En el presente documento también se describe una composición inmunogénica que comprende uno o más conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada uno de los uno o más conjugados de polisacárido-proteína comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epítipo universal, y en donde el antígeno polisacárido se
50 conjuga (por ejemplo, conjugado covalentemente) a la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el epítipo universal comprende (incluyendo consiste esencialmente en o consiste en) la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3. En algunas realizaciones, la proteína transportadora se deriva del toxoide tetánico, toxoide diftérico, materiales de reacción cruzada (CRM) de toxina diftérica, proteína de la cápside del rotavirus VP8, complejo de membrana externa meningocócica, o proteína D de *Haemophilus influenzae*. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de un polisacárido capsular. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (Pn) o *Neisseria meningitidis* (Men). En algunas realizaciones, la relación de peso a peso del antígeno polisacárido a la proteína transportadora quimérica es de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2 (tal como aproximadamente cualquiera de 0,8-0,9, 0,9-1,0, 1,0-1,1 o 1,1-1,2).
55
60

En el presente documento se describe una composición inmunogénica que comprende uno o más conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada uno de los uno o más conjugados de polisacárido-proteína comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epítipo universal, en donde el epítipo universal comprende
65 (incluyendo consiste esencialmente en o consiste en) la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3, en donde la proteína transportadora comprende cualquiera de las

secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 4-6, y en donde el antígeno polisacárido está (por ejemplo, conjugado covalentemente) a la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de un polisacárido capsular. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (Pn) o *Neisseria meningitidis* (Men). En algunas realizaciones, la relación de peso a peso del antígeno polisacárido a la proteína transportadora quimérica es de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2 (tal como aproximadamente cualquiera de 0,8-0,9, 0,9-1,0, 1,0-1,1 o 1,1-1,2).

Además se describe una composición inmunogénica que comprende uno o más conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada uno de los uno o más conjugados de polisacárido-proteína comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epitopo universal, en donde la proteína transportadora quimérica comprende (incluyendo consiste esencialmente en o consiste en) cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en SEQ ID Nos: 8-32, 39-44 y 51-56, y en donde el antígeno polisacárido está conjugado (por ejemplo, conjugado covalentemente) con la proteína transportadora quimérica. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de un polisacárido capsular. En algunas realizaciones, el antígeno polisacárido se deriva de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (Pn) o *Neisseria meningitidis* (Men). En algunas realizaciones, la relación de peso a peso del antígeno polisacárido a la proteína transportadora quimérica es de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2 (tal como aproximadamente cualquiera de 0,8-0,9, 0,9-1,0, 1,0-1,1 o 1,1-1,2).

En algunas realizaciones, La composición inmunogénica consiste en un conjugado de polisacárido-proteína. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende una pluralidad (tal como aproximadamente cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más) de los conjugados de polisacárido-proteína. La pluralidad de conjugados de polisacárido-proteína contiene diferentes tipos de conjugados de polisacárido-proteína, tales como conjugados de proteína PS con diferentes proteínas transportadoras quiméricas, conjugados de proteína-PS con PS derivados de diferentes serotipos de la misma especie de bacteria, conjugados de proteína-PS con PS derivados de diferentes especies de bacterias, conjugados de proteína PS con diferente proporción de proteína portadora quimérica de PS, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, no existe interacción entre los diferentes conjugados de polisacárido-proteína que perjudica sustancialmente la eficacia deseada de cada conjugado de polisacárido-proteína. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende una pluralidad de los conjugados de polisacárido-proteína, en donde al menos dos de los conjugados de polisacárido-proteína son diferentes. Por ejemplo, los al menos dos de los conjugados de polisacárido-proteína pueden diferir en las proteínas transportadoras quiméricas, tipos o combinaciones de tipos de epítopos universales en las proteínas transportadoras quiméricas, copias de epítopos universales en las proteínas transportadoras quiméricas, enlaces en las proteínas transportadoras quiméricas, posiciones (es decir, extremo N, extremo C, o ambos) de los epítopos universales dentro de las proteínas transportadoras quiméricas, o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende una pluralidad de conjugados de polisacárido-proteína que comprenden antígenos de polisacárido derivados de al menos dos especies bacterianas diferentes (incluidos diferentes serotipos). En algunas realizaciones, las al menos dos especies bacterianas diferentes se seleccionan del grupo que consiste en *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (Pn) o *Neisseria meningitidis* (Men). En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende una pluralidad de los conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende un antígeno polisacárido derivado de una bacteria de un serotipo distinto de la misma especie. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende uno o más (tal como aproximadamente cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24) de los conjugados de polisacárido-proteína, en donde el antígeno polisacárido (tal como el antígeno polisacárido capsular) se deriva de *Streptococcus pneumoniae* de un serotipo seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11 A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19 A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende uno o más (como aproximadamente cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13) conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende un polisacárido capsular derivado de *Streptococcus pneumoniae* de un serotipo diferente seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19 A, 19F, y 23F. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende aproximadamente 24 conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende un polisacárido capsular derivado de *Streptococcus pneumoniae* de un serotipo diferente seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11 A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19 A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende aproximadamente 13 conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende un polisacárido capsular derivado de *Streptococcus pneumoniae* de un serotipo diferente seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19 A, 19F, y 23F. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende uno o más (como aproximadamente cualquiera de 1, 2, 3 o 4) de los conjugados de polisacárido-proteína, en donde el antígeno polisacárido (tal como el antígeno polisacárido capsular) se deriva de *Neisseria meningitidis* de un serotipo seleccionado entre el grupo que consiste en A, C, Y, y W-135. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende aproximadamente 4 conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende un polisacárido capsular derivado de *Neisseria meningitidis* de un serotipo diferente seleccionado entre el grupo que

consiste en A, C, Y, y W-135.

La relación relativa (como peso a peso o mol a mol) entre los diferentes conjugados de polisacárido-proteína en la composición inmunogénica que comprende una pluralidad de conjugados de polisacárido-proteína puede depender de múltiples factores que afectan la inmunogenicidad de cada conjugado de polisacárido-proteína, así como la eficacia inmunogénica deseada contra cada antígeno polisacárido incluido en la composición inmunogénica. Por ejemplo, la relación relativa del antígeno polisacárido a la proteína transportadora quimérica, la naturaleza de la proteína transportadora quimérica (como tipo y número de epítopos universales), la naturaleza del antígeno PS (como el peso molecular, longitud, número de unidades de repetición, naturaleza química de las unidades de repetición, la fuente bacteriana, etc.), y/o el método para producir el antígeno PS, la proteína transportadora quimérica, y/o conjugar el antígeno PS con la proteína transportadora quimérica puede afectar la eficacia inmunogénica de cada conjugado de proteína PS en la composición inmunogénica, que puede diferir de un lote a otro para preparar los conjugados de proteína PS y, por lo tanto, puede tener que determinarse experimentalmente para cada lote de conjugado de proteína PS antes de mezclar los conjugados de proteína PS para obtener la composición inmunogénica. La eficacia inmunogénica deseada contra cada antígeno polisacárido depende de la aplicación real de la composición inmunogénica, por ejemplo, la frecuencia de cada serotipo bacteriano entre una población de individuos a inmunizar, la gravedad de cada serotipo bacteriano, los individuos a inmunizar (como si el individuo tiene una respuesta inmune normal o débil contra los antígenos PS, exposición previa o simultánea a conjugados de proteína PS similares, etc.), y el título de anticuerpos específico de PS eficaz requerido para lograr la protección deseada contra el serotipo de bacteria. Cualquiera de los métodos conocidos en la técnica para determinar la inmunogenicidad, como ensayos ELISA que cuantifican títulos de anticuerpos específicos de PS en un animal inmunizado con la composición inmunogénica, puede usarse para determinar la relación relativa entre los diferentes conjugados de polisacárido-proteína en la composición inmunogénica. Además, los métodos analíticos, tales como cromatografía, espectroscopía de masas, y similares, puede usarse para determinar las propiedades químicas y estructurales de cada conjugado de polisacárido-proteína en la composición inmunogénica. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende una pluralidad de conjugados de polisacárido-proteína en una relación molar aproximadamente igual.

En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende además uno o más adyuvantes. Como se usa en el presente documento, un adyuvante es un agente que modifica el efecto de los otros agentes en la composición inmunogénica o vacuna, como potenciar la inmunogenicidad de la composición inmunogénica. Se pueden administrar adyuvantes para aumentar la respuesta inmune, como producir un título más alto de anticuerpos, proporcionando una protección más duradera y/o reduciendo el número y la dosis de inyecciones. En la técnica se conoce bien los adyuvantes. En algunas realizaciones, el adyuvante puede estabilizar las formulaciones de la composición inmunogénica. Los adyuvantes adecuados para mejorar la eficacia de la composición inmunogénica incluyen, pero sin limitación: sales de aluminio (alumbre), como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; aceite mineral, como aceite de parafina; productos bacterianos, como componentes de la pared celular bacteriana, bacterias muertas, mutantes desintoxicados de toxoides bacterianos, etc.; compuestos orgánicos no bacterianos, como escualeno, timerosal, etc.; sistemas de administración, como sistemas adyuvantes de saponina (por ejemplo, Quil-A®), sistema adyuvante Ribi™ (RAS), etc.; citocinas, como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulante de las colonias de granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2, etc.; composiciones como adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund; otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para mejorar la eficacia de la composición inmunogénica; y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende además fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

En el presente documento se describe una vacuna que comprende una cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento significa uno o más cargas, diluyentes o sustancias encapsulantes sólidas o líquidas compatibles que son adecuadas para la administración a un sujeto. "Farmacéuticamente aceptable" se usa para referirse a un material no tóxico que es compatible con un sistema biológico como una célula, cultivo celular, tejido, u organismo. El término "vehículo" indica un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el cual se combina el principio activo para facilitar la aplicación. Las características del vehículo dependen de la vía de administración. Los vehículos fisiológica y farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes, y otros materiales que son bien conocidos en la técnica.

Se puede usar cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento en la vacuna, u otras composiciones o formulaciones farmacéuticas, combinando las composiciones inmunogénicas descritas con un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipientes, agentes estabilizantes y/u otros agentes, que se conocen en la técnica, para uso en los métodos de tratamiento, métodos de administración, y regímenes de dosificación descritos en el presente documento.

Los vehículos farmacéuticos adecuados incluyen agua estéril; solución salina, dextrosa; dextrosa en agua o solución salina; productos de condensación de aceite de ricino y óxido de etileno que combinan aproximadamente 30 a

aproximadamente 35 moles de óxido de etileno por mol de aceite de ricino; ácido líquido; alcoholes inferiores; aceites como aceite de maíz; aceite de cacahuete, aceite de sésamo y similares, con emulsionantes como mono- o di-glicéridos de un ácido graso o un fosfátido, por ejemplo, lecitina, y similares; glicoles; polialquilenglicoles; medios acuosos en presencia de un agente de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica; alginato sódico; 5 poli(vinilpirrolidona); y similares, solo o con agentes de distribución adecuados como lecitina; estearato de polioxietileno; y similares. El vehículo también puede contener adyuvantes como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes, emulsionantes y similares junto con el potenciador de penetración. La forma final puede ser estéril y también puede pasar fácilmente a través de un dispositivo de inyección, como una aguja hueca. La viscosidad adecuada puede lograrse y mantenerse mediante la elección adecuada de disolventes o excipientes. 10 Además, el uso de revestimientos moleculares o particulados como lecitina, la selección adecuada del tamaño de partícula en dispersiones, o el uso de materiales con propiedades tensioactivas se puede utilizar.

Las composiciones farmacéuticas (incluidas las vacunas) descritas en el presente documento pueden incluir otros agentes, excipientes o estabilizadores para mejorar las propiedades de la composición inmunogénica. Los ejemplos 15 de excipientes y diluyentes adecuados incluyen, pero sin limitación, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, solución salina, jarabe, metilcelulosa, metil- y propilhidroxibenzoatos, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes, o 20 agentes aromatizantes. Los ejemplos de agentes emulsionantes incluyen ésteres de tocoferol como succinato de tocoferil polietilenglicol y similares, pluronic®, emulsionantes basados en compuestos de polioxietileno, Span 80 y compuestos relacionados y otros emulsionantes conocidos en la técnica y aprobados para su uso en animales o en formas de dosificación humana. Las composiciones farmacéuticas (incluidas las vacunas) pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de la administración al 25 paciente empleando procedimientos bien conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica (incluida la vacuna) se formula para tener un pH en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 9,0, incluyendo por ejemplo intervalos de pH de cualquiera de 30 aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0, de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, o de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 6,0. En algunas realizaciones, el pH de la composición farmacéutica (incluida la vacuna) se formula a no menos de aproximadamente 5,6. La composición farmacéutica (incluida la vacuna) también puede hacerse isotónica con la sangre mediante la adición de un modificador de tonicidad adecuado, tal como glicerol.

"Individuo", "sujeto" o "paciente" como se usa en el presente documento se refiere a un mamífero e incluye, pero no se limita a, ser humano, bovino, caballo, felino, canino, roedor o primate. En algunas realizaciones, La composición 35 farmacéutica (incluida la vacuna) es adecuada para la administración a un ser humano. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica (incluida la vacuna) es adecuada para la administración a un humano por administración parenteral. Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección acuosas y no acuosas, isotónicas estériles, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacterioestáticos y solutos que hacen que la formulación sea compatible con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, agentes estabilizantes, y 40 conservantes. Las formulaciones pueden presentarse en envases sellados de dosis unitarias o multidosis, tales como jeringas y viales, y se pueden almacenar en una condición liofilizada (liofilizada) que requiere solo la adición de métodos de tratamiento con excipientes líquidos estériles, métodos de administración y regímenes de dosificación descritos en el presente documento (es decir, agua) para inyección, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos, y del tipo descrito anteriormente. Se prefieren formulaciones inyectables. En algunas realizaciones, la composición 45 farmacéutica (incluida la vacuna) está contenida en una jeringa de un solo uso, como una jeringa sellada de un solo uso. En algunas realizaciones, cada jeringa de un solo uso contiene una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del conjugado de polisacárido o la pluralidad de conjugados de polisacárido en una unidad de peso o volumen adecuado para la administración a un individuo. En algunas realizaciones, La composición farmacéutica (incluida la vacuna) está contenida en un vial multiusos. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica (incluida la 50 vacuna) está contenida a granel en un envase.

En algunas realizaciones, la vacuna es una vacuna monovalente, en donde la vacuna comprende una composición inmunogénica que comprende uno o más conjugados de polisacárido-proteína, en donde el uno o más conjugados de polisacárido-proteína comprende un antígeno polisacárido derivado de un solo serotipo de bacteria. En algunas 55 realizaciones, se proporciona una vacuna monovalente contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) que comprende uno o más conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada uno de los uno o más conjugados de polisacárido-proteína comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epítipo universal (tal como un epítipo universal que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3), y en donde el antígeno polisacárido se deriva de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib). En algunas realizaciones, la vacuna es una 60 vacuna multivalente, en donde la vacuna comprende una composición inmunogénica que comprende una pluralidad de conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende un antígeno

polisacárido derivado de una bacteria de un serotipo distinto de la misma especie. En algunas realizaciones, se proporciona una vacuna de *Streptococcus pneumoniae* 13-valente que comprende aproximadamente 13 conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epítipo universal (tal como un epítipo universal que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3), y en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende un polisacárido capsular derivado de *Streptococcus pneumoniae* de un serotipo diferente seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19 A, 19F, y 23F. En algunas realizaciones, se proporciona una vacuna de *Streptococcus pneumoniae* 24-valente que comprende aproximadamente 24 conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epítipo universal (tal como un epítipo universal que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3), y en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende un polisacárido capsular derivado de *Streptococcus pneumoniae* de un serotipo diferente seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11 A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19 A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. En algunas realizaciones, se proporciona una vacuna *Neisseria meningitidis* 4-valente que comprende aproximadamente 24 conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epítipo universal (tal como un epítipo universal que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3), y en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende un polisacárido capsular derivado de *Neisseria meningitidis* de un serotipo diferente seleccionado entre el grupo que consiste en A, C, Y, y W-135. En algunas realizaciones, la vacuna comprende además otros antígenos (relacionados o no relacionados con el antígeno PS o la proteína transportadora quimérica). En algunas realizaciones, los otros antígenos pueden formularse con adyuvantes, diluyentes, excipientes, vehículos y otras sustancias farmacéuticamente aceptables.

Métodos de tratamiento

En el presente documento también se describen métodos para tratar o prevenir una enfermedad (como una infección) causada por una bacteria, que comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones (incluidos los conjugados de polisacárido-proteína, composiciones inmunogénicas, composiciones farmacéuticas y vacunas) descritas en el presente documento, en donde la bacteria comprende el antígeno polisacárido. En algunas realizaciones, el individuo es un niño menor de aproximadamente 2 años de edad, un anciano o un individuo inmunocomprometido.

En el presente documento se describe un método para inmunizar a un individuo contra una enfermedad causada por una bacteria que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones inmunogénicas, composiciones farmacéuticas, o vacunas descritas en el presente documento, en donde la bacteria expresa un polisacárido (tal como polisacárido capsular) que comprende el antígeno polisacárido. También se describe el uso de cualquiera de las composiciones inmunogénicas, composiciones farmacéuticas, y vacunas en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad causada por una bacteria, en donde el antígeno polisacárido es un polisacárido expresado en la superficie de la bacteria o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, la bacteria es *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae*, o *Neisseria meningitidis* (Men). En algunas realizaciones, el individuo es un niño menor de aproximadamente 2 años de edad, un anciano o un individuo inmunocomprometido.

Los métodos de tratamiento descritos en el presente documento son generalmente aplicables a cualquier enfermedad o afección causada por una bacteria que expresa un polisacárido (como un polisacárido capsular) que comprende un antígeno polisacárido, incluyendo, pero no limitado a enfermedades o afecciones causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (Pn), o *Neisseria meningitidis* (Men). Por ejemplo, en algunas realizaciones, la enfermedad es neumonía, infección del oído, infección sinusal, meningitis, bacteremia, cualquier combinación de los mismos, y/o cualquier otra enfermedad o afección causada por *Streptococcus pneumoniae*. En algunas realizaciones, la enfermedad es meningitis, neumonía, epiglotitis, celulitis, artritis, infección del oído, cualquier combinación de los mismos, y/o cualquier otra enfermedad o afección causada por *Haemophilus influenzae* tipo b. En algunas realizaciones, la enfermedad es meningitis, meningococemia, combinación de los mismos y/o cualquier otra enfermedad o afección causada por *Neisseria meningitidis*.

"Individuo", "sujeto" o "paciente" como se usa en el presente documento se refiere a un mamífero e incluye, pero no se limita a, ser humano, bovino, caballo, felino, canino, roedor o primate. En algunas realizaciones, el individuo es un individuo humano. En algunas realizaciones, el individuo tiene un sistema inmune comprometido. En algunas realizaciones, la respuesta inmune débil individual a los antígenos de polisacárido (como el título bajo de anticuerpos específicos de PS, corta duración de la respuesta inmune y/o baja memoria inmune) en comparación con un adulto sano. En algunas realizaciones, el individuo tiene un sistema de linfocitos T deficiente o inmaduro. En algunas realizaciones, el individuo tiene un sistema de memoria inmune deficiente o inmaduro. En algunas realizaciones, el individuo es un niño pequeño (como un niño menor de aproximadamente 2 años de edad, como un niño de menos de aproximadamente 3 meses, 6 meses, 12 meses, 1,5 años o 2 años de edad). En algunas realizaciones, el

individuo es un anciano, como un individuo mayor de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o más años de edad. En algunas realizaciones, el individuo es un individuo inmunocomprometido. En algunas realizaciones, el método proporciona una inmunoprotección amplia entre individuos que tienen diferentes polimorfismos en las moléculas de MHC.

5 Como se usa en el presente documento, "tratamiento" o "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluidos resultados clínicos, incluyendo tratamiento terapéutico y medidas profilácticas o preventivas. Para los fines de esta divulgación, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: disminuir uno o más síntomas resultantes de la enfermedad, disminuir el
10 alcance de la enfermedad, estabilizar la enfermedad (por ejemplo, prevenir o retrasar el empeoramiento de la enfermedad), prevenir o retrasar la propagación de la enfermedad, prevenir o retrasar la aparición o recurrencia de la enfermedad, retrasar o ralentizar la progresión de la enfermedad, mejorar el estado de la enfermedad, proporcionar una remisión (ya sea parcial o total) de la enfermedad, disminuir la dosis de uno o más medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, aumentar la calidad de vida y/o prolongar la supervivencia. En algunas realizaciones, la
15 composición reduce la gravedad de uno o más síntomas asociados con la enfermedad (como la infección por una bacteria) en al menos aproximadamente cualquiera del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % en comparación con el síntoma correspondiente en el mismo individuo antes del tratamiento o en comparación con el síntoma correspondiente en otras personas que no reciben el método o la composición del tratamiento. Los métodos descritos en el presente documento contemplan uno o más de estos aspectos del
20 tratamiento.

Un tratamiento capaz de "retrasar la progresión" de una enfermedad puede incluir diferir, impedir, ralentizar, retardar, estabilizar, y/o posponer el desarrollo de la enfermedad. Este retraso puede ser de diferentes períodos de tiempo, dependiendo de los antecedentes de la enfermedad y/o del individuo que se trate. Como es evidente para un experto
25 en la materia, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, incluir la prevención, en que el individuo, por ejemplo, un individuo en riesgo de desarrollar el trastorno o afección, no desarrolla la enfermedad.

Como se entiende en la técnica, una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una composición, o una terapia de combinación suficiente para producir un resultado terapéutico deseado (por ejemplo, reducir la gravedad o la
30 duración de, estabilizar la gravedad de, eliminar uno o más síntomas o prevenir la aparición de la enfermedad). La cantidad puede estar en una o más dosis, es decir, una dosis única o dosis múltiples. Se pueden usar métodos convencionales para medir la magnitud del efecto beneficioso, como ensayos *in vitro* (por ejemplo, ELISA), ensayos basados en células (por ejemplo, ensayos de destrucción opsonofagocitótica), modelos animales y/o ensayos en humanos. En algunas realizaciones, la composición (incluidos los conjugados de polisacárido-proteína,
35 composiciones inmunogénicas, composiciones farmacéuticas y vacunas) se administra en una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos adversos, significativos. Tal cantidad puede variar según la especie de bacteria y el serotipo de la bacteria. Se pueden determinar cantidades óptimas de componentes para una vacuna particular mediante estudios estándar que implican la observación de respuestas inmunes apropiadas en sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo
40 adecuadamente separadas. En algunas realizaciones, la composición (incluidos los conjugados de polisacárido-proteína, composiciones inmunogénicas, composiciones farmacéuticas y vacunas) se administran en una o más dosis (como 1, 2, 3 o más). En algunas realizaciones, la composición se administra en al menos 2 (como 2, 3, 4 o más) dosis. En algunas realizaciones, el título de anticuerpos específicos de polisacárido en el individuo aumenta en respuesta a dosis posteriores en comparación con la dosis inicial. En algunas realizaciones, el intervalo entre dos
45 dosis adyacentes es aproximadamente uno de 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, o más. En algunas realizaciones, cada dosis comprende de 0,1 a 100 µg del antígeno polisacárido. En algunas realizaciones, cada dosis comprende de 0,1 a 10 µg del antígeno polisacárido.

Las composiciones (incluidos los conjugados de polisacárido-proteína, composiciones inmunogénicas, las
50 composiciones farmacéuticas y las vacunas) descritas en el presente documento pueden administrarse mediante cualquier vía de administración adecuada. En algunas realizaciones, la composición se administra parenteralmente, tal como inyección. En algunas realizaciones, la composición se administra a través de una vía sistémica o mucosa. Las vías de administración ejemplares aplicables a la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, inyección por vía intramuscular, intraperitoneal, rutas intradérmicas o subcutáneas; o inyección por vía mucosa a la vía
55 oral/alimentaria, tractos respiratorios (por ejemplo, intranasales) o genitourinarios.

Kits y artículos de fabricación

60 En el presente documento también se describe un kit o un artículo de fabricación que comprende cualquiera de las composiciones, incluyendo las proteínas transportadoras quiméricas, los conjugados de polisacárido-proteína, las composiciones inmunogénicas, las composiciones farmacéuticas y las vacunas descritas en el presente documento.

En el presente documento se describe un kit útil para mejorar la inmunogenicidad de un antígeno polisacárido que
65 comprende una proteína transportadora quimérica que comprende una proteína transportadora y un epítipo universal. En algunas realizaciones, el epítipo universal comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera seleccionado entre SEQ ID NOs: 1-3. En algunas realizaciones, la proteína transportadora se deriva del toxoide

tetánico, toxoide diftérico, materiales de reacción cruzada (CRM) de toxina diftérica, proteína de la cápside del rotavirus VP8, complejo de membrana externa meningocócica, o proteína D de *Haemophilus influenzae*. En algunas realizaciones, la proteína transportadora comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-6. En algunas realizaciones, la proteína transportadora quimérica comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 8-32, 39-44, y 51-56. En algunas realizaciones, el kit comprende además un antígeno polisacárido, y opcionalmente reactivos para conjugar el antígeno polisacárido con la proteína transportadora quimérica, para la preparación de un conjugado de polisacárido-proteína útil como vacuna contra la bacteria que comprende el antígeno polisacárido.

También se describe un kit útil para tratar o prevenir una enfermedad (como una infección) causada por una bacteria que comprende cualquiera de las composiciones (incluidos los conjugados de polisacárido-proteína), las composiciones inmunogénicas, las composiciones farmacéuticas y las vacunas descritas en el presente documento), en donde el antígeno polisacárido es un polisacárido expresado en la superficie de la bacteria o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, se proporciona un kit útil para inmunizar a un individuo contra una bacteria que comprende cualquiera de las composiciones (incluidos los conjugados de polisacárido-proteína, las composiciones inmunogénicas, las composiciones farmacéuticas y las vacunas descritas en el presente documento), en donde el antígeno polisacárido es un polisacárido expresado en la superficie de la bacteria o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, la bacteria es *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae*, o *Neisseria meningitidis* (Men). En algunas realizaciones, la composición, tal como la vacuna, está contenida en una jeringa.

El artículo de fabricación o kit puede comprender además un envase y una etiqueta o prospecto en o asociado con el envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los envases pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que está sola o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es la proteína transportadora quimérica, o el conjugado de polisacárido-proteína de la presente invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la dolencia de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección particular. Como alternativa o además, el artículo de fabricación o kit puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se considera que la memoria descriptiva es suficiente para permitir a un experto en la materia practicar la invención. Varias modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior.

40 Ejemplos

Los ejemplos, que están destinados a ser puramente ejemplos de la invención y, por lo tanto, no deben considerarse que limitan la invención de ninguna manera, también describen y detallan aspectos y realizaciones de la invención discutidos anteriormente. Los ejemplos no pretenden representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es o está cerca de la atmosférica.

Los ejemplos a continuación proporcionan un método para mejorar la inmunogenicidad de los conjugados de polisacárido-proteína mediante la adición de epítipo(s) universal a la proteína transportadora en el conjugado. La proteína transportadora quimérica que comprende el epítipo universal se produce usando bacterias manipuladas de forma recombinante. Luego, un polisacárido se conjuga covalentemente con la proteína transportadora quimérica que comprende el epítipo universal. Al entrar en el cuerpo de un animal, el conjugado de polisacárido-proteína puede ser absorbido y degradado por las células presentadoras de antígeno (APC) para producir epítopos universales y fracciones de unidades repetitivas de los polisacáridos, que pueden unirse y mostrarse mediante moléculas MHC de clase II para una inducción eficaz de linfocitos T, que conduce a una inmunogenicidad mejorada y a la producción de un título aumentado de anticuerpos específicos contra los polisacáridos capsulares bacterianos. En comparación con un conjugado de polisacárido-proteína correspondiente sin ningún epítipo universal, los conjugados de polisacárido-proteína ejemplares que tienen epítopos universales en la proteína transportadora como se describe en el presente documento tienen una inmunogenicidad mejorada de aproximadamente 3-5 veces.

La estrategia técnica para los conjugados de polisacárido-proteína ejemplares descritos en el presente documento es la siguiente:

a) introducir epítipo(s) universal(es) en una proteína transportadora para hacer una proteína transportadora quimérica, y producir la proteína transportadora quimérica usando bacterias modificadas genéticamente recombinantes;

5 b) conjugar covalentemente la proteína transportadora quimérica en a) que tiene un epítipo universal a un polisacárido para obtener un conjugado de polisacárido-proteína.

En algunas realizaciones adicionales, la proteína transportadora quimérica como se describe en estos ejemplos comprende X número de epítopos universales, en donde X es mayor o igual que 1.

10 En algunas realizaciones adicionales, la proteína transportadora quimérica como se describe en estos ejemplos comprende un epítipo universal unido al extremo N, al extremo C, o simultáneamente tanto al extremo N como al extremo C de la proteína transportadora.

15 En algunas realizaciones adicionales, la proteína transportadora quimérica como se describe en estos ejemplos comprende un epítipo universal unido al extremo N y/o al extremo C de la proteína transportadora a través de una secuencia de aminoácidos GSGSG.

20 En algunas realizaciones adicionales, la proteína transportadora quimérica como se describe en estos ejemplos comprende un epítipo universal seleccionado de QYIKANSKFIGITEL (denominado P2), FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (denominado P30), ISQAVHAAHAEINEAGR (denominado OVAp), y cualquier combinación de los mismos.

25 En algunas realizaciones adicionales, la proteína transportadora quimérica como se describe en estos ejemplos comprende una proteína transportadora seleccionada de la cadena A de la toxina diftérica mutante CRM197 (denominada CRM197A), el núcleo de la proteína de superficie del rotavirus VP8 (denominado CoreVP8) y la cadena A de la toxina diftérica H21G mutante (denominado H21G).

30 En algunas realizaciones adicionales, las bacterias modificadas genéticamente recombinantes descritas en estos ejemplos son *E. coli* genéticamente recombinantes.

35 En algunas realizaciones adicionales, el polisacárido como se describe en estos ejemplos son polisacáridos capsulares preparados cultivando *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (Pn) o *Neisseria meningitidis* (Men).

40 En algunas realizaciones adicionales, El método para conjugar covalentemente el polisacárido con la proteína transportadora quimérica que comprende el epítipo universal como se describe en estos ejemplos es la aminación reductora, método ADH (usando dihidrazida de ácido adípico), o método CDAP (usando 3-(etiliminometilamino)-N, N-dimetil-propan-1-amina).

Ejemplo 1: Preparación y evaluación inmunológica de conjugados de polisacárido-proteína que comprenden una proteína transportadora quimérica que comprende CRM197A y un epítipo universal

Parte 1. Diseño de las secuencias de aminoácidos de las proteínas transportadoras quiméricas

45 1. *Diseño de secuencia de la proteína transportadora inmunogénica CRM197*

50 La toxina diftérica es un polipéptido citoplasmático expresado por ϕ fago que porta el gen de la toxina diftérica en la bacteria *Corynebacterium diphtheriae*. El polipéptido tiene 560 aminoácidos y un peso molecular de 62.000 Dalton. La secuencia de aminoácidos de la toxina diftérica de tipo salvaje se muestra a continuación en la SEQ ID NO: 64.

(SEQ ID NO:64)

MSRKLFASILIGALLGIGAPPSAHAGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQK
PKSGTQGNYYYYDDWKGFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVITYPGLTKVLALKVDNA
ETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSV
ELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEH
 GPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNV
 AQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLV
 GELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVEDSII RTG
 FQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFC
 RPKSPVYVGNVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHDKVNSKLSLFFFEI
 KS

5 La secuencia líder de 25 restos N-terminal se elimina tras la secreción del polipéptido fuera de la bacteria, dando como resultado un polipéptido secretado de cadena sencilla que tiene 535 aminoácidos y un peso molecular de 58 kDa, con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 que se muestra a continuación.

(SEQ ID NO:65)

GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYDDWKGFYSTDNKYDA
AGYSVDNENPLSGKAGGVVKVITYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFI
KRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQAC
AGNRVRRSVGSSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLE
 EFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNV AQVIDSETADNLEKTTAALSILPGI
 GSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVH
 NSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVEDSII RTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLL
 PTIPGKLDVNKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNVHANLHVAFHRSS
 EKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHDKVNSKLSLFFFEIKS

10 La toxina diftérica secretada se corta enzimáticamente en la cadena A y la cadena B, que están conectadas a través de un enlace disulfuro para formar una sola molécula de proteína. Cada una de las dos cadenas polipeptídicas tiene una función única. La cadena A es el fragmento N-terminal de la proteína de la toxina diftérica, que tiene 193 aminoácidos y un peso molecular de 21 kDa. La cadena A es la culpable de la toxicidad de la toxina diftérica. En el citoplasma de las células eucariotas, la cadena A transfiere covalentemente un resto ADP-ribosa de NAD+ al factor de elongación-2 (EF-2), atenuando así la síntesis de proteínas en la célula hospedadora, lo que conduce a la inhibición del crecimiento celular y finalmente resulta en muerte celular.

15 La cadena B es el fragmento C-terminal de la toxina diftérica, que tiene 342 aminoácidos y un peso molecular de 37 kDa. La cadena B puede reconocer receptores específicos en la superficie de las células sensibles, que permite la unión de la toxina diftérica a las células sensibles y facilita la entrada de la cadena A en las células.

20 La cadena A de la toxina diftérica tiene una excelente solubilidad en agua. Sus aminoácidos son los que se muestran a continuación en SEQ ID NO: 66.

(SEQ ID NO: 66)

GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYDDWKGIFYSTDNKYDA
 AGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFI
 KRFGDGASRVVLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKRGQDAMYEYMAQAC
 AGNRVRR

La investigación ha demostrado que las mutaciones en el gen tox que codifica la toxina diftérica en el fago tienen poco efecto en la replicación del fago, pero reducen o eliminan en gran medida la toxicidad de la toxina diftérica expresada, que se conocen como Material de reacción cruzada (CRM) (Giannini *et al.* (1984) "The amino-acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM45 and CRM197". *Nucleic Acid Research* 12: 4063-4069). Las propiedades inmunogénicas del CRM en el suero todavía están altamente correlacionadas con las de la toxina de tipo salvaje. En particular, el mutante no tóxico CRM197 tiene una mutación de punto Gly→Glu en el aminoácido 52, y su secuencia de aminoácidos es como se muestra a continuación en la SEQ ID NO: 4.

(SEQ ID NO:4)

GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYDDWKEFYSTDNKYDA
 AGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFI
 KRFGDGASRVVLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKRGQDAMYEYMAQAC
 AGNRVRR

En comparación con otras proteínas transportadoras del mercado usadas para vacunas contra *Streptococcus pneumoniae*, la cadena A de CRM197 (denominada CRM197A en adelante) tiene las siguientes ventajas. Las propiedades inmunogénicas de CRM197A y la toxina diftérica de tipo salvaje de longitud completa están altamente correlacionadas. Con un peso molecular pequeño y alta solubilidad en agua, CRM197A es fácil de producir y de usar en reacciones químicas para la preparación de moléculas de alto peso molecular. Las aplicaciones clínicas a largo plazo de las vacunas basadas en la toxina diftérica han demostrado la seguridad y eficacia de dichas vacunas.

Aquí, la proteína CRM197A expresada recombinantemente se usó como una proteína transportadora en la producción de conjugados de polisacárido-proteína. CRM197A se unió covalentemente a polisacáridos capsulares (CP) de *Streptococcus pneumoniae* (Pn) para preparar conjugados Pn PS-CRM197A. CRM197A se unió covalentemente a polisacáridos capsulares (CP) de *Haemophila influenzae* tipo b (Hib) para preparar conjugados Hib PS-CRM197A. CRM197A se unió covalentemente a polisacáridos capsulares (CP) de *Neisseria meningitidis* (Men) para preparar conjugados Men CP-CRM197A. Cada uno de los conjugados se preparó adicionalmente en una composición de vacuna para servir como control para la investigación de la inmunogenicidad de los conjugados correspondientes que tienen el mismo CP pero una proteína transportadora química que comprenda CRM197A y uno o más epítomos universales.

2. Diseño de secuencia de proteínas transportadoras químicas

Los epítomos universales se fusionaron con la proteína transportadora inmunogénica CRM197A para construir una nueva proteína transportadora química útil para la preparación de conjugados de polisacárido-proteína. El epítomo universal P2, P30 u OVAp se fusionaron individualmente con el extremo N o el extremo C de la proteína transportadora CRM197A. Alternativamente, cada una de una combinación de dos tipos diferentes de epítomos universales se fusionó respectivamente con el extremo N o el extremo C de la proteína transportadora CRM197A. En una tercera estrategia, dos copias del mismo epítomo universal se fusionaron entre sí y después se fusionaron con el extremo N o el extremo C de la proteína transportadora CRM197A. Una cuarta estrategia fue fusionar un epítomo universal con el extremo C o el extremo N de la proteína transportadora CRM197A, y el término restante de CRM197A se unió a dos copias del mismo o un tipo diferente de epítomo universal, que se fusionaron entre sí.

2-1 Diseño de secuencia de una proteína transportadora química que comprende P2 y CRM197A

2-1-1 Diseño de secuencia de una proteína transportadora química P2-extremo-N-CRM197A (P2CRM197A)

Una copia de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) se fusionó con el extremo N de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P2CRM197A. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 8. La secuencia del epítipo P2 está subrayada.

(SEQ ID NO:8)

QYIKANSKFIGITELGSGSGGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGT
QGNYYDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTPGLTKVLALKVDNAETIKK
ELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEIN
FETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRR

2-1-2 Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica CRM197A-extremo-C-P2 (CRM197AP2)

Una copia de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) se fusionó al extremo C de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada CRM197AP2. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 9. La secuencia del epítipo P2 está subrayada.

(SEQ ID NO:9)

MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYDDWKEFYSTDNKYD
AAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEF
IKRFGDGASRVVLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQA
CAGNRVRRGSGSGQYIKANSKFIGITEL

2-1-3 Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P2-extremo-N-CRM197A-extremo-C-P2 (P2CRM197AP2)

Una copia de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) se fusionó con el extremo N y el extremo C de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) respectivamente, cada uno a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P2CRM197AP2. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 10. La secuencia del epítipo P2 está subrayada.

(SEQ ID NO:10)

QYIKANSKFIGITELGSGSGGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGT
QGNYYDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTPGLTKVLALKVDNAETIKK
ELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEIN
FETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRGSGSGQYIKANSKFIGITEL

2-1-4 Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P2P2-extremo-N-CRM197A (P2P2CRM197A)

Dos copias de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) se fusionaron entre sí a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas, y la secuencia fusionada se fusionó con el extremo N del CRM197A proteína transportadora (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P2P2CRM197A. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 11. La secuencia del epítipo P2

está subrayada.

(SEQ ID NO:11)

QYIKANSKFIGITELGSGSGQYIKANSKFIGITELGSGSGGADDVVDSSKSFVMENFSSYHG
TKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKT
YPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSS
VEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRR

5 *2-1-5 Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica CRM197A-extremo-C-P2P2 (CRM197AP2P2)*

Dos copias de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) se fusionaron entre sí a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas, y la secuencia fusionada se fusionó con el extremo N del CRM197A proteína transportadora (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P2P2CRM197A. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 12. La secuencia del epítipo P2 está subrayada.

(SEQ ID NO:12)

GADDVVDSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYDDWKEFYSTDNKYDA
AGYSVDNENPLSGKAGGVVKTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFI
KRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQAC
AGNRVRRGSGSGQYIKANSKFIGITELGSGSGQYIKANSKFIGITEL

15 *2-1-6 Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P2P2-extremo-N-CRM197A-extremo-C-P2 (P2P2CRM197AP2)*

Dos copias de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) se fusionaron entre sí a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas, y la secuencia fusionada se fusionó con el extremo N del CRM197A proteína transportadora (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas; además, una copia de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) se fusionó al extremo C de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P2P2CRM197AP2. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 13. La secuencia del epítipo P2 está subrayada.

(SEQ ID NO:13)

QYIKANSKFIGITELGSGSGQYIKANSKFIGITELGSGSGGADDVVDSSKSFVMENFSSYHG
TKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKT
YPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSS
VEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRGSGSGQYIKANSKFI
GITEL

30 *2-1-7 Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P2P2-extremo-N-CRM197A-extremo-C-P2 (P2CRM197AP2P2)*

ES 2 760 536 T3

Una copia de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) se fusionó con el extremo N de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas; además, dos copias de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) se fusionaron entre sí a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas, y la secuencia fusionada se fusionó con el extremo C del CRM197A proteína transportadora (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P2CRM197AP2P2. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 14. La secuencia del epítipo P2 está subrayada.

(SEQ ID NO:14)

QYIKANSKFIGITELGSGSGGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGT
QGNYYYYWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVITYPGLTKVLALKVDNAETIKK
ELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEIN
FETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRGSGSGQYIKANSKFIGITELGSGSGQYIKANSKFI
GITEL

10

2-2 Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica que comprende P30 y CRM197A

2-2-1 Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P30-extremo-N-CRM197A (P30CRM197A)

15

Una copia de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionó con el extremo N de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P30CRM197A. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 15. La secuencia del epítipo P30 está subrayada.

20

(SEQ ID NO:15)

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSGSGGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQ
KPKSGTQGNYYYYWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVITYPGLTKVLALKVDN
AETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALS
VELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRR

25

2-2-2 Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica CRM197A-extremo-C-P30 (CRM197AP30)

Una copia de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionó al extremo C de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada CRM197AP30. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 16. La secuencia del epítipo P30 está subrayada.

30

(SEQ ID NO:16)

MGADDVVDSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYD
 AAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVITYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTTEEF
 IKRFGDGASRVVLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQA
 CAGNRVRRGSGSGFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

2-2-3 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P30-extremo-N-CRM197A-extremo-C-P30 (P30CRM197AP30)*

5 Una copia de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionó con el extremo N y el extremo C de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) respectivamente, cada uno a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P30CRM197AP30. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a
 10 continuación en SEQ ID NO: 17. La secuencia del epítipo P30 está subrayada.

(SEQ ID NO:17)

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSGSGGADDVVDSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQ
 KPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVITYPGLTKVLALKVDN
 AETIKKELGLSLTEPLMEQVGTTEEFIKRFGDGASRVVLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALS
 VELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRGSGSGFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

2-2-4 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P30P30-extremo-N-CRM197A (P30P30CRM197A)*

15 Dos copias de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionaron entre sí a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas, y la secuencia fusionada se fusionó después al extremo N del CRM197A proteína transportadora (SEQ ID NO: 4), a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto
 20 entre ellas, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P30P30CRM197A. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 18. La secuencia del epítipo P30 está subrayada.

(SEQ ID NO:18)

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSGSGFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSGSGGADDVVDSK
 SFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENP
 LSGKAGGVVKVITYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTTEEFIKRFGDGASRV
 VLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRR

25 *2-2-5 Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica CRM197A-extremo-C-P30P30 (CRM197A P30P30)*

30 Dos copias de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionaron entre sí a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas, y la secuencia fusionada se fusionó después al extremo C del CRM197A proteína transportadora (SEQ ID NO: 4), a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto
 35 entre ellas, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada CRM197AP30P30. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 19. La secuencia del epítipo P30 está subrayada.

(SEQ ID NO:19)

GADDVVDDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYDDWKEFYSTDNKYDA
 AGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTTEEFI
 KRFGDGASRVVLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQAC
AGNRVRRGSGSGFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSGSGFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

2-2-6 *Diseño de secuencia de una proteína portadora quimérica P30P30-extremo-N-CRM197A-extremo-C-P30 (P30P30CRM197AP30)*

5 Dos copias de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionaron entre sí a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas, y la secuencia fusionada se fusionó después al extremo N del CRM197A proteína transportadora (SEQ ID NO: 4), a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas; además, una copia de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionó al extremo C de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4), a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P30P30CRM197AP30. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 20. La secuencia del epítipo P30 está subrayada.

(SEQ ID NO:20)

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSGSGFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSGSGGADDVVDDSSK
 SFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENP
 LSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTTEEFIKRFGDGASRV
 VLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRGSG
SGFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

15 2-2-7 *Diseño de secuencia de una proteína portadora quimérica P30-extremo-N-CRM197A-extremo-C-P30 P30 (P30CRM197AP30P30)*

20 Una copia de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionó con el extremo N de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4), a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas; además, dos copias de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionaron entre sí a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas, y la secuencia fusionada se fusionó con el extremo C del CRM197A proteína transportadora (SEQ ID NO: 4), a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P30CRM197AP30P30. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 21. La secuencia del epítipo P30 está subrayada.

(SEQ ID NO:21)

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSGSGGADDVVDDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQ
 KPKSGTQGNYYYYDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDN
 AETIKKELGLSLTEPLMEQVGTTEEFIKRFGDGASRVVLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALS
 VELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRGSGSGFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSG
SGFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

30 2-3 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica que comprende OVAp y CRM197A 2-3-1 Diseño*

de secuencia de una proteína transportadora quimérica OVAp-extremo-N-CRM197A (OVApCRM197A)

Una copia de la secuencia de aminoácidos de OVAp (SEQ ID NO: 3) se fusionó con el extremo N de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada OVApCRM197A. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 22. La secuencia del epítipo OVAp está subrayada.

(SEQ ID NO:22)

ISQAVHAAHAEINEAGRGSGSGGADDVVDSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKS
GTQGNYYYYDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVITYPGLTKVLALKVDNAETI
KKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPLFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELE
INFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRR

10 *2-3-2 Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica CRM197A-extremo-C-OVAp (CRM197AOVAp)*

Una copia de la secuencia de aminoácidos de OVAp (SEQ ID NO: 3) se fusionó con el extremo C de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada CRM197AOVAp. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 23. La secuencia del epítipo OVAp está subrayada.

(SEQ ID NO:23)

MGADDVVDSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYDWKEFYSTDNKYD
AAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVITYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEF
IKRFGDGASRVVLSLPLFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQA
CAGNRVRRGSGSGIISQAVHAAHAEINEAGR

20 *2-3-3 Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica OVAp-extremo-N-CRM197A-extremo-C-OVAp (OVApCRM197AOVAp)*

Una copia de la secuencia de aminoácidos de OVAp (SEQ ID NO: 3) se fusionó con el extremo N y el extremo C de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) respectivamente, cada uno a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada OVApCRM197AOVAp. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 24. La secuencia del epítipo OVAp está subrayada.

(SEQ ID NO:24)

ISQAVHAAHAEINEAGRGSGSGGADDVVDSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKS
GTQGNYYYYDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVITYPGLTKVLALKVDNAETI
KKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPLFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELE
INFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRGSGSGIISQAVHAAHAEINEAGR

30 *2-3-4 Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica OVApOVAp-extremo-N-CRM197A (OVApOVApCRM197A)*

ES 2 760 536 T3

5 Dos copias de la secuencia de aminoácidos de OVAp (SEQ ID NO: 3) se fusionaron entre sí a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas, y la secuencia fusionada se fusionó después al extremo N del CRM197A proteína transportadora (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada OVApOVApCRM197A. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 25. La secuencia del epítipo OVAp está subrayada.

(SEQ ID NO:25)

ISQAVHAAHAEINEAGRGSGSGISQAVHAAHAEINEAGRGSGSGGADDVVDS SKSFVMENF'S
SYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGV
VKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSL PFAE
GSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRR

10 *2-3-5 Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica CRM197A-extremo-C-OVApOVAp (CRM197AOVApOVAp)*

15 Dos copias de la secuencia de aminoácidos de OVAp (SEQ ID NO: 3) se fusionaron entre sí a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas, y la secuencia fusionada se fusionó después al extremo C del CRM197A proteína transportadora (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada CRM197AOVApOVAp. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 26. La secuencia del epítipo OVAp está subrayada.

(SEQ ID NO:26)

GADDVVDS SKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYDDWKEFYSTDNKYDA
AGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFI
KRFGRGDGASRVVLSL PFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKRGQDAMYEYMAQAC
20 AGNRVRRGSGSGISQAVHAAHAEINEAGRGSGSGISQAVHAAHAEINEAGR

25 *2-3-6 Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica OVApOVAp-extremo-N-CRM197A-extremo-C-OVAp (OVApOVApCRM197AOVAp)*

25 Dos copias de la secuencia de aminoácidos de OVAp (SEQ ID NO: 3) se fusionaron entre sí a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas, y la secuencia fusionada se fusionó después al extremo N del CRM197A proteína transportadora (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas; además, una copia de la secuencia de aminoácidos de OVAp se fusionó con el extremo C de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos,
30 para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada OVApOVApCRM197AOVAp. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 27. La secuencia del epítipo OVAp está subrayada.

(SEQ ID NO:27)

ISQAVHAAHAEINEAGRSGSGSGISQAVHAAHAEINEAGRSGSGGADDVVDS SKSFVMENF'S
 SYHGTPKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGV
 VKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPPFAE
 GSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRGSGSGISQAVH
AAHAEINEAGR

2-3-7 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica OVAp-extremo-N-CRM197A-extremo-C-OVApOVAp (OVApCRM197AOVApOVAp)*

5 Una copia de la secuencia de aminoácidos de OVAp (SEQ ID NO: 3) se fusionó con el extremo N de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas; además, dos copias de la secuencia de aminoácidos de OVAp (SEQ ID NO: 3) se fusionaron entre sí a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas, y la secuencia fusionada se fusionó después al extremo C del CRM197A proteína transportadora (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada OVApCRM197AOVApOVAp. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 28. La secuencia del epítipo OVAp está subrayada.

(SEQ ID NO:28)

ISQAVHAAHAEINEAGRSGSGSGGADDVVDS SKSFVMENFSSYHGTPKPGYVDSIQKGIQKPKS
 GTQGNYYYYDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETI
 KKEGLGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELE
 INFETRGRKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRGSGSGISQAVHAAHAEINEAGRSGSGSGISQAVH
AAHAEINEAGR

2-4 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica que comprende al menos dos tipos diferentes de epítipos universales*

20 Combinaciones de tres epítipos universales diferentes, P2, P30 y OVAp se fusionaron con la proteína transportadora CRM197A respectivamente para diseñar secuencialmente nuevas proteínas transportadoras quiméricas.

2-4-1 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P30-extremo-N-CRM197A-extremo-C-P2 (P2CRM197AP30)*

25 Una copia de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) se fusionó con el extremo N de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, y una copia de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionó al extremo C de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P2CRM197AP30. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 29. Las secuencias de los epítipos P2 y P30 están subrayadas.

(SEQ ID NO:29)

QYIKANSKFIGITELGSGSGGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGT
 QGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKK
 ELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEIN
 FETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRGSGSGFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

2-4-2 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P2-extremo-N-CRM197A-extremo-C-P30 (P30CRM197AP2)*

5 Una copia de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionó con el extremo N de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, y una copia de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) se fusionó al extremo C de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos,
 10 para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P30CRM197AP2. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 30. Las secuencias de los epítomos P2 y P30 están subrayadas.

(SEQ ID NO:30)

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSGSGGADDVVDSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQ
 KPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDN
 AETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPPFAEGSSSVEYINNWEQAKALS
 VELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRGSGSGQYIKANSKFIGITEL

15 2-4-3 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P2P30-extremo-N-CRM197A-extremo-C-P2 (P30CRM197AP2)*

20 Una copia de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) y una copia de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionaron entre sí a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) entremedio, la secuencia fusionada después se fusionó al extremo N de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas; adicionalmente, y una copia de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) se fusionó con el extremo C de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) entremedio, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P2P30CRM197AP2. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 31. Las secuencias de los epítomos P2, P30 y OVAp están subrayadas.

(SEQ ID NO:31)

QYIKANSKFIGITELGSGSGFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSGSGGADDVVDSKSFVMEN
 FSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAG
 GVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPP
 AEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRGSGSGQYIK
ANSKFIGITEL

30 2-4-4 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P2P30-extremo-N-CRM197A-extremo-C-OVAp (P2P30CRM197AO VAp)*

Una copia de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) y una copia de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionaron entre sí a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) entremedio, la secuencia fusionada después se fusionó al extremo N de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas; adicionalmente, y una copia de la secuencia de aminoácidos de OVAp (SEQ ID NO: 3) se fusionó con el extremo C de la proteína transportadora CRM197A (SEQ ID NO: 4) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) entremedio, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P2P30CRM197AOVAp. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 32. Las secuencias de los epítomos P2, P30 y OVAp están subrayadas.

(SEQ ID NO:32)

QYIKANSKFIGITELGSGSGFNFTVSEFWLRVPKVSASHLEGSGSGGADDVVDSSKSFVMEN
FSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAG
GVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPE
AEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRGSGSGISQA
VHAAHAEINEAGR

15 *II. Construcción de plásmidos de expresión para proteínas transportadoras quiméricas que comprenden proteína transportadora CM197A y epítomo(s) universal(es)*

1. *Construcción de un plásmido de expresión de la proteína transportadora CRM197A*

20 La secuencia de aminoácidos de la proteína CRM197 completa, PRF:224021, se obtuvo en GenBank, y se determinó que la secuencia del fragmento de cadena A de CRM197 (en lo sucesivo denominado CRM197A) era los aminoácidos 1-193 de la secuencia CRM197. Basándose en la secuencia CRM197A, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia CRM197A se optimizó para permitir la expresión de alta eficacia del fragmento de cadena A en *Escherichia coli*. Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de CRM197A y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia de CRM197A. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína CRM197A es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 33.

ES 2 760 536 T3

(SEQ ID NO:33)

```
CATATG GGTGCGGACG ACGTTGTGGA CTCCTCAAAA TCGTTTGTCA
TGGAAAACCTT CAGCTCTTAT CATGGCACCA AACCGGGTTA CGTGGACTCC
ATTCAGAAGG GCATCCAAAA ACCGAAGTCA GGCACCCAGG GTAAC TACGA
TGACGATTGG AAGGAATTCT ACAGCACGGA CAATAAGTAT GATGCGGCCG
GCTACTCTGT TGACAACGAA AATCCGCTGA GTGGTAAAGC AGGCGGTGTG
GTTAAGGTCA CCTATCCGGG TCTGACGAAA GTTCTGGCGC TGAAGGTCTGA
TAACGCCGAA ACCATTAAAA AGGAACTGGG CCTGTCTCTG ACCGAACCGC
TGATGGAACA AGTGGGTACG GAAGAATTTA TCAAACGTTT CGGCGATGGT
GCATCGCGTG TCGTGCTGAG CCTGCCGTTT GCTGAAGGCA GTTCCTCAGT
GGAATACATT AACAAATGGG AACAAAGCAA AGCTCTGTCA GTTGAAC TGG
AAATCAATTT CGAAACGCGT GGCAAACGCG GTCAAGATGC TATGTATGAA
TATATGGCTC AGGCGTGTGC GGGCAATCGC GTCCGTCGCT AAGGATCC
```

Las enzimas NdeI y BamHI se agregaron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora CRM197A para realizar una digestión de restricción de doble enzima. Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo. La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

2. Construcción de plásmidos de expresión para proteínas transportadoras quiméricas que comprenden CRM197A y epítomos universales

2-1. Construcción de un plásmido de expresión para P2CRM197A

Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de P2CRM197A, y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia P2CRM197A. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína P2CRM197A es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 34.

(SEQ ID NO:34)

CATATG CAATACATCA AGGCGAACAG CAAATTCATC GGCATCACGG
 AACTGGGCTC GGGCTCTGGC GTGCGGACG ACGTTGTGGA CTCCTCAAAA
 TCGTTTGTCA TGGAAACTT CAGCTCTTAT ATGGCACCA AACCGGGTTA
 CGTGGACTCC ATTCAGAAGG GCATCCAAAA ACCGAAGTCA GGCACCCAGG
 GTAAC TACGA TGACGATTGG AAGGAATTCT ACAGCACGGA CAATAAGTAT
 GATGCGGCCG GCTACTCTGT TGACAACGAA AATCCGCTGA GTGGTAAAGC
 AGGCGGTGTG GTTAAGGTCA CCTATCCGGG TCTGACGAAA GTTCTGGCGC
 TGAAGGTCGA TAACGCCGAA ACCATTAAAA AGGAACTGGG CCTGTCTCTG
 ACCGAACCGC TGATGGAACA AGTGGGTACG GAAGAATTTA TCAAACGTTT
 CGGCGATGGT GCATCGCGTG TCGTGCTGAG CCTGCCGTTT GCTGAAGGCA
 GTTCCTCAGT GGAATACATT AACCAATTGGG AACCAAGCAA AGCTCTGTCA
 GTTGA ACTGG AAATCAATTT CGAAACGCGT GGCAAACGCG GTCAAGATGC
 TATGTATGAA TATATGGCTC AGGCGTGTGC GGGCAATCGC GTCCGTCGCT
 AA
 GGATCC

5 Las enzimas NdeI y BamHI se agregaron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora P2CRM197A para realizar una digestión de restricción de doble enzima. Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo. La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

2-2. *Construcción de un plásmido de expresión para P2CRM197AP2*

15 Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de P2CRM197AP2, y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia P2CRM197AP2. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína P2CRM197AP2 es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 35.

(SEQ ID NO:35)

CATATG CAATACATCA AGGCGAACAG CAAATTCATC GGCATCACGG
 AACTGGGCTC GGGCTCTGGC GTGCGGACG ACGTTGTGGA CTCCTCAAAA
 TCGTTTGTCA TGGAAACTT CAGCTCTTAT ATGGCACCA AACCGGGTTA
 CGTGGACTCC ATTCAGAAGG GCATCCAAAA ACCGAAGTCA GGCACCCAGG
 GTAAC TACGA TGACGATTGG AAGGAATTCT ACAGCACGGA CAATAAGTAT
 GATGCGGCCG GCTACTCTGT TGACAACGAA AATCCGCTGA GTGGTAAAGC
 AGGCGGTGTG GTTAAGGTCA CCTATCCGGG TCTGACGAAA GTTCTGGCGC
 TGAAGGTCGA TAACGCCGAA ACCATTAAAA AGGAACTGGG CCTGTCTCTG
 ACCGAACCGC TGATGGAACA AGTGGGTACG GAAGAATTTA TCAAACGTTT
 CGGCGATGGT GCATCGCGTG TCGTGCTGAG CCTGCCGTTT GCTGAAGGCA
 GTTCCTCAGT GGAATACATT AACAATTGGG AACAAGCAAA AGCTCTGTCA
 GTTGAAGTGG AAATCAATTT CGAAACGCGT GGCAAACGCG GTCAAGATGC
 TATGTATGAA TATATGGCTC AGGCGTGTGC GGGCAATCGC GTCCGTCGCT
 AAGGCTCGGG CTCTGGCCAA TACATCAAGG CGAACAGCAA ATTCATCGGC
 ATCACGGAAC TGGGATCC

Las enzimas NdeI y BamHI se agregaron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora P2CRM197AP2 para realizar una digestión de restricción de doble enzima.
 5 Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo.
 10 La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

2-3. Construcción de plásmidos de expresión para CRM197AP2, P2P2CRM197A, CRM197AP2P2, P2P2CRM197AP2 y P2CRM197AP2P2

15 El método es el mismo que el descrito anteriormente en la sección "2-1. Construcción de un plásmido de expresión para P2CRM197A".

2-4. Construcción de un plásmido de expresión para P30CRM197A

20 Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de P30CRM197A, y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia P30CRM197A. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína P30CRM197A es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 36.

25

(SEQ ID NO:36)

CATATG TTCAATAATT TTACGGTGTC GTTTTGGCTG CGTGTCCCGA
 AAGTCTCTGC GAGTCATCTG GAAGGTTCTG GTAGCGGTGG TCGCGATGAC
 GTGGTTGATA GCTCTAAATC TTTCGTTATG GAAAACCTCA GTTCCTATCA
 TGGCACCAAA CCGGGTTACG TCGATTTCGAT TCAGAAAGGC ATCCAAAAAC
 CGAAAAGCGG CACCCAGGGT AACTACGATG ACGATTGGAA AGAATTCTAC
 TCAACGGACA ACAAATACGA TCGGGCCGGC TACTCCGTGG ACAACGAAAA
 TCCGCTGAGC GGTAAAGCGG GCGGTGTCGT GAAAGTTACC TATCCGGGTC
 TGACGAAAGT GCTGGCTCTG AAAGTTGATA ATGCGGAAAC CATCAAAAAA
 GAACTGGGCC TGTCCCTGAC CGAACCGCTG ATGGAACAAG TGGGTACGGA
 AGAATTTATC AAACGTTTCG GCGACGGTGC CTCTCGCGTT GTCCTGAGTC
 TGCCGTTTGC AGAAGGCTCA TCGAGCGTCG AATACATTAA CAATTGGGAA
 CAAGCAAAAG CTCTGAGCGT GGAACCTGGAA ATCAACTTCG AAACGCGTGG
 CAAACGCGGT CAGGATGCGA TGTATGAATA CATGGCGCAA GCCTGCGCAG
 GTAATCGTGT TCGTCGC GGATCC

Las enzimas NdeI y BamHI se agregaron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora P30CRM197A para realizar una digestión de restricción de doble enzima.
 5 Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo.
 10 La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

2-5. Construcción de plásmidos de expresión para CRM197AP30, P30CRM197AP30, P30P30CRM197A, CRM197AP30P30, P30P30CRM197AP30 y P30CRM197AP30P30

15 El método es el mismo que el descrito anteriormente en la sección "2-4. Construcción de un plásmido de expresión para P30CRM197A".

2-6. Construcción de un plásmido de expresión para OVApCRM197A

20 Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de OVApCRM197A, y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia OVApCRM197A. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína OVApCRM197A es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 37.
 25

CATATG ATCAGCCAAG CGGTTACGC AGCCCACGCC GAAATTAACG
AAGCGGGTCG CGGTAGCGGT TCTGGCGGTG CAGACGATGT TGTTGACTCC
AGCAAATCAT TCGTCATGGA AAACTTTAGC TCTTATCATG GCACCAAACC
GGGTTACGTG GACTCCATTC AGAAAGGCAT CAAAAAACCG AAATCAGGCA
CCCAGGGTAA CTATGATGAC GATTGGAAAAG AATTCTACTC TACGGACAAC
AAATACGATG CGGCCGGCTA CTCTGTTGAC AACGAAAATC CGCTGAGTGG
TAAAGCAGGC GGTGTGGTTA AAGTCACCTA TCCGGGTCTG ACGAAAGTTC
TGGCGCTGAA AGTCGATAAC GCCGAAACCA TCAAAAAAGA ACTGGGCCTG
TCGCTGACCG AACCGCTGAT GGAACAAGTG GGTACGGAAG AATTTATCAA
ACGTTTCGGC GATGGTGCAT CGCGTGTCTG GCTGAGCCTG CCGTTTGCTG
AAGGCAGTTC CTCAGTGGAA TACATTAACA ATTGGGAACA AGCAAAAGCT
CTGAGTGTTG AACTGGAAAT CAATTTGAA ACGCGTGGTA AACGCGGTCA
GGACGCAATG TATGAATATA TGGCCCAGGC TTGTGCAGGC AACCGTGTTT
GCCGTTAA GGATCC

5 Las enzimas NdeI y BamHI se agregaron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora OVApCRM197A para realizar una digestión de restricción de doble enzima. Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo.
10 La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

2-7. Construcción de plásmidos de expresión para CRM197AOVAp, OVApCRM197AOVAp, OVApOVApCRM197A, CRM197AOVApOVAp, OVApOVApCRM197AOVAp y OVApCRM197AOVApOVAp

15 El método es el mismo que el descrito anteriormente en la sección "2-6. Construcción de un plásmido de expresión para OVApCRM197A".

2-8. Construcción de un plásmido de expresión para P30CRM197AP2

20 Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de P30CRM197AP2, y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia P30CRM197AP2. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína P30CRM197AP2 es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 38.
25

(SEQ ID NO:38)

CATATG TTCAACAATT TTACGGTCTC GTTTTGGCTG CGTGTCCCGA
 AAGTGTCTGC CTCACATCTG GAAGGTAGCG GTTCAGGTGG TGCGGATGAC
 GTGGTTGATA GCTCTAAATC CTTTGTATG GAAAACCTCA GTTCCTATCA
 TGGTACCAAA CCGGGCTACG TCGATTCTAT TCAGAAAGGT ATCCAAAAAC
 CGAAAAGTGG TACCCAGGGC AACTATGATG ACGATTGGAA AGAATTCTAC
 TCTACGGACA ACAAATACGA TCGGGCCGGT TACTCGGTGG ACAACGAAAA
 TCCGCTGAGC GGTAAGCCG GCGGTGTCGT GAAAGTTACC TATCCGGGCC
 TGACGAAAGT GCTGGCTCTG AAAGTTGATA ACGCGGAAAC CATCAAAAAA

 GAACTGGGTC TGAGCCTGAC CGAACCGCTG ATGGAACAAG TGGGCACGGA
 AGAATTTATC AAACGTTTCG GTGACGGTGC ATCCCGTGTT GTCCTGTCAC
 TGCCGTTTGC AGAAGGTTCA TCGAGCGTCG AATACATCAA CAACTGGGAA
 CAAGCAAAAG CTCTGAGCGT GGAAGTGGAA ATCAATTTTCG AAACCCGTGG
 TAAACGCGGC CAGGATGCTA TGTATGAATA CATGGCGCAA GCCTGCGCAG
 GTAACCGTGT TCGTCGCGGC TCTGGTAGTG GCCAGTACAT CAAAGCGAAC
 AGTAAATTCA TCGGCATCAC GGAAGTGGATCC

Las enzimas NdeI y BamHI se agregaron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora P30CRM197AP2 para realizar una digestión de restricción de doble enzima.
 5 Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo.
 10 La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

2-9. Construcción de plásmidos de expresión para P2CRM197AP30, P2P30CRM197AP2 y P2P30CRM197AOVAp

El método es el mismo que el descrito anteriormente en la sección "2-8. Construcción de un plásmido de expresión para P30CRM197AP2".
 15

III. Preparación de proteínas transportadoras quiméricas CRM197A que comprenden un epítipo universal

Los experimentos han demostrado propiedades similares de la proteína transportadora CRM197A y las proteínas transportadoras quiméricas que comprenden la proteína transportadora CRM197A y epítopos universales. Por tanto, los métodos de purificación para todas las proteínas transportadoras descritas en el presente documento son similares. A continuación se describe un método ejemplar para preparar proteína transportadora quimérica que comprende la proteína transportadora CRM197A y epítopos universales.
 20

1. Preparación de bacterias modificadas que expresan proteínas transportadoras quiméricas CRM197A que comprenden un epítipo universal

Cada plásmido que expresa la proteína transportadora quimérica se transformó en células competentes utilizando métodos estándar de biología molecular, y se examinó la expresión de la proteína. Los clones que tenían altos niveles de expresión de proteínas y pasaron las pruebas de antisuero se seleccionaron para establecer una biblioteca de reserva maestra y una biblioteca de reserva de trabajo.
 30

2. Fermentación de bacterias modificadas genéticamente que expresan proteínas transportadoras quiméricas CRM197A que comprenden un epítipo universal

Se tomó un tubo de bacterias que podía expresar una proteína portadora quimérica CRM197A específica que comprende un epítipo universal de la biblioteca de reserva de trabajo de *E. coli* sometido a ingeniería en el refrigerador de baja temperatura y se descongeló a temperatura ambiente. La suspensión de bacterias en el material de trabajo se transfirió a un medio de 50 ml utilizando técnicas estériles, y se cultivó en una incubadora con agitación a 37 °C a una velocidad de agitación de 180 rpm hasta que DO₆₀₀ alcanzó aproximadamente 1,0. El cultivo bacteriano se usó para inocular un medio de cultivo de 1 l, que se cultivó en una incubadora con agitación a 37 °C a una velocidad de agitación de 180 rpm hasta que DO₆₀₀ alcanzó aproximadamente 1,0. El cultivo bacteriano de 1 l después se usó para inocular un medio de 20 l en un fermentador de 50 l, que después se fermentó a 240 rpm y 37 °C. Cuando DO₆₀₀ alcanzó aproximadamente 7-8, se añadió IPTG al cultivo para inducir la expresión de proteínas en la bacteria. La fermentación se detuvo a las 14 horas desde el comienzo del proceso de fermentación. El cultivo bacteriano fermentado se centrifugó y se recogieron las bacterias.

3. Purificación de proteínas transportadoras quiméricas CRM197A que comprenden un epítipo universal

Dado que CRM197A se usó como un componente central para construir diferentes proteínas transportadoras quiméricas que tienen epítipos universales, los experimentos demostraron que a pesar de la adición de los epítipos universales, los parámetros para la purificación de proteínas no se vieron afectados significativamente. El procedimiento de purificación de la proteína transportadora CRM197A podría modificarse para establecer métodos de purificación para las proteínas transportadoras quiméricas CRM197A que comprenden un epítipo universal.

Se pesaron 50 g de bacterias húmedas en una taza de centrífuga de 2 l. Se añadieron a la taza 300 ml de tampón 1X PBS pH 7,0 para resuspender las bacterias. La suspensión de bacterias se mezcló completamente en una placa de agitación magnética durante 30 minutos, y después se centrifugó durante 20 minutos a 4 °C, 4000 rpm. El sobrenadante se descartó y las bacterias se recogieron. Estas etapas se repitieron dos veces. Al tubo de centrífuga que tenía la bacteria se añadieron 300 ml de PBS 1X pH 7,0. Las bacterias se lisaron en un homogeneizador y se centrifugaron durante 20 minutos a 4 °C, 10000 rpm. El sedimento se recogió y el sobrenadante se descartó. Al sedimento se le añadieron 300 ml de tampón PBS 1X pH 7,0, y la mezcla se mezcló completamente en una placa de agitación magnética durante 30 minutos. La mezcla se centrifugó durante 20 minutos a 4 °C, 4000 rpm. El cuerpo de inclusión se recogió y el sobrenadante se descartó. Se añadieron 900 ml de solución desnaturante al cuerpo de inclusión lavado. La mezcla se centrifugó después durante 30 minutos a 25 °C, 10000 rpm. El sobrenadante se recogió y el sedimento se descartó. El sobrenadante se transfirió a una bolsa de diálisis de 6-8 KDA. La bolsa de diálisis se selló y se colocó en 10 l de tampón de replegamiento 1, y se dejó equilibrar durante la noche a temperatura ambiente en una placa de agitación magnética. Al día siguiente, la bolsa de diálisis se transfirió a 10 l de tampón de replegamiento 2 y se agitó para equilibrar a temperatura ambiente durante aproximadamente 8-10 horas. La bolsa de diálisis se transfirió a 10 l de tampón de diálisis 3, y se agitó para equilibrar a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, la bolsa de diálisis se transfirió a 10 l de tampón de replegamiento 4 y se agitó para equilibrar a temperatura ambiente durante aproximadamente 8-10 horas. La bolsa de diálisis se transfirió a 10 l de tampón de replegamiento 5 y se agitó para equilibrar a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, la bolsa de diálisis se transfirió a 2 l de tampón de almacenamiento y se agitó para equilibrar a temperatura ambiente durante aproximadamente 8-10 horas. El tampón de almacenamiento se reemplazó dos veces, y la diálisis se realizó a temperatura ambiente durante la noche. Se obtuvo 1 ml de solución de diálisis y se centrifugó durante 10 minutos a temperatura ambiente y 12000 rpm. El sobrenadante se recogió y la concentración de proteína se midió. La muestra de proteína se cargó en una columna de gel DEAE preequilibrada y se eluyó con un modo de gradiente para recoger el pico de proteína diana. La muestra recogida se cargó después en una columna hidrófoba de fenilo para una purificación adicional, y el pico eluido se recogió. Finalmente, la muestra recogida se cargó en una columna de gel SP y el pico eluido se recogió. La proteína diana purificada recogida se transfirió a una bolsa de diálisis y se dializó contra un tampón de NaCl 0,15 M. La muestra dializada se transfirió a 4 °C para su almacenamiento.

IV. Preparación de polisacáridos capsulares bacterianos

Los polisacáridos capsulares de tres especies bacterianas, incluyendo 13 serotipos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* tipo b, y grupos A, C, Y, y W135 de *Neisseria meningitidis*, se purificaron para sintetizar las vacunas conjugadas. La calidad de los polisacáridos capsulares purificados satisface los estándares de la OMS para los polisacáridos usados en la síntesis de vacunas conjugadas de polisacárido-proteína.

1. Preparación de polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*

1-1. Construcción de una biblioteca de reserva

13 cepas de serotipo de *Streptococcus pneumoniae* se adquirieron en ATCC, incluyendo 1 (número de artículo: 9163), 3 (número de artículo: 10813), 4 (número de artículo: BAA-334), 5 (número de artículo: BAA-341), 6A (número de artículo: BAA-659), 6B (número de artículo: 700675), 7F (número de artículo: 10351), 9V (número de artículo: 700671), 14 (número de artículo: 6314), 18C (número de artículo: 10356), 19A (número de artículo: 700673), 19F

(número de artículo: 700905), y 23F (700669). A cada una de las cepas de bacterias adquiridas en ATCC (reserva original) se le añadieron 0,5 ml de medio de cultivo líquido de *Streptococcus pneumoniae* AHC y se mezcló a fondo con la cepa bacteriana. Se usaron 0,25 ml de cultivo bacteriano para inocular un medio de cultivo AHC que contenía 5 % de sangre de oveja, y se incubó en un agitador a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 rpm durante aproximadamente 12-20 horas.

5 Después de que DO_{600} alcanzara 1,0, se usó un circuito de inoculación para inocular el cultivo de AHC que contenía 5 % de sangre de oveja en una placa de agar AHC, y se incubó en una incubadora a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12-20 horas. Se usó un circuito de inoculación para inocular de 1 a varias colonias bacterianas en 10 ml de solución de cultivo de AHC cada una, y se incubó en un agitador a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas con una velocidad de agitación de 150-200 rpm. Cuando DO_{600} del cultivo bacteriano alcanzó 1,0, se usaron 5 ml del cultivo AHC de bacterias para
10 inocular un cultivo AHC nuevo de 200 ml, y se incubaron en un agitador a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas, con una velocidad de agitación de 150-200 rpm. Después de que DO_{600} alcanzara 1,0, el cultivo bacteriano se dividió en alícuotas en 200 tubos de ensayo pequeños con 1 ml de cultivo bacteriano cada uno, y se centrifugó (4000 rpm, 10 minutos). El sobrenadante se descartó y 0,5 ml de solución de cultivo AHC fresca y 0,5 ml de leche desnatada estéril se añadieron al sedimento, se mezcló bien, y se congeló rápidamente en baño de hielo seco con etanol. La muestra
15 después se liofilizó, se número y se almacenó en un refrigerador a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ como reserva maestra. La reserva maestra se tomó y el método para establecer la reserva maestra se usó para establecer la reserva de trabajo: el cultivo bacteriano se usó para inocular una solución de cultivo AHC de 200 ml fresca y se incubó en un agitador a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas, con una velocidad de agitación de 150-200 rpm. Después de que DO_{600} alcanzara 1,0, el cultivo bacteriano se dividió en alícuotas en 200 tubos de ensayo pequeños con 1 ml de cultivo bacteriano cada uno,
20 y se centrifugó (4000 rpm, 10 minutos). El sobrenadante se descartó, se añadieron 0,6 ml de solución de cultivo AHC fresca y 0,4 ml de solución de glicerol al 40 % a la muestra, se mezcló bien, se congeló en hielo seco, y se almacenó en un refrigerador a baja temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ como reservas de trabajo.

1-2. Fermentación de *Streptococcus pneumoniae*

25 Se tomó una reserva de trabajo liofilizada de la biblioteca de reserva y se añadió 1 ml de solución de cultivo rica en AHC para disolver las bacterias liofilizadas. La solución de bacterias disueltas se usó para inocular una solución de cultivo rica en AHC de 5 ml en un tubo de ensayo, y se incubó durante la noche en una incubadora de CO_2 . Cuando se observó crecimiento de bacterias, el cultivo bacteriano se usó para inocular un medio rico en AHC de 100 ml en un matraz. El matraz se colocó en un agitador y se incubó a $36\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 rpm hasta que DO_{600} alcanzó 1,0. Se usaron dos alícuotas de cultivo bacteriano de 100 ml para inocular un medio de cultivo rico en AHC de 1 l en un frasco de cultivo respectivamente. El frasco de cultivo se colocó en un agitador y se incubó a $36\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 rpm hasta que DO_{600} alcanzó 1,0. La solución de cultivo rica en AHC filtrada estéril de 35 l se transfirió a un fermentador de 50 l. El cultivo bacteriano 2 l con una DO de 1 se transfirió al fermentador. Cuando el crecimiento bacteriano alcanzó la fase de meseta, se eliminaron las bacterias y el sobrenadante se recogió.
35

1- 3. Purificación de polisacáridos capsulares

40 Se usó un filtro de profundidad para filtrar el sobrenadante para eliminar aún más las bacterias y los desechos restantes. El sobrenadante estéril se concentró 10 veces (aproximadamente 600 ml) usando una membrana de ultrafiltro de 100 KDa. Se usaron 6 l de acetato sódico 25 mM para lavado por ultrafiltración. Se añadió solución de almacenamiento de HB para obtener una concentración final de 1 % (p/v), se mezcló bien, y se almacenó en una habitación fría durante la noche. La solución se centrifugó a 4000 rpm durante 1 hora, el precipitado de polisacárido/HB se recogió y el sobrenadante se descartó. Se añadió acetato sódico 25 mM y solución de HB al 1 %
45 al precipitante de polisacárido/HB, que se resuspendió por agitación, después la resuspensión se centrifugó a 4000 rpm durante 1 hora, El precipitante de polisacárido/HB se recogió y el sobrenadante se descartó. El proceso de centrifugación se repitió 3 veces. Se añadieron 600 ml de solución de cloruro sódico 0,25 a la mezcla de polisacárido + HB, se mezcló completamente y se añadió yoduro potásico a una concentración final del 0,5 %. La solución se almacenó en una habitación fría durante la noche. La solución se filtró usando un filtro de profundidad para eliminar el precipitante HB/l, y se usó solución de cloruro sódico 0,25 M/yoduro potásico al 0,5 % para lavar el precipitado en el filtro de filtro de profundidad. El filtrado se recogió y el precipitante se descartó. La solución de polisacárido en bruto se filtró en un filtro de profundidad con carbón activado durante 30 minutos (filtro activado al 4 %/solución de polisacárido en bruto de 0,5 mg/ml). Se añadió tampón de fosfato sódico pH 6,8 a la solución de polisacárido con una concentración final de 25 mM. La solución anterior se pasó a través de una columna de HA (50-100 ml) y se hizo
50 circular durante 30 minutos. El mismo tampón fosfato se usó para lavar la columna para un volumen de 4-5 columnas. Una membrana de 30 KDa se usó para ultrafiltrar y concentrar la solución de polisacárido 5 veces. Se usó agua libre de pirógenos para limpiar por ultrafiltro la solución de polisacárido. Una membrana de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ se usó para filtrar la solución de polisacárido, que después se liofilizó.

60 2. Preparación de polisacáridos capsulares de *Haemophilus influenzae* tipo b

2- 1. Construcción de una biblioteca de reserva

65 Una cepa bacteriana de tipo b de *Haemophilus influenzae* obtenida como obsequio se usó como reserva original para establecer la reserva maestra y la reserva de trabajo. El método para establecer las reservas se describe en la sección de construcción de una biblioteca de reservas para *Streptococcus pneumoniae*.

2-2. Fermentación de *Haemophilus influenza* tipo b

La reserva de trabajo de *Haemophilus influenza* tipo b (Hib) se usó para inocular los medios en una placa, y se incubó en una incubadora a 36,5 °C durante la noche. Se tomó una colonia Hib para inocular un medio de cultivo esencial fresco de 5 ml, y se incubó en un agitador a 36,5 °C y 300 rpm. Cuando el cultivo inoculado alcanzó la fase de crecimiento logarítmico medio, con una DO de 0,6-1,0, el cultivo inoculado se transfirió a un matraz de cultivo de 250 ml con 45 ml de medio de cultivo esencial fresco, y se incubó en un agitador a 36,5 °C y 300 rpm. Cuando el cultivo inoculado alcanzó la fase de crecimiento logarítmico medio, con una DO de 0,6-1,0, el cultivo inoculado se transfirió a un matraz de cultivo de 4 l con 1 l de medio de cultivo esencial fresco, y se incubó en un agitador a 36,5 °C y 300 rpm. Cuando el cultivo inoculado alcanzó la fase de crecimiento logarítmico medio (aproximadamente 16-18 horas), con una DO de 0,6-1,0, el cultivo inoculado se transfirió a un fermentador con 20 litros de medio de cultivo esencial fresco. Cuando la bacteria Hib alcanzó la fase de crecimiento logarítmico medio, se añadieron medios de cultivo esenciales frescos y medios de cultivo suplementarios, para proporcionar una concentración final de glucosa de 23 g/l en los medios de cultivo. La solución de cultivo suplementaria fresca añadida tenía un volumen total de 25 l. La fermentación se detuvo después de 14,5 horas de incubación.

2- 3. Purificación de polisacáridos capsulares

El cultivo de Hib se centrifugó y se recogieron las bacterias Hib granuladas, se resuspendieron en 2 l de agua destilada, y se mezcló completamente usando un agitador magnético. Se añadieron 200 ml de solución de desoxicolato sódico al 12 % a la suspensión de bacterias, se mezcló bien durante 30 minutos y se transfirió a una cámara fría a 10 °C ± 3 °C y se agitó durante 8-24 horas para lisar las bacterias y liberar los polisacáridos. Se usó una solución de ácido acético al 50 % para ajustar el pH del lisado bacteriano a 6,4-6,8 a 20 °C ± 5 °C, y se detuvo la agitación para permitir que la solución reposara durante 12-24 horas. La solución se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 hora, el sobrenadante se recogió y el sedimento se descartó. Se usó un tampón fosfato 0,05 M pH 7,0 para diálisis contra el sobrenadante de polisacárido. Se añadió un volumen igual de solución de HB al 0,2 %, se mezcló usando un agitador magnético durante 30 minutos y después se transfirió a una habitación fría a 4 °C para que reposara durante la noche. La solución se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 hora, el sedimento se recogió y el sobrenadante se descartó. Se añadieron 100 ml de solución de cloruro sódico 0,5 M para disolver el sedimento. Se añadieron 680 ml de etanol anhidro, se mezcló bien y después se transfirió a una cámara fría a 4 °C para que reposara durante la noche. La solución se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos, el sobrenadante se recogió y el sedimento se descartó. Se añadieron 5,2 l de etanol anhidro, se mezcló bien y después se transfirió a una cámara fría a 4 °C para que reposara durante la noche. La solución se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos, el sedimento se recogió y el sobrenadante se descartó. Se añadieron 500 ml de agua destilada para disolver el sedimento, que después se dializó y liofilizó.

3. Preparación de polisacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis*

3- 1. Construcción de una biblioteca de reserva

Las cepas bacterianas de *Neisseria meningitidis*, A, C, Y y W135 obtenidas como obsequio se usaron como cepas originales para establecer reservas maestras y reservas de trabajo. El método para establecer las reservas se describe en la sección de construcción de una biblioteca de reservas para *Streptococcus pneumoniae*.

3-2. Fermentación de *Neisseria meningitidis* y purificación de polisacáridos capsulares

Consulte las secciones correspondientes para la fermentación de Hib y la purificación de los polisacáridos de Hib.

V. Preparación de conjugados de polisacárido-proteína

Las estructuras químicas de diferentes polisacáridos bacterianos contienen diferentes grupos funcionales. Por tanto, se necesitan diferentes métodos sintéticos para unir covalentemente diferentes polisacáridos a las proteínas transportadoras para formar los conjugados. El rendimiento y las propiedades inmunogénicas de los conjugados formados por diferentes métodos sintéticos pueden ser diferentes. Los resultados experimentales de la presente invención mostraron que tres métodos sintéticos diferentes, es decir, aminación reductora, método CDAP (usando 3-(etiliminometilamino)-N,N-dimetil-propan-1-amina), y método ADH (dihidrazida de ácido adipico), para sintetizar conjugados específicos de polisacárido-proteína. Los ejemplos de conjugados de polisacárido-proteína de la presente invención incluyen conjugados de polisacárido (Pn) de *Streptococcus pneumoniae* 13-valentes, conjugados de polisacárido de *Haemophilus influenza* tipo b (Hib) y conjugados de polisacárido de *Neisseria meningitidis* (Men) 4-valentes.

1. Preparación de conjugados de polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* (Pn)-P2CRM197A 13-valentes

Se diseñaron y produjeron 26 tipos de conjugados de polisacárido-proteína que comprenden proteínas transportadoras quiméricas CRM197A. Dado que las estructuras de las proteínas son similares, el mismo método

seleccionado de aminación reductora, el método ADH y el método CDAP se usan para sintetizar los conjugados de polisacárido-proteína. El siguiente ejemplo solo muestra el proceso de síntesis usando la proteína transportadora química P2CRM197A con fines ilustrativos. Los métodos de síntesis que usan otras proteínas transportadoras químicas son similares y, por lo tanto, no se detallan en el presente documento.

5 *1-1. Preparación de conjugado de polisacárido capsular serotipo 1 (Pn1)-P2CRM197A de Streptococcus pneumoniae*

10 Se pesaron 5 mg de polisacárido digerido con Pn1 en un matraz de reacción, y se añadieron 0,5 ml de NaCl 1 M al matraz de reacción. El polisacárido se completó disolviendo por agitación. Se registró el pH inicial de la solución de polisacárido, y se midió una cantidad apropiada de solución de CDAP y se añadió al matraz de reacción. La mezcla se agitó y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1,5 minutos, y el pH de la mezcla se midió a 30 s. Después de 1,5 minutos, se añadió solución de NaOH 0,2 M para ajustar el pH de la solución a 9,5, y la mezcla se agitó y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 3 minutos (se usó NaOH 0,2 M para mantener el pH de la mezcla a 9,5). Inmediatamente después de 3 minutos, se añadieron al matraz de reacción 5 mg de proteína química P2CRM197A, y la mezcla se agitó y se dejó reaccionar a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora. Se añadieron 37,5 µl de solución de lisina 2 M al matraz de reacción, y se usó una solución de HCl 0,1 N para ajustar el pH de la mezcla a 9,0. La mezcla se agitó y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. El matraz de reacción se transfirió a 4 °C para permitir la reacción durante la noche. La mezcla de reacción se transfirió a una bolsa de diálisis (MWCO 6-8000), y se dializó contra una solución de NaCl al 0,85 % 3 veces (6 l/tiempo) a 4 °C. Después de la diálisis, la mezcla de reacción se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos, y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se purificó y se dializó usando una columna de gel Sepharose CL-4B, el pico conjugado se recogió y se tomó una muestra y se envió para su análisis.

25 *1-2. Preparación de conjugado de polisacárido capsular serotipo 3 (Pn3)-P2CRM197A de Streptococcus pneumoniae*

30 Se pesaron 20 mg de polisacárido digerido con Pn1 en un matraz de reacción, y se añadieron 2 ml de NaCl 0,15 M al matraz de reacción. El polisacárido se completó disolviendo por agitación. Se midió una cantidad apropiada de solución de CDAP y se añadió al matraz de reacción. La mezcla se agitó y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1,5 minutos, y el pH de la mezcla se midió a 30 s. Después de 1,5 minutos, se añadió solución de NaOH 0,2 M para ajustar el pH de la solución a 9,5, y la mezcla se agitó y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 3 minutos (se usó NaOH 0,2 M para mantener el pH de la mezcla a 9,5). Se añadió ADH al matraz de reacción para alcanzar una concentración final de 0,8 M, se mezcló bien y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. El polisacárido derivado se transfirió a una bolsa de diálisis, se dializó contra una solución de NaCl 0,15 M, y la solución de NaCl se cambió tres veces. La muestra se cargó en una columna G-50 y se eluyó usando NaCl 0,15 M, y se recogió el pico fuera del volumen vacío. La muestra recogida se transfirió a una bolsa de diálisis, serial hizo contra agua, y el agua se cambió tres veces. Se pesaron 5 mg del polisacárido Pn3 derivado y se disolvieron en 0,5 ml de solución de NaCl 0,15 M. Se añadieron 5 mg de proteína química P2CRM197A y se mezclaron completamente. Se añadió EDC 30 mM, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 4 horas, y se transfirió a 4 °C para permitir la reacción durante la noche. La mezcla de reacción se transfirió a una bolsa de diálisis (MWCO 6-8000), y se dializó contra una solución de NaCl al 0,85 % 3 veces (6 l/tiempo) a 4 °C. Después de la diálisis, la mezcla de reacción se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos, y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se purificó y se dializó usando una columna de gel Sepharose CL-4B, el pico conjugado se recogió y se tomó una muestra y se envió para su análisis.

35 *1-3. Preparación de conjugado de polisacárido capsular serotipo 4 (Pn4)-P2CRM197A de Streptococcus pneumoniae*

50 Se pesaron 5 mg de polisacárido activado en un matraz de reacción, y se midieron 100 µl de tampón de fosfato sódico 0,5 M y se añadieron al matraz de reacción. Se pesaron 5 mg de proteína química P2CR197A y se añadieron al matraz de reacción. La mezcla se agitó hasta que el polisacárido se disolvió por completo. Se midieron 0,5 ml de agua pura y se añadieron al matraz de reacción, y se mezclaron completamente agitando. Se pesaron 5,0 mg de cianoborohidruro sódico y se añadieron al matraz de reacción. El sistema de reacción se colocó en un baño seco a 40 °C para permitir la reacción durante 12 horas. Después de finalizar la reacción, se añadieron 1,5 ml de solución de cloruro sódico 0,15 M al matraz de reacción. Se pesaron 2,5 mg de borohidruro sódico y se añadieron al matraz de reacción. El sistema de reacción se colocó a 22 °C para permitir la reacción durante 5 horas. La mezcla de reacción se transfirió a una bolsa de diálisis (MWCO 12-14 kDa), y se dializó contra una solución de NaCl 0,15 M 3 veces (6 l/tiempo) a 4 °C. Después de la diálisis, la mezcla de reacción se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos, y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se purificó y se dializó usando una columna de gel Sepharose CL-4B, el pico conjugado se recogió y se tomó una muestra y se envió para su análisis.

60 *1-4. Preparación de conjugado de polisacárido capsular serotipo 5 (Pn5)-P2CRM197A de Streptococcus pneumoniae*

65 Se pesaron 5 mg de polisacárido activado en un matraz de reacción, y se midieron 100 µl de tampón de fosfato

sódico 0,5 M y se añadieron al matraz de reacción. Se pesaron 4,0 mg de proteína quimérica P2CR197A y se añadieron al matraz de reacción. Se midieron 0,5 ml de agua pura y se añadieron al matraz de reacción, se mezcló por agitación magnética para disolver el reactivo, y se midió el pH de la mezcla de reacción. Se pesaron 5,0 mg de cianoborohidruro sódico y se añadieron al matraz de reacción. El sistema de reacción se colocó a temperatura ambiente para permitir la reacción durante 48 horas. Se pesaron 2,5 mg de borohidruro sódico, se disolvieron en 10 µl de agua pura usando una pipeta, y se cargó en el matraz de reacción. El sistema de reacción se colocó a 23 °C para permitir la reacción durante 5 horas. La mezcla de reacción se transfirió a una bolsa de diálisis (MWCO 6-8 KDA) y se dializó contra una solución de NaCl 0,15 M 3 veces a 4 °C, cambiando la solución de NaCl cada 5 horas. Después de la diálisis, la mezcla de reacción se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos, y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se purificó y se dializó usando una columna de gel Sepharose CL-4B, el pico conjugado se recogió y se tomó una muestra y se envió para su análisis.

1-5. Preparación de conjugado de polisacárido capsular serotipo 6A (Pn6A)-P2CRM197A de *Streptococcus pneumoniae*

Se pesaron 6,0 mg de polisacárido activado Pn6A en un matraz de reacción. Se añadió 1 ml de agua pura al matraz de reacción, se agitó hasta que el polisacárido se disolvió por completo y se midió el pH inicial de la solución. Se usó NaOH 0,1 M para ajustar el pH de la solución a 7,0. Se añadieron 4,0 mg de proteína quimérica P2CRM197A al matraz de reacción, y se agitó a fondo. Se pesaron 5,0 mg de cianoborohidruro sódico y se añadieron al matraz de reacción, y se dejaron reaccionar a temperatura ambiente durante 18 horas. Se tomó una muestra después de la reacción y se envió para ensayo. Se pesaron 2,7 mg de borohidruro sódico, se añadió al matraz de reacción y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 5 horas. Se tomó una muestra después de la reacción y se envió para ensayo. La mezcla de reacción se transfirió a una bolsa de diálisis y se dializó contra una solución de NaCl 0,15 M 3 veces (6 l/tiempo) a 4 °C. Después de la diálisis, la mezcla de reacción se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos, y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se purificó y se dializó usando una columna de gel Sepharose CL-4B, el pico conjugado se recogió y se tomó una muestra y se envió para su análisis.

1-6. Preparación de conjugado de polisacárido capsular serotipo 6B (Pn6B)-P2CRM197A de *Streptococcus pneumoniae*

Se pesaron 5,0 mg de polisacárido Pn6B en un matraz de reacción. Se añadió 1 ml de agua pura al matraz de reacción, se agitó hasta que el polisacárido se disolvió por completo y se midió el pH inicial de la solución. Se usó NaOH 0,1 M para ajustar el pH de la solución a 7,0. Se añadieron 2,5 mg de proteína quimérica P2CRM197A al matraz de reacción, y se agitó a fondo. Se pesaron 5,0 mg de cianoborohidruro sódico y se añadieron al matraz de reacción, y se dejaron reaccionar a temperatura ambiente durante 20 horas. Se pesaron 2,5 mg de borohidruro sódico, se añadió al matraz de reacción y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 6 horas. La mezcla de reacción se transfirió a una bolsa de diálisis y se dializó contra una solución de NaCl 0,15 M 5 veces (6 l/tiempo) a 4 °C. Después de la diálisis, la mezcla de reacción se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos, y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se purificó y se dializó usando una columna de gel Sepharose CL-4B, el pico conjugado se recogió y se tomó una muestra y se envió para su análisis.

1-7. Preparación de conjugado de polisacárido capsular serotipo 6F (Pn6F)-P2CRM197A de *Streptococcus pneumoniae*

Se pesaron 10,0 mg de polisacárido Pn6F en un matraz de reacción. Se añadió 1 ml de agua pura al matraz de reacción y se agitó hasta que se disolvió el polisacárido. Se añadió NaOH 0,1 M gota a gota a la solución de polisacárido para ajustar el pH de la solución a 7,0. Se añadieron 3,5 mg de proteína quimérica P2CRM197A al matraz de reacción, y se agitó para mezclar completamente. Se pesaron 5,0 mg de cianoborohidruro sódico y se añadieron al matraz de reacción, y se dejaron reaccionar a temperatura ambiente durante 20 horas. Se añadieron 990 µl de agua al matraz de reacción y se mezclaron completamente. Se pesaron 2,5 mg de borohidruro sódico, se añadió al matraz de reacción y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 6 horas. La mezcla de reacción se transfirió a una bolsa de diálisis (MWCO 6-8KDA), y se dializó contra succinato 5 mM/tampón de cloruro sódico al 0,9 % 5 veces (6 l/tiempo) a 4 °C. Después de la diálisis, la mezcla de reacción se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos, y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se purificó y se dializó usando una columna de gel Sepharose CL-4B, el pico conjugado se recogió y se tomó una muestra y se envió para su análisis.

1-8. Preparación de conjugado de polisacárido capsular serotipo 9V (Pn9V)-P2CRM197A de *Streptococcus pneumoniae*

Se pesaron 10,0 mg de polisacárido activado con Pn9V en un matraz de reacción. Se añadieron 125 µl de tampón de fosfato sódico al matraz de reacción. Se añadieron 125 µl de agua pura al matraz de reacción, y se agitó hasta que el polisacárido se disolvió por completo. Se añadieron 15 mg de proteína quimérica P2CRM197A al matraz de reacción, y se agitó para disolver completamente. Se pesaron 10 mg de NaBH₃(CN) y se añadieron al matraz de reacción. El sistema de reacción se colocó a 22 °C y se dejó reaccionar durante 48 horas. Se pesaron 2,5 mg de borohidruro sódico, se añadieron al matraz de reacción y se dejaron reaccionar a 22 °C durante 5 horas. La mezcla de reacción se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos, y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se

purificó y se dializó usando una columna de gel Sepharose CL-4B, el pico conjugado se recogió y se tomó una muestra y se envió para su análisis.

5 *1-9. Preparación de conjugado de polisacárido capsular serotipo 14 (Pn14)-P2CRM197A de Streptococcus pneumoniae*

Se pesaron 5 mg de polisacárido activado con Pn14 en un matraz de reacción. Se añadió 1 ml 3,9 mg de proteína quimérica P2CRM197A al matraz de reacción, y se agitó para permitir que el polisacárido se disolviera completamente. Se añadieron 5 mg de cianoborohidruro sódico al matraz de reacción y se dejó reaccionar a 22 °C durante 48 horas. Se añadieron 2,5 mg de borohidruro sódico al matraz de reacción y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se transfirió a una bolsa de diálisis (MWCO 12-14 KDA), incluyendo 2 ml de la solución de diálisis usada para enjuagar el matraz de reacción. La mezcla de reacción se dializó contra solución de cloruro sódico 0,15 M 3 veces, 6 l/tiempo, cambiando la solución de cloruro sódico cada 5 horas. Después de la diálisis, la muestra dializada se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se purificó y se dializó usando una columna de gel Sepharose CL-4B, el pico conjugado se recogió y se tomó una muestra y se envió para su análisis.

20 *1-10. Preparación de conjugado de polisacárido capsular serotipo 18C (Pn18C)-P2CRM197A de Streptococcus pneumoniae*

Se pesaron 5 mg de polisacárido digerido con Pn18C en un matraz de reacción, y se añadió 1 ml de solución de cloruro sódico 1 M para disolver el polisacárido. Se midió un pH inicial de la solución disuelta. Se añadió una cantidad apropiada de solución de CDAP y se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 minutos. Se añadió solución de NaOH 0,2 M para ajustar el pH de la mezcla a 9,0. Después se permitió que la mezcla reaccionara a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se añadieron 10 mg de proteína quimérica P2CRM197A al matraz de reacción y se dejó reaccionar a 25 °C durante 45 minutos. Después de finalizar la reacción, se añadieron 37,5 µl de solución de lisina 2 M y se dejó reaccionar a 25 °C durante 30 minutos. La mezcla se dejó reaccionar a 4 °C durante la noche. La mezcla de reacción se transfirió a una bolsa de diálisis (MWCO 6-8 KDA) y se dializó contra una solución de cloruro sódico al 0,85 %, cambiando la solución de cloruro sódico 3 veces, 6 l/tiempo, cambiando la solución de cloruro sódico cada 5 horas. Después de la diálisis, la muestra dializada se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se purificó y se dializó usando una columna de gel Sepharose CL-4B, el pico conjugado se recogió y se tomó una muestra y se envió para su análisis.

35 *1-11. Preparación de conjugado de polisacárido capsular serotipo 19 A (Pn19A)-P2CRM197A de Streptococcus pneumoniae*

Se pesaron 10 mg de polisacárido activado con Pn19A en un matraz de reacción. Se añadieron 0,5 ml de solución tampón a las escamas de reacción y se agitó usando una barra magnética hasta que el polisacárido se disolvió por completo. Se añadieron 10 mg de proteína quimérica P2CRM197A al matraz de reacción, y se agitó para mezclar completamente. Se añadieron 5 mg de cianoborohidruro sódico al matraz de reacción y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 20 horas. Se añadieron 2,5 mg de borohidruro sódico al matraz de reacción y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 5 horas. La mezcla de reacción se transfirió a una bolsa de diálisis (MWCO 6-8 KDA), y se dializó contra solución de cloruro sódico al 0,85 % 3 veces, 6 l/tiempo, cambiando la solución de cloruro sódico cada 5 horas. Después de la diálisis, la muestra dializada se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se purificó y se dializó usando una columna de gel Sepharose CL-4B, el pico conjugado se recogió y se tomó una muestra y se envió para su análisis.

50 *1-12. Preparación de conjugado de polisacárido capsular serotipo 19F (Pn19F)-P2CRM197A de Streptococcus pneumoniae*

Se pesaron 5,2 mg de polisacárido Pn19F oxidado y se añadieron a un matraz de reacción. Se añadió 1 ml de agua pura al matraz de reacción y se agitó usando una barra magnética hasta que el polisacárido se disolvió por completo. Se añadieron 3,0 mg de proteína quimérica P2CRM197A al matraz de reacción, y se agitó para mezclar completamente. Se añadieron 4,9 mg de cianoborohidruro sódico al matraz de reacción, se agitó en una placa de agitación magnética y se dejó reaccionar a 18 °C durante 24 horas. Se añadieron 2,5 mg de borohidruro sódico al matraz de reacción y se dejó reaccionar a 18 °C en una incubadora durante 5 horas. La mezcla de reacción se transfirió a una bolsa de diálisis (MWCO 12-14 KDA) y se dializó 5 veces, 6 l de solución de diálisis/tiempo, cambiando la solución de diálisis cada 5 horas. Después de la diálisis, la muestra dializada se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se purificó y se dializó usando una columna de gel Sepharose CL-4B, el pico conjugado se recogió y se tomó una muestra y se envió para su análisis.

65 *1-13. Preparación de conjugado de polisacárido capsular serotipo 23F (Pn23F)-P2CRM197A de Streptococcus pneumoniae*

Se pesaron 4,9 mg de polisacárido Pn23F oxidado y se añadieron a un matraz de reacción. Se añadió 1 ml de agua pura al matraz de reacción y se agitó usando una barra magnética hasta que el polisacárido se disolvió por

completo. Se añadieron al matraz de reacción 5,0 mg de proteína quimérica P2CRM197A. Se añadieron 5,1 mg de cianoborohidruro sódico al matraz de reacción, se agitó en una placa de agitación magnética y se dejó reaccionar a 18 °C en una incubadora durante 17 horas. Se añadieron 2,5 mg de borohidruro sódico al matraz de reacción y se dejó reaccionar a 18 °C en una incubadora durante 5 horas. La mezcla de reacción se transfirió a una bolsa de diálisis (MWCO 12-14 KDA) y se dializó contra una solución de cloruro sódico 0,15 M 5 veces, 6 l de solución de diálisis/tiempo, cambiando la solución de diálisis cada 5 horas. Después de la diálisis, la muestra dializada se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se purificó y se dializó usando una columna de gel Sepharose CL-4B, el pico conjugado se recogió y se tomó una muestra y se envió para su análisis.

2. Preparación de conjugados de polisacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib)-P2CRM197A (Hib-P2CRM197A)

En los ejemplos de síntesis de vacunas conjugadas de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), se usaron seis proteínas transportadoras quiméricas que comprendían epítomos universales y la proteína transportadora CRM197, incluyendo proteínas transportadoras quiméricas P2CRM197A, P2CRM197AP2, P30CRM197A, OVApCRM197A, P30CRM197AP2, y P2P30CRM197AOVAp. Dado a que los métodos para sintetizar conjugados de Hib que tienen diferentes proteínas transportadoras quiméricas son similares, el método que usa la proteína portadora quimérica P2CRM197A se usa en el presente documento como un ejemplo en la presente invención para describir el método de síntesis de conjugado.

El método ADH se usó para sintetizar los conjugados Hib. Las etapas sintéticas de este método se pueden dividir en etapas de derivación de polisacárido Hib y etapas de síntesis conjugada.

2-1. Etapas de derivación del polisacárido Hib

Se disolvieron 5 mg de polisacárido Hib en 1 ml de agua pura y se activaron mediante la adición de bromuro de cianógeno. A la mezcla de reacción se añadieron 2 ml de solución de ADH para alcanzar una concentración final de 0,4 M, y se dejó reaccionar durante la noche a 2-8 °C. La mezcla de reacción se dializó contra cloruro sódico 0,2 M. La muestra se cargó en una columna G-50, y se recogió el pico fuera del volumen vacío. La muestra de conjugado se transfirió a una bolsa de diálisis, se dializó contra agua pura y se liofilizó para obtener el derivado de polisacárido sólido. El derivado de polisacárido se debería almacenar a menos de -20 °C o menos.

2-2. Síntesis de conjugado de polisacárido Hib-P2CRM197A

Se pesaron 10 mg de derivado de polisacárido Hib y se añadieron a un matraz de reacción. Se añadieron 0,5 ml de NaCl 0,15 M al matraz de reacción, se agitó para disolver el polisacárido, se colocó a temperatura ambiente seguido de 4 °C durante la noche para asegurar la disolución completa del polisacárido. La concentración del polisacárido en la mezcla fue de 20 mg/ml. La solución de polisacárido se filtró estéril a través de una membrana de 0,45 µm en un matraz de reacción. Se usó NaOH 0,1 M o HCl 0,1 N para ajustar el pH de la solución filtrada a 5,5. Se añadió una solución que contenía 5 mg de P2CRM197A al matraz de reacción, y se agitó para mezclar completamente. Se añadieron 2,9 mg de EDC al matraz de reacción, se agitó y se dejó reaccionar durante 4 horas. La mezcla de reacción se transfirió a una bolsa de diálisis (MWCO 6-8 KDA) contra una solución de NaCl 0,15 M a 4 °C, mientras que la solución de NaCl se cambió tres veces. La muestra dializada se purificó a través de una columna Sepharose CL-4B, y se recogió el pico fuera del volumen vacío. Basándose en los resultados del análisis, las fracciones que contenían el conjugado se agruparon, se filtraron de forma estéril y se almacenaron a 4 °C.

2-3. Síntesis de conjugados de polisacárido Hib-CRM197A

De acuerdo con el método descrito en la sección anterior "síntesis del conjugado de polisacárido Hib-P2CRM197A", la presente invención eligió seis proteínas transportadoras quiméricas adicionales que comprenden epítomos universales, incluyendo proteínas transportadoras quiméricas CRM197AP2, P2CRM197AP2, P30CRM197A, OVApCRM197A, P30CRM197AP2, P2P30CRM197AOVAp, y la muestra de control usando la proteína transportadora CRM197A, para preparar un total de 7 conjugados, es decir, Hib-CRM197AP2, Hib-P2CRM197AP2, Hib-P30CRM197A, Hib-OVApCRM197A, Hib-P30CRM197AP2, Hib-P2P30CRM197AOVAp, y Hib-CRM197A.

3. Preparación de conjugados de polisacárido-P2CRM197A *Neisseria meningitidis* (Men) 4-valentes

El método ADH se utilizó para sintetizar conjugados de polisacárido-P2CRM197A de *Neisseria meningitidis*. El método tiene dos etapas, es decir, derivación de polisacárido y síntesis de conjugado.

3-1. Síntesis de conjugado de la cepa A de polisacárido-P2CRM197A (MenA-P2CRM197A) de *Neisseria meningitidis*

3-1-1. Derivación de los polisacáridos de la cepa A (MenA) de *Neisseria meningitidis*

Se disolvieron 20 mg de polisacáridos MenA en 4 ml de agua pura y se activaron mediante la adición de bromuro de

cianógeno. A la mezcla de reacción se añadieron 10 ml de solución de ADH para alcanzar una concentración final de 0,4 M, y se dejó reaccionar durante la noche a 2-8 °C. La mezcla de reacción se dializó contra cloruro sódico 0,2 M. La muestra se cargó en una columna G-50, y se recogió el pico fuera del volumen vacío. La muestra de conjugado se transfirió a una bolsa de diálisis, se dializó contra agua pura y se liofilizó para obtener el derivado de polisacárido sólido. El derivado de polisacárido se debería almacenar a menos de -20 °C o menos.

3-1-2. Síntesis de conjugado de polisacárido MenA-P2CRM197A

Se pesaron 5 mg de derivado de polisacárido MenA y se añadieron a un matraz de reacción. Se añadieron 0,5 ml de NaCl 0,15 M al matraz de reacción, se agitó para disolver el polisacárido y se colocó a temperatura ambiente seguido de 4 °C durante la noche para asegurar la disolución completa del polisacárido. La concentración del polisacárido en la mezcla fue de 20 mg/ml. La solución de polisacárido se filtró estéril a través de una membrana de 0,45 µm en un matraz de reacción. Se usó NaOH 0,1 M o HCl 0,1 N para ajustar el pH de la solución filtrada a 5,5. Se añadió una solución que contenía 5 mg de P2CRM197A al matraz de reacción, y se agitó para mezclar completamente. Se añadieron 2,9 mg de EDC al matraz de reacción, se agitó y se dejó reaccionar durante 4 horas. La mezcla de reacción se transfirió a una bolsa de diálisis (MWCO 6-8 KDA) contra una solución de NaCl 0,15 M a 4 °C, mientras que la solución de NaCl se cambió tres veces. La muestra dializada se purificó a través de una columna Sepharose CL-4B, y se recogió el pico fuera del volumen vacío. Basándose en los resultados del análisis, las fracciones que contenían el conjugado se agruparon, se filtraron de forma estéril y se almacenaron a 4 °C.

3-1-3. Síntesis de otros conjugados de polisacárido-CRM197A de *Neisseria meningitidis*

De acuerdo con el método descrito en la sección anterior "síntesis del conjugado de polisacárido MenA-P2CRM197A", se sintetizaron tres conjugados adicionales, incluyendo el polisacárido del grupo C- P2CRM197A (denominado MenC-P2CRM 197A) de *Neisseria meningitidis*, polisacárido del grupo Y-P2CRM 197A (denominado MenY-P2CRM197A) de *Neisseria meningitidis*, y polisacárido del grupo W135-P2CRM197A (denominado MenW135-P2CRM197A) de *Neisseria meningitidis*.

3-2. Preparación de otros conjugados de polisacárido-CRM197A de *Neisseria meningitidis* 4-valentes

De acuerdo con el método descrito en la sección anterior "Preparación de conjugados de polisacárido-P2CRM197A de *Neisseria meningitidis* (Men) 4-valentes", la presente invención eligió seis proteínas transportadoras quiméricas que comprenden epítopos universales, incluyendo proteínas transportadoras quiméricas CRM197AP2, P2CRM197AP2, P30CRM197A, OVApCRM197A, P30CRM197AP2, P2P30CRM197AOVAp, y la muestra de control usando la proteína transportadora CRM197A, para preparar un total de 7 tipos de conjugados, es decir, 4Men-CRM197AP2, 4Men-P2CRM197AP2, 4Men-P30CRM197A, 4Men-OVApCRM197A, 4Men-P30CRM197AP2, 4Men-P2P30CRM197AOVAp y 4Men-CRM197A.

VI. Evaluación de las propiedades inmunogénicas de los conjugados de polisacárido-proteína

Las vacunas preparadas usando los conjugados de polisacárido-proteína correspondientes se inyectaron en ratones. Se recogieron muestras de sangre y se usaron ensayos ELISA para determinar los títulos de los anticuerpos antipolisacáridos en el suero. Los ensayos de opsonofagocitosis se usaron para evaluar la mejora de la inmunogenicidad.

1. Evaluación de la inmunogenicidad de los conjugados de polisacárido-proteína de *Streptococcus pneumoniae* 13-valentes

1) Evaluación de la inmunogenicidad de los conjugados de polisacárido Pn-P2CRM197A 13-valentes

Para evaluar si los conjugados de polisacárido-proteína que comprenden proteínas transportadoras quiméricas CRM197A que tienen epítopos universales tienen una inmunogenicidad superior que los conjugados de polisacárido-proteína que comprenden la proteína transportadora CRM197A sin epítopos universales, los conjugados de Pn-CRM197A 13-valentes se sintetizaron para servir como un control para evaluar la mejora de la inmunogenicidad de los conjugados de proteína transportadora quimérica Pn-CRM197A 13-valentes.

1-1. Preparación de una vacuna de conjugado de polisacárido Pn-proteína P2CRM197A 13-valente y una vacuna de conjugado de proteína de polisacárido Pn-CRM197A 13-valente

El sistema de filtración de flujo tangencial LABSCALE™ (TFF) (Millipore, USA) se usó para concentrar cada una de las soluciones de conjugados que comprenden polisacáridos capsulares Pn-1, -3, -4, -5, -6 A, -7F, -9V, -14, -18C, -19 A, -19F y -23F a una concentración de polisacárido de aproximadamente 40 µg/ml. La concentración de la solución del conjugado que comprende polisacáridos capsulares de serotipo Pn-6B se concentró a una concentración de polisacárido de 80 µg/ml. De acuerdo con las concentraciones finales de polisacáridos enumerados en la Tabla 1 a continuación, se añadió un volumen calculado correspondiente de cada uno de los conjugados de serotipo único al frasco de preparación.

Tabla 1. Concentraciones finales de soluciones conjugadas de un solo serotipo

Serotipo del polisacárido en el conjugado	Concentración de solución conjugada (mg/ml)	Concentración de polisacárido (mg/ml)
1	40	1
3	40	2
4	40	1
5	40	1
6A	40	2
6B	80	4
7F	40	1
9V	40	1
14	40	1
18C	40	1
19A	40	2
19F	40	2
23F	40	2

La mezcla de conjugado se filtró estéril a través de un filtro de 0,22 µm. Se añadió gel de fosfato de aluminio estéril para alcanzar una concentración final de iones de aluminio de 125 mg/ml. Se añadió tampón al volumen final y se envasó en 0,5 ml/frasco.

1-2. Preparación de conjugados de polisacárido-proteína de *Streptococcus pneumoniae* (Pn) 13-valentes que comprenden otras proteínas transportadoras quiméricas que tienen epítomos universales

De acuerdo con el método descrito en las secciones anteriores "Preparación de conjugados de proteína de polisacárido Pn-P2CRM197AP2 13-valentes", la presente invención preparó vacunas correspondientes a los siguientes conjugados de proteína transportadora quimérica de polisacárido Pn-CRM 197 13-valentes, que se usaron en ensayos de evaluación de inmunogenicidad.

Vacunas preparadas usando conjugados de polisacárido Pn 13-valentes que comprenden proteínas transportadoras quiméricas que tienen un epítomo universal P2: 13Pn-CRM197AP2, 13Pn-P2CRM197AP2, 13Pn-P2P2CRM197A, 13Pn-CRM197AP2P2, 13Pn-P2P2CRM197P2, y 13Pn-P2CRM197AP2P2.

Vacunas preparadas usando conjugados de polisacárido Pn 13-valentes que comprenden proteínas transportadoras quiméricas que tienen un epítomo universal P30: 13Pn-P30CRM197A, 13Pn-CRM197AP30, 13Pn-P30CRM197AP30, 13Pn-P30P30CRM197A, 13Pn-CRM197AP30P30, 13Pn-P30P30CRM197AP30, y 13P30CRM197AP30P30.

Vacunas preparadas usando conjugados de polisacárido Pn 13-valentes que comprenden proteínas transportadoras quiméricas que tienen un epítomo universal OVAp: 13Pn-OVApCRM197A, 13Pn-CRM197AOVAp, 13Pn-OVApCRM197AOVAp, 13Pn-OVApOVApCRM 197A, 13Pn-CRM197AOVApOVAp, 13Pn-OVApOVApCRM197AOVAp, y 13Pn-OVApCRM197AOVApOVAp.

Vacunas preparadas usando conjugados de polisacárido Pn 13-valentes que comprenden proteínas transportadoras quiméricas que tienen al menos dos tipos diferentes de epítomos universales: 13Pn-P30CRM197AP2, 13Pn-P2CRM197AP30, 13Pn-P2P30CRM197AP2, y 13Pn-P2P30CRM197AOVAp.

1-3. Inmunización de ratones y recolección de sangre

Se obtuvieron 70 ratones KM57 de 5-6 semanas de edad. A cada ratón se le inyectó la vacuna de conjugado de polisacárido Pn-proteína P2CRM197A 13-valente preparada. El volumen de inyección fue de 0,1 ml/ratón/tiempo. Los ratones se dividieron en dos grupos: al grupo 1 se le inyectó la vacuna de polisacárido Pn-P2CRM197A 13-valente; al grupo 2 se le inyectó la vacuna Pn polisacárido-CRM197A 13-valente como control. El calendario de inmunización de los ratones fue como se muestra en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2. Calendario de inmunización.

Grupo de inmunización	Numero de ratones	Numero de inyecciones	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
13Pn-P2CRM197A	10	1	Inyectar	Extraer sangre	-	-	-	-
	10	2	Inyectar	-	Inyectar	Extraer sangre	-	-
	10	3	Inyectar	-	Inyectar	-	Inyectar	Extraer sangre

(continuación)

Grupo de inmunización	Numero de ratones	Numero de inyecciones	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
13Pn-CRM197A	10	1	Inyectar	Extraer sangre	-	-	-	-
	10	2	Inyectar	-	Inyectar	Extraer sangre	-	-
	10	3	Inyectar	-	Inyectar	-	Inyectar	Extraer sangre

5 Se recogieron muestras de sangre en tubos de centrifuga, se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 2 horas y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Una pipeta se usó para extraer cuidadosamente el suero del sobrenadante, y se almacenó en un refrigerador a 4 °C para su análisis posterior.

1-4. Determinación del título de anticuerpo anti-polisacárido en suero de ratones usando ELISA

10 13 soluciones, cada una con 1 mg/ml de uno de los polisacáridos específicos de serotipo 13 Pn (en solución 1X PBS), se prepararon y almacenaron en un refrigerador a 4 °C. Las soluciones de polisacárido Pn específicas de serotipo se diluyeron a 2-4 µg/ml en tampón de revestimiento. Se añadieron 100 µl de tampón de revestimiento a cada pocillo de una placa ELISA para revestir el pocillo, y se incubaron a temperatura ambiente durante la noche. Los pocillos se lavaron con el tampón de lavado 4 veces y se añadieron 100 µl de tampón de bloqueo a cada pocillo, incubados a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos se lavaron con tampón de lavado 4 veces, y se
15 pudieron almacenar a 4 °C durante 1 semana.

Las muestras de suero obtenidas de ratones inyectados con vacunas conjugadas o muestra de control se diluyeron 1:10 para obtener muestras de suero de trabajo, que se diluyeron aún más mediante un número apropiado de plegamientos y se añadieron a la primera fila de pocillos en la placa ELISA, con un volumen total de 200 µl por pocillo. Una dilución doble en serie de la primera fila de muestras se preparó en las siguientes filas, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos se lavaron con tampón de lavado 4 veces. A cada pocillo se añadieron 100 µl de anticuerpo de cabra-anti-ratón marcado con fosfatasa alcalina (dilución 1:2000), y se incubaron a temperatura ambiente durante 4 horas. Los pocillos se lavaron con tampón de lavado 4 veces. A cada pocillo se añadieron 100 µl de sustrato de 4-nitrofenilfosfato disódico, y se registró DO a una longitud de onda de
20 405 nm. Los títulos para los anticuerpos de polisacárido Pn específicos de serotipo en suero de ratones fueron como se muestran en la Tabla 3 a continuación.
25

Tabla 3. Títulos de anticuerpos de polisacárido Pn específicos de serotipo.

Serotipo	Título de anticuerpos en suero de ratones contra cada uno de los polisacáridos específicos de serotipo 13 Pn (Eu)					
	13Pn-P2CRM197A			13Pn-CRM197A		
	1 descarga	2 descargas	3 descargas	1 descarga	2 descargas	3 descargas
1	0,02	1,82	5,65	0,02	0,74	1,85
3	0,03	1,52	4,12	0,01	0,62	1,54
4	0,06	2,04	8,56	0,04	1,04	1,68
5	0,02	2-21	5,67	0,02	0,83	1,09
6A	0,03	1,34	5,79	0,07	0,73	1,18
6B	0,02	0,96	4,92	0,03	0,46	0,98
7F	0,01	1,32	5,91	0,01	0,55	1,24
9V	0,05	0,85	5,54	0,01	0,71	1,14
14	0,04	2-13	5,12	0,03	0,87	1,22
18C	0,02	1,08	4,32	0,05	0,58	1,84
19A	0,01	0,64	3,34	0,02	0,54	1,12
19F	0,02	1,12	4,78	0,02	0,68	1,62
23F	0,03	0,85	4,44	0,01	0,55	1,78

30 Los resultados mostraron que las vacunas de conjugados que comprenden proteínas transportadoras quiméricas que tienen epítopos universales, es decir, los conjugados de polisacárido capsular Pn-P2CRM197A 13-valentes que comprenden la proteína transportadora quimérica P2CRM197A, tiene una inmunogenicidad superior que los conjugados de polisacárido capsular Pn-CRM197A 13-valentes. Los títulos de los anticuerpos IgG específicos contra los polisacáridos Pn en suero de ratones después de tres inyecciones fueron significativamente más altos que los
35 títulos de los anticuerpos IgG después de una o dos inyecciones. Cada título de anticuerpo específico de serotipo después de tres inyecciones fue superior a más de 4 veces el título después de una inyección, satisfacer los estándares de la OMS para aumentar los títulos de vacunas conjugadas. En comparación con los conjugados de polisacárido capsular Pn-CRM197A 13-valentes, los conjugados Pn PS-P2CRM197A 13 valentes tenían títulos de anticuerpos más altos contra cada CP específico de serotipo después de tres inyecciones en el suero de ratones.
40

1-5. Ensayo opsonofagocítico (OPA)

El ensayo opsonofagocítico es un método para evaluar la eficacia bactericida de una vacuna basada en conjugado de polisacárido Pn. Las muestras de suero de ratones se analizaron usando el "protocolo para el ensayo de destrucción opsonofagocítica multiplexada para anticuerpos contra *Streptococcus pneumoniae* polisacárido capsular" por UAB-MOPA. Las concentraciones de OPA se muestran en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4. Concentraciones de OPA.

Serotipo	13Pn-CRM197A (Suero después de tres inyecciones)	13Pn-P2CRM197A (Suero después de tres inyecciones)
1	1024	8192
3	512	4096
4	1024	8192
5	2048	8192
6 A	1024	4096
6B	512	2048
7F	1024	8192
9V	512	4096
14	2048	8192
18C	512	4096
19A	512	4096
19F	1024	8192
23F	1024	8192

10 Los resultados del experimento mostraron que las concentraciones de OPA de las muestras de suero de ratones obtenidas después de tres inyecciones de los conjugados Pn PS-P2CRM197A 13 valentes aumentaron significativamente en comparación con las concentraciones de OPA de las muestras de suero de ratones obtenidas después de tres inyecciones de conjugados Pn PS-CRM197A 13 valentes.

15 2) Evaluación de la inmunogenicidad de otros conjugados Pn PS-CRM197A 13-valentes

Similar a los métodos descritos en las secciones anteriores "Evaluación de la inmunogenicidad de los conjugados Pn PS-P2CRM197A 13-valentes", los títulos de los anticuerpos anti-polisacárido IgG como respuesta a las otras vacunas que comprenden proteínas transportadoras quiméricas que tienen epítopos universales se muestran en la
 20 Tabla 5 a continuación. La Tabla 5 solo enumera los títulos de IgG anti-polisacárido después de tres inyecciones.

Tabla 5. Títulos de IgG anti-PS.

Nombre de la vacuna	Título de anticuerpo IgG anti-Pn PS en suero de ratones después de 3 inyecciones (Eu)																
	Pn1	Pn3	Pn4	Pn5	Pn6A	Pn6B	Pn7F	Pn9V	Pn14	Pn18C	Pn19A	Pn19F	Pn23F				
13Pn-P2CRM197A	4,65	4,12	8,56	5,67	4,79	4,92	5,91	4,54	5,12	4,32	4,34	5,78	4,44				
13Pn-CRM197AP2	5,24	5,52	9,05	4,78	4,96	5,23	5,14	4,21	4,94	4,59	5,01	5,08	4,13				
13Pn-P2CRM197AP2	6,52	6,01	12,02	6,58	7,01	5,23	5,78	5,89	7,64	5,70	5,25	6,79	5,01				
13Pn-P2P2CRM197A	4,78	4,96	11,24	5,98	6,54	5,15	6,02	3,23	6,78	6,01	4,89	5,92	4,78				
13Pn-CRM197AP2P2	5,02	4,54	10,45	6,13	6,95	4,79	5,81	4,01	7,29	5,83	4,55	6,11	4,86				
13Pn-P2P2CRM197AP2	4,12	4,33	9,79	5,10	6,09	4,30	5,24	3,89	5,98	5,01	4,66	6,01	4,58				
13Pn-P2CRM197AP2P2	4,46	4,06	8,86	5,78	6,12	4,78	5,63	4,14	6,34	4,98	4,59	5,96	4,12				
13Pn-P30CRM197A	4,34	3,56	10,92	7,38	6,15	5,12	5,90	3,69	7,24	4,45	3,39	4,02	4,65				
13Pn-CRM197AP30	4,76	3,01	11,05	6,89	6,54	5,08	6,32	3,19	6,54	4,38	3,01	3,98	4,16				
13Pn-P30CRM197AP30	5,89	4,61	12,89	8,82	7,54	4,25	8,04	5,32	9,29	5,04	4,87	3,25	5,68				
13Pn-P30P30CRM197A	4,79	5,24	10,54	7,98	7,01	6,84	7,26	5,07	8,39	4,15	3,98	3,84	4,71				
13Pn-CRM197AP30P30	4,61	4,95	11,23	7,65	6,90	4,02	6,89	4,87	8,54	3,91	4,05	3,81	4,34				
13Pn-P30P30CRM197P30	4,57	5,37	9,27	8,14	6,53	5,78	7,09	4,62	7,98	3,76	3,39	4,50	4,01				
13Pn-P30CRM197P30P30	4,32	5,78	10,32	7,98	7,49	4,17	6,99	5,16	7,75	4,08	3,74	4,01	4,25				
13Pn-OVApCRM197A	4,78	4,97	8,12	6,24	4,31	2,12	4,11	3,26	4,98	4,25	3,04	4,08	3,65				
13Pn-CRM197AOVAp	4,24	5,01	9,36	6,36	5,78	3,25	4,89	4,12	5,54	5,49	2,78	5,28	4,77				
13Pn-OVApCRM197AOVAp	5,27	6,78	11,83	7,68	7,21	4,25	6,75	5,21	7,02	6,79	3,69	6,68	4,12				
13Pn-OVApOVApCRM197A	4,21	4,74	9,45	6,39	5,74	3,25	5,71	4,44	5,70	5,31	4,01	4,89	3,32				
13Pn-CRM197AOVApOVAp	4,01	3,32	8,94	6,73	5,42	4,08	5,68	3,94	5,52	4,23	3,02	5,01	3,19				
13Pn-OVApOVApCRM197A OVAp	3,89	4,01	8,99	7,24	4,70	3,58	5,94	3,30	4,58	4,91	2,88	4,59	2,74				
13Pn-OVApCRM197AOVAp OVAp	4,06	3,83	8,56	6,93	4,27	4,25	6,04	2,98	3,98	5,01	3,44	4,87	3,36				
13Pn-P2CRM197AP30	6,25	7,12	11,59	8,34	6,69	6,57	7,39	5,37	6,93	6,26	5,61	6,70	5,51				
13Pn-P30CRM197AP2	7,12	6,58	10,89	8,11	7,03	7,64	6,88	6,06	7,11	5,89	5,43	7,05	4,88				
13Pn-P2P30CRM197AP2	6,94	6,44	10,32	8,54	7,58	7,62	7,73	7,41	6,73	6,39	6,46	6,49	5,11				
13Pn-P2P30CRM197OVAp	4,52	4,26	8,47	6,48	7,98	5,53	5,61	5,54	4,66	5,27	5,63	6,56	4,71				
13Pn-CRM197A (Control)	1,05	1,12	2,68	1,39	1,18	0,98	1,22	1,14	0,98	1,34	1,12	1,62	0,88				

Los resultados anteriores demostraron que la inmunogenicidad de los conjugados de Pn PS 13-valentes que comprenden las proteínas transportadoras quiméricas CRM197A que tienen epítomos universales aumentó significativamente en comparación con los conjugados de Pn PS 13-valentes que comprenden la proteína transportadora CRM197A sin epítomos universales. Los conjugados de Pn PS 13-valentes que comprenden una proteína transportadora quimérica CRM197A que tiene dos copias del mismo epítomo universal tenían una inmunogenicidad más alta que los conjugados de Pn PS 13-valentes que comprenden proteínas transportadoras quiméricas CRM197A que tienen solo una copia del epítomo universal. Cuando el número de copias de un epítomo universal en la proteína transportadora quimérica se aumentó a tres, no hubo diferencia significativa en la inmunogenicidad de los conjugados de Pn PS 13-valentes preparados de los mismos, en comparación con los conjugados de Pn PS 13-valentes que comprenden una proteína transportadora quimérica CRM197A que tiene dos copias del epítomo universal. La fusión del epítomo universal en el extremo N o el extremo C de la proteína transportadora quimérica no produjo diferencias en la inmunogenicidad de los conjugados de Pn PS-proteína transportadora quimérica CRM197A de 13-valentes correspondientes. Las proteínas transportadoras quiméricas que tienen al menos dos tipos diferentes de epítomos universales aumentaron aún más la inmunogenicidad de los correspondientes conjugados de Pn PS-proteínas transportadoras quiméricas CRM197A 13-valentes.

2. Evaluación de la inmunogenicidad de los conjugados de Hib PS-proteína transportadora quimérica CRM197A

2-1. Preparación de una vacuna basada en conjugados de Hib PS-proteína quimérica CRM197A

Los polisacáridos Hib (Hib PS) se usaron para preparar conjugados que comprenden la proteína transportadora CRM197A, o cualquiera de los 6 tipos diferentes de proteínas transportadoras quiméricas CRM197A que tienen epítomos universales. Los conjugados de Hib PS- proteína se usaron para preparar además las vacunas correspondientes para inyección. El método es como se describe a continuación:

El sistema de filtración de flujo tangencial LABSCALE™ (TFF) (Millipore, USA) se usó para concentrar cada una de las soluciones de conjugados de CP-proteína a una concentración de polisacárido de aproximadamente 25 µg/ml. Las soluciones concentradas se esterilizaron cada una a través de un filtro de 0,22 µm. Se añadió adyuvante de fosfato de aluminio estéril a cada solución para alcanzar una concentración final de iones de aluminio de 125 mg/ml. Las soluciones de vacuna se agitaron para mezclar bien y se almacenaron en un refrigerador de 2-8 °C.

2-2. Inmunización y evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas.

Se usaron métodos similares a los descritos en la sección anterior "Evaluación de la inmunogenicidad de los conjugados de Pn PS-CRM197A de 13-valentes" para inmunizar animales, recoger muestras de sangre y determinar los títulos séricos de anticuerpos contra polisacáridos Hib usando ensayos ELISA. Los resultados son como se muestra en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6. Títulos de anticuerpos anti-Hib PS en suero de ratones.

Vacuna Hib	Título de anticuerpo IgG anti-Hib PS en suero de ratones (Eu)		
	1 inyección	2 inyecciones	3 inyecciones
Hib-P2CRM197A	0,01	1,45	5,88
Hib-CRM197AP2	0,03	1,28	6,39
Hib-P2CRM197A VP2	0,23	2-40	7,26
Hib-P30CRM197A	0,04	2,04	6,31
Hib-OVApCRM197A	0,02	2,03	9,23
Hib-P30CRM 197AP2	0,16	2-26	8,11
Hib-P2P30CRM 197AOVAp	0,06	2,09	6,41
Hib-CRM197A (Control)	0,02	0,78	2-41

Los títulos del anticuerpo anti-Hib PS anterior mostraron resultados similares de los diferentes tipos de conjugados de proteína quimérica Hib PS-CRM197A. En comparación con los conjugados de Hib PS-proteína CRM197A sin epítomos universales, los otros seis conjugados que comprenden proteínas transportadoras quiméricas CRM197A que tienen epítomos universales, es decir, Hib-P2CRM197A, Hib-P2CRM197AP2, Hib-P30CRM197A, Hib-OVApCRM197A, Hib-P30CRM197AP2, y Hib-P2P30CRM197AOVAp, habían mejorado significativamente los títulos de IgG. Los títulos de IgG de las muestras de suero después de tres inyecciones en comparación con los títulos de IgG de las muestras de suero después de una inyección también fueron significativamente diferentes, con una p<0,05.

3. Evaluación de la inmunogenicidad de conjugados de Men PS-proteína quimérica CRM197A 4-valentes

3-1. Preparación de una vacuna de conjugado de Men PS-proteína quimérica CRM197A (4Men-P2CRM197A) 4-valentes

El sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) LABSCALE™ (Millipore, USA) se uso para concentrar cada solución de MenA-P2CRM197A, MenC-P2CRM197A, MenY-P2CRM197A, y MenW135-P2CRM197A se conjugan a una concentración de polisacárido de aproximadamente 1000 µg/ml, y después se diluyen con solución de NaCl al 0,85 % y se mezclan para preparar una vacuna conjugada 4Men- P2CRM197A que tiene una concentración de polisacárido de cada grupo de 100 µg/ml. La solución de la vacuna se filtró a través de una membrana de 0,22 µm para eliminar las bacterias. Se añadió adyuvante de fosfato de aluminio estéril a la solución de vacuna para alcanzar una concentración final de iones de aluminio de 125 mg/ml. Las soluciones de la vacuna se almacenaron en un refrigerador de 2-8 °C.

10 3-2. Inmunización y evaluación de la inmunogenicidad de la vacuna.

Las muestras de suero se obtuvieron usando métodos similares a los descritos en la sección anterior "Evaluación de la inmunogenicidad de los conjugados de Pn PS-CRM197A 13-valentes". A cada ratón se le inyectó 0,1 ml de la solución de vacuna, con una dosis de inyección de polisacárido de 10 µg/ratón/tiempo. Los ensayos ELISA se usaron para determinar los títulos séricos de anticuerpos contra cada grupo de polisacárido Men. Los resultados son como se muestra en la Tabla 7 a continuación.

15

Tabla 7. Títulos de anticuerpos anti-Men PS en suero de ratones.

Vacuna	Grupo de PS	Título de anticuerpo IgG anti-Men PS en suero de ratones (Eu)		
		1 inyección	2 inyecciones	3 inyecciones
4Men-P2CRM197A	A	0,03	2-32	6,78
	C	0,05	1,98	5,32
	Y	0,02	1,05	4,49
	W135	0,08	1,75	5,44
4Men-CRM197AP2	A	0,02	1,65	4,98
	C	0,01	1,34	5,11
	Y	0,03	1,26	6,80
	W135	0,03	1,07	5,50
4Men-P2CRM197AP2	A	0,12	3,01	7,96
	C	0,18	2-29	9,32
	Y	0,14	2,71	7,89
	W135	0,16	2,55	7,65
4Men-P30CRM197A	A	0,02	2-40	5,66
	C	0,04	2-18	4,64
	Y	0,03	1,14	6,15
	W135	0,05	1,45	6,53
4Men-OVApCRM197A	A	0,01	2-22	4,88
	C	0,03	2-41	5,01
	Y	0,02	1,20	6,84
	W135	0,04	1,33	4,66
4Men-P30CRM197AP2	A	0,15	2-34	7,06
	C	0,20	2-24	9,39
	Y	0,11	2,01	8,89
	W135	0,13	2-40	7,45
4Men-P2P30CRM197AOVAp	A	0,04	1,65	5,16
	C	0,06	1,40	5,33
	Y	0,04	1,97	5,30
	W135	0,06	1,68	4,27
4Men-CRM197A (Control)	A	0,03	0,75	2-23
	C	0,04	0,62	1,85
	Y	0,02	0,98	1,96
	W135	0,06	0,82	1,77

20 Los títulos del anticuerpo PS anti-Men anterior mostraron resultados similares a los de los conjugados Pn PS 13-valentes y los conjugados Hib PS. En comparación con los conjugados de Men PS-proteína CRM197A 4-valentes sin epítomos universales, los conjugados que comprenden proteínas transportadoras quiméricas CRM197A que tienen epítomos universales tenían títulos de IgG anti-PS específicos significativamente más altos. Los títulos de IgG de las muestras de suero después de tres inyecciones en comparación con los títulos de IgG de las muestras de suero después de una inyección también fueron significativamente diferentes, con una p<0,05.

25

Ejemplo 2: Preparación y evaluación de la inmunogenicidad de conjugados de polisacárido-proteína que comprenden una proteína transportadora quimérica que comprende la proteína de superficie de rotavirus VP8 (CoreVP8) y un epítomo universal

I. Diseño de secuencia de proteínas quiméricas CoreVP8 y Core VP8 que comprenden epítomos universales

1. Diseño de secuencia de CoreVP8

5 El rotavirus se puede dividir en diferentes tipos, subtipos y serotipos basados en las propiedades inmunogénicas del virus. En la actualidad, se han descubierto 7 serotipos (serotipo A-G). La mayoría de los rotavirus patógenos humanos pertenecen a los serotipos A, B y C. Los grupos de antígenos de las proteínas de la cápside de superficie VP7 y VP4 de diferentes rotavirus son diferentes, y cada uno puede inducir independientemente los anticuerpos neutralizantes correspondientes. El serotipo de un rotavirus se puede determinar por la inmunogenicidad específica de los antígenos VP4 y VP7. El rotavirus A se puede clasificar adicionalmente como serotipo G y serotipo P según la naturaleza de VP7 y VP4. VP4 es una proteína que la tripsina puede dividir en dos proteínas virales diferentes, es decir, VP8 y VP5. La investigación ha demostrado que VP5 tiene una secuencia de aminoácidos estable, pero la secuencia de aminoácidos de VP8 está asociada con una alta tasa de mutación. La secuencia de VP8 determina si el virus pertenece al serotipo P. Por tanto, la proteína de superficie VP8 se puede usar como antígeno para inmunizar animales con el fin de obtener un antígeno con un amplio alcance de protección. La presente invención usa VP8 como una proteína transportadora inmunogénica en conjugados de polisacárido-proteína. Los antígenos derivados de la proteína transportadora inmunogénica VP8 en los conjugados pueden desencadenar la producción de anticuerpos en la población humana inmunizada y proporcionar inmunidad contra la infección por rotavirus.

15 El serotipo P de la cepa de rotavirus Wa pertenece al serotipo P1A y comprende el 90 % de todas las cepas de rotavirus patógenos endémicos en humanos. La presente invención se basa en el gen que codifica la subunidad VP8 en VP4 de la cepa de rotavirus Wa. El gen VP8 se modificó, se clonó, se expresó y se purificó para preparar proteínas transportadoras en vacunas conjugadas.

20 La proteína VP8 de la cepa Wa del rotavirus humano tiene 247 aminoácidos y un peso molecular de 32.000 Dalton. La secuencia de aminoácidos se muestra a continuación en SEQ ID NO: 67.

(SEQ ID NO:67)

MASLIYRQLLSNSYVTNISDEVNEIGTKKTTNVTVNP GPFAQTGYAPVDWGHGELPDSTLVQ
 PTLDGPYQPTSLNLPVDYWMLIAPTREGKVAEGTNTTDRWFACVLVEPNVQNTQRQYVLDGR
 NVQLNVSNESRTSWKFILFIKLTDPGTYTQYSTLSTPHKLCAWMKRDNRVYWYQGATPNASE
 SYYL TINNDNSNVSSDAEFYLI PQSQTAMCTQYINNGLPPIQNTRNIVPVNITSRQIKDAIR

30 La proteína viral VP8 es una proteína de la cápside del rotavirus y es una proteína estructural. La proteína VP8 de longitud completa tiene poca solubilidad en agua. Si se usa VP8 de longitud completa como proteína transportadora para sintetizar conjugados, el proceso de purificación podría ser difícil y el rendimiento de los conjugados podría ser bajo. Para superar este problema, el gen que codifica la proteína VP8 de longitud completa se puede escindir selectivamente para clonar fragmentos de VP8 de longitud variable, para mejorar la solubilidad en agua de la proteína VP8 escindida. A pesar de la escisión, los principales epítomos de la proteína VP8 deben conservarse. El sitio de escisión de la proteína VP8 puede estar en el extremo N, el extremo C, o en ambos de la proteína. Una realización preferente de la presente invención tiene la escisión tanto del extremo N como del extremo C de la proteína VP8, es decir, escisión antes de la posición 64 del extremo N y después de la posición 223 cerca del extremo C. La proteína VP8 escindida tiene 160 aminoácidos. Los experimentos han demostrado que esta secuencia abarca la región del receptor que media la unión del rotavirus a las células hospedadoras. Los ácidos siálicos en la superficie de las células hospedadoras se consideran el ligando para la unión de VP8. El polipéptido VP8 escindido se denomina VP8 central, con un peso molecular de 28 kDa. La secuencia de aminoácidos de CoreVP8 se muestra a continuación en SEQ ID NO: 5.

(SEQ ID NO:5)

LDGPYQPTSLNLPVDYWMLIAPTREGKVAEGTNTTDRWFACVLVEPNVQNTQRQYVLDGRNV
QLNVSNESRTSWKFILFIKLTDPGTYTQYSTLSTPHKLCAWMKRDNRVYWYQGATPNASESY
YLTINNDNSNVSSDAEFYLI PQSQTAMCTQYINNGL

Los experimentos han demostrado que el polipéptido CoreVP8 tiene una alta solubilidad en agua y es fácil de

purificar. Además, como una proteína transportadora para conjugados, CoreVP8 permite un alto rendimiento de los conjugados sintetizados.

2. *Diseño de secuencia de proteínas portadoras quiméricas Core VP8 que comprenden un epítipo universal*

Los epítipos universales se fusionaron con la proteína transportadora inmunogénica CoreVP8 para construir una nueva proteína transportadora quimérica útil para la preparación de conjugados de polisacárido-proteína. El epítipo universal puede fusionarse con el extremo N o el extremo C de la proteína CoreVP8. Alternativamente, dos epítipos universales diferentes pueden fusionarse cada uno con el extremo N o el extremo C de la proteína CoreVP8 respectiva. En una tercera estrategia, dos copias del mismo epítipo universal pueden fusionarse entre sí y después fusionarse con el extremo N o el extremo C de la proteína CoreVP8.

Como el diseño de secuencia para las proteínas transportadoras quiméricas que comprenden CoreVP8 y epítipos universales es similar al de las proteínas transportadoras quiméricas que comprenden CRM197A y epítipos universales, la presente descripción describe varias proteínas portadoras quiméricas CoreVP8 representativas que comprenden epítipos universales. Debe entenderse que la presente invención no se limita a los ejemplos descritos en el presente documento.

2-1 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica que comprende P2 y Core VP8*

2-1-1 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P2-extremo-N-CoreVP8 (P2CoreVP8)*

Una copia de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) se fusionó con el extremo N de la proteína transportadora CoreVP8 (SEQ ID NO: 5) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P2CoreVP8. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 39. La secuencia del epítipo P2 está subrayada.

(SEQ ID NO:39)

QYIKANSKFIGITELGSGSGLDGPYQPTSLNLPVDYWMLIAPTREGKVAEGTNTTDRWFACV
 LVEPNVQNTQRQYVLDGRNVQLNVSNESRTSWKFILFIKLTDPGTYTQYSTLSTPHKLCAWM
 KRDNRVYWYQGATPNASESYYLTINNDNSNVSSDAEFYLI PQSQTAMCTQYINNGL

2-1-2 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P2-extremo-N-CoreVP8-extremo-C-P2 (P2CoreVP8P2)*

Una copia de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) se fusionó con el extremo N y el extremo C de la proteína transportadora CoreVP8 (SEQ ID NO: 5) respectivamente, cada uno a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P2CoreVP8P2. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 40. La secuencia del epítipo P2 está subrayada.

(SEQ ID NO:40)

QYIKANSKFIGITELGSGSGLDGPYQPTSLNLPVDYWMLIAPTREGKVAEGTNTTDRWFACV
 LVEPNVQNTQRQYVLDGRNVQLNVSNESRTSWKFILFIKLTDPGTYTQYSTLSTPHKLCAWM
 KRDNRVYWYQGATPNASESYYLTINNDNSNVSSDAEFYLI PQSQTAMCTQYINNGLGSGSGQ
YIKANSKFIGITEL

2-2 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica que comprende P30 y Core VP8*

2-2-1 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P30-extremo-N-CoreVP8 (P30 CoreVP8)*

Una copia de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionó con el extremo N de la proteína transportadora CoreVP8 (SEQ ID NO: 5) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos,

para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P30CoreVP8. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 41. La secuencia del epítipo P30 está subrayada.

(SEQ ID NO:41)

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSGSGLDGPYQPTSLNLPVDYWMLIAPTREGKVAEGTNTTDD
 RWFACVLVEPNVQNTQRQYVLDGRNVQLNVSNESRTSWKFILFIKLTDPGTYTQYSTLSTPH
 KLCAWMKRDNRVYWYQGATPNASESYYLTINNDNSNVSSDAEFYLI PQSQ TAMCTQYINNGL

5

2-3 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica que comprende OVAp y Core VP8*

2-3-1 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica OVAp-extremo-N-Core VP8 (OVAp CoreVP8)*

10

Una copia de la secuencia de aminoácidos de OVAp (SEQ ID NO: 3) se fusionó con el extremo N de la proteína transportadora CoreVP8 (SEQ ID NO: 5) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada OVApCoreVP8. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 42. La secuencia del epítipo OVAp está subrayada.

15

(SEQ ID NO:42)

ISQAVHAAHAEINEAGRGSGSGLDGPYQPTSLNLPVDYWMLIAPTREGKVAEGTNTTDRWFA
 CVLVEPNVQNTQRQYVLDGRNVQLNVSNESRTSWKFILFIKLTDPGTYTQYSTLSTPHKLC
 AWMKRDNRVYWYQGATPNASESYYLTINNDNSNVSSDAEFYLI PQSQ TAMCTQYINNGL

20

2-4 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica que comprende al menos dos tipos diferentes de epítipos universales*

2-4-1 *Diseño de secuencia de una proteína portadora quimérica P30-extremo-N-CoreVP8-extremo-C-P2 (P30CoreVP8P2)*

25

Una copia de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionó con el extremo N de la proteína transportadora CoreVP8 (SEQ ID NO: 5) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, y una copia de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) se fusionó al extremo C de la proteína transportadora CoreVP8 (SEQ ID NO: 5) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P30CoreVP8P2. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 43. Las secuencias de los epítipos P2 y P30 están subrayadas.

30

(SEQ ID NO:43)

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSGSGLDGPYQPTSLNLPVDYWMLIAPTREGKVAEGTNTTDD
 RWFACVLVEPNVQNTQRQYVLDGRNVQLNVSNESRTSWKFILFIKLTDPGTYTQYSTLSTPH
 KLCAWMKRDNRVYWYQGATPNASESYYLTINNDNSNVSSDAEFYLI PQSQ TAMCTQYINNGL
GSGSGQYIKANSKFIGITEL

35

2-4-2 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P2P30-extremo-N-CoreVP8-extremo-C-OVAp (P2P30CoreVP8OVAp)*

Una copia de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) y una copia de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionaron entre sí a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) entremedio, la

5 secuencia fusionada después se fusionó al extremo N de la proteína transportadora CoreVP8 (SEQ ID NO: 5) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas; adicionalmente, y una copia de la secuencia de aminoácidos de OVAp (SEQ ID NO: 3) se fusionó con el extremo C de la proteína transportadora CoreVP8 (SEQ ID NO: 5) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) entremedio, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P2P30CoreVP80VAp. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 44. Las secuencias de los epítomos P2, Los epítomos P30 y OVAp están subrayados.

(SEQ ID NO:44)

QYIKANSKFIGITELGSGSGFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSGSGLDGPYQPTSLNLPVDY
 WMLIAPTREGKVAEGTNTTDRWFACVLVEPNVQNTQRQYVLDGRNVQLNVSNESRTSWKFIL
 FIKLTPDGTYTQYSTLSTPHKLCAWMKRDNRVYWYQGATPNASESYYLTINNDNSNVSSDAE
FYLIPOSQTAMCTQYINNGLGSGSGISQAVHAAHAEINEAGR

10 *II. Construcción de plásmidos de expresión para proteínas transportadoras quiméricas que comprenden proteína transportadora Core VP8 y epítomo(s) universal(es)*

15 *1. Construcción de un plásmido de expresión de la proteína transportadora Core VP8*

La secuencia de aminoácidos de la cepa Wa del rotavirus humano, GenBank: AGI04377, se obtuvo en GenBank, y se determinó la secuencia del fragmento de proteína VP8. Basándose en la secuencia VP8, segmentos del extremo N y el extremo C de la secuencia de aminoácidos se eliminaron respectivamente para obtener la secuencia de aminoácidos CoreVP8. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de CoreVP8 se optimizó para permitir la expresión de alta eficacia de la proteína CoreVP8 en *Escherichia coli*.

20 Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de CoreVP8 y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia de CoreVP8. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína CoreVP8 es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 45.

(SEQ ID NO:45)

CATATG TGGATGGTCC GTATCAACCG ACGACGTTTA CCCCGCCGAA
 CGATTATTGG ATTCTGATCA ACTCAAATAC GAACGGCGTG GTTTACGAAA
 GTACCAACAA TTCCGATTTT TGGACGGCGG TCGTGGCCAT CGAACCGCAT
 GTTAATCCGG CGACCGCCA GTATACCATT TTTGGTGAAAT GCAAACAATT
 CAATGTCAGC AACGACTCTA ATAAATGGAA GTTTCTGGAA ATGTTCCGTA
 GCTCTAGTCA GAACGAATTT TATAATCGTC GCACCCTGAC GTCTGATACC
 CGTCTGGTGG GCATCCTGAA GTACGGCGGT CGCGTTTGA CCTTCCATGG
 TGAAACGCCG CGTGCAACCA CGGACTCCTC ATCGACCGCG AACCTGAACA
 ATATTTCAAT CACGATTCAC CACGATTCAC CACGATTCAC TCGGAATTTT

 ACATCATCCC GCGTAGCCAG GAAAGCAAAT GCAACGAATA CATCAATAAT
 GGTCTGTGAT AAGGATCC

30 Las enzimas NdeI y BamHI se añadieron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora CRM197A para llevar a cabo una digestión de restricción de doble enzima.

Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo. La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

2. *Construcción de plásmidos de expresión para proteínas transportadoras quiméricas que comprenden Core VP8 y epítomos universales*

Para evaluar la inmunogenicidad de los conjugados de proteína PS que comprenden una proteína transportadora quimérica CoreVP8 que tiene un epítomo universal, se diseñaron seis tipos diferentes de proteínas transportadoras quiméricas CoreVP8 como ejemplo.

2-1. *Construcción de un plásmido de expresión para P2CoreVP8*

Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de P2CoreVP8, y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia P2CoreVP8. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína P2CoreVP8 es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 46.

(SEQ ID NO:46)

CATATG CAGTACATTA AAGCAAACCTC AAAATTCATT GGCATTACCG
 AACTGGGCTC AGGCTCAGGT TGGATGGTC CGTATCAACC GACGACGTTT
 ACCCCGCCGA ACGATTATTG GATTCTGATC ACTCAAATA CGAACGGCGT
 GGTTTACGAA AGTACCAACA ATTCCGATTT CTGGACGGCG GTCGTGGCCA
 TCGAACCGCA TGTTAATCCG GTCGACCGCC AGTATAACCAT TTTTGGTGAA

 AGCAAACAAT TCAATGTCAG CAACGACTCT AATAAATGGA AGTTTCTGGA
 AATGTTCCGT AGCTCTAGTC AGAACGAATT TTATAATCGT CGCACCCCTGA
 CGTCTGATAC CCGTCTGGTG GGCATCCTGA AGTACGGCGG TCGCGTTTGG
 ACCTTCCATG GTGAAACGCC GCGTGCAACC ACGGACTCCT CATCGACCGC
 GAACCTGAAC AATATTTCAA TCACGATTCA CTCGGAATTT TACATCATCC
 CGCGTAGCCA GGAAAGCAA TGCAACGAAT ACATCAATAA TGGTCTGTGA
 GGATCC

Las enzimas NdeI y BamHI se agregaron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora P2CoreVP8 para realizar una digestión de restricción de doble enzima. Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo. La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

2-2. *Construcción de un plásmido de expresión para P2CoreVP8P2*

El método es similar al método descrito en la sección anterior "2-1. Construcción de un plásmido de expresión para P2CoreVP8.

2-3. *Construcción de plásmidos de expresión para P30CoreVP8*

ES 2 760 536 T3

5 Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de P30CoreVP8, y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia P30CoreVP8. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína P30CoreVP8 es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 47.

(SEQ ID NO:47)

```
CATATG TTCAATAATT TTACGGTGTC GTTTTGGCTG CGTGTGCCGA
AAGTGTCTGC CTCCCATCTG GAAGGTTCTG GTTCAGGTCT GGACGGTCCG
TATCAGCCGA CCACGTTTAC CCCGCCGAAC GATTACTGGA TTCTGATCAA

CAGCAATACG AACGGCGTGG TTTATGAATC AACCAACAAT TCGGATTTCT
GGACGGCGGT CGTGGCCATC GAACCGCATG TTAATCCGGT CGACCGCCAG
TACACCATCT TCGGTGAATC AAAACAATTC AACGTCAGCA ACGACTCTAA
CAAATGGAAA TTCCTGGAAA TGTTCCGTAG CTCTAGTCAG AACGAATTTT
ATAATCGTCG CACCCTGACG TCCGATACCC GTCTGGTGGG CATCCTGAAA
TACGGCGGTC GCGTTTGGAC CTTCCATGGT GAAACGCCGC GTGCAACCAC
GGACTCCTCA TCGACCGCGA ACCTGAACAA TATTAGCATC ACGATCCACT
CTGAATTCTA CATCATCCCG CGCAGTCAAG AATCCAAATG CAACGAATAC
10 ATCAACAATG GCCTGTAA GGATCC
```

15 Las enzimas NdeI y BamHI se agregaron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora P30CoreVP8 para realizar una digestión de restricción de doble enzima. Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la
20 reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo. La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

2-4. Construcción de un plásmido de expresión para OVApCoreVP8

25 Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de OVApCoreVP8, y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia OVApCoreVP8. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína OVApCoreVP8 es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 48.

ES 2 760 536 T3

(SEQ ID NO:48)

```
CATATG ATCAGCCAAG CGGTTACGC AGCCCACGCC GAAATTAACG
AAGCGGGTCG CGGTAGCGGT TCTGGCCTGG ATGGTCCGTA TCAACCGACG
ACGTTTACCC CGCCGAACGA TTATTGGATT CTGATCAACT CAAATACGAA
CGGCGTGGTT TACGAAAGTA CCAACAATTC CGATTTCTGG ACGGCGGTTCG

TGGCCATCGA ACCGCATGTT AATCCGGTCG ACCGCCAGTA TACCATTTTT
GGTCAAAGCA AACAATTCAA TGTCAGCAAC GACTCTAATA AATGGAAGTT
TCTGGAAATG TTCCGTAGCT CTAGTCAGAA CGAATTTTAT AATCGTCGCA
CCCTGACGTC TGATACCCGT CTGGTGGGCA TCCTGAAGTA CGGCGGTTCG
GTTTGGACCT TCCATGGTGA AACGCCGCGT GCAACC ACG GACTCCTCAT
CGACCGCGAA CCTGAACAAT ATTTCAATCA CGATTCACTC GGAATTTTAC
ATCATCCCGC GTAGCCAGGA AAGCAAATGC AACGAATACA TCAATAATGG
TCTGTGATAA GGATCC
```

- Las enzimas NdeI y BamHI se agregaron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora OVApCoreVP8 para realizar una digestión de restricción de doble enzima.
- 5 Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo.
- 10 La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

2-5. Construcción de plásmidos de expresión para P30CoreVP8P2

- Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de P30CoreVP8P2, y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia P30CoreVP8P2. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína P30CoreVP8P2 es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 49.
- 15

ES 2 760 536 T3

(SEQ ID NO:49)

CATATG ATCAGCCAAG CGGTTACGCG AGCCCACGCC GAAATTAACG AAGCGGGTCG
CGGTAGCGGT TCTGGCCTGG ATGGTCCGTA TCAACCGACG ACGTTTACCC
CGCCGAACGA TTATTGGATT CTGATCAACT CAAATACGAA CGGCGTGGTT
TACGAAAGTA CCAACAATTC CGATTTCTGG ACGGCGGTCG TGGCCATCGA
ACCGCATGTT AATCCGGTGC ACCGCCAGTA TACCATTTTT GGTGAAAGCA

AACAATTCAA TGTCAGCAAC GACTCTAATA AATGGAAGTT TCTGGAAATG
TTCCGTAGCT CTAGTCAGAA CGAATTTTAT AATCGTCGCA CCCTGACGTC
TGATACCCGT CTGGTGGGCA TCCTGAAGTA CGGCGGTCGC GTTTGGACCT
TCCATGGTGA AACGCCGCGT GCAACC ACG GACTCCTCAT CGACCGCGAA
CCTGAACAAT ATTTCAATCA CGATTCACTC GGAATTTTAC ATCATCCCGC
GTAGCCAGGA AAGCAAATGC AACGAATACA TCAATAATGG TCTGTGATAA
GGCTCAGGCT CAGGTCAGTA CATTAAAGCA AACTCAAAAT TCATTGGCAT
TACCGAACTG GGATCC

Las enzimas NdeI y BamHI se añadieron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora P30CoreVP8P2 para llevar a cabo una digestión de restricción de doble enzima.

- 5 Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo.
- 10 La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

2-6. Construcción de un plásmido de expresión para P2P30CoreVP80VAp

- 15 Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de P2P30CoreVP80VAp, y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia P2P30CoreVP80VAp. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína P2P30CoreVP80VAp es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 50.

(SEQ ID NO:50)

CATATG CAGTACATTA AAGCAAACCTC AAAAT TCAT TGGCATTACC
 GAACTGGGTA GCGGTTCTGG CATCAGCCAA GCGGTTACAG CAGCCCACGC
 CGAAATTAAC GAAGCGGGTC GCGGTAGCGG TTCTGGCCTG GATGGTCCGT
 ATCAACCGAC GACGTTTACC CCGCCGAACG ATTATTGGAT TCTGATCAAC
 TCAAATACGA ACGGCGTGGT TTACGAAAGT ACCAACAATT CCGATTTCTG

 GACGGCGGTC GTGGCCATCG AACCGCATGT TAATCCGGTC GACCGCCAGT
 ATACCATTTT TGGTGAAAGC AAACAATTCA ATGTCAGCAA CGACTCTAAT
 AAATGGAAGT TTCTGGAAAT GTTCCGTAGC TCTAGTCAGA ACGAATTTTA
 TAATCGTCGC ACCCTGACGT CTGATACCCG TCTGGTGGGC ATCCTGAAGT
 ACGGCGGTCG CGTTTGGACC TTCCATGGTG AAACGCCGCG TGCAACCACG
 GACTCCTCAT CGACCGCGAA CCTGAACAAT ATTTCAATCA CGATTCACTC
 GGAATTTTAC ATCATCCCGC GTAGCCAGGA AAGCAAATGC AACGAATACA
 TCAATAATGG TCTGTGATAA GGCTCAGGCT CAGGTATCAG CCAAGCGGTT
 CACGCAGCCC ACGCCGAAAT TAACGAAGCG GGTCGC GGATCC

Las enzimas NdeI y BamHI se agregaron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora P2P30CoreVP80VAp para realizar una digestión de restricción de doble enzima. Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo. La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

III. Preparación de la proteína transportadora Core VP8 y las proteínas transportadoras quiméricas CoreVP8 que comprenden un epítipo universal

Los experimentos han demostrado propiedades similares de la proteína transportadora CoreVP8 y las proteínas transportadoras quiméricas que comprenden la proteína transportadora CoreVP8 y epítipos universales. Por tanto, los métodos de purificación para todas las proteínas transportadoras descritas en el presente documento son similares. A continuación se describe un método ejemplar para preparar la proteína transportadora quimérica CoreVP8 que comprende un epítipo universal.

1. Preparación de bacterias modificadas que expresan proteínas portadoras quiméricas Core VP8 que comprenden un epítipo universal

Cada plásmido que expresa la proteína transportadora quimérica se transformó en células competentes utilizando métodos estándar de biología molecular, y se examinó la expresión de la proteína. Los clones que tenían altos niveles de expresión de proteínas y pasaron los ensayos de antisueros se seleccionaron para establecer una biblioteca de reserva maestra y una biblioteca de reserva en funcionamiento.

2. Fermentación de bacterias modificadas que expresan proteínas transportadoras quiméricas Core VP8 que comprenden un epítipo universal

Se tomó un tubo de bacterias que podía expresar una proteína portadora quimérica CoreVP8 específica que comprende un epítipo universal de la biblioteca de reserva de trabajo de *E. coli* sometido a ingeniería en el refrigerador de baja temperatura y se descongeló a temperatura ambiente. La suspensión de bacterias en el material de trabajo se transfirió a un medio de 50 ml utilizando técnicas estériles, y se cultivó en una incubadora con agitación

a 37 °C a una velocidad de agitación de 180 rpm hasta que DO₆₀₀ alcanzó aproximadamente 1,0. El cultivo bacteriano se usó para inocular un medio de cultivo de 1 l, que se cultivó en una incubadora con agitación a 37 °C a una velocidad de agitación de 180 rpm hasta que DO₆₀₀ alcanzó aproximadamente 1,0. El cultivo bacteriano de 1 l después se usó para inocular un medio de 20 l en un fermentador de 50 l, que después se fermentó a 240 rpm y 37 °C. Cuando DO₆₀₀ alcanzó aproximadamente 7-8, se añadió IPTG al cultivo para inducir la expresión de proteínas en la bacteria. La fermentación se detuvo a las 14 horas desde el comienzo del proceso de fermentación. El cultivo bacteriano fermentado se centrifugó y se recogieron las bacterias.

3. Purificación de proteínas transportadoras quiméricas Core VP8 que comprenden un epítipo universal

Dado que CoreVP8 se usó como un componente central para construir diferentes proteínas transportadoras quiméricas que tienen epítipos universales, los experimentos demostraron que a pesar de la adición de los epítipos universales, los parámetros para la purificación de proteínas no se vieron afectados significativamente. El procedimiento de purificación de la proteína transportadora CoreVP8 podría modificarse para establecer métodos de purificación para las proteínas transportadoras quiméricas CoreVP8 que comprenden un epítipo universal.

Se pesaron 50 g de bacterias húmedas en una taza de centrifuga de 2 l. Se añadieron a la taza 300 ml de tampón 1X PBS pH 7,0 para resuspender las bacterias. La suspensión de bacterias se mezcló completamente en una placa de agitación magnética durante 30 minutos, y después se centrifugó durante 20 minutos a 4 °C, 4000 rpm. El sobrenadante se descartó y las bacterias se recogieron. Estas etapas se repitieron dos veces. Al tubo de centrifuga que tenía la bacteria se añadieron 300 ml de PBS 1X pH 7,0. Las bacterias se lisaron en un homogeneizador y se centrifugaron durante 20 minutos a 4 °C, 10000 rpm. El sedimento se recogió y el sobrenadante se descartó. Al sedimento se le añadieron 300 ml de tampón PBS 1X pH 7,0, y la mezcla se mezcló completamente en una placa de agitación magnética durante 30 minutos. La mezcla se centrifugó durante 20 minutos a 4 °C, 4000 rpm. El cuerpo de inclusión se recogió y el sobrenadante se descartó. Se añadieron 900 ml de solución desnaturalizante al cuerpo de inclusión lavado. La mezcla se centrifugó después durante 30 minutos a 25 °C, 10000 rpm. El sobrenadante se recogió y el sedimento se descartó. El sobrenadante se transfirió a una bolsa de diálisis de 6-8 KDA. La bolsa de diálisis se selló y se colocó en 10 l de tampón de plegamiento 1, y se dejó equilibrar durante la noche a temperatura ambiente en una placa de agitación magnética. Al día siguiente, la bolsa de diálisis se transfirió a 10 l de tampón de plegamiento 2 y se agitó para equilibrar a temperatura ambiente durante aproximadamente 8-10 horas. La bolsa de diálisis se transfirió a 10 l de tampón de diálisis 3, y se agitó para equilibrar a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, la bolsa de diálisis se transfirió a 10 l de tampón de plegamiento 4 y se agitó para equilibrar a temperatura ambiente durante aproximadamente 8-10 horas. La bolsa de diálisis se transfirió a 10 l de tampón de plegamiento 5 y se agitó para equilibrar a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, la bolsa de diálisis se transfirió a 2 l de tampón de almacenamiento y se agitó para equilibrar a temperatura ambiente durante aproximadamente 8-10 horas. El tampón de almacenamiento se reemplazó dos veces, y la diálisis se realizó a temperatura ambiente durante la noche. Se obtuvo 1 ml de solución de diálisis y se centrifugó durante 10 minutos a temperatura ambiente y 12000 rpm. El sobrenadante se recogió y la concentración de proteína se midió. La muestra de proteína se cargó en una columna de gel DEAE preequilibrada y se eluyó con un modo de gradiente para recoger el pico de proteína diana. La muestra recogida se cargó después en una columna Q Sepharose para una purificación adicional, y se recogió el pico eluido. Finalmente, la muestra recogida se cargó en una columna de gel SP y el pico eluido se recogió. La proteína diana purificada recogida se transfirió a una bolsa de diálisis y se dializó contra un tampón de NaCl 0,15 M. La muestra dializada se transfirió a 4 °C para su almacenamiento.

IV. Preparación de conjugados de polisacárido-CoreVP8

Tres métodos sintéticos diferentes, es decir, aminación reductora, método CDAP (usando 3-(etiliminometileno-amino)-N,N-dimetil-propan-1-amina), y método ADH (usando dihidrazida de ácido adípico), se usaron para sintetizar conjugados específicos de polisacárido-CoreVP8. El rendimiento y las propiedades inmunogénicas de los conjugados formados por diferentes métodos sintéticos pueden ser diferentes. Para investigar el efecto de diferentes proteínas transportadoras quiméricas que tienen epítipos universales en la inmunogenicidad de diferentes conjugados de polisacáridos bacterianos (PS), la presente divulgación describe conjugados de PS (Pn)-CoreVP8 de *Streptococcus pneumoniae* 13-valentes, conjugados de PS-CoreVP8 de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), y conjugados de PS-CoreVP8 de *Neisseria meningitidis* (Men) 4-valentes.

1. Preparación de conjugados de Pn PS-proteína CoreVP8 13-valentes (con o sin epítipos universales)

6 proteínas transportadoras quiméricas CoreVP8 que tienen epítipos universales, incluyendo proteínas transportadoras quiméricas P2CoreVp8, P2CoreVP8P2, P30CoreVP8, OVApCoreVP8, P30CoreVP8P2 y P2P30CoreVP8OVAp, se usaron para sintetizar una vacuna de conjugado Pn PS 13-valentes: 13Pn-P2CoreVp8, 13Pn-P2CoreVP8P2, 13Pn-P30CoreVP8, 13Pn-OVApCoreVP8, 13Pn-P30CoreVP8P2, y 13Pn-P2P30CoreVP8OVAp. Los métodos para preparar estos conjugados son similares a los métodos para preparar las vacunas de conjugado de Pn PS-CRM197A 13-valentes descritos anteriormente.

2. Preparación de conjugados de Hib PS-proteína CoreVP8 (con o sin epítipos universales)

5 6 proteínas transportadoras quiméricas CoreVP8 que tienen epítomos universales, incluyendo proteínas transportadoras quiméricas P2CoreVp8, P2CoreVP8P2, P30CoreVP8, OVApCoreVP8, P30CoreVP8P2 y P2P30CoreVP8OVAp, se usaron para sintetizar una vacuna de conjugado de Hib PS: Hib-P2CoreVp8, Hib-P2CoreVP8P2, Hib-P30CoreVP8, Hib-OVApCoreVP8, Hib-P30CoreVP8P2, y 13Pn-P2P30CoreVP8OVAp. Los métodos para preparar estos conjugados son similares a los métodos para preparar las vacunas de conjugado de Hib PS-CRM197A descritas anteriormente.

3. Preparación de conjugados de Men PS-proteína CoreVP8 4-valentes (con o sin epítomos universales)

10 6 proteínas transportadoras quiméricas CoreVP8 que tienen epítomos universales, incluyendo proteínas transportadoras quiméricas P2CoreVp8, P2CoreVP8P2, P30CoreVP8, OVApCoreVP8, P30CoreVP8P2 y P2P30CoreVP8OVAp, se usaron para sintetizar una vacuna de conjugado de Men PS 4-valente: 4Men-P2CoreVp8, 4Men-P2CoreVP8P2, 4Men-P30CoreVP8, 4Men-OVApCoreVP8, 4Men-P30CoreVP8P2, y 4Men-P2P30CoreVP8OVAp. Los métodos para preparar estos conjugados son similares a los métodos para preparar las vacunas de conjugado de Men PS-CRM197A 4-valentes descritos anteriormente.

V. Evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas de conjugado de polisacárido-CoreVP8

1. Evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas de conjugado de Pn PS-CoreVP8 13-valentes

20 Se usaron métodos similares a los descritos en las secciones anteriores "Evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas de conjugado de Pn PS-P2CRM197A 13-valentes" para determinar los títulos de los anticuerpos anti-PS IgG, los resultados se muestran en la Tabla 9 siguiente. La Tabla 9 solo enumera los títulos de IgG anti-PS después de tres inyecciones.

25

Tabla 9. Títulos de IgG anti-PS en suero de ratones después de tres inyecciones de vacunas de conjugado de Pn PS-CoreVP8 13-valentes.

Nombre de la vacuna	Título de anticuerpo IgG anti-Pn PS en suero de ratones después de 3 inyecciones (Eu)																
	Pn1	Pn3	Pn4	Pn5	Pn6A	Pn6B	Pn7F	Pn9V	Pn14	Pn18C	Pn19A	Pn19F	Pn23F				
13Pn-P2CoreVP8	4,23	2,83	7,98	6,15	5,30	2,54	4,65	3,78	6,71	4,32	3,16	4,09	5,98				
13Pn-P2CoreVP8P2	3,98	3,15	8,54	6,69	5,01	3,31	5,24	3,20	6,80	4,45	3,86	3,97	4,78				
13Pn-P30CoreVP8	3,78	1,95	8,02	5,90	4,57	2,40	4,27	3,01	5,96	3,88	3,54	4,12	5,31				
13Pn-OVApCoreVP8	2,99	3,20	7,50	5,69	4,13	2,91	4,78	3,51	5,64	4,50	3,05	3,19	6,89				
13Pn-P30CoreVP8P2	6,14	3,23	8,15	6,96	5,27	5,06	6,14	4,40	6,80	6,41	4,95	5,87	8,95				
13Pn-P2P30CoreVP8OVAp	2,78	3,88	6,89	6,60	4,28	3,69	4,46	3,79	5,38	4,73	4,01	4,78	5,69				
13Pn-CoreVP8 (Control)	1,21	1,01	1,54	1,18	0,85	0,79	1,60	1,02	1,25	1,68	0,98	1,28	1,87				

Los datos de la Tabla 9 mostraron que la inmunogenicidad de los conjugados de Pn PS-CoreVP8 13-valentes que comprenden proteínas transportadoras quiméricas que tienen epítomos universales aumentó significativamente en comparación con los conjugados de Pn PS-CoreVP8 13-valentes que comprenden la proteína transportadora CoreVP8 sin un epítomo universal. Los conjugados de Pn PS 13-valentes que comprenden una proteína transportadora quimérica CoreVP8 que tiene dos copias del mismo epítomo universal tenían una inmunogenicidad más alta que los conjugados de Pn PS 13-valentes que comprenden una proteína transportadora quimérica CoreVP8 que tiene solo una copia del epítomo universal. Las proteínas transportadoras quiméricas que tienen al menos dos tipos diferentes de epítomos universales aumentaron aún más la inmunogenicidad de los conjugados de Pn PS-CoreVP8 de 13-valentes correspondientes.

2. Evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas de conjugado de Hib PS-CoreVP8

Se usaron métodos similares a los descritos en las secciones anteriores "Evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas de conjugado de Hib PS-P2CRM197A" para determinar los títulos de los anticuerpos IgG anti-PS mediante ensayos ELISA. Los resultados se muestran en la Tabla 10 siguiente.

Tabla 10. Títulos de IgG anti-PS en suero de ratones en respuesta a vacunas conjugadas Hib PS-CoreVP8.

Vacuna Hib	Título de anticuerpo IgG anti-Hib PS en suero de ratones (Eu)		
	1 inyección	2 inyecciones	3 inyecciones
Hib-P2CoreVP8	0,01	1,45	5,88
Hib-P2CoreVP8P2	0,23	2,40	7,26
Hib-P30CoreVP8	0,04	2,04	5,31
Hib-OVApCoreVP8	0,02	2,33	5,23
Hib-P2CoreVP8P30	0,16	2,26	8,11
Hib-P2P30CoreVP80V Ap	0,06	2,09	6,41
Hib-CoreVP8 (Control)	0,02	1,22	2,41

Los títulos del anticuerpo PS anti-Hib anterior mostraron resultados similares de los diferentes tipos de conjugados de proteína quimérica Hib PS-CoreVP8. En comparación con los conjugados de Hib PS-proteína CoreVP8 sin epítomos universales, los otros seis conjugados que comprenden proteínas transportadoras quiméricas CoreVP8 que tienen epítomos universales, es decir, Hib-P2CoreVP8, Hib-P2CoreVP8P2, Hib-P30CoreVP8, Hib-OVApCoreVP8, Hib-P30CoreVP8P2, y Hib-P2P30CoreVP80VAp, habían mejorado significativamente los títulos de IgG. Los títulos de IgG de las muestras de suero después de tres inyecciones en comparación con los títulos de IgG de las muestras de suero después de una inyección también fueron significativamente diferentes, con una $p < 0,05$.

3. Evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas de conjugado de Men PS-CoreVP8 4-valentes

Se obtuvieron muestras de suero usando métodos similares a los descritos en la sección anterior "Evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas de conjugado de Pn PS-P2CRM197A 13-valentes". A cada ratón se le inyectó 0,1 ml de la solución de vacuna, con una dosis de inyección de polisacárido de 10 µg/ratón/tiempo. Los ensayos ELISA se usaron para determinar los títulos séricos de anticuerpos contra cada grupo de polisacáridos. Los resultados son como se muestra en la Tabla 11 a continuación.

Tabla 11. Títulos de anticuerpos anti-Men PS en suero de ratones.

Vacuna	Grupo de PS	Título de anticuerpo IgG anti-Men PS en suero de ratones (Eu)		
		1 inyección	2 inyecciones	3 inyecciones
4Men-P2CoreVP8	A	0,04	1,80	4,68
	C	0,01	2,32	5,52
	Y	0,05	1,95	4,19
	W135	0,07	1,80	4,04
4Men-P2CoreVP8P2	A	0,20	2,51	6,06
	C	0,14	1,69	5,12
	Y	0,18	2,01	6,49
	W135	0,07	2,40	7,25
4Men-P30CoreVP8	A	0,03	1,55	3,35
	C	0,02	1,12	3,80
	Y	0,01	1,24	3,81
	W135	0,04	1,39	4,13
4Men-OV ApCoreVP8	A	0,02	1,22	3,43
	C	0,04	1,81	4,52
	Y	0,01	1,50	3,14
	W135	0,05	1,44	3,96

(continuación)

Vacuna	Grupo de PS	Título de anticuerpo IgG anti-Men PS en suero de ratones (Eu)		
		1 inyección	2 inyecciones	3 inyecciones
4Men-P30CoreVP8P2	A	0,20	2,34	7,11
	C	0,16	1,98	5,44
	Y	0,11	2,11	5,09
	W135	0,13	1,80	5,80
4Men-P2P30CoreVP8OVAp	A	0,08	1,60	4,46
	C	0,11	1,55	5,22
	Y	0,07	1,90	4,54
	W135	0,12	1,78	4,01
4Men-CoreVP8 (Control)	A	0,02	0,66	1,43
	C	0,01	0,70	1,58
	Y	0,04	0,84	1,16
	W135	0,03	1,03	1,22

Los títulos del anticuerpo PS anti-Men anterior mostraron resultados similares a los de los conjugados Pn PS 13-valentes y los conjugados Hib PS. En comparación con los conjugados de Men PS-proteína CoreVP8 4-valentes sin epítomos universales, los conjugados que comprenden proteínas transportadoras quiméricas CoreVP8 que tienen epítomos universales tenían títulos de IgG anti-PS específicos significativamente más altos. Los títulos de IgG de las muestras de suero después de tres inyecciones en comparación con los títulos de IgG de las muestras de suero después de una inyección también fueron significativamente diferentes, con una $p < 0,05$.

Ejemplo 3: Preparación y evaluación de la inmunogenicidad de los conjugados de polisacárido-proteína que comprenden una proteína transportadora quimérica que comprende la cadena de proteína A diftérica H21G (en lo sucesivo denominada H21G) y un epítomo universal

1. Diseño de secuencia de proteínas transportadoras quiméricas H21G y H21G que comprenden epítomos universales

1.1. Diseño de secuencia de H21G

La proteína transportadora H21G es una proteína recombinante basada en la cadena de toxina diftérica A, en donde la histidina (H) 21 de la cadena A de la toxina diftérica es reemplazada por una glicina (G). Similar al mutante de toxina diftérica CRM197, la cadena mutante modificada de la toxina diftérica A conserva la inmunogenicidad específica de la toxina diftérica. Los sueros anti-H21G reaccionan de forma cruzada con la toxina o el toxoide diftérico. Como H21G es similar a la toxina diftérica, desde un punto de vista de seguridad, H21G puede servir como una proteína transportadora adecuada para sintetizar vacunas conjugadas. La secuencia de aminoácidos del mutante de la toxina diftérica H21G se muestra a continuación en la SEQ ID NO: 6.

(SEQ ID NO:6)

GADDVVDSSKSFVMENFSSYGGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYDDDWKGFYSTDNKYDA
 AGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTTEEFI
 KRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQAC
 AGNRVRR

2. Diseño de secuencia de proteínas transportadoras quiméricas H21G que comprenden un epítomo universal

Los epítomos universales se fusionaron con la proteína transportadora inmunogénica H21G para construir una nueva proteína transportadora quimérica útil para la preparación de conjugados de polisacárido-proteína. El epítomo universal puede fusionarse con el extremo N o el extremo C de la proteína H21G. Alternativamente, dos epítomos universales diferentes pueden fusionarse cada uno con el extremo N o el extremo C de la proteína H21G respectiva. En una tercera estrategia, dos copias del mismo epítomo universal pueden fusionarse entre sí y después fusionarse con el extremo N o el extremo C de la proteína H21G.

Debido a los mecanismos similares de los conjugados de polisacárido-proteína que comprenden proteínas transportadoras quiméricas que tienen epítomos universales, la presente descripción describe 6 proteínas transportadoras quiméricas CoreVP8 representativas que comprenden epítomos universales. Debe entenderse que

la presente invención no se limita a los ejemplos descritos en el presente documento.

2-1 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica que comprende P30 y H21G*

5 2-1-1 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P30-extremo-N-H21G (P30H21G)*

Una copia de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionó con el extremo N de la proteína transportadora H21G (SEQ ID NO: 6) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P30H21G. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 51. La secuencia del epítipo P30 está subrayada.

(SEQ ID NO:51)

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSGSGGADDVVDSKSFVMENFSSYGGTKPGYVDSIQKGIQ
KPKSGTQGN^YDDDWKGFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDN
AETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSL^PFAEGSSSVEYINNWEQAKALS
VELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRR

15 2-1-2 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P30-extremo-N-H21G-extremo-C-P30 (P2CoreVP8P2)*

Una copia de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionó con el extremo N y el extremo C de la proteína transportadora H21G (SEQ ID NO: 6) respectivamente, cada uno a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P30H21GP30. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 52. La secuencia del epítipo P30 está subrayada.

(SEQ ID NO:52)

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSGSGGADDVVDSKSFVMENFSSYGGTKPGYVDSIQKGIQ
KPKSGTQGN^YDDDWKGFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDN
AETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSL^PFAEGSSSVEYINNWEQAKALS
VELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRGSGSGFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

25

2-2 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica que comprende P3 y H21G*

30 2-2-1 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P2-extremo-N-H21G (P2H21G)*

Una copia de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) se fusionó con el extremo N de la proteína transportadora H21G (SEQ ID NO: 6) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P2H21G. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 53. La secuencia del epítipo P2 está subrayada.

35

(SEQ ID NO:53)

QYIKANSKFIGITELGSGSGGADDVVDSKSFVMENFSSYGGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGT
QGN^YDDDWKGFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKK
ELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSL^PFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEIN
FETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRR

2-3 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica que comprende OVAp y H21G*

2-3-1 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica OVAp-extremo-N-H21G (OVApH21G)*

5 Una copia de la secuencia de aminoácidos de OVAp (SEQ ID NO: 3) se fusionó con el extremo N de la proteína transportadora H21G (SEQ ID NO: 6) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada OVApCoreVP8. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 54. La secuencia del epítipo OVAp está subrayada.

(SEQ ID NO:54)

ISQAVHAAHAEINEAGRGSGSGGADDVVDSSKSFVMENFSSYGGTKPGYVDSIQKGIQKPKS
 GTQGNYYYYDDWKGFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETI
 KKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSL PFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELE
 INFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRR

15 2-4 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica que comprende al menos dos tipos diferentes de epítopos universales*

2-4-1 *Diseño de secuencia de una proteína transportadora quimérica P2-extremo-N-H21G-extremo-C-P30 (P30H21GP2)*

20 Una copia de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionó con el extremo N de la proteína transportadora H21G (SEQ ID NO: 6) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, y una copia de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) se fusionó al extremo C de la proteína transportadora H21G (SEQ ID NO: 6) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellos, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P30H21GP2. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 55. Las secuencias de los epítopos P2 y P30 están subrayadas.

(SEQ ID NO:55)

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGSGSGGADDVVDSSKSFVMENFSSYGGTKPGYVDSIQKGIQ
 KPKSGTQGNYYYYDDWKGFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDN
 AETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSL PFAEGSSSVEYINNWEQAKALS
 VELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRGSGSGQYIKANSKFIGITEL

30 2-4-2 *Diseño de secuencia de una proteína portadora quimérica P2OVAp-extremo-N-H21G-extremo-C-P30 (P2OVApH21GP30)*

35 Una copia de la secuencia de aminoácidos de P2 (SEQ ID NO: 1) y una copia de la secuencia de aminoácidos de OVAp (SEQ ID NO: 3) se fusionaron entre sí a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) entremedio, la secuencia fusionada después se fusionó al extremo N de la proteína transportadora H21G (SEQ ID NO: 6) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) dispuesto entre ellas; adicionalmente, y una copia de la secuencia de aminoácidos de P30 (SEQ ID NO: 2) se fusionó con el extremo C de la proteína transportadora H21G (SEQ ID NO: 6) a través de un enlazador GSGSG (SEQ ID NO: 7) entremedio, para obtener una nueva proteína transportadora quimérica llamada P2OVApH21GP30. La secuencia de aminoácidos de la nueva proteína transportadora quimérica se muestra a continuación en SEQ ID NO: 56. Las secuencias de los epítopos P2, Los epítopos P30 y OVAp están subrayados.

(SEQ ID NO:56)

QYIKANSKFIGITELGSGSGISQAVHAAHAEINEAGRSGSGGADDVVDSSKSFVMENFSSY
 GGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYDDWKGIFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVK
 VTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGS
 SSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRGSGSGFNNFTVSF
WLRVPKVSASHLE

II. *Construcción de plásmidos de expresión para proteínas transportadoras quiméricas que comprenden proteína transportadora H21G y epítopo(s) universal(es)*

5

1. *Construcción de un plásmido de expresión de la proteína transportadora H21G*

La secuencia de aminoácidos de la toxina diftérica de longitud completa, Secuencia de referencia:

10 NP_928615, se obtuvo en GenBank, y se determinó la secuencia del fragmento de la cadena A de la toxina diftérica. La histidina 21 de la secuencia fue reemplazada por una glicina. Basándose en la secuencia modificada, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos H21G se optimizó para permitir la expresión de alta eficacia de la proteína H21G en *Escherichia coli*. Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de H21G y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia de H21G. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína H21G es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 57.

15

(SEQ ID NO:57)

CATATG GGTGCCGACG ACGTGGTTGA TAGCTCTAAA TCTTTCGTTA
 TGGAAACTT CAGTTCCTAT GCGGTACCA AACCGGGCTA CGTCGATTTCG
 ATTCAGAAAG GTATCCAAA ACCGAAAAGC GGCACCCAGG GTAACCTATGA
 TGACGATTGG AAAGGCTTTT ACTCAACGGA CAATAAATAT GATGCGGCCG
 GCTACTCCGT GGACAACGAA AATCCGCTGA GCGGTAAAGC GGGCGGTGTC
 GTGAAAGTTA CCTATCCGGG TCTGACGAAA GTGCTGGCTC TGAAAGTTGA
 TAATGCGGAA ACCATCAAAA AAGAACTGGG CCTGTCCCTG ACCGAACCGC
 TGATGGAACA AGTGGGTACG GAAGAATTTA TCAAACGTTT CGGCGACGGT
 GCCTCTCGCG TTGTCCTGAG TCTGCCGTTT GCAGAAGGCT CATCGAGCGT
 CGAATACATT AACAATTGGG AACAAGCAAA AGCTCTGAGC GTGGAAGTGG
 AAATCAACTT CGAAACGCGT GGCAAACGCG GTCAGGATGC GATGTATGAA
 TACATGGCGC AAGCCTGCGC AGGTAATCGT GTTCGTTCG GGATCC

20

Las enzimas NdeI y BamHI se agregaron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora H21G para realizar una digestión de restricción de doble enzima. Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las

25

células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo. La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

5 *2. Construcción de plásmidos de expresión para proteínas transportadoras quiméricas que comprenden H21G y epítomos universales*

2-1. Construcción de un plásmido de expresión para P30H21G

10 Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de P30H21G, y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia P30H21G. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína P30H21G es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 58.

15

(SEQ ID NO:58)

CATATG TTCAACAATT TTACGGTGTC TTTTGGCTG CGTGTGCCGA
 AAGTGTCTGC GAGTCATCTG GAAGGTAGTG GTTCTGGTGG TGCCGACGAC
 GTGGTTGATA GCTCTAAATC TTTCGTTATG GAAAACCTCA GTTCCTATGG
 CGGTACCAAA CCGGGCTACG TCGATTGAT TCAGAAAGGT ATCCAAAAAC
 CGAAAAGCGG CACCCAGGGT AACTATGATG ACGATTGGAA AGGCTTTTAC
 TCAACGGACA ATAAATATGA TGCGGCCGGC TACTCCGTGG ACAACGAAAA
 TCCGCTGAGC GGTAAGCGG GCGGTGTCGT GAAAGTTACC TATCCGGGTC
 TGACGAAAGT GCTGGCTCTG AAAGTTGATA ATGCGGAAAC CATCAAAAAA
 GAACTGGGCC TGTCCCTGAC CGAACCGCTG ATGGAACAAG TGGGTACGGA

 AGAATTTATC AAACGTTTCG GCGACGGTGC CTCTCGCGTT GTCCTGAGTC
 TGCCGTTTGC AGAAGGCTCA TCGAGCGTCG AATACATTAA CAATTGGGAA
 CAAGCAAAAG CTCTGAGCGT GGAACCTGAA ATCAACTTCG AAACGCGTGG
 CAAACGCGGT CAGGATGCGA TGTATGAATA CATGGCGCAA GCCTGCGCAG
 GTAATCGTGT TCGTCGCTAA GGATCC

20 Las enzimas NdeI y BamHI se agregaron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora P30H21G para realizar una digestión de restricción de doble enzima. Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo.
 25 La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

2-2. Construcción de un plásmido de expresión para P30H21GP30

30 Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de P30H21GP30, y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia P30H21GP30. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína P30H21GP30 es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 59.

(SEQ ID NO:59)

CATATG TTCAACAATT TTACGGTGTC TTTTGGCTG CGTGTGCCGA
 AAGTGTCTGC GAGTCATCTG GAAGGTAGTG GTTCTGGTGG TGCCGACGAC
 GTGGTTGATA GCTCTAAATC TTTCGTTATG GAAAACCTCA GTTCCTATGG
 CGGTACCAAAA CCGGGCTACG TCGATTTCGAT TCAGAAAGGT ATCCAAAAAC
 CGAAAAGCGG CACCCAGGGT AACTATGATG ACGATTGGAA AGGCTTTTAC
 TCAACGGACA ATAAATATGA TGC GGCCGGC TACTCCGTGG ACAACGAAAA
 TCCGCTGAGC GGTAAGCGG GCGGTGTCGT GAAAGTTACC TATCCGGGTC
 TGACGAAAGT GCTGGCTCTG AAAGTTGATA ATGCGGAAAC CATCAAAAAA

 GAACTGGGCC TGTCCTGAC CGAACCCTG ATGGAACAAG TGGGTACGGA
 AGAATTTATC AAACGTTTCG GCGACGGTGC CTCTCGCGTT GTCCTGAGTC
 TGCCGTTTGC AGAAGGCTCA TCGAGCGTCG AATACATTAA CAATTGGGAA
 CAAGCAAAAAG CTCTGAGCGT GGAACCTGGAA ATCAACTTCG AAACGCGTGG
 CAAACGCGGT CAGGATGCGA TGTATGAATA CATGGCGCAA GCCTGCGCAG
 GTAATCGTGT TCGTCGCTAA GGTAGTGGTT CTGGTTTCAA CAATTTTACG
 GTGTCTTTTT GGCTGCGTGT GCCGAAAGTG TCTGCGAGTC ATCTGGAA
 GGATCC

- Las enzimas Nde I y BamHI se agregaron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora P30H21GP30 para realizar una digestión de restricción de doble enzima.
- 5 Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo.
- 10 La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

2-3. Construcción de plásmidos de expresión para P2H21G

- Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de P2H21G, y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia P2H21G. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína P2H21G es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 60.
- 15

(SEQ ID NO:60)

CATATG CAGTACATTA AAGCAAACCTC AAAAT TCAT TGGCATTACC
 GAACTGGGTA GTGGTTCTGG TGGTGCCGAC GACGTGGTTG ATAGCTCTAA
 ATCTTTTCGTT ATGGAAAACCT TCAGTTCCTA TGG CGGTAC CAAACCGGGCT
 ACGTCGATTC GATTCAGAAA GGTATCCAAA AACCGAAAAG CGGCACCCAG
 GGTAACCTATG ATGACGATTG GAAAGGCTTT TACTCAACGG ACAATAAATA

ES 2 760 536 T3

TGATGCGGCC GGCTACTCCG TGGACAACGA AAATCCGCTG AGCGGTAAAG
CGGGCGGTGT CGTGAAAGTT ACCTATCCGG GTCTGACGAA AGTGCTGGCT
CTGAAAGTTG ATAATGCGGA AACCATCAAA AAAGAACTGG GCCTGTCCCT
GACCGAACCG CTGATGGAAC AAGTGGGTAC GGAAGAATTT ATCAAACGTT
TCGGCGACGG TGCCTCTCGC GTTGTCTCTGA GTCTGCCGTT TGCAGAAGGC
TCATCGAGCG TCGAATACAT TAACAATTGG GAACAAGCAA AAGCTCTGAG
CGTGGAAGCTG GAAATCAACT TCGAAACGCG TGGCAAACGC GGTCAGGATG
CGATGTATGA ATACATGGCG CAAGCCTGCG CAGGTAATCG TGTTCTGTCGC
TAA
GGATCC

- 5 Las enzimas NdeI y BamHI se agregaron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora P2H21G para realizar una digestión de restricción de doble enzima. Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión
- 10 diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo. La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

2-4. Construcción de un plásmido de expresión para OVApH21G

- 15 Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de OVApH21G, y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia OVApH21G. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína OVApH21G es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 61.

20

(SEQ ID NO:61)

CATATG ATCAGCCAAG CGGTTACGCG AGCCCACGCC GAAATTAACG
AAGCGGGTTCG CGGTAGCGGT TCTGGCGGTG CCGACGACGT GGTTGATAGC
TCTAAATCTT TCGTTATGGA AACTTCAGT TCCTATGGCG GTACCAAACC

ES 2 760 536 T3

```
GGGCTACGTC GATTCGATTC AGAAAGGTAT CCAAAAACCG AAAAGCGGCA
CCCAGGGTAA CTATGATGAC GATTGGAAAG GCTTTTACTC AACGGACAAT
AAATATGATG CGGCCGGCTA CTC CGTGGAC AACGAAAATC CGCTGAGCGG
TAAAGCGGGC GGTGTCGTGA AAGTTACCTA TCCGGGTCTG ACGAAAAGTGC
TGGCTCTGAA AGTTGATAAT GCGGAAACCA TCAAAAAGA ACTGGGCCTG
TCCCTGACCG AACCGCTGAT GGAACAAGTG GGTACGGAAG AATTTATCAA
ACGTTTCGGC GACGGTGCCT CTCGCGTTGT CCTGAGTCTG CCGTTTGCAG
AAGGCTCATC GAGCGTCGAA TACATTAACA ATTGGGAACA AGCAAAAGCT
CTGAGCGTGG AACTGAAAAT CAACTTCGAA ACGCGTGGCA AACGCGGTCA
GGATGCGATG TATGAATACA TGGCGCAAGC CTGCGCAGGT AATCGTGTTT
GTCGCTAA GGATCC
```

5 Las enzimas NdeI y BamHI se agregaron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora OVApH21G para realizar una digestión de restricción de doble enzima. Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo. La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

2-5. Construcción de plásmidos de expresión para P30H21GP2

15 Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de P30H21GP2, y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia P30H21GP2. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína P30H21GP2 es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 62.

(SEQ ID NO:62)

```
CATATG TTCAACAATT TTACGGTGTC TTTTGGCTG CGTGTGCCGA
AAGTGTCTGC GAGTCATCTG GAAGGTAGTG GTTCTGGTGG TGCCGACGAC
```

20

ES 2 760 536 T3

```
GTGGTTGATA GCTCTAAATC TTTCGTTATG GAAAAC TC AGTTCCTATG
GCGGTACCAA ACCGGGCTAC GTCGATTCGA TTCAGAAAGG TATCCAAA A
ACCGAAAAGC GGCACCCAGG GTAAC TATGA TGACGATTGG AAAGGCTTTT
ACTCAACGGA CAATAAATAT GATGCGGCCG GCTACTCCGT GGACAACGAA
AATCCGCTGA GCGGTAAAGC GGGCGGTGTC GTGAAAGTTA CCTATCCGGG
TCTGACGAAA GTGCTGGCTC TGAAAGTTGA TAATGCGGAA ACCATCAAAA
AAGAACTGGG CCTGTCCCTG ACCGAACCGC TGATGGAACA AGTGGGTACG
GAAGAATTTA TCAAACGTTT CGGCGACGGT GCCTCTCGCG TTGTCCTGAG
TCTGCCGTTT GCAGAAGGCT CATCGAGCGT CGAATACATT AACAATTGGG
AACAAGCAAA AGCTCTGAGC GTGGAAC TGG AAATCAACTT CGAAACGCGT
GGCAAACGCG GTCAGGATGC GATGTATGAA TACATGGCGC AAGCCTGCGC
AGGTAATCGT GTTCGTCGCT AAGGCTCAGG CTCAGGTCAG TACATTAAAG
CAAAC TCAAA ATTCATTGGC ATTACCGAAC TGGGATCC
```

5 Las enzimas Nde I y BamHI se agregaron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora P30H21GP2 para realizar una digestión de restricción de doble enzima. Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo. La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

2-6. Construcción de un plásmido de expresión para P20VApH21GP30

15 Se usó un plásmido de expresión personalizado. La enzima de restricción Nde I se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia CATATG, y la enzima de restricción Bam HI se usó para reconocer sitios que tienen una secuencia GGATCC. Se analizó la secuencia de ácidos nucleicos de P20VApH21GP30, y no se encontraron sitios de reconocimiento de Nde I o Bam HI en la secuencia P20VApH21GP30. La secuencia de ácidos nucleicos sintetizada que codifica la proteína P20VApH21GP30 es como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 63.

(SEQ ID NO:63)

20

CATATG CAGTACATTA AAGCAAACCTC AAAAT TCAT TGGCATTACC
 GAACTGGGTA GTGGTTCTGG TATCAGCCAA GCGGTTACAG CAGCCCACGC
 CGAAATTAAC GAAGCGGGTC GCGGTAGCGG TTCTGGCGGT GCCGACGACG
 TGGTTGATAG CTCTAAATCT TTCGTTATGG AAAACTTCAG TTCCTATGGC
 GGTACCAAAC CGGGCTACGT CGATTTCGATT CAGAAAGGTA TCCAAAAACC
 GAAAAGCGGC ACCCAGGGTA ACTATGATGA CGATTGGAAA GGCTTTTACT
 CAACGGACAA TAAATATGAT GCGGCCGGCT ACTCCGTGGA CAACGAAAAAT
 CCGCTGAGCG GTAAAGCGGG CCGTGTCGTG AAAGTTACCT ATCCGGGTCT
 GACGAAAGTG CTGGCTCTGA AAGTTGATAA TGCAGAAACC ATCAAAAAAG
 AACTGGGCCT GTCCCTGACC GAACCGCTGA TGAACAAGT GGGTACGGAA
 GAATTTATCA AACGTTTCGG CGACGGTGCC TCTCGCGTTG TCCTGAGTCT
 GCCGTTTGCA GAAGGCTCAT CGAGCGTCGA ATACATTAAC AATTGGGAAC
 AAGCAAAGC TCTGAGCGTG GAACTGGAAA TCAACTTCGA AACGCGTGGC
 AAACGCGGTC AGGATGCGAT GTATGAATAC ATGGCGCAAG CCTGCGCAGG
 TAATCGTGTT CGTCGCTAAG GTAGTGTTTC TGGTTTCAAC AATTTTACGG
 TGTCTTTTTG GCTGCGTGTG CCGAAAGTGT CTGCGAGTCA TCTGGAA
 GGATCC

Las enzimas NdeI y BamHI se agregaron cada una al plásmido vacío y al producto de PCR del gen sintetizado que codifica la proteína transportadora P2OVApH21GP30 para realizar una digestión de restricción de doble enzima. Después de la purificación, se añadió ligasa T4 a la mezcla de ligadura para ligar los fragmentos. Después de completar la reacción de ligadura, el plásmido de expresión se purificó y verificó usando métodos de verificación por PCR y mapeo de digestión de restricción. Usando células competentes BL21 (DE3), el plásmido de expresión se transformó en las células y se seleccionaron las colonias. Después de obtener un clon positivo de la bacteria de expresión diseñada, se estableció una biblioteca de reservas, incluyendo reservas maestras y reservas de trabajo. La biblioteca de reservas se almacenó en el refrigerador a -20 °C.

III. Preparación de la proteína transportadora Core VP8 y las proteínas transportadoras quiméricas H21G que comprenden un epítipo universal

Los experimentos han demostrado propiedades similares de la proteína transportadora H21G y las proteínas transportadoras quiméricas que comprenden la proteína transportadora H21P y los epítipos universales. Por tanto, los métodos de purificación para todas las proteínas transportadoras descritas en el presente documento son similares. A continuación se describe un método ejemplar para preparar la proteína transportadora quimérica H21P que comprende un epítipo universal.

1. Preparación de bacterias modificadas que expresan proteínas transportadoras quiméricas H21G que comprenden un epítipo universal

Cada plásmido que expresa la proteína transportadora quimérica se transformó en células competentes utilizando métodos estándar de biología molecular, y se examinó la expresión de la proteína. Los clones que tenían altos niveles de expresión de proteínas y pasaron los ensayos de antisueros se seleccionaron para establecer una biblioteca de reserva maestra y una biblioteca de reserva en funcionamiento.

2. Fermentación de bacterias modificadas genéticamente que expresan proteínas transportadoras quiméricas H21G que comprenden un epítipo universal

Véanse los métodos descritos en la sección "Fermentación de bacterias modificadas que expresan proteínas transportadoras quiméricas CRM197A que comprenden un epítipo universal".

3. Purificación de proteínas transportadoras quiméricas H21G que comprenden un epítipo universal

Dado que H21G se usó como un componente central para construir diferentes proteínas transportadoras quiméricas que tienen epítomos universales, los experimentos demostraron que a pesar de la adición de los epítomos universales, los parámetros para la purificación de proteínas no se vieron afectados significativamente. El procedimiento de purificación de la proteína transportadora H21G podría modificarse para establecer métodos de purificación para las proteínas transportadoras quiméricas H21G que comprenden un epítomo universal.

Se pesaron 50 g de bacterias húmedas en una taza de centrífuga de 2 l. Se añadieron a la taza 300 ml de tampón 1X PBS pH 7,0 para resuspender las bacterias. La suspensión de bacterias se mezcló completamente en una placa de agitación magnética durante 30 minutos, y después se centrifugó durante 20 minutos a 4 °C, 4000 rpm. El sobrenadante se descartó y las bacterias se recogieron. Estas etapas se repitieron dos veces. Al tubo de centrífuga que tenía la bacteria se añadieron 300 ml de PBS 1X pH 7,0. Las bacterias se lisaron en un homogeneizador y se centrifugaron durante 20 minutos a 4 °C, 10000 rpm. El sedimento se recogió y el sobrenadante se descartó. Al sedimento se le añadieron 300 ml de tampón PBS 1X pH 7,0, y la mezcla se mezcló completamente en una placa de agitación magnética durante 30 minutos. La mezcla se centrifugó durante 20 minutos a 4 °C, 4000 rpm. El cuerpo de inclusión se recogió y el sobrenadante se descartó. Se añadieron 900 ml de solución desnaturalizante al cuerpo de inclusión lavado. La mezcla se centrifugó después durante 30 minutos a 25 °C, 10000 rpm. El sobrenadante se recogió y el sedimento se descartó. El sobrenadante se transfirió a una bolsa de diálisis de 6-8 KDA. La bolsa de diálisis se selló y se colocó en 10 l de tampón de replegamiento 1, y se dejó equilibrar durante la noche a temperatura ambiente en una placa de agitación magnética. Al día siguiente, la bolsa de diálisis se transfirió a 10 l de tampón de replegamiento 2 y se agitó para equilibrar a temperatura ambiente durante aproximadamente 8-10 horas. La bolsa de diálisis se transfirió a 10 l de tampón de diálisis 3, y se agitó para equilibrar a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, la bolsa de diálisis se transfirió a 10 l de tampón de replegamiento 4 y se agitó para equilibrar a temperatura ambiente durante aproximadamente 8-10 horas. La bolsa de diálisis se transfirió a 10 l de tampón de replegamiento 5 y se agitó para equilibrar a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, la bolsa de diálisis se transfirió a 2 l de tampón de almacenamiento y se agitó para equilibrar a temperatura ambiente durante aproximadamente 8-10 horas. El tampón de almacenamiento se reemplazó dos veces, y la diálisis se realizó a temperatura ambiente durante la noche. Se obtuvo 1 ml de solución de diálisis y se centrifugó durante 10 minutos a temperatura ambiente y 12000 rpm. El sobrenadante se recogió y la concentración de proteína se midió. La muestra de proteína se cargó en una columna de gel DEAE preequilibrada y se eluyó con un modo de gradiente para recoger el pico de proteína diana. La muestra recogida se cargó después en una columna de fenil sepharose para una purificación adicional, y se recogió el pico eluido. Finalmente, la muestra recogida se cargó en una columna de gel Q Sepharose y se recogió el pico eluido. La proteína diana purificada recogida se transfirió a una bolsa de diálisis y se dializó contra un tampón de NaCl 0,15 M. La muestra dializada se transfirió a 4 °C para su almacenamiento.

IV. Preparación de conjugados de polisacárido-H21G

Tres métodos sintéticos diferentes, es decir, aminación reductora, método CDAP (usando 3-(etiliminometileno-amino)-N,N-dimetil-propan-1-amina), y método ADH (usando dihidrazida de ácido adípico), se usaron para sintetizar conjugados específicos de polisacárido-H21G. El rendimiento y las propiedades inmunogénicas de los conjugados formados por diferentes métodos sintéticos pueden ser diferentes. Para investigar el efecto de diferentes proteínas transportadoras quiméricas que tienen epítomos universales en la inmunogenicidad de diferentes conjugados de polisacáridos bacterianos (PS), la presente divulgación describe conjugados de PS-H21G de *Streptococcus pneumoniae* (Pn) 13-valentes, conjugados de PS-H21G de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) y conjugados de PS-H21G de *Neisseria meningitidis* (Men) 4-valentes.

1. Preparación de conjugados de Pn PS-proteína H21G 13-valentes (con o sin epítomos universales)

6 proteínas transportadoras quiméricas H21G que tienen epítomos universales, incluyendo proteínas transportadoras quiméricas P30H21G, P30H21GP30, P2H21G, OVApH21G, P30H21GP2 y P2OVApH21GP30, se usaron para sintetizar una vacuna de conjugado Pn PS 13-valentes: 13Pn-P30H21G, 13Pn-P30H21GP30, 13Pn-P2H21G, 13Pn-OVApH21G, 13Pn-P30H21GP2, y 13Pn-P2OVApH21GP30. Los métodos para preparar estos conjugados son similares a los métodos para preparar las vacunas de conjugado de Pn PS-CRM197A 13-valentes descritos anteriormente.

2. Preparación de conjugados de Hib PS-proteína H21G (con o sin epítomos universales)

6 proteínas transportadoras quiméricas H21B que tienen epítomos universales, incluyendo proteínas transportadoras quiméricas P30H21G, P30H21GP30, P2H21G, OVApH21G, P30H21GP2 y P2OVApH21GP30, se usaron para sintetizar una vacuna de conjugado de Hib PS: Hib-P30H21G, Hib-P30H21GP30, Hib-P2H21G, Hib-OVApH21G, Hib-P30H21GP2, y Hib-P2OVApH21GP30. Los métodos para preparar estos conjugados son similares a los métodos para preparar las vacunas de conjugado de Hib PS-CRM197A descritas anteriormente.

3. Preparación de conjugados de Men PS-proteína H21G 4-valentes (con o sin epítomos universales)

6 proteínas transportadoras quiméricas H21G que tienen epítomos universales, incluyendo proteínas transportadoras quiméricas P30H21G, P30H21GP30, P2H21G, OVApH21G, P30H21GP2 y P2OVApH21GP30, se usaron para sintetizar una vacuna de conjugado de Men PS 4-valente: 4Men-P30H21G, 4Men-P30H21GP30, 4Men-P2H21G, 4Men-OVApH21G, 4Men-P30H21GP2, y 4Men-P2OVApH21GP30. Los métodos para preparar estos conjugados son similares a los métodos para preparar las vacunas de conjugado de Men PS-CRM197A 4-valentes descritos anteriormente.

V. Evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas de conjugado de polisacárido-H21G

10 *1. Evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas de conjugado de Pn PS-H21G 13-valentes*

Se usaron métodos similares a los descritos en las secciones anteriores "Evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas de conjugado de Pn PS-P2CRM197A 13-valentes" para determinar los títulos de los anticuerpos anti-PS IgG, los resultados se muestran en la Tabla 12 siguiente. La Tabla 12 solo enumera los títulos de IgG anti-PS después de tres inyecciones. La vacuna de conjugado de Pn PS-H21G 13-valente preparada se usó para inmunizar ratones y se obtuvieron muestras de suero de los ratones. A cada ratón se le inyectó 0,1 ml de la solución de vacuna, y la dosis de polisacárido es de 10 µg/ratón/tiempo.

Tabla 12. Títulos de IgG anti-PS en suero de ratones después de tres inyecciones de vacunas de conjugado de Pn PS-H21G 13-valentes.

Nombre de la vacuna	Título de anticuerpo IgG anti-Pn PS en suero de ratones después de 3 inyecciones (Eu)														
	Pn1	Pn3	Pn4	Pn5	Pn6A	Pn6B	Pn7F	Pn9V	Pn14	Pn18C	Pn19A	Pn19F	Pn23F		
13Pn-P30H21G	3,60	3,79	8,61	6,28	5,91	2,44	4,48	3,42	5,94	4,28	3,09	4,51	5,09		
13Pn-P30H21 GP30	3,54	4,15	7,74	6,48	5,32	2,65	4,83	4,05	5,85	4,78	2,81	4,65	4,69		
13Pn-P2H21G	4,76	5,01	10,25	7,39	6,74	4,25	6,43	4,89	6,60	6,74	4,11	5,18	4,36		
13Pn-OVApH21G	3,44	4,05	7,29	6,41	5,80	3,01	4,89	3,92	5,21	4,64	3,07	4,35	4,78		
13Pn-P30H21GP2	4,66	5,84	11,25	8,08	6,58	4,44	7,02	4,91	7,19	6,69	4,55	5,21	4,88		
13Pn-P2P30H21GOVAp	3,78	4,11	6,83	5,84	5,37	2,98	4,56	4,02	5,55	4,78	2,79	4,54	3,82		
13Pn-H21G (Control)	1,96	0,98	1,45	1,77	0,92	1,01	1,59	0,79	1,21	1,47	1,05	1,56	0,90		

Los datos de la Tabla 12 mostraron que la inmunogenicidad de los conjugados de Pn PS-H21G 13-valentes que comprenden proteínas transportadoras quiméricas que tienen epítomos universales aumentó significativamente en comparación con los conjugados de Pn PS-H21G 13-valentes que comprenden la proteína transportadora CoreVP8 sin un epítomo universal.

5

2. Evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas de conjugado de Hib PS-H21G

Se usaron métodos similares a los descritos en las secciones anteriores "Evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas de conjugado de Hib PS-P2CRM197A" para determinar los títulos de los anticuerpos IgG anti-PS mediante ensayos ELISA. Los resultados se muestran en la Tabla 13 siguiente.

10

Tabla 13. Títulos de IgG anti-PS en suero de ratones en respuesta a vacunas de conjugado de Hib PS-H21G.

Vacuna Hib	Título de anticuerpo IgG anti-Hib PS en suero de ratones (Eu)		
	1 inyección	2 inyecciones	3 inyecciones
Hib-P30H21G	0,04	2,33	4,57
Hib-P30H21GP30	0,32	3,14	6,33
Hib-P2H21G	0,02	2,05	4,66
Hib-OVApH21G	0,03	2,39	5,77
Hib-P30H21GP2	0,26	3,44	7,43
Hib-P2OV ApH21GP30	0,05	2,44	4,15
Hib-H21G (Control)	0,01	0,78	2,38

Los títulos del anticuerpo anti-Hib PS anterior mostraron resultados similares de los diferentes tipos de conjugados de proteína quimérica Hib PS-H21G. En comparación con los conjugados de Hib PS-proteína H21G sin epítomos universales, los otros seis conjugados que comprenden proteínas transportadoras quiméricas H21G que tienen epítomos universales, es decir, Hib-P30H21G, Hib-P30H21GP30, Hib-P2H21G, Hib-OVApH21G, Hib-P30H21GP2, y Hib-P2OVApH21GP30, habían mejorado significativamente los títulos de IgG. Los títulos de IgG de las muestras de suero después de tres inyecciones en comparación con los títulos de IgG de las muestras de suero después de una inyección también fueron significativamente diferentes, con una $p < 0,05$.

15

20

3. Evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas de conjugado de Men PS-H21G 4-valentes

Se obtuvieron muestras de suero usando métodos similares a los descritos en la sección anterior "Evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas de conjugado de Pn PS-P2CRM197A 13-valentes". A cada ratón se le inyectó 0,1 ml de la solución de vacuna, con una dosis de inyección de polisacárido de 10 µg/ratón/tiempo. Los ensayos ELISA se usaron para determinar los títulos séricos de anticuerpos contra cada grupo de polisacáridos. Los resultados son como se muestra en la Tabla 14 a continuación.

25

30

Tabla 14. Títulos de anticuerpos anti-Men PS en suero de ratones.

Vacuna	Grupo de PS	Título de anticuerpo IgG anti-Men PS en suero de ratones (Eu)		
		1 inyección	2 inyecciones	3 inyecciones
4Men-P30H21G	A	0,06	1,79	4,90
	C	0,03	1,54	4,50
	Y	0,02	1,78	5,22
	W135	0,05	1,60	4,33
4Men-P30H21GP30	A	0,04	2,53	6,16
	C	0,04	2,44	5,52
	Y	0,02	1,89	7,19
	W135	0,03	1,68	6,55
4Men-P2H21G	A	0,23	1,65	5,44
	C	0,12	1,82	4,82
	Y	0,11	1,39	4,33
	W135	0,14	1,47	4,06
4Men-OVApH21G	A	0,03	1,42	3,55
	C	0,05	1,51	4,80
	Y	0,02	2,01	3,22
	W135	0,04	1,39	3,80
4Men-P30H21GP2	A	0,18	2,34	7,11
	C	0,20	1,77	6,74
	Y	0,10	1,51	6,44
	W135	0,15	1,92	8,10

(continuación)

Vacuna	Grupo de PS	Título de anticuerpo IgG anti-Men PS en suero de ratones (Eu)		
		1 inyección	2 inyecciones	3 inyecciones
4Men-P2OVApH21GP30	A	0,09	1,20	3,46
	C	0,10	1,35	2,82
	Y	0,09	1,40	3,64
	W135	0,11	1,38	4,41
4Mne-H21G (control)	A	0,03	0,65	1,46
	C	0,02	0,81	1,08
	Y	0,01	0,74	1,62
	W135	0,01	0,73	1,11

Los títulos del anticuerpo PS anti-Men anterior mostraron resultados similares a los de los conjugados Pn PS 13-valentes y los conjugados Hib PS. En comparación con los conjugados de Men PS-proteína H21G 4-valentes sin epítopos universales, los conjugados que comprenden proteínas transportadoras químéricas H21G que tienen epítopos universales tenían títulos de IgG anti-PS específicos significativamente más altos. Los títulos de IgG de las muestras de suero después de tres inyecciones en comparación con los títulos de IgG de las muestras de suero después de una inyección también fueron significativamente diferentes, con una $p < 0,05$.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> KANVAX BIOPHARMACEUTICALS LTD.

15 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MEJORAR LA INMUNOGENICIDAD DE LOS CONJUGADOS DE POLISACÁRIDO-PROTEÍNA

<130> 750342000140

20 <140> Todavía sin asignar
<141> Simultáneamente con esto

<150> CN2014101985335
<151> 11/05/2014

25 <160> 67

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

30 <210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Epítipo P2 de toxoide tetánico

<400> 1

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15

40 <210> 2
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Epítipo P30 de toxoide tetánico

50 <400> 2

ES 2 760 536 T3

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 1 5 10 15
 Ala Ser His Leu Glu
 20

5 <210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Epítipo OVAp de toxoide tetánico
 10 <400> 3

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 Arg

15 <210> 4
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Toxina diftérica CRM197A
 <400> 4

Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
 1 5 10 15
 Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30
 Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45
 Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60
 Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95
 Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110
 Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125
 Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140
 Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160
 Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175
 Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
 180 185 190
 Arg

25 <210> 5
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Rotavirus CoreVP8

ES 2 760 536 T3

<400> 5

```

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

      130          135          140
Pro Gln Ser Gln Thr Ala Met Cys Thr Gln Tyr Ile Asn Asn Gly Leu
145          150          155          160

```

5

<210> 6
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Toxina diftérica H21G

15

<400> 6

```

Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
 1          5          10          15
Phe Ser Ser Tyr Gly Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20          25          30
Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35          40          45
Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50          55          60
Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65          70          75          80
Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85          90          95
Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100         105         110
Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115         120         125
Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130         135         140
Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145         150         155         160
Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165         170         175
Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
 180         185         190
Arg

```

ES 2 760 536 T3

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

<220>
 <223> enlazador

10 <400> 7

Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5

15 <210> 8
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> P2CRM197A

20 <400> 8

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

25 <210> 9
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> CRM197AP2

<400> 9

ES 2 760 536 T3

```

Met Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu
 1      5      10      15
Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile
      20      25      30
Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp
      35      40      45
Asp Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala
      50      55      60
Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly
      65      70      75      80
Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys
      85      90      95
Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr
      100      105      110
Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe
      115      120      125
Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly
      130      135      140
Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu
      145      150      155      160
Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln
      165      170      175
Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val

      180      185      190
Arg Arg Gly Ser Gly Ser Gly Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
      195      200      205
Ile Gly Ile Thr Glu Leu
      210

```

<210> 10
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> P2CRM197AP2

<400> 10

5

10

ES 2 760 536 T3

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

<210> 11
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> P2P2CRM197A

10

<400> 11

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Ser Gly Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile
 20 25 30
 Thr Glu Leu Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser
 35 40 45

ES 2 760 536 T3

```

Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys
 50          55          60
Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser
65          70          75          80
Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr
          85          90          95
Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro
          100          105          110
Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu
          115          120          125
Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys
          130          135          140
Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr
145          150          155          160
Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu
          165          170          175
Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn
          180          185          190
Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu
          195          200          205
Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln
210          215          220
Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg Arg
225          230

```

<210> 12
 <211> 233
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CRM197AP2P2

10 <400> 12

ES 2 760 536 T3

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

<210> 14
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> P2CRM197AP2P2

10

<400> 14

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe
 20 25 30
 Val Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val
 35 40 45
 Asp Ser Ile Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly

ES 2 760 536 T3

50						55						60					
Asn	Tyr	Asp	Asp	Asp	Trp	Lys	Glu	Phe	Tyr	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys	Tyr		
65					70					75					80		
Asp	Ala	Ala	Gly	Tyr	Ser	Val	Asp	Asn	Glu	Asn	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys		
			85						90					95			
Ala	Gly	Gly	Val	Val	Lys	Val	Thr	Tyr	Pro	Gly	Leu	Thr	Lys	Val	Leu		
			100					105					110				
Ala	Leu	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Glu	Thr	Ile	Lys	Lys	Glu	Leu	Gly	Leu		
		115					120					125					
Ser	Leu	Thr	Glu	Pro	Leu	Met	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Glu	Glu	Phe	Ile		
	130					135				140							
Lys	Arg	Phe	Gly	Asp	Gly	Ala	Ser	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe		
145				150						155				160			
Ala	Glu	Gly	Ser	Ser	Ser	Val	Glu	Tyr	Ile	Asn	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala		
			165					170						175			
Lys	Ala	Leu	Ser	Val	Glu	Leu	Glu	Ile	Asn	Phe	Glu	Thr	Arg	Gly	Lys		
			180					185					190				
Arg	Gly	Gln	Asp	Ala	Met	Tyr	Glu	Tyr	Met	Ala	Gln	Ala	Cys	Ala	Gly		
		195					200					205					
Asn	Arg	Val	Arg	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ala	Asn		
	210				215						220						
Ser	Lys	Phe	Ile	Gly	Ile	Thr	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Tyr		
225				230						235				240			
Ile	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Phe	Ile	Gly	Ile	Thr	Glu	Leu					
			245					250									

<210> 15
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> P30CRM197A

10

<400> 15

ES 2 760 536 T3

```

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

```

210

215

<210> 16
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CRM197AP30

<400> 16

ES 2 760 536 T3

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

<210> 17
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> P30CRM197AP30

10

<400> 17

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

ES 2 760 536 T3

Asn	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys	Ala	Gly	Gly	Val	Val	Lys	Val	Thr	Tyr	Pro
			100					105					110		
Gly	Leu	Thr	Lys	Val	Leu	Ala	Leu	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Glu	Thr	Ile
			115				120					125			
Lys	Lys	Glu	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu	Pro	Leu	Met	Glu	Gln	Val
	130					135					140				
Gly	Thr	Glu	Glu	Phe	Ile	Lys	Arg	Phe	Gly	Asp	Gly	Ala	Ser	Arg	Val
145					150					155					160
Val	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe	Ala	Glu	Gly	Ser	Ser	Ser	Val	Glu	Tyr	Ile
				165					170					175	
Asn	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser	Val	Glu	Leu	Glu	Ile	Asn
			180					185					190		
Phe	Glu	Thr	Arg	Gly	Lys	Arg	Gly	Gln	Asp	Ala	Met	Tyr	Glu	Tyr	Met
		195					200					205			
Ala	Gln	Ala	Cys	Ala	Gly	Asn	Arg	Val	Arg	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
	210					215					220				
Phe	Asn	Asn	Phe	Thr	Val	Ser	Phe	Trp	Leu	Arg	Val	Pro	Lys	Val	Ser
225					230					235					240
Ala	Ser	His	Leu	Glu											
				245											

<210> 18
 <211> 245
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> P30P30CRM197A

10 <400> 18

ES 2 760 536 T3

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

<210> 19
 <211> 245
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CRM197AP30P30

10 <400> 19

ES 2 760 536 T3

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

<210> 20
 <211> 271
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> P30P30CRM197AP30

10 <400> 20

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 1 5 10 15
 Ala Ser His Leu Glu Gly Ser Gly Ser Gly Phe Asn Asn Phe Thr Val
 20 25 30
 Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gly
 35 40 45
 Ser Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe
 50 55 60
 Val Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val

ES 2 760 536 T3

65					70					75					80
Asp	Ser	Ile	Gln	Lys	Gly	Ile	Gln	Lys	Pro	Lys	Ser	Gly	Thr	Gln	Gly
				85					90					95	
Asn	Tyr	Asp	Asp	Asp	Trp	Lys	Glu	Phe	Tyr	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys	Tyr
			100					105					110		
Asp	Ala	Ala	Gly	Tyr	Ser	Val	Asp	Asn	Glu	Asn	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys
			115					120				125			
Ala	Gly	Gly	Val	Val	Lys	Val	Thr	Tyr	Pro	Gly	Leu	Thr	Lys	Val	Leu
			130				135					140			
Ala	Leu	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Glu	Thr	Ile	Lys	Lys	Glu	Leu	Gly	Leu
					150					155					160
Ser	Leu	Thr	Glu	Pro	Leu	Met	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Glu	Glu	Phe	Ile
				165					170					175	
Lys	Arg	Phe	Gly	Asp	Gly	Ala	Ser	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe
			180					185					190		
Ala	Glu	Gly	Ser	Ser	Ser	Val	Glu	Tyr	Ile	Asn	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala
			195					200				205			
Lys	Ala	Leu	Ser	Val	Glu	Leu	Glu	Ile	Asn	Phe	Glu	Thr	Arg	Gly	Lys
			210				215					220			
Arg	Gly	Gln	Asp	Ala	Met	Tyr	Glu	Tyr	Met	Ala	Gln	Ala	Cys	Ala	Gly
					230					235					240
Asn	Arg	Val	Arg	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Phe	Asn	Asn	Phe	Thr	Val
				245						250				255	
Ser	Phe	Trp	Leu	Arg	Val	Pro	Lys	Val	Ser	Ala	Ser	His	Leu	Glu	
			260					265					270		

<210> 21
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> P30CRM197AP30P30

10

<400> 21

ES 2 760 536 T3

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

<210> 23
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> CRM197AOVAp

10

<400> 23

Met Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu
 1 5 10 15
 Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile
 20 25 30
 Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp
 35 40 45

ES 2 760 536 T3

```

Asp Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala
 50      55      60
Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly
65      70      75      80
Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys
      85      90      95
Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr
      100      105      110
Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe
      115      120      125
Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly
      130      135      140
Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu
145      150      155      160
Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln
      165      170      175
Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val
      180      185      190
Arg Arg Gly Ser Gly Ser Gly Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His
      195      200      205
Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
      210      215

```

<210> 24
 <211> 237
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> OVApCRM197AOVAp

10 <400> 24

ES 2 760 536 T3

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

<210> 25
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> OVApOVApCRM 197A

10

<400> 25

ES 2 760 536 T3

```

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

```

<210> 26
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> CRM197AOVApOVAp

10

<400> 26

```

Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
 1          5          10          15
Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20          25          30
Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35          40          45
Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50          55          60
Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65          70          75          80
Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val

```

ES 2 760 536 T3

				85					90					95			
Asp	Asn	Ala	Glu	Thr	Ile	Lys	Lys	Glu	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu		
			100					105						110			
Pro	Leu	Met	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Glu	Glu	Phe	Ile	Lys	Arg	Phe	Gly		
		115						120					125				
Asp	Gly	Ala	Ser	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe	Ala	Glu	Gly	Ser		
	130					135						140					
Ser	Ser	Val	Glu	Tyr	Ile	Asn	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser		
145					150					155					160		
Val	Glu	Leu	Glu	Ile	Asn	Phe	Glu	Thr	Arg	Gly	Lys	Arg	Gly	Gln	Asp		
				165					170						175		
Ala	Met	Tyr	Glu	Tyr	Met	Ala	Gln	Ala	Cys	Ala	Gly	Asn	Arg	Val	Arg		
			180					185					190				
Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ile	Ser	Gln	Ala	Val	His	Ala	Ala	His	Ala		
		195						200					205				
Glu	Ile	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ile	Ser	Gln	Ala		
	210					215						220					
Val	His	Ala	Ala	His	Ala	Glu	Ile	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg					
225					230						235						

<210> 27
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> OVApOVApCRM197AOVAp

10

<400> 27

ES 2 760 536 T3

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

<210> 28
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> OVApCRM197AOVApOVAp

10

<400> 28

ES 2 760 536 T3

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

<210> 29
 <211> 239
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> P2CRM197AP30

10 <400> 29

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe
 20 25 30
 Val Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val
 35 40 45

ES 2 760 536 T3

Asp	Ser	Ile	Gln	Lys	Gly	Ile	Gln	Lys	Pro	Lys	Ser	Gly	Thr	Gln	Gly
50						55					60				
Asn	Tyr	Asp	Asp	Asp	Trp	Lys	Glu	Phe	Tyr	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys	Tyr
65					70					75					80
Asp	Ala	Ala	Gly	Tyr	Ser	Val	Asp	Asn	Glu	Asn	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys
				85					90					95	
Ala	Gly	Gly	Val	Val	Lys	Val	Thr	Tyr	Pro	Gly	Leu	Thr	Lys	Val	Leu
			100					105					110		
Ala	Leu	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Glu	Thr	Ile	Lys	Lys	Glu	Leu	Gly	Leu
		115					120					125			
Ser	Leu	Thr	Glu	Pro	Leu	Met	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Glu	Glu	Phe	Ile
	130					135					140				
Lys	Arg	Phe	Gly	Asp	Gly	Ala	Ser	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe
145					150					155					160
Ala	Glu	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Tyr	Ile	Asn	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala	
				165				170						175	
Lys	Ala	Leu	Ser	Val	Glu	Leu	Glu	Ile	Asn	Phe	Glu	Thr	Arg	Gly	Lys
			180					185					190		
Arg	Gly	Gln	Asp	Ala	Met	Tyr	Glu	Tyr	Met	Ala	Gln	Ala	Cys	Ala	Gly
		195					200					205			
Asn	Arg	Val	Arg	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Phe	Asn	Asn	Phe	Thr	Val
	210				215						220				
Ser	Phe	Trp	Leu	Arg	Val	Pro	Lys	Val	Ser	Ala	Ser	His	Leu	Glu	
225					230					235					

<210> 30
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> P30CRM197AP2

10

<400> 30

ES 2 760 536 T3

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

<210> 32
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> P2P30CRM197AOVAp

10

<400> 32

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Ser Gly Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val
 20 25 30
 Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ala

ES 2 760 536 T3

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

5 <210> 33
 <211> 594
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CRM197A

<400> 33

```

catatgggtg cggacgacgt tgtggactcc tcaaaatcgt ttgtcatgga aaacttcagc 60
tcttatcatg gcaccaaacc gggttacgtg gactccattc agaagggcat ccaaaaaccg 120
aagtcaggca cccagggtaa ctacgatgac gattggaagg aattctacag cacggacaat 180
aagtatgatg cggccggcta ctctgttgac aacgaaaatc cgctgagtgg taaagcaggc 240
gggtgtggta aggtcaccta tccgggtctg acgaaagttc tggcgtgaa ggtcgataac 300
gccgaaacca ttaaaaagga actgggctctg tctctgaccg aaccgctgat ggaacaagtg 360
ggtacggaag aatttatcaa acgtttcggc gatggtgcat cgcgtgtcgt gctgagcctg 420
ccgtttgctg aaggcagttc ctcagtggaa tacattaaca attgggaaca agcaaaagct 480
ctgtcagttg aactggaaat caatttcgaa acgcgtggca aacgcgtca agatgctatg 540
tatgaatata tggctcaggc gtgtgcgggc aatcgcgtcc gtcgctaagg atcc 594
  
```

15 <210> 34
 <211> 652
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> P2CRM197A

<400> 34

ES 2 760 536 T3

catatgcaat acatcaaggc gaacagcaaa ttcacggaact gggctcgggc 60
 tctggcgtgc ggacgacggt gtggactcct caaaatcgtt tgcacatggaa aacttcagct 120
 cttatatggc accaaaccgg gttacgtgga ctccattcag aagggcatcc aaaaaccgaa 180

gtcaggcacc cagggtaact acgatgacga ttggaaggaa ttctacagca cggacaataa 240
 gtatgatgcg gccggctact ctggtgacaa cgaaaatccg ctgagtggtg aagcaggcgg 300
 tgtgggtaag gtcacctatc cgggtctgac gaaagtctct gcgctgaagg tcgataacgc 360
 cgaaaccatt aaaaaggaac tgggcctgtc tctgaccgaa ccgctgatgg aacaagtggg 420
 tacggaagaa tttatcaaac gtttcggcga tgggtgcatcg cgtgtcgtgc tgagcctgcc 480
 gtttgctgaa ggcagttcct cagtggaata cattaacaat tgggaacaag caaaagctct 540
 gtcagttgaa ctggaaatca atttcgaaac gcgtggcaaa cgcggtcaag atgctatgta 600
 tgaatatatg gctcaggcgt gtgcgggcaa tcgcgtccgt cgctaaggat cc 652

<210> 35
 <211> 712
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> P2CRM197AP2

<400> 35

catatgcaat acatcaaggc gaacagcaaa ttcacggaact gggctcgggc 60
 tctggcgtgc ggacgacggt gtggactcct caaaatcgtt tgcacatggaa aacttcagct 120
 cttatatggc accaaaccgg gttacgtgga ctccattcag aagggcatcc aaaaaccgaa 180
 gtcaggcacc cagggtaact acgatgacga ttggaaggaa ttctacagca cggacaataa 240
 gtatgatgcg gccggctact ctggtgacaa cgaaaatccg ctgagtggtg aagcaggcgg 300
 tgtgggtaag gtcacctatc cgggtctgac gaaagtctct gcgctgaagg tcgataacgc 360
 cgaaaccatt aaaaaggaac tgggcctgtc tctgaccgaa ccgctgatgg aacaagtggg 420
 tacggaagaa tttatcaaac gtttcggcga tgggtgcatcg cgtgtcgtgc tgagcctgcc 480
 gtttgctgaa ggcagttcct cagtggaata cattaacaat tgggaacaag caaaagctct 540
 gtcagttgaa ctggaaatca atttcgaaac gcgtggcaaa cgcggtcaag atgctatgta 600
 tgaatatatg gctcaggcgt gtgcgggcaa tcgcgtccgt cgctaaggat cgggctctgg 660
 ccaatacatc aaggcgaaca gcaaattcat cggcatcacg gaactgggat cc 712

<210> 36
 <211> 669
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> P30CRM197A

<400> 36

catatgttca ataattttac ggtgtcgttt tggctgcgtg tcccgaagt ctctgcgagt 60
 catctggaag gttctggtag cgggtggtgcg gatgacgtgg ttgatagctc taaatcttc 120
 gttatggaaa acttcagttc ctatcatggc accaaaccgg gttacgtcga ttcgattcag 180
 aaaggcatcc aaaaaccgaa aagcggcacc cagggtaact acgatgacga ttggaaagaa 240
 ttctactcaa cggacaacaa atacgatgcg gccggctact ccgtggacaa cgaaaatccg 300
 ctgagcggta aagcgggagg tgtcgtgaaa gttacctatc cgggtctgac gaaagtctct 360
 gctctgaaag ttgataatgc ggaaaccatc aaaaaagaac tgggcctgtc cctgaccgaa 420
 ccgctgatgg aacaagtggg tacggaagaa tttatcaaac gtttcggcga cgggtcctct 480
 cgctgtgtcc tgagtctgcc gtttgcagaa ggctcatcga gcgtcgaata cattaacaat 540
 tgggaacaag caaaagctct gagcgtggaa ctggaaatca acttcgaaac gcgtggcaaa 600
 cgcggtcagg atgcgatgta tgaatacatg gcgcaagcct gcgcaggtaa tcgtgtctct 660
 cgcggtatcc 669

<210> 37

ES 2 760 536 T3

<211> 660
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> OVApCRM197A

<400> 37

catatgatca gccaaagcggg tcacgcagcc cacgccgaaa ttaacgaagc gggtcgcbgg 60

agcggttctg gcgggtgcaga cgatggtggt gactccagca aatcattcgt catggaaaac 120
 tttagctctt atcatggcac caaacggggg tacgtggact ccattcagaa aggcattccaa 180
 aaaccgaaat caggcaccca gggttaactat gatgacgatt ggaaagaatt ctactctacg 240
 gacaacaaat acgatgcggc cggctactct gttgacaacg aaaatccgct gagtggtaaa 300
 gcaggcgggt tggttaaagt cacctatccg ggtctgacga aagttctggc gctgaaagtc 360
 gataacgccg aaaccatcaa aaaagaactg ggcctgtcgc tgaccgaacc gctgatggaa 420
 caagtgggta cggaagaatt tatcaaactg ttcggcgatg gtgcatcgcg tgcgtgctg 480
 agcctgccgt ttgctgaagg cagttcctca gtggaatata ttaacaattg ggaacaagca 540
 aaagctctga gtggtgaact ggaaatcaat ttcgaaacgc gtggtaaacg cggtcaggac 600
 gcaatgtatg aatatatggc ccaggcttgt gcaggcaacc gtggttcgcbg ttaaggatcc 660

10

<210> 38
 <211> 729
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> P30CRM197AP2

20

<400> 38

catatggtca acaattttac ggtctcggtt tggctgcgtg tcccgaaggt gtctgcctca 60
 catctggaag gtagcgggtc aggtggtgcg gatgacgtgg ttgatagctc taaatccttt 120
 gttatggaaa acttcagttc ctatcatggt accaaaccgg gctacgtcga ttctattcag 180
 aaaggtatcc aaaaaccgaa aagtgggtacc cagggcaact atgatgacga ttggaaagaa 240
 ttctactcta cggacaacaa atacgatgcg gccgggtact cgggtggacaa cgaaaatccg 300
 ctgagcggta aagccggcgg tgtcgtgaaa gttacctatc cgggcctgac gaaagtgctg 360
 gctctgaaag ttgataacgc ggaaaccatc aaaaaagaac tgggtctgag cctgaccgaa 420
 ccgctgatgg aacaagtggg cacggaagaa tttatcaaac gtttcggtga cgggtgcatcc 480
 cgtggtgtcc tgtcactgcc gtttgcagaa ggttcatcga gcgtcgaata catcaacaac 540
 tgggaacaag caaaagctct gagcgtggaa ctggaaatca atttcgaaac ccgtggtaaa 600
 cgcgccaggt atgctatgta tgaatacatg gcgcaagcct gcgcaggtaa ccgtgttcgt 660
 cgcggtctct gtagtggcca gtacatcaaa gcgaacagta aattcatcgg catcacggaa 720
 ctgggatcc 729

25

<210> 39
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> P2CoreVP8

<400> 39

ES 2 760 536 T3

```

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

145          150          155          160
Phe Tyr Leu Ile Pro Gln Ser Gln Thr Ala Met Cys Thr Gln Tyr Ile
 165          170          175
Asn Asn Gly Leu
 180

```

<210> 40
 <211> 200
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> P2CoreVP8P2

10 <400> 40

ES 2 760 536 T3

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

<210> 41
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> P30CoreVP8

10

<400> 41

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 1 5 10 15
 Ala Ser His Leu Glu Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asp Gly Pro Tyr Gln
 20 25 30
 Pro Thr Ser Leu Asn Leu Pro Val Asp Tyr Trp Met Leu Ile Ala Pro
 35 40 45
 Thr Arg Glu Gly Lys Val Ala Glu Gly Thr Asn Thr Thr Asp Arg Trp
 50 55 60
 Phe Ala Cys Val Leu Val Glu Pro Asn Val Gln Asn Thr Gln Arg Gln
 65 70 75 80

ES 2 760 536 T3

Tyr Val Leu Asp Gly Arg Asn Val Gln Leu Asn Val Ser Asn Glu Ser
 85 90 95
 Arg Thr Ser Trp Lys Phe Ile Leu Phe Ile Lys Leu Thr Pro Asp Gly
 100 105 110
 Thr Tyr Thr Gln Tyr Ser Thr Leu Ser Thr Pro His Lys Leu Cys Ala
 115 120 125
 Trp Met Lys Arg Asp Asn Arg Val Tyr Trp Tyr Gln Gly Ala Thr Pro
 130 135 140
 Asn Ala Ser Glu Ser Tyr Tyr Leu Thr Ile Asn Asn Asp Asn Ser Asn
 145 150 155 160
 Val Ser Ser Asp Ala Glu Phe Tyr Leu Ile Pro Gln Ser Gln Thr Ala
 165 170 175
 Met Cys Thr Gln Tyr Ile Asn Asn Gly Leu
 180 185

- 5 <210> 42
- <211> 182
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> OVApCoreVP8
- 10 <400> 42

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 Arg Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr Ser Leu
 20 25 30
 Asn Leu Pro Val Asp Tyr Trp Met Leu Ile Ala Pro Thr Arg Glu Gly
 35 40 45
 Lys Val Ala Glu Gly Thr Asn Thr Thr Asp Arg Trp Phe Ala Cys Val
 50 55 60
 Leu Val Glu Pro Asn Val Gln Asn Thr Gln Arg Gln Tyr Val Leu Asp
 65 70 75 80
 Gly Arg Asn Val Gln Leu Asn Val Ser Asn Glu Ser Arg Thr Ser Trp
 85 90 95
 Lys Phe Ile Leu Phe Ile Lys Leu Thr Pro Asp Gly Thr Tyr Thr Gln
 100 105 110
 Tyr Ser Thr Leu Ser Thr Pro His Lys Leu Cys Ala Trp Met Lys Arg
 115 120 125
 Asp Asn Arg Val Tyr Trp Tyr Gln Gly Ala Thr Pro Asn Ala Ser Glu
 130 135 140
 Ser Tyr Tyr Leu Thr Ile Asn Asn Asp Asn Ser Asn Val Ser Ser Asp
 145 150 155 160
 Ala Glu Phe Tyr Leu Ile Pro Gln Ser Gln Thr Ala Met Cys Thr Gln
 165 170 175
 Tyr Ile Asn Asn Gly Leu
 180

- 15 <210> 43
- <211> 206
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> P30CoreVP8P2
- <400> 43

ES 2 760 536 T3

```

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 1      5      10      15
Ala Ser His Leu Glu Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asp Gly Pro Tyr Gln

                20                25                30
Pro Thr Ser Leu Asn Leu Pro Val Asp Tyr Trp Met Leu Ile Ala Pro
 35      40      45
Thr Arg Glu Gly Lys Val Ala Glu Gly Thr Asn Thr Thr Asp Arg Trp
 50      55      60
Phe Ala Cys Val Leu Val Glu Pro Asn Val Gln Asn Thr Gln Arg Gln
 65      70      75      80
Tyr Val Leu Asp Gly Arg Asn Val Gln Leu Asn Val Ser Asn Glu Ser
 85      90      95
Arg Thr Ser Trp Lys Phe Ile Leu Phe Ile Lys Leu Thr Pro Asp Gly
 100     105     110
Thr Tyr Thr Gln Tyr Ser Thr Leu Ser Thr Pro His Lys Leu Cys Ala
 115     120     125
Trp Met Lys Arg Asp Asn Arg Val Tyr Trp Tyr Gln Gly Ala Thr Pro
 130     135     140
Asn Ala Ser Glu Ser Tyr Tyr Leu Thr Ile Asn Asn Asp Asn Ser Asn
 145     150     155     160
Val Ser Ser Asp Ala Glu Phe Tyr Leu Ile Pro Gln Ser Gln Thr Ala
 165     170     175
Met Cys Thr Gln Tyr Ile Asn Asn Gly Leu Gly Ser Gly Ser Gly Gln
 180     185     190
Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 195     200     205

```

<210> 44
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> P2P30CoreVP80VAp

10

<400> 44

ES 2 760 536 T3

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

225

5 <210> 45
 <211> 514
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CoreVP8
 <400> 45

```

catatgtgga tggtcogtat caaccgacga cgtttacccc gccgaacgat tattggattc 60
tgatcaactc aaatacgaac ggcgtgggtt acgaaagtac caacaattcc gatttctgga 120
cggcggtcgt ggccatcgaa ccgcatgta atccggcgac cgccagtata ccatttttgg 180
tgaaatgcaa acaattcaat gtcagcaacg actctaataa atggaagttt ctggaaatgt 240
tccgtagctc tagtcagaac gaattttata atcgtcgcac cctgacgtct gataccctgc 300
tgggtgggcat cctgaagtac ggcggtcgcg tttggacctt ccatggtgaa acgccgcgtg 360
caaccacgga ctctcatcg accgcgaacc tgaacaatat ttcaatcacg attcaccacg 420
attcaccacg attcactcgg aattttacat catcccgcgt agccaggaaa gcaaatgcaa 480
cgaatacatc aataatggtc tgtgataagg atcc 514
  
```

15 <210> 46
 <211> 550
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> P2CoreVP8

ES 2 760 536 T3

<400> 46

```

catatgcagt acattaaagc aaactcaaaa ttcattggca ttaccgaact gggctcaggc 60
tcaggttggg tgggtccgat caaccgacga cgtttacccc gccgaacgat tattggattc 120
tgatcactca aatacgaacg gcgtggttta cgaaagtacc aacaattccg atttctggac 180
ggcggctcgtg gccatcgaac cgcatgttaa tccggtcgac cgccagtata ccatttttgg 240
tgaaagcaaa caattcaatg tcagcaacga ctctaataaa tggagtttc tggaaatggt 300
ccgtagctct agtcagaacg aatthtataa tcgtcgcacc ctgacgtctg ataccctctc 360
ggtgggcatc ctgaagtacg gcggtcgcgt ttggaccttc catggtgaaa cgccgcgtgc 420
aaccacggac tcctcatcga ccgcgaacct gaacaatatt tcaatcacga ttcactcgga 480
atthtcatc atcccgcgta gccaggaaag caaatgcaac gaatacatca ataatggtct 540
gtgaggatcc                                     550
    
```

5 <210> 47
 <211> 570
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> P30CoreVP8

<400> 47

```

catatgttca ataatthtac ggtgtcgttt tggctcgcgtg tgccgaaagt gtctgcctcc 60
catctggaag gttctggttc aggtctggac ggtccgatc agccgaccac gtttaccctc 120
ccgaacgatt actggattct gatcaacagc aatacgaacg gcgtggttta tgaatcaacc 180
aacaattcgg atttctggac ggcggctcgtg gccatcgaac cgcatgttaa tccggtcgac 240
cgccagtaca ccactctcgg tgaatcaaaa caattcaacg tcagcaacga ctctaacaaa 300
tgaaattcc tggaaatggt ccgtagctct agtcagaacg aatthtataa tcgtcgcacc 360
ctgacgtccg ataccctctc ggtgggcatc ctgaaatagc gcggtcgcgt ttggaccttc 420
catggtgaaa cgccgcgtgc aaccacggac tcctcatcga ccgcgaacct gaacaatatt 480
agcatcacga tccactctga attctacatc atcccgcgca gtcaagaatc caaatgcaac 540
gaatacatca acaatggcct gtaaggatcc                                     570
    
```

15 <210> 48
 <211> 561
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> OVApCoreVP8

25 <400> 48

```

catatgatca gccaaagcgt tcacgcagcc cacgccgaaa ttaacgaagc gggctcgcggt 60
agcggttctg gcctggatgg tccgtatcaa ccgacgacgt ttaccctgcc gaacgattat 120
tggattctga tcaactcaaa tacgaacggc gtggtttacg aaagtaccaa caattccgat 180
ttctggacgg cggctcgtggc catcgaaccg catgttaatc cggctcgcacc ccagtatacc 240
atthtgggtg aaagcaaaaca attcaatgtc agcaacgact ctaataaatg gaagtttctg 300
gaaatgttcc gtagctctag tcagaacgaa thttataatc gtcgcaccct gacgtctgat 360
accctctgg tgggcatcct gaagtacggc ggtcgcggtt ggaccttcca tgggaaacg 420
ccgcgtgcaa ccacggactc ctcatcgacc gcgaacctga acaatatttc aatcacgatt 480
cactcggaat thtcatcatc cccgcgtagc caggaaagca aatgcaacga atacatcaat 540
aatggtctgt gataaggatc c                                     561
    
```

30 <210> 49
 <211> 621
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 760 536 T3

<220>
<223> P30CoreVP8P2

<400> 49

5

```

catatgatca gccaaagcggg tcacgcagcc cagcgcgaaa ttaacgaagc gggtcgcggg 60
agcgggttctg gcctggatgg tccgtatcaa ccgacgcagc ttaccccgcc gaacgattat 120
tggattctga tcaactcaaa tacgaacggc gtgggtttacg aaagtaccaa caattccgat 180
ttctggacgg cggtcgtggc catcgaaccg catgttaatc cggtcgaccg ccagtatacc 240
atTTTTGGTg aaagcaaaca attcaatgtc agcaacgact ctaataaatg gaagtttctg 300
gaaatgTtcc gtagctctag tcagaacgaa ttttataatc gtcgcaccct gacgtctgat 360
accCGTctgg tgggcatcct gaagtacggc ggtcgcggtt ggaccttcca tggTgaaacg 420
ccgcgtgcaa ccacggactc ctcatcgacc gcgaacctga acaatatttc aatcacgatt 480
cactcggaat tttacatcat cccgcgtagc caggaaagca aatgcaacga atacatcaat 540
aatggtctgt gataaggctc aggctcaggt cagtacatta aagcaaactc aaaattcatt 600
ggcattaccg aactgggatc c                                     621
    
```

<210> 50
<211> 687
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> P2P30CoreVP8OvAp

15

<400> 50

```

catatgcagt acattaaagc aaactcaaaa ttcattggca ttaccgaact gggtagcggg 60
tctggcatca gccaaagcggg tcacgcagcc cagcgcgaaa ttaacgaagc gggtcgcggg 120
agcgggttctg gcctggatgg tccgtatcaa ccgacgcagc ttaccccgcc gaacgattat 180
tggattctga tcaactcaaa tacgaacggc gtgggtttacg aaagtaccaa caattccgat 240
ttctggacgg cggtcgtggc catcgaaccg catgttaatc cggtcgaccg ccagtatacc 300
atTTTTGGTg aaagcaaaca attcaatgtc agcaacgact ctaataaatg gaagtttctg 360
gaaatgTtcc gtagctctag tcagaacgaa ttttataatc gtcgcaccct gacgtctgat 420
accCGTctgg tgggcatcct gaagtacggc ggtcgcggtt ggaccttcca tggTgaaacg 480
ccgcgtgcaa ccacggactc ctcatcgacc gcgaacctga acaatatttc aatcacgatt 540
cactcggaat tttacatcat cccgcgtagc caggaaagca aatgcaacga atacatcaat 600
aatggtctgt gataaggctc aggctcaggt atcagccaag cggttcacgc agcccacgcc 660
gaaattaacg aagcgggtcg cggatcc                                     687
    
```

<210> 51
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> P30H21G

25

<400> 51

ES 2 760 536 T3

```

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

```

<210> 52
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> P30H21GP30

10

<400> 52

```

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

```

ES 2 760 536 T3

Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu Pro Leu Met Glu Gln Val
 130 135 140
 Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val
 145 150 155 160
 Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser Ser Val Glu Tyr Ile
 165 170 175
 Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn
 180 185 190
 Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met
 195 200 205
 Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg Arg Gly Ser Gly Ser Gly
 210 215 220
 Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 225 230 235 240
 Ala Ser His Leu Glu
 245

- <210> 53
- <211> 213
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> P2H21G
- 10 <400> 53

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

- 15 <210> 54
- <211> 215
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 760 536 T3

<220>
<223> OVApH21G

<400> 54

5

```

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

<210> 55
<211> 239
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> P30H21GP2

15

<400> 55

ES 2 760 536 T3

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

<210> 56
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> P2OVApH21GP30

10

<400> 56

ES 2 760 536 T3

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

5 <210> 57
 <211> 591
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> H21G
 <400> 57

catatgggtg cgcacgacgt ggttgatagc tctaaatctt tcgttatgga aaacttcagt 60
 tcctatggcg gtaccaaacc gggctacgtc gattcgattc agaaaggtat ccaaaaaccg 120
 aaaagcggca cccagggtaa ctatgatgac gattggaaag gcttttactc aacggacaat 180
 aaatatgatg cggccggcta ctccgtggac aacgaaaatc cgctgagcgg taaagcgggc 240
 ggtgtcgtga aagttacctt tccgggtctg acgaaagtgc tggctctgaa agttgataat 300
 gcgaaacca tcaaaaaaga actgggcctg tccctgaccg aaccgctgat ggaacaagtg 360
 ggtacggaag aatttatcaa acgtttcggc gacgggtgct ctgcggttg cctgagtctg 420
 ccgtttgcag aaggctcatc gagcgtcgaa tacattaaca attgggaaca agcaaaagct 480
 ctgagcgtgg aactggaat caacttcgaa acgcgtggca aacgcggtca ggatgcatg 540
 tatgaataca tggcgcaagc ctgctgcaggt aatcgtgttc gtcgaggatc c 591

15 <210> 58
 <211> 672
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>

ES 2 760 536 T3

<223> P30H21G

<400> 58

```

catatgttca acaatthttac ggtgtctttt tggctgctgtg tgccgaaagt gtctgctgagt 60
catctggaag gtagtggttc tgggtggtgcc gacgacgtgg ttgatagctc taaatctttc 120
gttatggaaa acttcagttc ctatggcggg accaaaccgg gctacgtcga ttcgattcag 180
aaaggtatcc aaaaaccgaa aagcggcacc cagggttaact atgatgacga ttggaaaggc 240
ttttactcaa cggacaataa atatgatgcg gccggctact ccgtggacaa cgaaaatccg 300
ctgagcggta aagcgggctg tgtcgtgaaa gttacctatc cgggtctgac gaaagtgtctg 360
gctctgaaag ttgataatgc ggaaaccatc aaaaaagaac tgggcctgtc cctgaccgaa 420
ccgctgatgg aacaagtggg tacggaagaa tttatcaaac gtttcggcga cgggtgcctct 480
cgcgttctcc tgagtctgcc gtttgcagaa ggctcatcga gcgtcgaata cattaacaat 540
tgggaacaag caaaagctct gagcgtggaa ctggaaatca acttcgaaac gcgtggcaaa 600
cgcggtcagg atgcatgta tgaatacatg gcgcaagcct gcgcaggtaa tcgtgttctg 660
cgctaaggat cc 672

```

5

<210> 59

<211> 750

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> P30H21GP30

15

<400> 59

```

catatgttca acaatthttac ggtgtctttt tggctgctgtg tgccgaaagt gtctgctgagt 60
catctggaag gtagtggttc tgggtggtgcc gacgacgtgg ttgatagctc taaatctttc 120
gttatggaaa acttcagttc ctatggcggg accaaaccgg gctacgtcga ttcgattcag 180
aaaggtatcc aaaaaccgaa aagcggcacc cagggttaact atgatgacga ttggaaaggc 240
ttttactcaa cggacaataa atatgatgcg gccggctact ccgtggacaa cgaaaatccg 300
ctgagcggta aagcgggctg tgtcgtgaaa gttacctatc cgggtctgac gaaagtgtctg 360
gctctgaaag ttgataatgc ggaaaccatc aaaaaagaac tgggcctgtc cctgaccgaa 420
ccgctgatgg aacaagtggg tacggaagaa tttatcaaac gtttcggcga cgggtgcctct 480
cgcgttctcc tgagtctgcc gtttgcagaa ggctcatcga gcgtcgaata cattaacaat 540
tgggaacaag caaaagctct gagcgtggaa ctggaaatca acttcgaaac gcgtggcaaa 600
cgcggtcagg atgcatgta tgaatacatg gcgcaagcct gcgcaggtaa tcgtgttctg 660
cgctaaggta gtggttctgg tttcaacaat tttacgggtg ctttttggct gcgtgtgccc 720
aaagtgtctg cgagtcattc ggaagatcc 750

```

<210> 60

20 <211> 654

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> P2H21G

<400> 60

ES 2 760 536 T3

```

catatgcagt acattaaagc aaactcaaaa ttcattggca ttaccgaact gggtagtggt 60
tctgggtggtg cgcacgacgt ggttgatagc tctaaatctt tcgttatgga aaacttcagt 120
tcctatggcg gtaccaaac gggctacgtc gattcgattc agaaaggat ccaaaaaccg 180
aaaagcggca cccagggtaa ctatgatgac gattggaaag gcttttactc aacggacaat 240
aaatatgatg cggccggcta ctccgtggac aacgaaaatc cgctgagcgg taaagcgggc 300
gggtgctgtga aagttaccta tccgggtctg acgaaagtgc tggctctgaa agttgataat 360
gcggaacca tcaaaaaaga actgggcctg tccctgaccg aaccgctgat ggaacaagtg 420
ggtacggaag aatttatcaa acgtttcggc gacggtgcct ctccgcttgt cctgagctctg 480
ccgtttgcag aaggctcatc gagcgtcgaa tacattaaca attggaaca agcaaaagct 540
ctgagcgtgg aactggaat caacttcgaa acgctggca aacgcggtca ggatgcgatg 600
tatgaataca tggcgcaagc ctgcgcaggt aatcgtgttc gtcgctaagg atcc 654

```

5 <210> 61
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> OVApH21G

<400> 61

```

catatgatca gccaaagcggg tcaacgcagcc cacgccgaaa ttaacgaagc gggtcgcggg 60
agcggttctg gcgggtgccga cgacgtgggt gatagctcta aatctttcgt tatggaaaac 120
ttcagttcct atggcgggtac caaacccgggc tacgtcgatt cgattcagaa aggtatccaa 180
aaaccgaaaa gcggcaccga gggtaactat gatgacgatt ggaaaggctt ttactcaacg 240
gacaataaat atgatgcggc cggctactcc gtggacaacg aaaatccgct gagcggtaaa 300
gcgggcgggtg tcgtgaaagt tacctatccg ggtctgacga aagtgtgtgc tctgaaagtt 360
gataatgcgg aaaccatcaa aaaagaactg ggctgtccc tgaccgaacc gctgatggaa 420
caagtgggta cggagaatt tatcaaacgt ttcggcgacg gtgcctctcg cgttgtcctg 480
agtctgccgt ttgcagaagg ctcatcgagc gtcgaataca ttaacaattg ggaacaagca 540
aaagctctga gcgtggaact ggaaatcaac ttcgaaacgc gtggcaaacg cggtcaggat 600
gcgatgtatg aatacatggc gcaagcctgc gcaggtaatc gtgttcgtcg ctaaggatcc 660

```

15 <210> 62
 <211> 732
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> P30H21GP2

<400> 62

```

catatggtca acaatthttac ggtgtctttt tggctgctg tgcgaaagt gtctgcgagt 60
catctggaag gtagtggttc tgggtggtgcc gacgacgtgg ttgatagctc taaatctttc 120
gttatggaaa acttcagttc ctatggcggg accaaaaccg gctacgtcga ttcgattcag 180
aaaggtatcc aaaaaccgaa aagcggcacc cagggttaact atgatgacga ttggaaaggc 240
ttttactcaa cggacaataa atatgatgac gccggctact ccgtggacaa cgaaaatccg 300
ctgagcggta aagcgggcgg tgtcgtgaaa gttacctatc cgggtctgac gaaagtgtctg 360
gctctgaaag ttgataatgc ggaaaccatc aaaaaagaac tgggcctgtc cctgaccgaa 420
ccgctgatgg aacaagtggg tacggaagaa tttatcaaac gtttcggcga cgggtgcctct 480
cgcgttgtcc tgagtctgcc gtttgagaa ggctcatcga gcgtcgaata cattaacaat 540
tggaacaag caaaagctct gagcgtggaa ctggaaatca acttcgaaac gcgtggcaaa 600
cgcggtcagg atgcgatgta tgaatacatg gcgcaagcct gcgcaggtaa tctgtttcgt 660
cgctaaggct caggctcagg tcagtacatt aaagcaaac caaaattcat tggcattacc 720
gaactgggat cc 732

```

25 <210> 63
 <211> 798
 <212> ADN

ES 2 760 536 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> P2OVApH21GP30

5

<400> 63

```
catatgcagt acattaaagc aaactcaaaa ttcattggca ttaccgaact gggtagtggt 60
tctggtatca gccaaagcgg tcaacgagcc cacgccgaaa ttaacgaagc gggtcgcggt 120
agcggttctg gcggtgccga cgacgtgggt gatagctcta aatctttcgt tatggaaaac 180
ttcagttcct atggcgggtac caaacggggc tacgtcgatt cgattcagaa aggtatccaa 240
aaaccgaaaa gcggcaccca gggtaactat gatgacgatt ggaaaggctt ttactcaacg 300
gacaataaat atgatgcggc cggctactcc gtggacaacg aaaatccgct gagcggtaaa 360
gcgggcgggtg tcgtgaaagt tacctatccg ggtctgacga aagtgctggc tctgaaagt 420
gataatgcgg aaaccatcaa aaaagaactg ggcctgtccc tgaccgaacc gctgatggaa 480
caagtgggta cggaagaatt tatcaaactg ttcggcgacg gtgcctctcg cgttgtcctg 540
agtctgccgt ttgcagaagg ctcatcgagc gtcgaataca ttaacaattg ggaacaagca 600
aaagctctga gcgtggaact ggaaatcaac ttcgaaacgc gtggcaaacg cggtcaggat 660
gcatgtatg aatacatggc gcaagcctgc gcaggtaatc gtgttcgtcg ctaaggtagt 720
ggttctgggt tcaacaattt tacgggtgtc ttttggctgc gtgtgccgaa agtgtctgcg 780
agtcatctgg aaggatcc
```

10

<210> 64

<211> 560

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Toxina diftérica de longitud completa

<400> 64

ES 2 760 536 T3

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

ES 2 760 536 T3

Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu
 260 265 270
 Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu
 275 280 285
 Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala
 290 295 300
 Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp
 305 310 315 320
 Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly
 325 330 335
 Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu
 340 345 350
 Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala
 355 360 365
 Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn
 370 375 380
 Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr
 385 390 395 400
 Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His
 405 410 415
 Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg
 420 425 430
 Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu
 435 440 445
 Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly
 450 455 460
 Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg
 465 470 475 480
 Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys
 485 490 495
 Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu
 500 505 510
 His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu
 515 520 525
 Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp
 530 535 540
 His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
 545 550 555 560

<210> 65
 <211> 535
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Toxina diftérica de longitud completa secretada

10 <400> 65

ES 2 760 536 T3

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

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125
 Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140
 Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160
 Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175
 Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
 180 185 190
 Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
 195 200 205
 Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220
 Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240
 Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
 245 250 255
 His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
 260 265 270
 Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285
 Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
 290 295 300
 Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320
 Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
 325 330 335
 Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 340 345 350
 Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365
 Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380
 Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
 385 390 395 400
 Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
 405 410 415
 Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
 420 425 430
 Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
 435 440 445
 His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
 450 455 460
 Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
 465 470 475 480
 Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
 485 490 495
 Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
 500 505 510
 Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
 515 520 525
 Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
 530 535

<210> 66
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Toxina diftérica, cadena A

ES 2 760 536 T3

<400> 66

Gly	Ala	Asp	Asp	Val	Val	Asp	Ser	Ser	Lys	Ser	Phe	Val	Met	Glu	Asn
1				5					10					15	
Phe	Ser	Ser	Tyr	His	Gly	Thr	Lys	Pro	Gly	Tyr	Val	Asp	Ser	Ile	Gln
			20					25					30		
Lys	Gly	Ile	Gln	Lys	Pro	Lys	Ser	Gly	Thr	Gln	Gly	Asn	Tyr	Asp	Asp
		35					40					45			
Asp	Trp	Lys	Gly	Phe	Tyr	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys	Tyr	Asp	Ala	Ala	Gly
	50					55					60				
Tyr	Ser	Val	Asp	Asn	Glu	Asn	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys	Ala	Gly	Gly	Val
65					70					75					80
Val	Lys	Val	Thr	Tyr	Pro	Gly	Leu	Thr	Lys	Val	Leu	Ala	Leu	Lys	Val
			85						90					95	
Asp	Asn	Ala	Glu	Thr	Ile	Lys	Lys	Glu	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu
			100					105					110		
Pro	Leu	Met	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Glu	Glu	Phe	Ile	Lys	Arg	Phe	Gly
		115					120					125			
Asp	Gly	Ala	Ser	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe	Ala	Glu	Gly	Ser
	130					135					140				
Ser	Ser	Val	Glu	Tyr	Ile	Asn	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser
145					150					155					160
Val	Glu	Leu	Glu	Ile	Asn	Phe	Glu	Thr	Arg	Gly	Lys	Arg	Gly	Gln	Asp
				165					170					175	
Ala	Met	Tyr	Glu	Tyr	Met	Ala	Gln	Ala	Cys	Ala	Gly	Asn	Arg	Val	Arg
			180					185					190		
Arg															

5

<210> 67

<211> 247

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> VP8 de longitud completa

15

<400> 67

ES 2 760 536 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de polisacárido-proteína que comprende una proteína transportadora quimérica y un antígeno polisacárido, en donde la proteína transportadora quimérica comprende una proteína transportadora y un epítipo universal, en donde el antígeno polisacárido se conjuga covalentemente con la proteína transportadora quimérica, y en donde la proteína transportadora quimérica comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 8-32, 39-44, y 51-56.
2. El conjugado de polisacárido-proteína de la reivindicación 1, en donde;
- (i) la relación de peso a peso del antígeno polisacárido a la proteína transportadora quimérica es de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2;
 - (ii) el antígeno polisacárido tiene un peso molecular promedio entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 1000 kDa; y/o
 - (iii) el antígeno polisacárido se deriva de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (Pn), o *Neisseria meningitidis* (Men).
3. El conjugado de polisacárido-proteína de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el antígeno polisacárido se deriva de un polisacárido capsular, y en donde opcionalmente:
- (i) el polisacárido capsular se deriva de *Streptococcus pneumoniae* de un serotipo seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11 A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19 A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F;
 - (ii) el polisacárido capsular se deriva de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib); o
 - (iii) el polisacárido capsular se deriva de *Neisseria meningitidis* de un serotipo seleccionado entre el grupo que consiste en A, C, Y, y W-135.
4. Una composición inmunogénica que comprende el conjugado de polisacárido-proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, en donde:
- (i) la composición inmunogénica comprende una pluralidad de los conjugados de polisacárido-proteína, en donde al menos dos de los conjugados de polisacárido-proteína comprenden una proteína transportadora que es diferente de uno a otro; y/o
 - (ii) la composición inmunogénica comprende además un adyuvante, y en donde opcionalmente el adyuvante es fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.
6. La composición inmunogénica de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde la composición inmunogénica comprende una pluralidad de los conjugados de polisacárido-proteína, y en donde:
- (i) al menos dos de los conjugados de polisacárido-proteína comprenden un antígeno polisacárido que se deriva de una especie bacteriana que es diferente de uno a otro; o
 - (ii) cada conjugado de polisacárido-proteína comprende un antígeno polisacárido derivado de una bacteria de un serotipo distinto de la misma especie; y en donde opcionalmente:
 - (a) la composición inmunogénica comprende aproximadamente 13 conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende un polisacárido capsular derivado de *Streptococcus pneumoniae* de un serotipo diferente seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19 A, 19F y 23F;
 - (b) la composición inmunogénica comprende aproximadamente 24 conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende un polisacárido capsular derivado de *Streptococcus pneumoniae* de un serotipo diferente seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11 A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19 A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F; o
 - (c) la composición inmunogénica comprende aproximadamente 4 conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada conjugado de polisacárido-proteína comprende un polisacárido capsular derivado de *Neisseria meningitidis* de un serotipo diferente seleccionado entre el grupo que consiste en A, C, Y, y W-135.
7. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Una composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6 o una vacuna de la reivindicación 7 para uso en un método de inmunización de un individuo contra una enfermedad causada por una bacteria, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la composición inmunogénica o la vacuna, en donde el antígeno polisacárido es un polisacárido expresado en la superficie de la bacteria o un derivado de la misma; en donde opcionalmente:

- (i) la enfermedad es neumonía, infección del oído, infección sinusal, meningitis, o bacteriemia causada por *Streptococcus pneumoniae*;
- 5 (ii) la enfermedad es meningitis, neumonía, epiglotitis, celulitis, artritis, o infección del oído causada por *Haemophilus influenzae* tipo b; o
- (iii) la enfermedad es meningitis o meningococemia causada por *Neisseria meningitides*.
9. La composición inmunogénica o vacuna para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde:
- 10 (i) la composición inmunogénica o la vacuna se administra al individuo en al menos dos dosis;
- (ii) el individuo tiene una respuesta inmune pobre al antígeno polisacárido; y/o
- (iii) el individuo es un niño menor de aproximadamente 2 años de edad, un anciano o un individuo inmunocomprometido.
- 15 10. Un método para preparar el conjugado de polisacárido-proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende conjugar el antígeno polisacárido con la proteína transportadora quimérica.
11. El método de la reivindicación 10, en donde el antígeno polisacárido se prepara cultivando una bacteria que comprende el antígeno polisacárido y recuperando el antígeno polisacárido del cultivo, que además comprende
- 20 opcionalmente:
- a) preparar el antígeno polisacárido antes de conjugar el antígeno polisacárido con la proteína transportadora quimérica;
- 25 b) preparar la proteína transportadora quimérica antes de conjugar el antígeno polisacárido con la proteína transportadora quimérica; y/o
- c) aislar la proteína transportadora quimérica conjugada y el antígeno polisacárido para obtener el conjugado de polisacárido-proteína.
12. El método de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde la proteína transportadora quimérica se prepara cultivando una célula hospedadora transformada con un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína transportadora quimérica en condiciones que permiten la expresión de la proteína transportadora quimérica, y recuperando la proteína transportadora quimérica expresada del cultivo.
- 30 13. El método de la reivindicación 12, en donde la célula hospedadora es *Escherichia coli* o levadura.
- 35 14. El método de la reivindicación 13, en donde el vector comprende la secuencia de ácidos nucleicos de una cualquiera seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 34-38, 46-50, y 58-63.
15. El método de la reivindicación 10, en donde el antígeno polisacárido se conjuga con la proteína transportadora quimérica por aminación reductora, conjugación de cianilación, o una reacción de carbodiimida, en donde
- 40 opcionalmente:
- (i) el antígeno polisacárido se activa mediante tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamonioipiridinio (CDAP); y/o
- 45 (ii) el antígeno polisacárido se conjuga con la proteína transportadora quimérica a través de un enlazador de dihidrazida de ácido adípico (ADH).