

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 428**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2016 PCT/CN2016/098520**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.04.2017 WO17054635**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2016 E 16850259 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3357933**

54 Título: **Proteína de fusión de Haemophilus influenzae y método de construcción y uso de la misma**

30 Prioridad:

30.09.2015 CN 201510638297

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

25.09.2020

73 Titular/es:

**CANSINO BIOLOGICS INC. (100.0%)
401-420, Floor 4, Biomedical Park of West Zone,
185 South Avenue, TEDA West District
Tianjin 300457, CN**

72 Inventor/es:

**LI, JUNQIANG;
MIAO, DANQING;
YANG, MINGMING;
SHAO, ZHONGQI;
ZHU, TAO y
YU, XUEFENG**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 784 428 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

Proteína de fusión de *Haemophilus influenzae* y método de construcción y uso de la misma

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo técnico del desarrollo de productos de vacuna, en particular a una proteína de fusión de *Haemophilus influenzae* y un método de construcción y uso de la misma.

Antecedentes de la invención

Haemophilus influenzae (Hi) es una clase de bacilos Gram-negativos no móviles, sin esporas, en forma de varilla, que viven en las vías respiratorias de personas normales y son patógenos oportunistas, que provocan principalmente infecciones respiratorias superiores, otitis media y neumonía, así como sepsis, meningitis y otras infecciones serias en niños.

Haemophilus influenzae puede dividirse en capsular (tipificables) y no capsular (no tipificables). La *Haemophilus influenzae* capsular puede clasificarse en 6 serotipos, a, b, c, d, e y f según los componentes del polisacárido capsular. La no capsular también se denomina *Haemophilus influenzae* no tipificable (NTHI).

Las enfermedades invasivas de *Haemophilus influenzae* ocurren en todo el mundo. El serotipo B de *Haemophilus influenzae* (Hib) es la bacteria más tóxica y principal patógena que puede causar meningitis bacteriana en niños menores de 5 años. La incidencia de serotipo b de *Haemophilus influenzae* se ha reducido significativamente con la promoción y el uso a nivel mundial de la vacuna conjugada de Hib, que se desarrolla basándose en polisacárido capsular de serotipo b de *Haemophilus influenzae*. El polisacárido capsular es la principal sustancia antigénica de *Haemophilus influenzae* y puede inducir una respuesta inmune protectora en el cuerpo humano, sin embargo, el polisacárido capsular es un antígeno independiente del timo, que solo puede producir anticuerpos IgM débiles, pero no conduce a memoria inmune, y no puede proteger de manera efectiva a bebés y niños dentro de los 2 años de edad. Desarrolladores de vacunas conjugan el polisacárido capsular a un portador de proteínas para formar una vacuna conjugada de polisacárido-proteína, en la que el portador de proteínas cambia el antígeno polisacárido del antígeno independiente del timo al antígeno dependiente del timo, activando así linfocitos T cooperadores e induciendo a las células B a producir anticuerpos IgG específicos. La vacuna conjugada de Hib se utiliza ahora ampliamente en el mundo. Sin embargo, la vacuna conjugada de Hib solo es eficaz contra el serotipo b de *Haemophilus influenzae*, y no puede prevenir infecciones por otros serotipos de *Haemophilus influenzae* y *Haemophilus influenzae* no tipificable, dando como resultado un aumento sustancial en las tasas de infección de otros serotipos de *Haemophilus influenzae* y *Haemophilus influenzae* no tipificable. Por ejemplo, la *Haemophilus influenzae* no tipificable puede provocar otitis media (OM), la biota egipcia de la *Haemophilus influenzae* puede provocar conjuntivitis epidémica y la fiebre purpúrica brasileña. Hasta ahora no se han aprobado en el mundo vacunas para la prevención de *Haemophilus influenzae* distintas del serotipo b de o *Haemophilus influenzae* no tipificable.

La proteína D (HiD) es una lipoproteína en la superficie de *Haemophilus influenzae* y tiene un peso molecular relativo de 42 KDa. La proteína D se conserva altamente en todas las cepas de *Haemophilus influenzae* (incluyendo *Haemophilus influenzae* con y sin cápsula), y es un antígeno específico de la inmunoglobulina D humana. Aunque la proteína D es eficaz en la prevención de otitis media causada por NTHi, la HiD tiene un peso molecular relativamente bajo y una inmunogenicidad débil.

Hin47 (también conocida como HtrA) es una proteína de choque térmico expresada por *Haemophilus influenzae* a presión ambiente, que tiene actividad serina proteasa. Hin47 es un importante antígeno inmune, que puede estimular el cuerpo para producir células B y respuestas de células T como se demuestra mediante experimentos y, por tanto, su inmunogenicidad se ha confirmado totalmente.

Sumario de la invención

El problema técnico que va a resolverse por la presente invención es proporcionar una proteína de fusión Hin47-HiD como portador de proteínas de vacunas conjugadas.

Otro problema técnico que va a resolverse por la presente invención es proporcionar un método para la construcción de la proteína de fusión mencionada anteriormente.

Otro problema técnico que va a resolverse por la presente invención es proporcionar el uso de la proteína de fusión mencionada anteriormente Hin47-HiD, en la que la proteína de fusión se utiliza como portador de proteínas en la vacuna conjugada de Hia e Hib para el desarrollo de una vacuna conjugada de *Haemophilus influenzae*.

Con el fin de resolver los problemas técnicos anteriores, se proporciona la solución técnica de la presente invención de la siguiente manera:

una proteína de fusión de *Haemophilus influenzae* que puede obtenerse mediante la fusión de la proteína *Haemophilus influenzae* HiD y la proteína *Haemophilus influenzae* Hin47, en concreto Hin47-HiD, en la que la secuencia de aminoácidos de Hin47 es la secuencia mostrada en SEQ ID NO.1, y la secuencia de aminoácidos de HiD es la secuencia mostrada en SEQ ID NO.3.

Preferiblemente, la proteína de fusión de *Haemophilus influenzae* mencionada anteriormente puede obtenerse mediante fusión de mutante de proteína HiD *Haemophilus influenzae* y/o mutante de proteína *Haemophilus influenzae* Hin47, el mutante tiene cada uno un 80 % o más de homología con la proteína de tipo silvestre de la misma, y el mutante puede mantener una inmunogenicidad no inferior al 70 % de la de la proteína de tipo silvestre.

Preferiblemente, el sistema de expresión génica de fusión de la proteína de fusión de *Haemophilus influenzae* mencionada anteriormente mencionada anteriormente incluye, pero no se limita a, un sistema de expresión procarriótica, un sistema de expresión eucariótica y un sistema de expresión de levadura.

Preferiblemente, para la proteína de fusión de *Haemophilus influenzae* mencionada anteriormente, el gen que codifica la proteína *Haemophilus influenzae* HiD y el gen que codifica la proteína *Haemophilus influenzae* Hin47 (proteínas monoméricas que constituyen la proteína de fusión) incluyen, pero no se limitan a, sus tipos silvestres y mutantes.

Preferiblemente, en la proteína de fusión de *Haemophilus influenzae* mencionada anteriormente, el Hin47-HiD puede obtenerse por fusión de Hin47 e HiD en una proporción 1: 1 a través de un ligador, y el ligador permite a los monómeros de la proteína Hin47 y la proteína HiD mantener sus propias conformaciones únicas.

Preferiblemente, en la proteína de fusión de *Haemophilus influenzae* mencionada anteriormente, el ligador incluye, pero no se limita a, G4S, DL o EL, en la que el ligador permite a la proteína Hin47 y a los monómeros de proteína HiD mantener sus propias conformaciones únicas.

Preferiblemente, en la proteína de fusión de *Haemophilus influenzae* mencionada anteriormente, el ligador es G4S con la secuencia mostrada en SEQ ID NO.2.

Preferiblemente, en la proteína de fusión de *Haemophilus influenzae* mencionada anteriormente, la forma de composición de un gen para la proteína de fusión es (n)Hin47-ligador-(n)HiD, (n)HiD-ligador-(n)Hin47, -ligador-HiD-(Hin47-ligador-HiD)n-ligador-Hin47-, -ligador-Hin47-(HiD-ligador-Hin47)n-ligador-HiD-, en la que n es 1-3, que representa el número de copias de los genes para los monómeros.

Preferiblemente, en la proteína de fusión de *Haemophilus influenzae* mencionada anteriormente, la forma de composición del gen para la proteína de fusión es -ligador-(Hin47-ligador-HiD-ligador)n-Hin47-, -ligador-(HiD-ligador-Hin47-ligador)n -HiD-, en la que n es 1-3, que representa el número de copias de los genes para los monómeros.

Preferiblemente, la proteína de fusión de *Haemophilus influenzae* mencionada anteriormente Hin47-HiD, como portador de proteínas de una vacuna conjugada, puede mejorar de manera efectiva la inmunogenicidad de un antígeno polisacárido.

Preferiblemente, la proteína de fusión de *Haemophilus influenzae* mencionada anteriormente Hin47-HiD, puede utilizarse como portador de proteínas en el desarrollo de las vacunas conjugadas en las que los antígenos polisacáridos son ingredientes activos, en la que las vacunas conjugadas incluyen, pero no se limitan a, vacunas contra *Haemophilus influenzae*, neumonía, meningitis, disentería, fiebre tifoidea y similares.

La presente invención proporciona una vacuna de amplio espectro del conjugado de polisacárido-proteína de *Haemophilus influenzae* que se prepara usando uno o más polisacárido(s) capsular(es) en serotipos a, b, c, d, e y f de *Haemophilus influenzae* como antígeno(s), e Hin47-HiD como portador de proteínas.

Preferiblemente, en la vacuna de amplio espectro mencionada anteriormente del conjugado de polisacárido-proteína de *Haemophilus influenzae*, el componente de antígeno polisacárido puede prevenir de manera efectiva el/los serotipo(s) de *Haemophilus influenzae* correspondiente(s), y el componente de portador de proteínas puede prevenir la *Haemophilus influenzae* no tipificable.

Preferiblemente, la vacuna de amplio espectro mencionada anteriormente del conjugado de polisacárido-proteína de *Haemophilus influenzae*, es una vacuna conjugada bivalente que comprende un conjugado de Hia con el portador de proteínas Hin47-HiD y un conjugado de Hib con el portador de proteínas Hin47-HiD.

Preferiblemente, en la vacuna de amplio espectro mencionada anteriormente del conjugado de polisacárido-proteína de *Haemophilus influenzae*, la formulación de la vacuna conjugada bivalente está en forma líquida o polvo liofilizado, conteniendo cada dosis 8-15 µg de serotipo a de polisacárido, 8-15 µg de serotipo b de polisacárido y 20-80 µg de Hin47-HiD.

Preferiblemente, en el conjugado de amplio espectro mencionado anteriormente del conjugado de polisacárido-proteína de *Haemophilus influenzae*, la formulación de la vacuna conjugada bivalente está en forma líquida, cada dosis de 0,5 ml conteniendo 8-15 µg de serotipo a de polisacárido, 8-15 µg de serotipo b de polisacárido y 20-80 µg de Hin47-HiD.

5 Preferiblemente, en la vacuna de amplio espectro mencionada anteriormente del conjugado de polisacárido-proteína de *Haemophilus influenzae*, la vacuna conjugada bivalente no contiene conservantes y puede contener adyuvantes, que incluyen, pero no se limitan a fosfato de aluminio, y la disolución tampón que es PB y NaCl, con una concentración final de NaCl al 0,45 %+ PB de 10 mM.

10 El método mencionado anteriormente para la construcción de la proteína de fusión implica etapas específicas de la siguiente manera:

15 (1) Síntesis de ADN:

un gen de fusión que comprende una copia del gen Hin47 y una copia del gen HiD, con el Hin47 en la dirección 5' de HiD, y el sitio de restricción diseñado en el 5' del gen de fusión que es *NdeI* y en el 3' que es *BamHI*;

20 (2) Clonación del gen de fusión en el vector T:

someter el gen de fusión a doble digestión con *NdeI* y *BamHI*, ligar con un vector T sometido a doble digestión con las mismas endonucleasas a través de ADN T4 ligasa, transformar en una célula competente DH5a, extraer el plásmido y confirmar por PCR y doble digestión;

25 (3) Construcción del vector de expresión:

someter el clon T a doble digestión con *NdeI* y *BamHI* para obtener el gen de fusión, ligar con pET9a sometido a doble digestión con las mismas endonucleasas, transformar en una célula competente BL21, luego verificar el vector de expresión mediante doble digestión y PCR;

30 (4) Prueba de la expresión:

35 recoger una colonia monoclonal positiva, cultivar en medio de LB, centrifugar, recoger el precipitado, disolver de nuevo el precipitado con PBS, romper por sonicación y someter el sobrenadante a electroforesis SDS-PAGE.

Preferiblemente, el método mencionado anteriormente para la construcción de la proteína de fusión tiene las etapas específicas de la siguiente manera:

40 (1) Síntesis de ADN:

45 sintetizar el gen de fusión Hin47-HiD por Life Technologies Corporation, en el que el ligador seleccionado es G4S (GGGGS), el gen de fusión que comprende una copia del gen para Hin47 y una copia del gen para HiD, con Hin47 en la dirección 5' de HiD, y el sitio de restricción diseñado en el 5' del gen de fusión que es *NdeI* y en el 3' que es *BamHI*, en el que la secuencia de aminoácidos de Hin47 que es la secuencia mostrada en SEQ ID NO.1, la secuencia de aminoácidos del ligador que es la secuencia mostrada en SEQ ID NO.2, y la secuencia de aminoácidos de HiD que es la secuencia mostrada en SEQ ID NO.3, a partir de lo cual puede verse que la proteína de fusión Hin47-HiD contiene 790 aa y tiene un peso molecular de 87 KDa;

50 La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión Hin47-HiD

	Secuencia de aminoácidos
Hin47	<p>MTLPSFVSEQNSLAPMLEKVQPAVVTLVVEGKAKVDSRSPFLDDIPEE FKFFFGDRFAEQ FGGRGESKRNFRLGSGVIINASKGYVLTNNAVIDEADKITVQLQDG REFKAKLVGKDEL SDIALVQLEKPSNLTEIKFADSDKLRVGDFTVAIGNPFGLGQTVTSGIV SALGRSTGSDS GTYENYIQTDAAVNRGNSGGALVNLNGELIGINTAIISPSGGNAGIAFA IPSNQASNLVQ QILEFGQVRRGLLGKGGELNADLAKAFNVSAQQGAFVSEVLPKSAA EKAGLKAGDIITA MNGQKISSFAEIRAKIATTGAGKEISLTYLRDGKSHDVKMKLQADDS SQLSSKTELPALD GATLKDYDAKGVKGIEITKIQPNSLAAQRGLKSGDIIIGINRQMIENIR ELNKVLETEPS AVALNILRGDSNFYLLVQ</p>
Ligador	GGGGS
HiD	<p>DPSSHSSNMANTQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYL EQDLAMTKDGR LVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFE TKDGKQAQVYPNRFPLWKSHFRIHTFEDEIEFIQGLEKSTGKKVGIYPEI KAPWFHHQNGKDIAAETLKVLLKKGDKKTDMMVYLQTFDFNELKRIK TELLPQMGM DLKLVQLIAYTDWKETQEKDPKGYWVNYNDWMFKPG AMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIVYTPLVKELAQYNVEV HPYTVRKDALPEFFTDVNQMYDALLNKSGATGVFTDFPDTGVEFLKGI K</p>

(2) Clonación del gen de fusión en el vector T:

5 someter el gen de fusión a doble digestión con *NdeI* y *BamHI*, ligar con un vector T sometido a doble digestión con la misma endonucleasa a través de ADN T4 ligasa, transformar en una célula competente DH5a extrayendo el plásmido e identificando por PCR y doble digestión;

(3) Construcción del vector de expresión:

10 someter el clon T clon a doble digestión con *NdeI* y *BamHI* para obtener el gen de fusión, ligar con pET9a sometido a doble digestión con las mismas endonucleasas, transformar en una célula competente BL21, luego confirmar el vector de expresión por doble digestión y PCR;

(4) Prueba de la expresión:

15 recoger una colonia monoclonal positiva, transferir a medio de LB, cultivar a 37°C mientras se agita a 200 rpm durante la noche, transferir a 50 ml de medio de LB fresco, cuando OD₆₀₀=0,6-0,7, añadir IPTG a una concentración final de 1 mM, inducir a 37°C durante 4 horas, centrifugar y recoger el precipitado, disolver de nuevo el precipitado con PBS, romper por sonicación, someter el sobrenadante a electroforesis SDS-PAGE.

Los resultados muestran que la cepa de expresión construida, cuando se induce por IPTG, expresa con éxito la proteína diana.

25 Debe observarse que las técnicas utilizadas en la construcción e inducción mencionadas anteriormente de la expresión de la proteína de fusión Hin47-HiD son procedimientos experimentales rutinarios conocidos por los expertos en la técnica y están disponibles en la bibliografía publicada y en libros.

30 El método de purificación mencionado anteriormente de la proteína de fusión Hin47-HiD tiene las etapas específicas de la siguiente manera:

(1) Fermentación bacteriana

fermentar bacterias por métodos convencionales, que pueden encontrarse en la bibliografía publicada o conocida por los expertos en la técnica; inocular las células bacterianas en medio de LB, agitar a 250 rpm durante la noche a 37 °C; transferir el cultivo nocturno a un matraz de 2 l que contiene 1 l de medio, cuando OD₆₀₀=0,6-0,7, añadir IPTG a una concentración final de 1 mM, inducir la expresión durante 4 horas, centrifugar a 8000 rpm durante 30 minutos y recoger el precipitado bacteriano;

(2) Purificación de proteínas

después de que se complete la fermentación, centrifugar y recoger el precipitado bacteriano, disolver de nuevo el precipitado con PBS, romper por sonicación, centrifugar y recoger el sobrenadante, pasar el sobrenadante a través de una columna Q, recoger el líquido de flujo pasante (la proteína diana fluye a su través); pasar el líquido de flujo pasante de columna Q a través de una columna CHT, usar PB de 150 mM + NaCl de 170 mM para lavar la columna, y PB de 175 mM + NaCl de 1 M para eludir la proteína diana.

La proteína diana con una pureza del 80 % o superior puede obtenerse mediante la purificación de columna en dos etapas y puede utilizarse en el desarrollo subsecuente de la vacuna conjugada.

Un método de preparación de vacuna conjugada bivalente Hia e Hib tiene las etapas específicas de la siguiente manera:

(1) Purificación y prueba de polisacáridos capsulares

preparar el antígeno polisacárido por métodos comunes, incluir específicamente el cultivo de *Haemophilus influenzae* por fermentación, someter el producto crudo a precipitación fraccionada con CTAB o etanol, recuperar además el antígeno polisacárido capsular por separación de gel CL-4B, luego someter a diálisis y liofilización; los métodos para la purificación e identificación de los polisacáridos capsulares de serotipo a y serotipo b de *Haemophilus influenzae* pueden encontrarse en la bibliografía publicada;

(2) Preparación de los volúmenes de conjugados de Hia e Hib

preparación de la vacuna conjugada de Hia: después de añadir serotipo a de polisacárido capsular al CDAP (que es tetrafluoroborato de ciano- 4-dimetilaminopiridina) durante 30 s, añadir TEA de 0,2 M para ajustar el pH a 9,5 para activar el polisacárido durante 2,5 min; ajustar el pH a 9,0 y luego añadir la proteína portadora según la proporción de polisacárido con respecto a proteína de 1: 1, hacer reaccionar a temperatura ambiente durante 1 h, mantener la mezcla resultante a 4°C durante la noche y añadir glicina de 2 M para terminar la reacción; someter a diálisis para eliminar los reactivos de reacción, separar y purificar el conjugado por gel CL-4B; o

preparación de la vacuna conjugada de Hib: después de añadir serotipo b de polisacárido capsular al CDAP durante 30 s, añadir TEA de 0,2 M para ajustar el pH a 9,5 para activar el polisacárido durante 2,5 min; ajustar el pH a 9,0 y luego añadir la proteína portadora según la proporción de polisacárido con respecto a proteína de 1: 1, hacer reaccionar a temperatura ambiente durante 1 h, mantener la mezcla resultante a 4°C durante la noche, añadir glicina de 2 M para terminar la reacción; someter a diálisis para eliminar los reactivos de reacción, separar y purificar el conjugado por gel CL-4B;

(3) Preparación de vacuna conjugada bivalente de Hia e Hib

la preparación en lotes final recomendada contiene 10 ug (contenido de polisacárido) de conjugado de Hia e Hib, NaCl al 0,45 % y PB de 10 mM por dosis; el producto preparado basándose en la fórmula mencionada anteriormente puede proporcionar protección suficiente para la población inmunizada;

según la formulación final y la concentración del volumen de conjugado, calcular la cantidad requerida del volumen de conjugado; tomar la cantidad predeterminada de volumen de conjugado, agregar PB y NaCl y luego suplementar con WFI de manera que la concentración final de Hia e Hib en el conjugado es de 20 ug/ml (contenido de polisacárido), la concentración final de NaCl es de 0,9 % y la concentración final de PB es de 20 mM; distribuir para obtener el lote final;

(4) Estudio de inmunogenicidad de vacuna conjugada bivalente de Hia e Hib

los animales pueden producir reacciones de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hia y el polisacárido capsular de Hib, y la reacción de anticuerpos contra la proteína portadora también puede generarse después de inmunizarse con la vacuna conjugada bivalente de Hia e Hib mencionada anteriormente en una dosis de 1/4 (125 µl); en el que el anticuerpo contra el polisacárido capsular Hia puede prevenir de manera efectiva el serotipo a de *Haemophilus influenzae*, el anticuerpo contra el polisacárido

capsular Hib puede prevenir de manera efectiva el serotipo b de *Haemophilus influenzae* y el anticuerpo contra la proteína portadora (Hin47, HiD) puede prevenir de manera efectiva la *Haemophilus influenzae* no tipificable.

5 Los efectos beneficiosos de la presente invención son de la siguiente manera:

la proteína de fusión Hin47-HiD puede mejorar de manera efectiva la inmunogenicidad del antígeno proteico individual de Hin47 y HiD; además, la proteína de fusión Hin47-HiD puede mejorar de manera efectiva la inmunogenicidad de los antígenos polisacáridos como portador de proteínas de la vacuna conjugada; la proteína de fusión Hin47-HiD
10 puede utilizarse como portador de proteínas de la vacuna conjugada para desarrollar una vacuna conjugada de Hia, una vacuna conjugada de Hib, y una vacuna bivalente que contiene la vacuna conjugada de Hia y la vacuna conjugada de Hib.

Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 ilustra la prueba de la expresión de la proteína de fusión;

la figura 2 ilustra el proceso de purificación de la proteína de fusión Hin47-HiD;

20 la figura 3 ilustra la comparación entre la inmunogenicidad de Hin47 y HiD

la figura 4 ilustra la comparación de inmunogenicidad de anti-Hin47 entre Hin47 y Hin47-HiD, donde la dosis de inmunización del monómero Hin47 en la proteína de fusión Hin47-HiD es la misma que la del antígeno Hin47 en el grupo de control, donde L, M y H indican que la dosis del monómero Hin47 (incluyendo Hin47 en el grupo de control)
25 en la proteína de fusión Hin47-HiD es 1 µg, 5 µg y 10 µg, respectivamente;

la figura 5 ilustra la comparación de inmunogenicidad de anti-HiD entre HiD y Hin47-HiD, en la que la dosis de inmunización del monómero HiD en la proteína de fusión Hin47-HiD es la misma que la del antígeno HiD en el grupo de control, en el que L, M y H indican que la dosis del antígeno de monómero HiD (incluyendo HiD en el grupo de control)
30 en la proteína de fusión Hin47-HiD es de 1 µg, 5 µg y 10 µg, respectivamente;

la figura 6 ilustra el proceso de purificación de conjugado de Hia;

35 la figura 7 ilustra el proceso de purificación de conjugado de Hib.

Descripción detallada de la invención

La solución técnica de la presente invención se describe además a continuación con referencia a ejemplos específicos.

40 Ejemplo 1: Preparación de la proteína de fusión Hin47-HiD

(1) Construcción del vector de expresión de Hin47-HiD

45 El gen de fusión Hin47-HiD se sintetizó por Life Technologies Corporation, en el que el ligador seleccionado era G4S (GGGS), el gen de fusión comprendía una copia del gen para Hin47 y una copia del gen para HiD, con Hin47 en la dirección 5' de HiD, y el sitio de restricción diseñado en el 5' del gen de fusión que es *NdeI* y en el 3' que es *BamHI*, en el que la secuencia de aminoácidos de Hin47 era la secuencia mostrada en SEQ ID NO.1, la secuencia de aminoácidos del ligador era la secuencia mostrada en SEQ ID NO.2, y la secuencia de aminoácidos del HiD era la secuencia mostrada en SEQ ID NO. 3, véase la tabla 1 a continuación para detalles.

50 Tabla 1 Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión Hin47-HiD

	Secuencia de aminoácidos
Hin47	MTLPSFVSEQNSLAPMLEKVQPAVVTLVVEGKAKVDSRSPFLDDIPEE FKFFFGDRFAEQ FGGRGESKRNFRLGSGVVIINASKGYVLTNNNAVIDEADKITVQLQDG REFKAKLVGKDEL SDIALVQLEKPSNLTEIKFADSDKLRVGDFTVAIGNPFGLGQTVTSGIV SALGRSTGSDS GTYENYIQTDAAVNRGNSGGALVNLNGELIGINTAIISPSGGNAGIAFA IPSNQASNLVQ QILEFGQVRRGLLGIKGGELNADLAKAFNVSAQQGAFVSEVLPKSAA EKAGLKAGDIITA MNGQKISSFAEIRAKIATTGAGKEISLTYLRDGKSHDVKMKLQADDS SQLSSKTELPALD GATLKDYDAKGVKGIETKIQPNSLAAQRGLKSGDIIIIGINRQMIENIR ELNKVLETEPS AVALNILRGDSNFYLLVQ
Ligador	GGGGS
HiD	DPSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQAD YLEQDLAMTKDGR LVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRIYVIDFTLKEIQSLEMTENF ETKDGKQAQVYPNRFPLWKSHFRIHTFEDEIEFIQGLEKSTGKKVGIY PEIKAPWFHHQNGKDIAAETLKVLLKYGDKKTDMMVYLQTFDFNEL KRIKTELLPQMGMDLKLVLQLIAYTDWKETQEKDPKGYWVNYNDW MFKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIVYTPLVKELA QYNVEVHPYTVRKDALPEFFTDVNQMYDALLNKSGATGVFTDFPDT GVEFLKGIK

Como puede verse en la tabla 1, la proteína de fusión Hin47-HiD contiene 790 aa y tiene un peso molecular de 87 kD.

- 5 El gen de fusión se sometió a doble digestión con *NdeI* y *BamHI*, ligado con un vector T sometido a doble digestión con las mismas endonucleasas usando ADN T4 ligasa, el plásmido resultante se transformó en células competentes DH5a, y extraído y verificado por PCR y doble digestión.

- 10 El clon T se sometió a doble digestión con *NdeI* y *BamHI* para obtener el gen de fusión, que se ligó con pET9a sometido a doble digestión con las mismas endonucleasas, el gen de fusión en el plásmido de expresión se transformó en células competentes BL21, y el vector de expresión se confirmó por doble digestión y PCR.

- 15 Las colonias monoclonales positivas se recolectaron, se transfirieron a medio de LB, se cultivaron a 37°C y se agitaron a 200 rpm durante la noche, se transfirieron a 50 ml de medio de LB fresco, cuando $OD_{600}=0,6-0,7$, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM, y después de inducción a 37°C durante 4 horas, se recolectó el sedimento celular por centrifugación. El precipitado se disolvió de nuevo con PBS y se sonicó, y el sobrenadante se sometió a electroforesis SDS-PAGE para analizar si se expresó la proteína, el resultado se muestra en la figura 1:

- 20 La figura 1 muestra que la proteína de fusión se expresó altamente en el sobrenadante.

Debe observarse que las técnicas utilizadas en la construcción del vector de expresión para la proteína de fusión Hin47-HiD y la expresión inducida son procedimientos experimentales rutinarios conocidos por los expertos en la técnica y están disponibles en bibliografía publicada y en libros.

- 25 (2) Purificación de la proteína de fusión Hin47-HiD

Las células bacterianas que expresan Hin47-HiD se cultivaron durante la noche, y luego se transfirieron al medio de fermentación. Cuando $OD_{600}=0,6-0,7$, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM, y después de la inducción a 37°C durante 4 horas, la bacteria se sometió a centrifugación para recoger el precipitado.

El precipitado se disolvió de nuevo con PBS, se sonicó, y se centrifugó para recoger el sobrenadante. El sobrenadante se pasó a través de una columna Q para recoger el líquido de flujo pasante (la proteína diana fluyó a su través), luego el líquido de flujo pasante de columna Q pasó a través de una columna CHT, y PB de 150 mM + NaCl de 170 mM se utilizó para lavar la columna, y PB de 175 mM + NaCl de 1 M se utilizó para eludir la proteína diana. El proceso de purificación es ventajoso dado que tiene etapas simples, puede hacer uso de rellenos convencionales, y puede producir la proteína diana con la pureza del 80 % o superior con solo dos etapas. El resultado se muestra en la figura 2.

Como puede verse en la figura 2, la proteína diana con una pureza del 80 % o superior puede obtenerse mediante la purificación de columna en dos etapas.

Ejemplo 2: Estudio sobre la inmunogenicidad de la proteína de fusión Hin47-HiD

Se inmunizó un ratón BALB/C con la proteína de fusión Hin47-HiD tres veces en intervalos de dos semanas para estudiar su inmunogenicidad, con Hin47 y HiD como controles. Se recolectó toda la sangre 14 días después de la última inmunización y se sometieron a prueba los niveles de anticuerpos de suero.

En los grupos de control, las dosis de inmunización del antígeno de proteína Hin47 o HiD fueron de 1 µg, 5 µg y 10 µg, respectivamente mientras que, en el grupo de inmunización de la proteína de fusión, las dosis del monómero proteico fueron de 1 µg, 5 µg y 10 µg, respectivamente.

Los ratones se inmunizaron con antígenos Hin47 y HiD en tres dosis de 1 µg, 5 µg y 10 µg, respectivamente, y los títulos de anticuerpos de los tres sueros inmunes se sometieron a prueba con los antígenos correspondientes, los resultados se muestran en la figura 3.

Análisis estadístico:

$P(\text{Hin47 } 1 \text{ } \mu\text{g}: \text{HiD } 1 \text{ } \mu\text{g})=0,000<0,01$

$P(\text{Hin47 } 5 \text{ } \mu\text{g}: \text{HiD } 5 \text{ } \mu\text{g})=0,000<0,01$

$P(\text{Hin47 } 10 \text{ } \mu\text{g}: \text{HiD } 10 \text{ } \mu\text{g})=0,000<0,01$

Los resultados mostraron que Hin47 genera una respuesta inmune más fuerte que HiD a la misma dosis.

Se estudió la inmunogenicidad de la proteína de fusión Hin47-HiD en tres dosis, y la dosis de inmunización real del monómero proteico en la proteína de fusión fue la misma que la del antígeno de control (Hin47 o HiD). En el experimento de comparación para la inmunogenicidad entre Hin47-HiD e Hin47, los tres grupos L, M y H representaron las dosis de antígeno de monómero Hin47 en la proteína de fusión de 1 µg, 5 µg y 10 µg, respectivamente.

La comparación de la inmunogenicidad entre Hin47 y Hin47-HiD se muestra en la figura 4.

Análisis estadístico:

$P(\text{grupo L Hin47: Hin47-HiD})=0,2820>0,05$

$P(\text{grupo M Hin47: Hin47-HiD})=0,2820>0,05$

$P(\text{grupo H Hin47: Hin47-HiD})=0,350>0,05$

Los resultados muestran que la proteína de fusión Hin47-HiD no afecta a la inmunogenicidad de Hin47.

Se estudió la inmunogenicidad de la proteína de fusión Hin47-HiD en tres dosis, y la dosis de inmunización real del monómero proteico en la proteína de fusión fue la misma que la del antígeno de control (Hin47 o HiD). En el experimento de comparación para la inmunogenicidad entre Hin47-HiD e HiD, los tres grupos L, M y H representaron las dosis de antígeno de monómero HiD en la proteína de fusión de 1 µg, 5 µg y 10 µg, respectivamente.

La comparación de la inmunogenicidad entre HiD y Hin47-HiD se muestra en la figura 5.

Análisis estadístico:

$P(\text{grupo L HiD: Hin47-HiD}) = 0,000<0,01$

$P(\text{grupo M HiD: Hin47-HiD})=0,000<0,01$

P(grupo H HiD: Hin47-HiD)=0,000<0,01

5 Los resultados muestran que la proteína de fusión Hin47-HiD puede mejorar de manera efectiva la inmunogenicidad de HiD.

Ejemplo 3: Preparación de volúmenes de conjugados de Hia e Hib

10 Los conjugados de polisacárido-proteína de polisacáridos Hia e Hib se prepararon usando el mismo método. Específicamente, después de añadir el polisacárido capsular a CDAP durante 30 segundos, se añadió TEA de 0,2 M para ajustar el pH a 9,5 para la activación de polisacárido, y la activación se continuó durante 2,5 min, después de la activación, el pH se ajustó a 9,0, se añadió proteína de fusión Hin47-HiD según una proporción de polisacárido con respecto a proteína de 1: 1, la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora, la mezcla resultante se mantuvo a 4°C durante la noche, y luego se añadió glicina de 2 M para terminar la reacción; la mezcla resultante se sometió a diálisis para eliminar los reactivos de reacción, y el conjugado se separó y se purificó por gel CL-4B.

15 El resultado de la separación en gel CL-4B del conjugado de Hia se muestra en la figura 6.

20 El resultado de la separación en gel CL-4B del conjugado de Hib se muestra en la figura 7.

Tabla 2 Resultados de pruebas de vacuna conjugada bivalente Hia e Hib

Nombre del conjugado	Contenido de polisacáridos mg/ml	Contenido de proteínas mg/ml	Polisacárido / proteína	Sin polisacáridos	Sin proteínas
Volumen de conjugado de Hia	3,5	7,21	0,485	13 %	4 %
Volumen de conjugado de Hib	2,8	8,47	0,33	10 %	2 %

25 Ejemplo 4: Producción del producto terminado de vacuna conjugada bivalente de Hia e Hib, es decir, vacuna conjugada contra serotipo a y serotipo b de *Haemophilus influenzae*

30 Al tomar como ejemplo la producción de 200 viales de la vacuna, en teoría, se requirieron 100 ml del volumen final para preparar 200 viales del lote final. Según la concentración del volumen de conjugado, se requirieron 0,57 ml de volumen de conjugado de Hia, 0,72 ml de volumen de conjugado de Hib, 1 ml de PB a 1 M y 50 ml de NS, suministrados con 47,7 ml de WFI, para obtener el volumen final, entonces se llenó cada vial con 0,5 ml para obtener el producto terminado.

35 El lote final contiene 10 ug (contenido de polisacáridos) de conjugado de Hia y 10 µg de conjugado de Hib, NaCl al 0,45 % y PB de 10 mM por dosis.

Ejemplo 5: Estudio sobre la inmunogenicidad de la vacuna conjugada contra serotipo a y serotipo b de *Haemophilus influenzae*

40 Se evaluó la inmunogenicidad de la vacuna conjugada contra serotipo a y serotipo b de *Haemophilus influenzae* (con Hin47-HiD como la proteína portadora) según el protocolo para la prueba de eficacia de la vacuna conjugada contra el serotipo b de *Haemophilus influenzae* descrito en la Farmacopea China. Específicamente, se inmunizaron 10 ratones BALB/C con un peso de 12-14 g con la vacuna conjugada contra serotipo a y serotipo b de *Haemophilus influenzae* en dosis humana de 1/4 (conteniendo 2,5 µg de polisacárido Hia y 2,5 µg de polisacárido Hib respectivamente), y se inmunizaron 10 ratones BALB/C con NS como control negativo, se realizó la inmunización 2 veces en intervalos de 2 semanas, y se retiraron los globos oculares para recolectar suero 14 días después de la última inmunización.

50 Los títulos de anticuerpos en suero tanto contra serotipo a como serotipo b de polisacárido capsular se midieron mediante ELISA, y se utilizó la medición de las muestras de suero de ratones inmunizados por NS como valor de corte para calcular la tasa de respuesta inmune positiva en el grupo vacunal. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3 Resultados de prueba de respuesta inmune con la vacuna conjugada contra serotipo a y serotipo b de *Haemophilus influenzae*

55

Nombre de vacuna conjugada	Antígeno de recubrimiento	Dilución	Tasa de respuesta inmune
vacuna conjugada contra serotipo a y serotipo b de <i>Haemophilus influenzae</i>	serotipo a de polisacárido capsular	100	100 %
	serotipo b de polisacárido capsular	100	100 %

Los resultados muestran que: la proteína de fusión Hin47-HiD, como portador de proteínas, puede estimular de manera efectiva al cuerpo para producir respuesta inmune a los antígenos polisacáridos. En este ejemplo, se inmunizaron los ratones con la vacuna conjugada contra serotipo a y serotipo b de *Haemophilus influenzae* en dosis humana de 1/4, y la tasa de respuesta tras dos inmunizaciones fue del 100 %, lo que alcanzó el estándar de liberación de la Farmacopea China para la eficacia de inmunización de la vacuna conjugada de Hib.

Ejemplo 6: Estudio sobre la protección de la vacuna conjugada contra serotipo a y serotipo b de *Haemophilus influenzae*

El contenido de anticuerpos específicos en suero puede medirse de manera efectiva mediante ELISA, sin embargo, no todos los anticuerpos tienen función de protección bactericida, y los anticuerpos bactericidas séricos (SBA) pueden reflejar la actividad funcional de anticuerpos, lo que refleja directamente los efectos protectores de la vacuna.

Los resultados de prueba de SBA en sueros de ratones inmunizados con la vacuna conjugada contra serotipo a y serotipo b de *Haemophilus influenzae* se muestran en la tabla 4.

Tabla 4 Resultados de prueba de SBA de la vacuna conjugada contra serotipo a y serotipo b de *Haemophilus influenzae*

Nombre de vacuna conjugada	Cepa bacteriana	SBA
vacuna conjugada contra serotipo a y serotipo b de <i>Haemophilus influenzae</i>	Serotipo a de <i>Haemophilus influenzae</i>	1341
	Serotipo b de <i>Haemophilus influenzae</i>	1560

En este ejemplo, el SBA en sueros de ratones inmunizados con la vacuna conjugada contra serotipo a y serotipo b de *Haemophilus influenzae* fue tan alto como 1300, lo que puede prevenir de manera efectiva la infección por serotipo a de *Haemophilus influenzae* y serotipo b de *Haemophilus influenzae*.

Tabla 5 Títulos de anticuerpos contra la proteína portadora en la vacuna conjugada contra serotipo a y serotipo b de *Haemophilus influenzae*

Nombre de vacuna conjugada	Título de anticuerpo de antígeno anti-Hin47 (GMT/IgOD)	Título de anticuerpo de antígeno anti-HiD (GMT/IgOD)
vacuna conjugada contra serotipo a y serotipo b de <i>Haemophilus influenzae</i>	6,34	5,65

Como puede verse en la tabla 5, los ratones produjeron simultáneamente anticuerpos para la proteína portadora después de inmunizarse con la vacuna conjugada contra serotipo a y serotipo b de *Haemophilus influenzae*, en los que el título de anticuerpo anti-HiD fue de 5,65 y el de anticuerpo anti-Hin47 fue de hasta 6,34. Estos anticuerpos podrían prevenir de manera efectiva la infección de *Haemophilus influenzae* no tipificable.

Los resultados de protección muestran que: después de que se inmunizan los ratones con la vacuna conjugada contra serotipo a y serotipo b de *Haemophilus influenzae*, anticuerpos polisacáridos anti-HIA y anti-Hib pueden prevenir de manera efectiva serotipo a de *Haemophilus influenzae* y serotipo b de *Haemophilus influenzae*, mientras que los anticuerpos contra la proteína portadora Hin47-HiD pueden prevenir de manera efectiva *Haemophilus influenzae* no tipificable.

El principio de aplicación de la presente invención puede ser de la siguiente manera: la vacuna conjugada polisacárido-proteína puede promover que el antígeno polisacárido independiente del timo se convierta en dependiente del timo, haciendo de ese modo que el antígeno polisacárido sea adecuado para inmunoprofilaxis en poblaciones como lactantes y niños. La primera generación del portador de proteínas de vacuna conjugada es el toxoide tetánico TT y el toxoide diftérico DT, la segunda generación del portador de proteínas de vacuna conjugada es una proteína no tóxica como mutantes de toxina diftérica CRM; la presente invención pertenece a una nueva generación de portador de proteínas de vacuna conjugada, que está caracterizada porque, además de mejorar de manera efectiva la inmunogenicidad de los antígenos polisacáridos, los anticuerpos contra la propia proteína portadora también pueden

5 resistir determinadas enfermedades. Hin47 y HiD han demostrado prevenir *Haemophilus influenzae* no tipificable, mientras que la proteína de fusión Hin47-HiD desarrollada por la presente invención puede mejorar significativamente la inmunogenicidad del antígeno débil HiD sin afectar a la inmunogenicidad de Hin47 y, lo que es más importante, la proteína de fusión Hin47-HiD puede ser eficaz como un portador de proteínas de vacuna conjugada. Por tanto, en la presente invención, se desarrolla un portador de proteínas de vacuna conjugada novedoso, la vacuna conjugada desarrollada, usándolo como portador, puede prevenir la infección bacteriana correspondiente al antígeno polisacárido, además, los anticuerpos contra la propia proteína portadora pueden prevenir la *Haemophilus influenzae* no tipificable.

10 La descripción detallada anteriormente de la proteína de fusión de *Haemophilus influenzae*, el método de construcción y uso de los mismos con referencia a los ejemplos anteriores, se pretende que sea ilustrativa y no limitativa, y determinadas realizaciones pueden extenderse dentro del alcance de la presente invención. Por tanto, cualquier cambio y modificación sin apartarse del concepto general de la presente invención debe entrar dentro del alcance de protección de la presente invención.

15

Lista de secuencias

<110> CanSino Biologics Inc.

20 <120> Proteína de fusión de *Haemophilus influenzae* y método de construcción y uso de la misma

<130> P16071EPPC

<160> 3

25

<170> Patente en versión 3.3

<210> 1

<211> 438

30

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

<400> 1

ES 2 784 428 T3

Met Thr Leu Pro Ser Phe Val Ser Glu Gln Asn Ser Leu Ala Pro Met
 1 5 10 15

Leu Glu Lys Val Gln Pro Ala Val Val Thr Leu Ser Val Glu Gly Lys
 20 25 30

Ala Lys Val Asp Ser Arg Ser Pro Phe Leu Asp Asp Ile Pro Glu Glu
 35 40 45

Phe Lys Phe Phe Phe Gly Asp Arg Phe Ala Glu Gln Phe Gly Gly Arg
 50 55 60

Gly Glu Ser Lys Arg Asn Phe Arg Gly Leu Gly Ser Gly Val Ile Ile
 65 70 75 80

Asn Ala Ser Lys Gly Tyr Val Leu Thr Asn Asn Ala Val Ile Asp Glu
 85 90 95

Ala Asp Lys Ile Thr Val Gln Leu Gln Asp Gly Arg Glu Phe Lys Ala
 100 105 110

Lys Leu Val Gly Lys Asp Glu Leu Ser Asp Ile Ala Leu Val Gln Leu
 115 120 125

Glu Lys Pro Ser Asn Leu Thr Glu Ile Lys Phe Ala Asp Ser Asp Lys
 130 135 140

Leu Arg Val Gly Asp Phe Thr Val Ala Ile Gly Asn Pro Phe Gly Leu
 145 150 155 160

Gly Gln Thr Val Thr Ser Gly Ile Val Ser Ala Leu Gly Arg Ser Thr
 165 170 175

ES 2 784 428 T3

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

Val Asn Arg Gly Asn Ser Gly Gly Ala Leu Val Asn Leu Asn Gly Glu
195 200 205

Leu Ile Gly Ile Asn Thr Ala Ile Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asn Ala
210 215 220

Gly Ile Ala Phe Ala Ile Pro Ser Asn Gln Ala Ser Asn Leu Val Gln
225 230 235 240

Gln Ile Leu Glu Phe Gly Gln Val Arg Arg Gly Leu Leu Gly Ile Lys
245 250 255

Gly Gly Glu Leu Asn Ala Asp Leu Ala Lys Ala Phe Asn Val Ser Ala
260 265 270

Gln Gln Gly Ala Phe Val Ser Glu Val Leu Pro Lys Ser Ala Ala Glu
275 280 285

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

Lys Ile Ser Ser Phe Ala Glu Ile Arg Ala Lys Ile Ala Thr Thr Gly
305 310 315 320

Ala Gly Lys Glu Ile Ser Leu Thr Tyr Leu Arg Asp Gly Lys Ser His
325 330 335

Asp Val Lys Met Lys Leu Gln Ala Asp Asp Ser Ser Gln Leu Ser Ser
340 345 350

Lys Thr Glu Leu Pro Ala Leu Asp Gly Ala Thr Leu Lys Asp Tyr Asp
355 360 365

Ala Lys Gly Val Lys Gly Ile Glu Ile Thr Lys Ile Gln Pro Asn Ser
370 375 380

Leu Ala Ala Gln Arg Gly Leu Lys Ser Gly Asp Ile Ile Ile Gly Ile
385 390 395 400

Asn Arg Gln Met Ile Glu Asn Ile Arg Glu Leu Asn Lys Val Leu Glu
405 410 415

Thr Glu Pro Ser Ala Val Ala Leu Asn Ile Leu Arg Gly Asp Ser Asn
420 425 430

Phe Tyr Leu Leu Val Gln
435

5 <210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Polipéptido de cadena corta
<400> 2

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

15 <210> 3
<211> 347
<212> PRT
<213> *Haemophilus influenzae*

20 <400> 3

Asp Pro Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys Ser
1 5 10 15

Asp Lys Ile Ile Ile Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro Glu
20 25 30

His Thr Leu Glu Ser Lys Ala Leu Ala Phe Ala Gln Gln Ala Asp Tyr
35 40 45

Leu Glu Gln Asp Leu Ala Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Val Ile
50 55 60

His Asp His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe Pro
65 70 75 80

His Arg His Arg Lys Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Ile Asp Phe Thr Leu
85 90 95

Lys Glu Ile Gln Ser Leu Glu Met Thr Glu Asn Phe Glu Thr Lys Asp
100 105 110

Gly Lys Gln Ala Gln Val Tyr Pro Asn Arg Phe Pro Leu Trp Lys Ser
115 120 125

His Phe Arg Ile His Thr Phe Glu Asp Glu Ile Glu Phe Ile Gln Gly
130 135 140

ES 2 784 428 T3

Leu Glu Lys Ser Thr Gly Lys Lys Val Gly Ile Tyr Pro Glu Ile Lys
 145 150 155 160

Ala Pro Trp Phe His His Gln Asn Gly Lys Asp Ile Ala Ala Glu Thr
 165 170 175

Leu Lys Val Leu Lys Lys Tyr Gly Tyr Asp Lys Lys Thr Asp Met Val
 180 185 190

Tyr Leu Gln Thr Phe Asp Phe Asn Glu Leu Lys Arg Ile Lys Thr Glu
 195 200 205

Leu Leu Pro Gln Met Gly Met Asp Leu Lys Leu Val Gln Leu Ile Ala
 210 215 220

Tyr Thr Asp Trp Lys Glu Thr Gln Glu Lys Asp Pro Lys Gly Tyr Trp
 225 230 235 240

Val Asn Tyr Asn Tyr Asp Trp Met Phe Lys Pro Gly Ala Met Ala Glu
 245 250 255

Val Val Lys Tyr Ala Asp Gly Val Gly Pro Gly Trp Tyr Met Leu Val
 260 265 270

Asn Lys Glu Glu Ser Lys Pro Asp Asn Ile Val Tyr Thr Pro Leu Val
 275 280 285

Lys Glu Leu Ala Gln Tyr Asn Val Glu Val His Pro Tyr Thr Val Arg
 290 295 300

Lys Asp Ala Leu Pro Glu Phe Phe Thr Asp Val Asn Gln Met Tyr Asp
 305 310 315 320

Ala Leu Leu Asn Lys Ser Gly Ala Thr Gly Val Phe Thr Asp Phe Pro
 325 330 335

Asp Thr Gly Val Glu Phe Leu Lys Gly Ile Lys
 340 345

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión de *Haemophilus influenzae* Hin47-Ligador-HiD, en la que la secuencia de aminoácidos de Hin47 es la secuencia mostrada en SEQ ID NO.1, y la secuencia de aminoácidos de HiD es la secuencia mostrada en SEQ ID NO.3, y el ligador es G4S con la secuencia mostrada en SEQ ID NO.2, en la que la proteína de fusión tiene 790 aa y un peso molecular de 87 kD.
2. Proteína de fusión según la reivindicación 1 para su uso como portador de proteínas en la preparación de una vacuna conjugada utilizando un antígeno polisacárido como ingrediente activo.
3. Proteína de fusión según la reivindicación 2, en la que la vacuna conjugada es contra *Haemophilus influenzae*, neumonía, meningitis, disentería o fiebre tifoidea.
4. Proteína de fusión según la reivindicación 2, en la que la vacuna conjugada es una vacuna conjugada bivalente que comprende un conjugado de Hia con el portador de proteínas Hin47-HiD y un conjugado de Hib con el portador de proteínas Hin47-HiD.
5. Preparación de vacuna conjugada de polisacárido-proteína de *Haemophilus influenzae* preparada usando uno o más polisacárido(s) capsular(es) en un serotipo a, b, c, d, e y f de *Haemophilus influenzae* como antígeno(s), y la proteína de fusión según la reivindicación 1 como portador de proteínas.
6. Preparación de vacuna según la reivindicación 5, en la que el componente de antígeno polisacárido en la preparación puede prevenir de manera efectiva el/los serotipo(s) de *Haemophilus influenzae* correspondiente(s), y el componente de portador de proteínas puede prevenir la *Haemophilus influenzae* no tipificable.
7. Preparación de vacuna según la reivindicación 5, en la que la preparación de vacuna es una vacuna conjugada bivalente que comprende un conjugado de Hia con el portador de proteínas Hin47-HiD y un conjugado de Hib con el portador de proteínas.
8. Preparación de vacuna según la reivindicación 7, en la que la formulación de la vacuna conjugada bivalente está en forma líquida o polvo liofilizado, conteniendo cada dosis 8-15 µg de serotipo a de polisacárido, 8-15 µg de serotipo b de polisacárido y 20-80 µg del portador de proteínas.
9. Preparación de vacuna según la reivindicación 7, en la que la formulación de la vacuna conjugada bivalente está en forma líquida, conteniendo cada dosis de 0,5 ml 8-15 µg de serotipo a de polisacárido, 8-15 µg de serotipo b de polisacárido y 20-80 µg del portador de proteínas.
10. Preparación de vacuna según la reivindicación 9, en la que la vacuna conjugada bivalente no contiene conservantes, y la disolución tampón en la preparación es PB y NaCl, con una concentración final de 0,45 % NaCl + PB 10 mM.
11. Método para la construcción de la proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que comprende las siguientes etapas:
 - (1) sintetizar gen:

un gen de fusión que comprende una copia del gen Hin47 y una copia del gen HiD, con el Hin47 en la dirección 5' de HiD, y siendo el sitio de restricción diseñado en el 5' del gen de fusión *NdeI* y siendo en el 3' *BamHI*;
 - (2) construir la clonación del gen de fusión en el vector T:

someter el gen de fusión a doble digestión con *NdeI* y *BamHI*, ligar con un vector T sometido a doble digestión con las mismas endonucleasas a través de ADN T4 ligasa, transformar en una célula competente DH5a, extraer el plásmido y confirmar por PCR y doble digestión;
 - (3) construir un vector de expresión:

someter el clon T a doble digestión con *NdeI* y *BamHI* para obtener el gen de fusión, ligar con pET9a sometido a doble digestión con las mismas endonucleasas, transformar en una célula competente BL21, luego verificar el vector de expresión mediante doble digestión y PCR;
 - (4) someter a prueba la expresión:

recoger una colonia monoclonal positiva, cultivar en medio de LB, centrifugar, recoger el precipitado, disolver de nuevo el precipitado con PBS, romper por sonicación y someter el sobrenadante a electroforesis SDS-

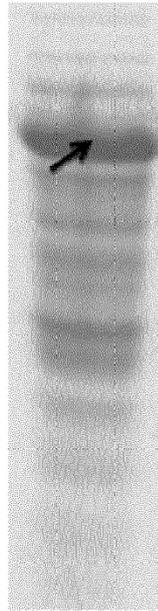


FIG.1



FIG.2

Comparación entre la inmunogenicidad de Hin47 y HiD

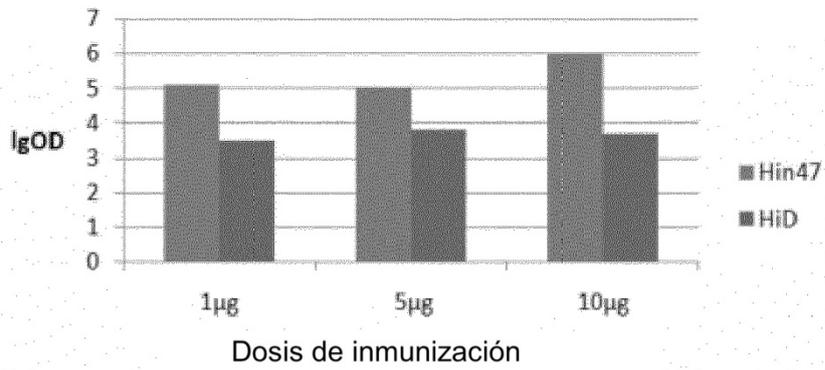


FIG.3

Inmunogenicidad de la proteína de fusión Hin47 y Hin47-HiD

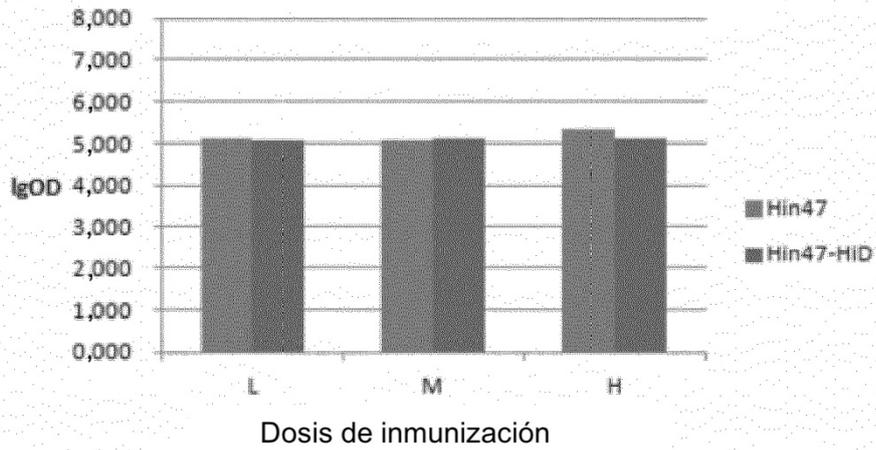


FIG.4

Inmunogenicidad de la proteína de fusión Hin47 y Hin47-HiD

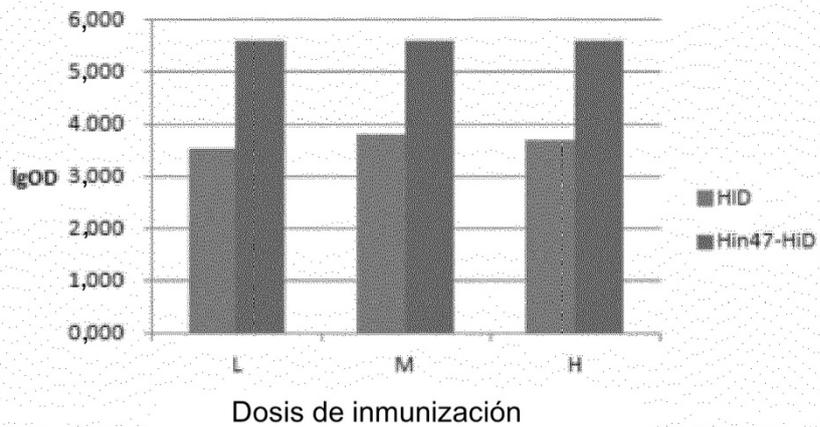


FIG.5

