

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 984**

51 Int. Cl.:

A61K 39/002 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2011 PCT/US2011/059501**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12067866**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2011 E 11841437 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 2640417**

54 Título: **Vacuna multivalente para filariasis**

30 Prioridad:

07.03.2011 US 201161449954 P

10.08.2011 US 201161522079 P

15.11.2010 US 413681 P

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

07.01.2021

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY
OF ILLIONIS (100.0%)**

**352 Henry Administration Building, 506 South
Wright Street
Urbana, IL 61801, US**

72 Inventor/es:

KALYANASUNDARAM, RAMASWAMY

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 800 984 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

Vacuna multivalente para filariasis

5 Introducción

Esta solicitud de patente reclama el beneficio de prioridad de Solicitud Provisional de los Estados Unidos Número de Serie 61/413,681, presentada el 15 de noviembre de 2010; Solicitud Provisional de Estados Unidos Número de Serie 61/449,954, presentada el 7 de marzo de 2011 y de Solicitud Provisional de Estados Unidos Número de Serie 61/522,079, presentada el 10 de agosto de 2011.

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo el número de contrato 5R01AI064745-04 otorgado por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene determinados derechos con respecto a la invención.

15 Antecedentes de la invención

La filariasis linfática causada por los nematodos filariales *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* y *Brugia timori*, afecta a más de 120 millones de personas en todo el mundo (OMS (1992) World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 821: 1-71). El programa de administración masiva de medicamentos de la Organización Mundial de la Salud está reduciendo significativamente la tasa de incidencia de filariasis linfática en muchas partes del mundo (Hotez (2009) Clin. Pharmacol. El r. 85 (6): 659-64). Sin embargo, se ha informado que la falta de efectividad en la administración masiva de medicamentos en varias regiones endémicas se debe principalmente a no conformidad (Babu & (2008) Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 102(12): 1207-13; El-Setouhy, y col. (2007) Am. J. Trop. Med. Hyg. 77(6): 1069-73). Además, se ha informado de resistencia a los medicamentos al menos a uno de los medicamentos en la combinación de medicamentos en masa (Horton (2009) Ann. Trop. Med. Parasitol. 103(1): S33-40; Schwab, y col. (2007) Parasitology 134(Pt 7): 1025-40). Dado que se requiere la administración anual de los medicamentos en masa para un control efectivo, existe una preocupación alarmante por seleccionar parásitos resistentes a los medicamentos. Por lo tanto, existe una necesidad inmediata de una estrategia múltiple para controlar esta infección transmitida por mosquitos.

La vacunación es una estrategia para controlar esta infección y se han probado varios antígenos vacunales candidatos a subunidades en animales de laboratorio con resultados variables (Bottazzi, y col. (2006) Expert Rev. Vaccines 5 (2) : 189-98; Chenthamarakshan, y col. (1995) Parasite Immunol. 17 (6): 277-85; Dissanayake, y col. (1995) Am. J. Trop. Med. Hyg. 53 (3): 289-94; Li, y col. (1993) J. Immunol. 150 (5): 1881-5; Maizels y col. (2001) Int. J. Parasitol. 31 (9): 889-98; Thirugnanam, y col. (2007) Exp. Parasitol 116 (4): 483-91; Veerapathran, y col. (2009) PLoS Negl. Trop. Dis. 3(6): e457). La filariasis linfática es un organismo multicelular con un ciclo de vida complejo y produce una gran variedad de moléculas moduladoras del huésped. Por lo tanto, luchar contra esta infección con una sola vacuna antigénica puede ser difícil. Mediante el cribado de una biblioteca de expresión de ADNc de fago del parásito *B. malayi* con sueros de individuos inmunes, se identificaron varios posibles candidatos a vacuna (Gnanasekar, y col. (2004) Infect. Immun. 72(8): 4707-15). Sin embargo, se logró un grado variable de protección con cada uno de los antígenos vacunales candidatos cuando se administró como una vacuna de ADN, proteína o refuerzo principal (Veerapathran, y col. (2009) *supra*).

Anand y col. ,2008 describe una vacuna de cóctel basada en plásmidos que codifican el transcrito larvario abundante de *Brugia malayi* (BmALT-2) específico de la etapa (L3) y la enzima de desintoxicación antioxidante *B. malayi* tioredoxina peroxidasa (BmTPX) para inducir anticuerpos, eficacia protectora y respuesta inmune mediada por células en ratones. Los ratones administrados con la vacuna cóctel indujeron hasta un 78 % de citotoxicidad contra *B. malayi* mf. Esta citotoxicidad fue alta en comparación con el 34 % inducido por el pVAX-ALT2 o el 37 % por pVAX-TPX.

Gnanasekar y col. ,2008 describe una molécula similar a la tetraspanina (TSP) en los parásitos filariales linfáticos. El gen de longitud completa clonado de *B. malayi* mostró una similitud significativa con el TSP de *Caenorhabditis elegans* y el TSP humano y, por lo tanto, el gen se denominó TSP de *B. malayi* (BmTSP).

Samykutty y col. ,2010 describe una vacuna multivalente basada en ADN que comprende los antígenos BmALT-2 y BmHSP de la filariasis linfática. Se puede lograr una protección de casi el 90 % utilizando la formulación multivalente en una estrategia de refuerzo de proteína principal de ADN.

Resumen de la Invención

La presente invención presenta una vacuna multivalente compuesta de una proteína de fusión que comprende tres o más antígenos aislados unidos covalentemente de uno o más nematodos filariales donde los antígenos comprenden Transcripción Larval Abundante (ALT-2), Tetraspanina, y proteína de choque térmico pequeña (HSP) 12. 6, o fragmentos de la misma, donde el fragmento se selecciona del grupo de SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 63 y SEQ ID

- NO: 64. En ciertas realizaciones, los nematodos filariales se seleccionan del grupo de *Brugia malayi*, *Wuchereria Bancroft*, *Brugia timori*, *Onchocerca volvulus* y *Loa loa*. En una realización, los antígenos están basados en proteínas, basados en ADN o una combinación de los mismos. Los antígenos están unidos covalentemente. Los antígenos incluyen Transcripción Larval Abundante (ALT-2), Tetraspanina, proteína de choque térmico pequeña (HSP) 12,6, o fragmentos de los mismos que incluyen, *por ejemplo*, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 y SEQ ID NO: 69. Los vectores recombinantes que contienen uno o más antígenos de uno o más nematodos filariales también se describen como células huésped recombinantes que contienen los mismos.
- 10 También se describe un procedimiento para inmunizar a un animal contra la filariasis administrando a un animal que lo necesite una vacuna multivalente de la presente invención.

Breve descripción de los Dibujos

- 15 La Figura 1 muestra el título de anticuerpos IgG anti-BmHSP y anti-BmALT-2 en los sueros de ratones vacunados. Se inmunizaron ratones balb/c de 6 semanas de edad utilizando una estrategia de refuerzo principal con una vacuna monovalente (*Bmhsp* principal y rBmHSP refuerzo o *Bmalt-2* principal y rBmALT-2 refuerzo) y una vacuna multivalente (*Bmhsp/Bmalt-2* principal y rBmHSP y rBmALT-2 refuerzo). El título de anticuerpos IgG se midió en el suero usando un ELISA indirecto. Los datos presentados son el título de anticuerpos 2 semanas después del último refuerzo. Los resultados muestran que las vacunas bivalentes y multivalentes inducen anticuerpos IgG significativos contra cada uno de los antígenos componentes. Los resultados también muestran que los antígenos en las formulaciones monovalentes y multivalentes actúan sinérgicamente para aumentar las respuestas inmunes. N=5. Estadísticamente significativo ** p <0,001, * p <0,05. Los valores representados son la media ± DE.
- 20
- 25 La Figura 2 muestra el número de células secretoras de IL-4 (Figura 2A) e IFN-γ (Figura 2B) en el bazo de ratones vacunados con vacuna monovalente (BmHSP o BmALT-2) o multivalente. Se realizó un ensayo ELISPOT después de estimular las células con rBmHSP o rBmALT (1 μg/ml). Las preparaciones de células individuales de células de bazo se estimularon con antígenos respectivos durante 48 horas y se contaron las células formadoras de manchas. Los resultados muestran que tanto la vacuna monovalente como la multivalente promovieron las células secretoras de IL-4. La vacunación multivalente indujo el mayor número de células productoras de IL-4 que los controles. Las células productoras de IFN-γ fueron comparativamente bajas. Estos resultados confirman además que BmHSP y BmALT-2 aumentan sinérgicamente las respuestas inmunes en animales vacunados después de una vacunación multivalente. N=5. Los resultados se expresan como el número medio de unidades formadoras de manchas por 3 x 10⁶ células ± DE.
- 30
- 35 La Figura 3 muestra el grado de protección conferido por una vacuna multivalente en un modelo de ratón. La cepa Balb/c de ratones se inmunizó con ADN híbrido HAT (HSP/ALT-2/TSP), con proteína HAT recombinante o una combinación de ambos utilizando una estrategia de refuerzo principal. Se usó ADN híbrido HAT para el cebado. Dos semanas después del cebado, los ratones fueron reforzados con proteína híbrida HAT. Otro grupo de ratones se inmunizó con ADN híbrido HAT o con proteína híbrida HAT. Los grupos de control de ratones recibieron solo vector blanco o adyuvante de alumbre. Dos semanas después de la última inmunización, los ratones fueron expuestos a 20 larvas infecciosas de *Brugia malayi* colocándolas en una cámara de microporos en la cavidad peritoneal de los ratones inmunizados. Después de 48 horas, se midió la muerte larval para determinar el éxito de la vacunación.
- 40
- 45 La Figura 4 muestra un western blot de BmTSP recombinante (carril 1) y dos fracciones diferentes de *O. volvulus* TSP recombinante aislado (carriles 2 y 3) sondeados con sueros de ratones vacunados con cHAT.

Descripción Detallada de la Invención

- 50 Se ha desarrollado una vacuna multivalente para la filariasis. Se prepararon combinaciones de antígenos, transcripción larval abundante (ALT-2), tetraspanina (TSP), proteína de choque térmico pequeña (HSP) 12,6, en un antígeno de ADN híbrido o un antígeno de proteína de fusión. Cuando se probó en animales experimentales (es decir, ratón, meriones, mastomys), la combinación de ADN híbrido más vacunación de proteína híbrida proporcionó una protección del 100 %. La vacuna híbrida de proteína sola dio > 80 % de protección. Por consiguiente, la presente invención
- 55 presenta vacunas basadas en proteínas y ADN multivalentes compuestas de antígenos de nematodos filariales como se define en las reivindicaciones o ácidos nucleicos que codifican los mismos y el uso de las vacunas para prevenir o controlar la filariasis en humanos y animales.

- 60 Para los propósitos de la presente invención, una vacuna multivalente o polivalente se refiere a una vacuna preparada a partir de tres o más antígenos unidos covalentemente como se define en las reivindicaciones. Según algunas realizaciones, el antígeno es una molécula de ácido nucleico, que se denomina en esta invención antígeno "basado en ADN". Según otras realizaciones, el antígeno es una proteína o polipéptido, al que se hace referencia en esta

invención como antígeno "basado en proteínas". Una vacuna multivalente de la invención puede estar compuesta de tres antígenos como se define en las reivindicaciones o sus fragmentos en varias combinaciones de permutación. En algunas realizaciones, la vacuna multivalente está compuesta únicamente por antígenos proteicos. En otras realizaciones, la vacuna multivalente está compuesta únicamente de antígenos basados en ADN. La vacuna multivalente también puede estar compuesta de una mezcla de antígenos basados en proteínas y ADN.

Los antígenos descritos en esta memoria se pueden proporcionar o expresan a partir de una molécula de ácido nucleico sencilla que contiene, *por ejemplo*, sitios de entrada de ribosoma interno entre los antígenos. Además, los antígenos de la vacuna multivalente de esta invención pueden unirse covalentemente para formar una molécula híbrida o quimérica, donde los antígenos son inmediatamente adyacentes entre sí (*por ejemplo*, una fusión en marco con o sin un espaciador corto). Alternativamente, los antígenos se pueden proporcionar como una mezcla de antígenos individuales. Además, se contempla que la vacuna instantánea pueda estar compuesta de una molécula híbrida.

En una realización, los antígenos de la vacuna multivalente, como se define en las reivindicaciones, son proteínas diferentes de una especie de nematodo filarial. Como ejemplo de esta realización, la vacuna multivalente está compuesta de antígenos ALT-2, TSP y HSP aislados de una o más cepas de *B. malayi*. En otra realización adicional, la vacuna multivalente como se define en las reivindicaciones de una combinación de diferentes antígenos de diferentes especies de nematodos filariales.

Para preparar vacunas de ADN multivalente o vacunas de ADN recombinante multivalente, la secuencia de ADN del gen de interés (también usado indistintamente como molécula de ADN) no necesita contener la longitud completa del ADN codificando la proteína correspondiente. Del mismo modo, cuando se preparan vacunas basadas en proteínas multivalentes o vacunas de proteínas recombinantes multivalentes, la secuencia proteica no necesita contener la proteína de longitud completa. En la mayoría de los casos, un fragmento de la proteína o gen que codifica una región del epítipo es suficiente para la inmunización. La secuencia de ADN/proteína de una región de epítipo se puede encontrar secuenciando la parte correspondiente del gen de varias cepas o especies y comparándolas. Es probable que los principales determinantes antigénicos sean los que muestran la mayor heterología. Además, es probable que estas regiones se encuentren de manera accesible en la estructura conformacional de las proteínas. Uno o más de dichos fragmentos de proteínas o genes que codifican los determinantes antigénicos pueden prepararse mediante síntesis química o mediante tecnología de ADN recombinante. Estos fragmentos de proteínas o genes, si se desea, se pueden unir entre sí o con otras proteínas o moléculas de ADN, respectivamente.

Como se describe en esta invención, los antígenos ALT-2, TSP y HSP se identificaron como protectores contra la infección por larvas de filaria. Por consiguiente, en realizaciones particulares, la vacuna multivalente instantánea incluye una proteína de fusión compuesta de antígenos o fragmentos de proteína ALT-2, TSP y HSP como se define en las reivindicaciones o un ácido nucleico que codifica dicha proteína de fusión como también se define en las reivindicaciones. Las secuencias de proteínas y ácidos nucleicos para estos antígenos están disponibles en la técnica con los números de acceso GENBANK enumerados en la Tabla 1.

40

TABLA 1

Antígeno	Fuente	Proteína	SEQ ID NO:	Ácido Nucleico	SEQ ID NO:
ALT-2	<i>B. malayi</i>	P90708 XP_001896203	37 39	BMU84723 XM_001896168	38 40
	<i>W. bancrofti</i>	AAC35355	41	AF084553	42
	<i>L. loa</i>	XP_003151340	43	XM_003151292	44
TSP	<i>B. malayi</i>	ABN55911	45	EF397425	46
	<i>L. loa</i>	XP_003136177	47	XM_003136129	48
HSP	<i>B. malayi</i>	AAU04396	49	AY692227	50
	<i>O. volvulus</i>	CAA48633	51	X68669	52
	<i>L. loa</i>	XP_003139338	53	XM_003139290	54
VAL-1	<i>B. malayi</i>	AAB97283	55	AF042088	56
	<i>W. bancrofti</i>	AAD16985	57	AF109794	58
	<i>O. volvulus</i>	AAB69625	59	AF020586	60

Antígeno	Fuente	Proteína	SEQ ID NO:	Ácido Nucleico	SEQ ID NO:
	<i>L. loa</i>	XP_003146897	61	XM_003146849	62

Además, la secuencia de nucleótidos que codifica *O. volvulus* TSP se puede encontrar en GENBANK Núm. de acceso JN861043. Los antígenos proteicos y las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden usarse como moléculas de longitud completa o menos que moléculas de longitud completa. A este respecto, la presente invención incluye además el uso de fragmentos de los antígenos proteicos y moléculas de ácido nucleico mencionados anteriormente y también se definen en las reivindicaciones. Los ejemplos de fragmentos de ácido nucleico pueden incluir 20,30,40,50,60,70,80,90,100,150 o 200 porciones de residuos de aminoácidos de antígenos proteicos de longitud completa (*p. ej.*, los enumerados en la Tabla 1) o 60,90,120,150,180,210,240,270,300,350 o 600 porciones de nucleótidos de moléculas de ácido nucleico de longitud completa (*p. ej.*, las listadas en la Tabla 1). Fragmentos de proteínas ejemplares incluyen el dominio del lazo extracelular (ECL) de TSP (ver, *por ejemplo*, el dominio ECL de *W. bancrofti* TSP de SEQ ID NO: 63) y la delección N-terminal de HSP 12.6 (cHSP; ver, *por ejemplo*, el fragmento *W. bancrofti* HSP de la SEC ID NO: 64). Una vacuna puede incluir además otros antígenos conocidos a partir de *W. bancrofti*, *B. malayi*, *O. volvulus*, *L. loa* y *B. timori*. Los ejemplos de otros antígenos adecuados incluyen, pero no se limitan a, glutatión peroxidasa (ver Cookson, y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5837-5841; Maizels, y col. (1983) Parasitology 87: 249-263; Maizels, y col. (1983) Clin. Exp. Immunol 51: 269-277); antígeno recombinante (*BmR1*; ver Noordin, y col. (2004) Filaria J. 3: 10); clase II aminoacil-ARNt sintetasa (verKron, y col. (1995) FEBS Lett. 374: 122-4); análogo de proteína de choque térmico 70 (hsc70) (verSelkirk, y col. (1989) J. Immunol. 143: 299-308); y paramiosina (verLi, y col. (1991) Mol. Biochem. Parasitol 49: 315-23). El antígeno se puede obtener de un nematodo filarial seleccionado del grupo de *W. bancrofti*, *B. malayi*, *O. volvulus*, *L. loa* y *B. timori*.

Como se describe en esta invención, los antígenos de la vacuna multivalente se aíslan de un nematodo filarial. A este respecto, una molécula o proteína de ácido nucleico aislada es una molécula o proteína de ácido nucleico que se ha eliminado de su medio natural (*es decir*, que ha sido sometida a manipulación humana). Como tal, "aislado" no refleja el grado en que la molécula o proteína de ácido nucleico ha sido purificada (*por ejemplo*, purificada a más del 95 % de homogeneidad). Una molécula o proteína de ácido nucleico aislada y opcionalmente purificada como se describe en esta invención puede obtenerse a partir de su fuente natural o producirse usando tecnología de ADN recombinante (*por ejemplo*, amplificación o clonación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) o síntesis química. Las moléculas y proteínas de ácido nucleico aisladas también pueden incluir, por ejemplo, variantes alélicas naturales o isómeros que inducen una respuesta inmune en el huésped.

Una realización de la presente invención incluye un vector recombinante, que incluye al menos una molécula de ácido nucleico aislada de la presente invención, insertada en un vector capaz de administrar el ácido nucleico molécula en una célula huésped. Tal vector contiene secuencias de ácido nucleico heterólogo, que son secuencias de ácido nucleico que no se encuentran naturalmente adyacentes a las moléculas de ácido nucleico de la presente invención y que preferiblemente derivan de una especie distinta de la especie de la que se encuentran las moléculas de ácido nucleico. derivado. El vector puede ser procariota o eucariota, y típicamente es un virus o un plásmido. Los vectores recombinantes pueden usarse en la clonación, secuenciación y/o manipulación de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención.

La presente descripción también incluye un vector de expresión, que incluye una molécula de ácido nucleico de la presente invención en un vector recombinante que es capaz de expresar la molécula de ácido nucleico cuando se transforma en una célula huésped. Preferiblemente, el vector de expresión también es capaz de replicarse dentro de la célula huésped. Los vectores de expresión pueden ser procariotas o eucariotas, y típicamente son virus o plásmidos. Los vectores de expresión descritos en esta invención incluyen cualquier vector que funcione (*es decir*, expresión génica directa) en células recombinantes de la presente invención, incluidas células bacterianas, fúngicas, de parásitos, insectos, otros animales y plantas. Por ejemplo, los vectores de expresión pueden dirigir la expresión génica en células bacterianas, de levadura, de helmintos u otros parásitos, insectos y mamíferos.

Alternativamente, pueden contener secuencias reguladoras tales como secuencias de control de transcripción, secuencias de control de traslación, orígenes de replicación y otras secuencias reguladoras que son compatibles con la célula recombinante y que controlan la expresión de moléculas de ácido nucleico de la presente invención. También pueden incluir secuencias de control de transcripción. Las secuencias de control de la transcripción son secuencias que controlan el inicio, el alargamiento y la terminación de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción particularmente importantes son aquellas que controlan el inicio de la transcripción, como las secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras. Las secuencias de control de la transcripción adecuadas incluyen cualquier secuencia de control de la transcripción que pueda funcionar en al menos una de las células recombinantes de la presente invención. Los expertos en la técnica conocen una variedad de tales secuencias de

control de la transcripción. Las secuencias de control de transcripción preferidas incluyen aquellas que funcionan en bacterias, levaduras, helmintos u otro endoparásito, o células de insectos y mamíferos, tales como, pero sin limitación, *tac*, *lac*, *trp*, *trc*, *oxi-pro*, *omp/lpp*, *rrnB*, bacteriófago lambda (como lambda p_L y lambda $p_{R'}$ fusiones que incluyen tales promotores), bacteriófago T7, T7lac, bacteriófago T3, bacteriófago SP6, bacteriófago SP01, metalotioneína, factor de apareamiento alfa, alcohol de *Pichia* oxidasa, promotor subgenómico de alfavirus, gen de resistencia a antibiótico, baculovirus, virus de insecto *Heliothis zea*, virus vaccinia, virus herpes, poxvirus de mapache, otros poxvirus, adenovirus, citomegalovirus (como promotor temprano inmediato), virus simio 40, retrovirus, actina, repetición terminal larga retroviral, virus del sarcoma de Rous, choque térmico, secuencias de control de transcripción de fosfato y nitrato, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células procariontes o eucariotas. Secuencias de control de transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles por linfoquina (*por ejemplo*, promotores inducibles por interferones o interleucinas). Secuencias de control de transcripción de la presente invención también pueden incluir secuencias de control de transcripción de origen natural asociadas naturalmente con helmintos parásitos, tales como secuencias de control de transcripción de *B. malayi*.

Moléculas recombinantes de la presente invención también pueden contener (a) señales secretoras (*es decir*, secuencias de ácido nucleico de segmento de señal) para permitir que una proteína expresada de la presente invención sea secretada por la célula que produce las proteínas y/o (b) secuencias de fusión que conducen a la expresión de moléculas de ácido nucleico de la presente invención como proteínas de fusión. Ejemplos de segmentos de señal adecuados incluyen cualquier segmento de señal capaz de dirigir la secreción de una proteína de la presente invención. Segmentos de señal preferidos incluyen, pero no se limitan a, activador de plasminógeno tisular (t-PA), interferón, interleucina, hormona del crecimiento, histocompatibilidad y segmentos de señal de glicoproteína de envoltura viral. Además, una molécula de ácido nucleico de la presente invención puede unirse a un segmento de fusión que dirige la proteína codificada al proteosoma, tal como un segmento de fusión de ubiquitina. Moléculas recombinantes eucariotas también pueden incluir secuencias intermedias y/o no trasladadas que rodean y/o están dentro de las secuencias de ácido nucleico de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención.

Otra realización de la presente invención incluye una célula huésped recombinante que alberga una o más moléculas recombinantes de la presente invención. La transformación de una molécula de ácido nucleico en una célula se puede lograr mediante cualquier procedimiento mediante el cual se pueda insertar una molécula de ácido nucleico en la célula. Las técnicas de transformación incluyen, entre otras, transfección, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción y fusión de protoplastos. Una célula recombinante puede permanecer unicelular o puede crecer en un tejido, órgano u organismo multicelular. Las moléculas de ácido nucleico transformadas de la presente invención pueden permanecer extracromosómicas o pueden integrarse en uno o más sitios dentro de un cromosoma de la célula transformada (*es decir*, recombinante) de tal manera que se retenga su capacidad de expresarse.

Células huésped adecuadas para transformar incluyen cualquier célula que pueda transformarse con una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Células huésped pueden ser células no transformadas o células que ya se han transformado con al menos una molécula de ácido nucleico (*por ejemplo*, moléculas de ácido nucleico que codifican una o más proteínas de fusión de la presente invención y/u otras proteínas útiles en la producción de vacunas multivalentes). Células huésped de la presente invención pueden ser endógenas (*es decir*, naturalmente) capaces de producir proteínas de fusión de la presente invención o pueden ser capaces de producir tales proteínas después de transformarse con al menos una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Células huésped de la presente invención pueden ser cualquier célula capaz de producir al menos una proteína de la presente invención, e incluyen bacterias, hongos (incluida la levadura), parásitos (incluidos helmintos, protozoos y ectoparásitos), otros insectos, otras células animales y vegetales. . . Células huésped preferidas incluyen células bacterianas, micobacterianas, de levadura, de helmintos, de insectos y de mamíferos. Células huésped más preferidas incluyen *Salmonella*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Listeria*, *Saccharomyces*, *Spodoptera*, *Mycobacteria*, *Trichoplusia*, células BHK (riñón de hámster bebé), células MDCK (línea celular de riñón canino Madin-Darby), células CRFK (línea celular de riñón felino Crandell), células CV-1 (línea celular de riñón de mono africano utilizada, por ejemplo, para cultivar poxvirus de mapache), células COS (*por ejemplo*, COS-7) y células Vero. Células huésped particularmente preferidas son *Escherichia coli*, que incluyen derivados de *E. coli* K-12; *Salmonella typhi*; *Salmonella typhimurium*; *Spodoptera frugiperda*; *Trichoplusia ni*; células BHK; células MDCK; células CRFK; células CV-1; células COS; células Vero; y células mioblastos de ratón no tumorigénicas G8 (*por ejemplo*, ATCC CRL 1246). Huéspedes de células de mamíferos apropiados adicionales incluyen otras líneas celulares de riñón, otras líneas celulares de fibroblastos (*por ejemplo*, líneas celulares de fibroblastos de embriones humanos, murinos o de pollo), líneas celulares de mieloma, células de ovario de hámster chino, células NIH/3T3 de ratón, células LMTK³¹ y/o Células HeLa. En una realización, las proteínas pueden expresarse como proteínas heterólogas en líneas celulares de mieloma que emplean promotores de inmunoglobulina.

Una célula recombinante se produce preferiblemente transformando una célula huésped con una o más moléculas recombinantes, cada una de las cuales comprende una o más moléculas de ácido nucleico de la presente invención y una o más secuencias de control de la transcripción, ejemplos de los cuales se describen en esta invención.

Tecnologías de ADN recombinante pueden usarse para mejorar la expresión de moléculas de ácido nucleico transformadas mediante manipulación, por ejemplo, del número de copias de las moléculas de ácido nucleico dentro de una célula huésped, la eficiencia con la que esas moléculas de ácido nucleico se transcriben, la eficiencia con la que se traducen las transcripciones resultantes y la eficiencia de las modificaciones postraslacionales. Técnicas recombinantes útiles para aumentar la expresión de moléculas de ácido nucleico de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, unir operativamente moléculas de ácido nucleico a plásmidos de alto número de copias, integración de moléculas de ácido nucleico en uno o más cromosomas de células huésped, además de secuencias de estabilidad de vector a plásmidos, sustituciones o modificaciones de señales de control de la transcripción (*por ejemplo*, promotores, operadores, potenciadores), sustituciones o modificaciones de señales de control de traslación (*por ejemplo*, sitios de unión a ribosomas, secuencias de Shine-Dalgarno), modificación de moléculas de ácido nucleico de la presente invención para corresponder con el uso de codones de la célula huésped, deleción de secuencias que desestabilizan las transcripciones y el uso de señales de control que separan temporalmente el crecimiento de células recombinantes de la producción de enzimas recombinantes durante la fermentación. La actividad de una proteína recombinante expresada de la presente invención puede mejorarse fragmentando, modificando o derivatizando moléculas de ácido nucleico que codifican dicha proteína. Además, mientras que las secuencias no optimizadas con codón pueden usarse para expresar proteínas de fusión en células huésped tales como *E. coli* (ver Tabla 1), en las realizaciones relacionadas con vacunas de ADN, la molécula de ácido nucleico puede optimizarse con codón para facilitar la expresión en células de mamíferos. A este respecto, las secuencias de codones optimizados para BmALT-2, N-terminal borraron HSP 12. 6 (cHSP) de *W. bancroftii* y el dominio ECL de *W. bancroftii* Tetraspanin se exponen en SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, y SEQ ID NO: 69, respectivamente.

Antígenos basados en proteínas aisladas como se describen en esta invención o la proteína de fusión de la presente invención pueden producirse de diversas maneras, incluyendo la producción y recuperación de proteínas naturales, producción y recuperación de proteínas recombinantes y síntesis química de las proteínas. En una realización, la proteína de fusión de la presente invención se produce cultivando una célula capaz de expresar la proteína de fusión en condiciones efectivas para producir la proteína, y recuperando la proteína de fusión. Una célula preferida para cultivo es una célula recombinante de la presente invención. Condiciones de cultivo efectivas incluyen, entre otras, medios efectivos, biorreactor, temperatura, pH y condiciones de oxígeno que permiten la producción de proteínas. Un medio efectivo se refiere a cualquier medio en el que una célula se cultiva para producir una proteína de la presente invención. Dicho medio incluye típicamente un medio acuoso que tiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato, y sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados, tales como vitaminas. Las células de la presente invención pueden cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de Petri. El cultivo puede llevarse a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. Tales condiciones de cultivo están dentro de la experiencia de un experto en la materia.

Dependiendo del vector y del sistema huésped usado para la producción, las proteínas resultantes de la presente invención pueden permanecer dentro de la célula recombinante; ser secretada en el medio de fermentación; ser secretada en un espacio entre dos membranas celulares, como el espacio periplásmico en *E. coli*; o ser retenida en la superficie externa de una célula o membrana viral.

recuperación de proteínas de la invención puede incluir la recolección del medio de fermentación completo que contiene la proteína y no necesita implicar pasos adicionales de separación o purificación. Las proteínas de la presente invención pueden purificarse usando una variedad de técnicas de purificación de proteínas estándar, tales como, pero sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de concanavalina A, cromatofocalización y solubilización diferencial. Las proteínas de la presente invención se recuperan preferiblemente en forma sustancialmente pura, permitiendo de ese modo el uso eficaz de la proteína como composición terapéutica. Una composición terapéutica para animales, por ejemplo, no debería presentar toxicidad sustancial y preferiblemente debería ser capaz de estimular la producción de anticuerpos en un animal tratado.

Una realización de la presente invención es la vacuna multivalente como se describe en las reivindicaciones que, cuando se administra a un animal de manera efectiva, es capaz de proteger a ese animal de la filiaris causada por un nematodo filarial. Como se usa en esta invención, la vacuna de la invención es protectora porque, cuando se administra a un animal de manera efectiva, es capaz de tratar, mejorar y/o prevenir la enfermedad causada por un nematodo filarial que incluye, entre otros, *W Bancroftii*, *B. malayi*, *O. volvulus*, *L. loa*, *Mansonella streptocerca*, *Dracunculus medinensis*, *M. perstans*, *M. ozzardi* y/o *B. timori*. Las vacunas de la presente invención se pueden administrar a cualquier animal susceptible a dicha terapia, preferiblemente a mamíferos, y más preferiblemente a humanos, mascotas como gatos, y animales de alimentación económica y/o animales de zoológico. Los animales preferidos para protegerse contra la elefantiasis son los humanos.

A de la presente invención cuando se administra al huésped puede desarrollar anticuerpos que pueden matar a los parásitos en el vector en el que se desarrolla el nematodo filarial, como en un mosquito cuando alimentan al huésped.

Con el fin de proteger a un animal de una enfermedad causada por un nematodo filarial, una composición inmunogénica de la presente invención es adecuada para administrarse al animal de una manera efectiva de tal manera que la composición sea capaz de proteger a ese animal de una enfermedad causada por el nematodo filarial. Las composiciones de la presente invención pueden administrarse a animales antes de la infección para prevenir la infección (*es decir*, como una vacuna preventiva) y/o pueden administrarse a animales después de la infección para tratar la enfermedad causada por el nematodo filarial (*es decir*, como una vacuna terapéutica).

composiciones de la presente invención pueden formularse en un excipiente que el animal a tratar puede tolerar. Ejemplos de tales excipientes incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank y otras soluciones salinas acuosas fisiológicamente equilibradas. También se pueden usar vehículos no acuosos, como aceites fijos, aceite de sésamo, oleato de etilo o triglicéridos. Otras formulaciones útiles incluyen suspensiones que contienen agentes potenciadores de la viscosidad, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Los excipientes también pueden contener pequeñas cantidades de aditivos, como sustancias que mejoran la isotonicidad y la estabilidad química. Los ejemplos de tampones incluyen tampón fosfato, tampón bicarbonato y tampón Tris, mientras que los ejemplos de conservantes incluyen timerosal, m- u o-cresol, formalina y alcohol bencílico. Las formulaciones estándar pueden ser inyectables líquidas o sólidas que se pueden absorber en un líquido adecuado como suspensión o solución inyectable. Por lo tanto, en una formulación no líquida, el excipiente puede comprender dextrosa, albúmina sérica humana, conservantes, etc. , a los que se puede agregar agua estéril o solución salina antes de la administración.

La vacuna de la presente invención puede incluir un adyuvante. Los adyuvantes son agentes capaces de mejorar la respuesta inmune de un animal a un antígeno específico. Adyuvantes adecuados incluyen, entre otros, citocinas, quimiocinas y compuestos que inducen la producción de citocinas y quimiocinas (por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), colonias de macrófagos factor estimulante (M-CSF), factor estimulante de colonias (CSF), eritropoyetina (EPO), interleucina 2 (IL-2), interleucina-3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 7 (IL-7), interleucina 8 (IL-8), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12), interferón gamma, factor inductor de interferón gamma I (IGIF), factor de crecimiento transformante beta, RANTES (regulado por la activación, células T normales expresadas y presumiblemente secretadas), proteínas inflamatorias de macrófagos (p. ej. , MIP-1 alfa y MIP-1 beta) y factor iniciador de elongación de Leishmania (LEIF)); componentes bacterianos (por ejemplo, endotoxinas, en particular superantígenos, exotoxinas y componentes de la pared celular); agonistas de receptores de tipo toll (por ejemplo, agonistas de TLR4); sales a base de aluminio; sales a base de calcio; sílice; polinucleótidos; toxoides; proteínas séricas, proteínas de cubierta viral; adyuvantes de copolímero de bloque (*por ejemplo*, adyuvante TITERMAX de Hunter (VAXCEL, Inc. Norcross, GA), adyuvantes de Ribí (Ribí ImmunoChem Research, Inc. , Hamilton, MT); y saponinas y sus derivados (*por ejemplo*, QUIL A (Superfos Biosector A/S) , Dinamarca). Adyuvantes proteicos de la presente invención pueden administrarse en forma de la propia proteína o de moléculas de ácido nucleico que codifican tales proteínas usando las técnicas descritas en esta invención.

Una vacuna de la presente invención puede incluir un vehículo. Los portadores incluyen compuestos que aumentan la vida media de una composición terapéutica en el animal tratado. Los vehículos adecuados incluyen, entre otros, vehículos de liberación controlada polimérica, implantes biodegradables, liposomas, bacterias, virus, otras células, aceites, ésteres y glicoles.

La presente descripción también cubre una formulación de liberación controlada que es capaz de liberar lentamente una composición de la presente invención en un animal. Como se usa en esta invención, una formulación de liberación controlada puede incluir una composición de la presente invención en un vehículo de liberación controlada. Vehículos de liberación controlada adecuados incluyen, entre otros, polímeros biocompatibles, otras matrices poliméricas, cápsulas, microcápsulas, micropartículas, preparaciones de bolo, bombas osmóticas, dispositivos de difusión, liposomas, liposferas y sistemas de administración transdérmica. Otras formulaciones de liberación controlada como se describen en esta invención incluyen líquidos que, tras la administración a un animal, forman un sólido o un gel in situ. Formulaciones de liberación controlada preferidas son biodegradables (*es decir*, bioerosionables).

Una formulación de liberación controlada preferida es capaz de liberar una vacuna en la sangre del animal tratado a una velocidad constante suficiente para alcanzar niveles de dosis terapéutica de la composición para proteger a un animal por enfermedad causada por un nematodo filarial. La vacuna se libera preferiblemente durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 meses. Una formulación de liberación controlada como se describe en esta invención es capaz de efectuar un tratamiento preferiblemente durante al menos aproximadamente 1 mes, más preferiblemente durante al menos aproximadamente 3 meses, incluso más preferiblemente durante al menos aproximadamente 6 meses, incluso más preferiblemente durante al menos

aproximadamente 9 meses, e incluso más preferiblemente durante al menos aproximadamente 12 meses.

Vacunas de la presente invención pueden administrarse a animales antes de la infección para prevenir la infección y/o pueden administrarse a animales después de la infección para tratar la enfermedad causada por un nematodo filarial.

- 5 Por ejemplo, las proteínas, los ácidos nucleicos y sus mezclas pueden usarse como agentes inmunoterapéuticos. Protocolos aceptables para administrar composiciones de manera efectiva incluyen el tamaño de la dosis individual, el número de dosis, la frecuencia de administración de la dosis y el modo de administración. La determinación de tales protocolos puede ser realizada por los expertos en la materia. Una dosis única adecuada es una dosis que es capaz de proteger a un animal de la enfermedad cuando se administra una o más veces durante un período de tiempo
- 10 adecuado. Por ejemplo, una dosis única preferida de una vacuna basada en proteínas es de aproximadamente 1 microgramo (pg) a aproximadamente 10 miligramos (mg) de vacuna basada en proteínas por kilogramo de peso corporal del animal. Las vacunas de refuerzo pueden administrarse desde aproximadamente 2 semanas hasta varios años después de la administración original. Las administraciones de refuerzo se administran preferiblemente cuando la respuesta inmune del animal se vuelve insuficiente para proteger al animal de la enfermedad. Un programa de
- 15 administración preferido es uno en el que se administran de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 1 mg de la vacuna por kg de peso corporal del animal de aproximadamente una a aproximadamente dos veces durante un período de tiempo de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 12 meses. Modos de administración pueden incluir, entre otros, rutas subcutánea, intradérmica, intravenosa, intranasal, oral, transdérmica e intramuscular.
- 20 Donde la vacuna incluye una molécula de ácido nucleico, la vacuna puede administrarse a un animal de una manera que permita la expresión de esa molécula de ácido nucleico en una proteína protectora en el animal. Las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse a un animal en una variedad de procedimientos que incluyen, entre otros, administrar un ácido nucleico desnudo (*es decir*, no empaquetado en una capa viral o membrana celular) como una vacuna genética (*por ejemplo*, como moléculas de ADN desnudo, tal como se enseña, *por ejemplo* en Wolff, y col.
- 25 (1990) *Science* 247: 1465-1468); o administrar una molécula de ácido nucleico empaquetada como una vacuna de virus recombinante o como una vacuna de células recombinantes (*es decir*, la molécula de ácido nucleico es administrada por un vehículo viral o celular).

- Una vacuna genética (*es decir*, ácido nucleico desnudo) de la presente invención incluye una molécula de ácido
- 30 nucleico de la presente invención. Una vacuna genética de la presente invención puede incluir una o más moléculas de ácido nucleico de la presente invención en forma de, *por ejemplo*, una molécula recombinante dicistrónica. Vacunas genéticas preferidas incluyen al menos una porción de un genoma viral (*es decir*, un vector viral). Vectores virales preferidos incluyen aquellos basados en alfavirus, poxvirus, adenovirus, herpesvirus, picornavirus y retrovirus, con aquellos basados en alfavirus (tales como sindbis o virus del bosque Semliki), siendo particularmente preferidos
- 35 los herpesvirus y poxvirus específicos de la especie. Se puede usar cualquier secuencia de control de transcripción adecuada, incluidas las descritas como adecuadas para la producción de proteínas. Las secuencias de control de la transcripción particularmente preferidas incluyen el citomegalovirus inmediato temprano (preferiblemente junto con Intron-A), la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous y las secuencias de control de la transcripción específicas del tejido, así como las secuencias de control de la transcripción endógenas a los vectores virales si se
- 40 usan vectores virales. También se prefiere la incorporación de una señal de poliadenilación "fuerte".

- Las vacunas genéticas de la presente invención se pueden administrar de varias maneras, incluyendo vías de administración intramuscular, subcutánea, intradérmica, transdérmica, intranasal y oral. Además, se contempla que la
- 45 vacuna puede administrarse mediante pistola genética, parche cutáneo, electroporación o administración basada en nano. A este respecto, las vacunas basadas en ADN y en proteínas pueden administrarse al mismo tiempo. Una dosis única preferida de una vacuna genética varía de aproximadamente 1 nanogramo (ng) a aproximadamente 600 µg, dependiendo de la ruta de administración y/o procedimiento de administración, como pueden determinar los expertos en la materia. Procedimientos de suministro adecuados incluyen, *por ejemplo*, *por inyección*, como gotas, en aerosol y/o tópicamente. Las vacunas genéticas de la presente invención pueden estar contenidas en un excipiente acuoso
- 50 (*por ejemplo*, solución salina tamponada con fosfato) solas o en un vehículo (*por ejemplo*, vehículos basados en lípidos).

- Una vacuna de virus recombinante puede incluir una molécula recombinante de la presente invención que se envasa en una cubierta viral y que se puede expresar en un animal después de la administración. Preferiblemente, la molécula
- 55 recombinante es deficiente en empaquetamiento o replicación y/o codifica un virus atenuado. Se pueden usar varios virus recombinantes, incluidos, entre otros, los basados en alfavirus, poxvirus, adenovirus, herpesvirus, picornavirus y retrovirus. Las vacunas de virus recombinantes preferidas son aquellas basadas en alfavirus (como el virus Sindbis), poxvirus de mapache, herpesvirus específicos de la especie y poxvirus específicos de la especie. Ejemplos de procedimientos para producir y usar vacunas de virus recombinantes de alfavirus se describen en Publicación PCT No.
- 60 WO 94/17813.

Cuando se administra a un animal, dicha vacuna de virus recombinante infecta las células dentro del animal

inmunizado y dirige la producción de una proteína protectora que es capaz de proteger al animal de la filariasis causada por nematodos filariales. A modo de ilustración, una dosis única de una vacuna de virus recombinante de este tipo puede ser de aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 1×10^8 unidades formadoras de placa de virus (pfu) por kilogramo de peso corporal del animal. Los protocolos de administración son similares a los descritos en esta invención para las vacunas basadas en proteínas, con vías de administración subcutánea, intramuscular, intranasal y oral.

Una vacuna de células recombinantes como se describe en esta invención puede incluir células recombinantes de la presente invención que expresan una proteína de fusión de la presente invención. Ejemplos de tales células recombinantes incluyen *Salmonella*, *E. coli*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *S. frugiperda*, levadura (incluyendo *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*), BHK, CV-1, mioblastos G8, COS (p. ej. , COS-7), Vero , Células recombinantes MDCK y CRFK. Las vacunas de células recombinantes como se describen en esta invención pueden administrarse de diversas maneras, pero tienen la ventaja de que pueden administrarse por vía oral, preferiblemente a dosis que varían de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} células por kilogramo de peso corporal. Los protocolos de administración son similares a los descritos en esta invención para las vacunas basadas en proteínas. Las vacunas de células recombinantes pueden incluir células enteras, células despojadas de las paredes celulares o lisados celulares.

Como se sabe en la técnica, hay tres grupos de nematodos filariales, clasificados según el nicho dentro del cuerpo que ocupan: filariasis linfática, filariasis subcutánea y filariasis de cavidad serosa. La filariasis linfática es causada por los gusanos *W. bancrofti*, *B. malayi* y *B. timori*. Estos gusanos ocupan el sistema linfático, incluidos los ganglios linfáticos, y causan fiebre, linfadenitis (inflamación de los ganglios linfáticos), linfangitis (inflamación de los vasos linfáticos en respuesta a la infección) y linfedema (elefantiasis). La filariasis subcutánea es causada por *Loa loa* (gusano ocular africano), *Mansonella streptocerca*, *O. volvulus* y *Dracunculus medinensis*. Estos gusanos ocupan la capa subcutánea de la piel, en la capa de grasa, y se presentan con erupciones cutáneas, pápulas urticariales y artritis, así como con máculas de hiperpigmentación e hipopigmentación. *Onchocerca volvulus* se manifiesta en los ojos, causando "ceguera de los ríos". La filariasis de la cavidad serosa es causada por los gusanos *M. perstans* y *M. ozzardi*, que ocupan la cavidad serosa del abdomen. La filariasis de la cavidad serosa se presenta con síntomas similares a la filariasis subcutánea, además del dolor abdominal, porque estos gusanos también son habitantes de los tejidos profundos.

La eficacia de una vacuna de la presente invención para proteger a un animal de la filariasis causada por nematodos filariales puede probarse de varias maneras, incluyendo, pero sin limitarse a, detección de anticuerpos protectores (usando, por ejemplo, proteínas de fusión de la presente invención) o las proteínas descritas en esta invención, detección de inmunidad celular dentro del animal tratado, o exposición del animal tratado a un nematodo filarial para determinar si el animal tratado es resistente a la enfermedad y no exhibe uno o más signos de enfermedad. Los estudios de exposición pueden incluir la implantación de cámaras que incluyen larvas de nematodos filariales en el animal tratado y/o la administración directa de larvas al animal tratado. Por ejemplo, las composiciones terapéuticas pueden ensayarse en modelos animales tales como ratones, meriones (*Meriones unguiculatus*) y/o mastomys (por ejemplo, *Mastomys natalensis*). Dichas técnicas son conocidas por los expertos en la materia. La invención se describe con mayor detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

40

Ejemplo comparativo 1: Vacuna de proteína de choque térmico pequeño

Parásitos. *B. malayi* L3 se obtuvieron del NIAID/NIH Filariasis Research Reagent Resource Center (FR3) en la Universidad de Georgia, Atenas, GA.

45

Muestras de sueros humanos. Se recogieron aproximadamente 10 ml de muestras de sangre de los siguientes grupos clínicos de sujetos (1) sujetos endémicos normales (EN), estos eran individuos asintomáticos y no microfilarémicos; (2) sujetos microfilarémicos asintomáticos (Mt) que tenían microfilarias circulantes en su sangre y fueron identificados por examen microscópico de sus frotis de sangre nocturnos; (3) pacientes con Patología crónica (PC) incluyen aquellos sujetos que exhibieron edema linfático y otros síntomas clínicos crónicos de filariasis y (4) sujetos normales no endémicos (NEN) que vivían en áreas no endémicas y no tenían parásitos o anticuerpos circulantes y no mostró evidencia de alguna enfermedad filarial. Los sueros se separaron de estas muestras de sangre y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Expresión y purificación de la proteína de choque térmico B. malayi recombinante. Para producir la proteína recombinante de choque térmico pequeño *B. malayi* 12.6 (rBmHSP), la secuencia del gen de longitud completa se clonó en pRSET-A (con una etiqueta de hexahistidina N-terminal) y se transformó en BL21 (DE3) que contiene pLysS (Invitrogen, Carlsbad, CA) para minimizar la toxicidad debida a la proteína. Cuando la absorbancia de los cultivos alcanzó un valor de 0,6 OD, se añadió 1 mM de IPTG (isopropiltio-d-galactopiranosido) a los cultivos y se incubó durante 3 horas adicionales para inducir la expresión génica. Después de lisar las células, las proteínas totales se separaron en una SDS-PAGE al 15 % para confirmar la expresión de la proteína etiquetada con his. Posteriormente, la proteína recombinante etiquetada con histidina se purificó usando una cromatografía en columna de afinidad de

60

metal cobalto inmovilizado (Clontech, Mountain View, CA) según las recomendaciones del fabricante. La proteína recombinante se separó luego en una SDS-PAGE al 15 % y se tiñó con COOMASSIE azul brillante R250. Se obtuvo una sola banda después de la purificación en columna.

5 *Modelo tridimensional de BmHSP.* Se construyó un modelo tridimensional de proteína BmHSP por modelado de homología. Se realizaron búsquedas de homología de secuencia BLAST para identificar proteínas de plantilla en la base de datos PDB. La alfa-cristalina A humana, una proteína recientemente cristalizada, mostró una identidad de secuencia significativa y, por lo tanto, se eligió como plantilla para modelar BmHSP. La construcción del modelo se realizó utilizando MODELLER 9v6 (Sali y Blundell (1993) J. Mol. Biol. 234: 779-815). La estructura 3-D obtenida se validó posteriormente utilizando el programa PROCHECK (Laskowski, y col. (1993) J. Appl. Cryst 26: 283-29). El mejor modelo predicho por PROCHECK tenía una puntuación de -0,46 y fue elegido para modelar más y para generar la estructura 3-D usando el programa Rasmol.

15 *Análisis de la estructura de BmHSP.* La estructura secundaria y el sitio de interacción proteína-proteína de BmHSP se predijeron en PDBsum y el servidor Predict Protein E-Mail en el Laboratorio Europeo de Biología Molecular, Heidelberg (Roos, y col. (1995) Parasitol. Today 11: 148-150). El escaneo de motivos se realizó a través del análisis de patrones PROSITE para identificar los motivos funcionales en BmHSP. Los epítomos de células B, células T y CTL en secuencias BmHSP se predijeron usando la Base de datos de epítomos inmunes y el recurso de análisis (IEDB).

20 *Análisis filogenético de BmHSP.* Las secuencias de aminoácidos de BmHSP se compararon con miembros de otras pequeñas familias de proteínas de choque térmico de diferentes organismos. Se analizaron las siguientes secuencias. Los números de acceso se dan entre paréntesis. *Aconthocheilonema vitae* (CAA48631); *Archaeoglobus fulgidus* (O28308); *Artibeus jamaicensis* (P02482); *Aspergillus fumigatus* (Q4WV00); *Arabidopsis thaliana* (O81822); *Artemia persimilis* (DQ310578); *Azotobacter vinelandii* (P96193); *Brugia pahangi* (CAA61152), *Brugia malayi* (AAU04396); 25 *Buchnera aphidicola* (P57640); *Bombyx mori* (AF315318_1); *Bradyrhizobium japonicum* (P70918); *Caenorhabditis elegans* (Q7JP52); *Coccidioides immitis* (Q1E6R4); *Carica papaya* (Q69BI7); *Caenorhabditis remanei* (AAZ42349); *Dictyostelium discoideum* (Q54I91); *Escherichia coli* (ibpA; P0C054); *Escherichia coli* (ibpB; P0C058); *Homo sapiens* (P02489); *Haemonchus contortus* (AAN05752); *Lygodactylus picturatus* (Q6EWI0); *Onchocerca volvulus* (CAA48633), *Ostertagia ostergi* (CAG25499); *Macaca mulatta* (P02488); *Mycobacterium tuberculosis* (P0A5B7); *Mus musculus* (AAA37861); 30 *Nippostrongylus brasiliensis* (BAI81970); *Plasmodium falciparum* (Q8IB02); *Rattus rattus* (CAA42910); *Saccharomyces cerevisiae* (P15992); *Solanum lycopersicum* (O82545); *Streptococcus thermophilus* (P80485); *Trichinella spiralis* (ABJ55914); *Trypanosoma brucei* (Q57V53); *Toxoplasma gondii* (Q6DUA8). El dominio de alfa-cristalina de todas las secuencias de sHSP se alineó utilizando el algoritmo ClustalW y el conjunto de datos se utilizó para construir un árbol filogenético con el software PHYLIP. Los árboles se hicieron usando el procedimiento de 35 unión vecino, con distancias de aminoácidos corregidas por Poisson.

Ensayo de Chaperona. Una de las características típicas de la chaperona es que pueden unirse y proteger a las proteínas celulares del daño por calor. Cuando las proteínas están expuestas al daño por calor, se agregan (agregación térmica). Las chaperonas previenen esta agregación. Para determinar si BmHSP podría prevenir la 40 agregación térmica, se usó un ensayo de agregación térmica de citrulina sintasa (CS) (Sigma, St. Louis, MO). CS fue seleccionado porque esta proteína es altamente sensible a la desnaturalización por calor. Se utilizó un procedimiento establecido (Gnanasekar, y col. (2009) Biochem. Biophys. Res. Commun. 386: 333-337). Brevemente, 1 μ M de CS se expuso a 45 °C en presencia o ausencia de BmHSP (2 μ M) suspendido en 50 mM de fosfato de sodio pH 7,4 tampón que contiene NaCl 100 mM. Se usó BSA como control. CS se incubó con BmHSP a una relación molar de (1: 2) 45 durante varios intervalos de tiempo de 0 a 40 minutos. La desnaturalización térmica (agregación) se monitorizó espectrofotométricamente a 360 nm.

Ensayo de unión a péptido in vitro para la actividad de chaperona. Otra característica de las proteínas de choque térmico es que pueden unirse a una variedad de proteínas. Para determinar si BmHSP también tiene esta función, CS 50 y otra proteína, la luciferasa, se desnaturalizaron químicamente con clorhidrato de guanidina 6M según procedimientos conocidos (Gnanasekar, y col. (2009) *supra*). Las proteínas nativas y químicamente desnaturalizadas se revistieron sobre placas de 96 pocillos durante la noche a 4 °C. Después de lavar con PBS, los pocillos se bloquearon con BSA al 3 % a temperatura ambiente. Después de un lavado adicional, los pocillos se incubaron con rBmHSP marcado con his durante 1 hora a 37 °C. Después de lavar nuevamente con PBS, se añadió conjugado de HRP anti-his etiquetado 55 óptimamente diluido y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después del lavado final, se desarrolló el color con ABTS [2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] y se midió la DO a 405 nm.

Niveles de anticuerpos anti-BmHSP en sueros humanos. Se analizó un total de 20 muestras de suero pertenecientes a diferentes grupos clínicos como Mf, CP, EN y NEN para determinar la presencia y el título de anticuerpos IgG anti- 60 BmHSP utilizando un ELISA indirecto (Cheimaraj, y col. (1992) J. Trop. Med. Hyg. 95: 47-51). Brevemente, los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos se revistieron con rBmHSP (1 μ g/ml) en tampón de carbonato, pH 9,6, durante la noche a 4 °C y se bloquearon con BSA al 3 % durante 1 hora a 37 °C. Se agregaron muestras de suero a

los pocillos y las placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Después de lavar los pocillos, se añadió IgG antihumana de ratón marcada con HRP (1: 5000) y se incubó adicionalmente durante 1 hora a 37°C. El color se desarrolló utilizando sustrato ABTS. La absorbancia se midió a 405 nm en un lector de microplacas (BIO-RAD, Hercules, CA). El isotipo de anticuerpos IgG anti-BmHSP en el suero de los sujetos también se determinó usando un ELISA específico de isotipo.

5 Se usaron IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 antihumanos monoclonales de ratón biotinilados como anticuerpos secundarios y se desarrolló color con conjugado avidina-HRP (Sigma, St. Louis, MO) como anticuerpos secundarios.

Clonación de BmHSP con codón optimizado en el vector pVAX para la vacuna de ADN. Los genes Bmhspt optimizados concodón se clonaron en el vector de expresión eucariota pVAX (Invitrogen) usando cebadores específicos de inserto

10 *(cebador directo, 5'-CGC GGA TCC ATG GAA GAG AAG GTG GTG-3 '(SEC ID NO: 1) que contiene el sitio BamHI y cebador inverso, 5'-CCG GAA TTC TCA CTT GTC GTT GGT G-3 '(SEQ ID NO: 2) que contiene el sitio EcoRI). Los parámetros de PCR fueron los siguientes: 94 °C de desnaturalización durante 30 segundos, 50 °C de recocido del cebador durante 30 segundos, 72 °C de extensión del cebador durante 30 segundos durante 30 ciclos; y se realizó una extensión final de 5 minutos a 72 °C. El inserto de ADN fue secuenciado para asegurar la autenticidad de la secuencia de nucleótidos clonada en ambas cadenas. Los plásmidos se mantuvieron y se propagaron en células E. coli/TOP10F'. Posterior*

15 *mente, los plásmidos se purificaron usando un kit de extracción de plásmidos sin endotoxina (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADN se analizó por electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó por espectrofotometría (DO 260/280, relación > 1,8).*

20 *Inmunización de ratones.* Se usaron ratones Balb/c machos de seis semanas de edad comprados en Charles River Laboratories en estos experimentos. El uso humano de animales en este estudio y el protocolo fue aprobado por el comité de IACUC en la Facultad de Medicina de la Universidad de Illinois Rockford. Cada grupo estaba compuesto por cinco (5) ratones y todos los ratones fueron inmunizados por vía intraperitoneal usando tres regímenes de inmunización diferentes. Los ratones del grupo A se inmunizaron usando un régimen de refuerzo principal. Los ratones

25 *se cebaron dos veces a intervalos de dos semanas con 100 µg de ADN de pVAX Bmhspt libre de endotoxina, optimizado con codón, suspendido en un volumen de 50 µl. Después del cebado, todos los ratones recibieron dos dosis de refuerzo de 15 µg de proteína rBmHSP (50 µl cada una) suspendidas en alumbre a intervalos de dos semanas. Los ratones del grupo B se inmunizaron con proteína rBmHSP sola. Estos ratones recibieron cuatro dosis de 15 µg de proteína rBmHSP suspendidas en alumbre administradas a intervalos de dos semanas. Los ratones del grupo C se inmunizaron con ADN solo. Los ratones recibieron cuatro dosis de 100 µg of pVAX Bmhspt ADN dadas con intervalos*

30 *de dos semanas. Los animales del grupo D recibieron 100 µg de control de vector pVAX y adyuvante en el mismo intervalo y permanecieron como controles negativos. Se recogieron muestras de sangre de cada ratón antes de la inmunización y un mes después de la última dosis de refuerzo. Después de separar los sueros, se determinaron el título de anticuerpos IgG anti-BmHSP circulantes y los isotipos respectivos. Se usaron sueros que mostraron un alto*

35 *título de anticuerpos contra BmHSP en el ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) descrito en esta invención.*

Niveles de Anticuerpos Anti-BmHSP en los Sueros de Ratones. Los niveles de anticuerpos IgG anti-BmHSP en los sueros de grupos de ratones inmunizados y de control se determinaron usando un ELISA indirecto (Veerapathan, y col. (2009) PLoS Negl. Trop. Dis. 3: e457). Los niveles de anticuerpos anti-BmHSP IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 también se determinaron usando un kit ELISA de isotipado de anticuerpos de ratón (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL). Se desarrolló el color con sustrato cromógeno ABTS (ácido 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y se midió la absorbancia a 405 nm en un lector ELISA (BIO-RAD).

40

45 *Anticuerpos anti-BmHSP de Reducción de Sueros Humano y de Ratones.* Los anticuerpos anti-BmHSP se redujeron de sueros agrupados de sujetos EN y ratones inmunizados incubando los sueros agrupados con resina IMAC de cobalto junto con rBmHSP marcado con his según los procedimientos establecidos (Veerapathan, y col. (2009) *supra*). Brevemente, 1 mg de rBmHSP marcado con his se acopló a 2 ml de volumen de lecho de resina IMAC durante 2 horas a 37 °C. Después de lavar la resina una vez con 10 ml de PBS (pH 8), se añadieron 200 µl de sueros agrupados y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después de la incubación, la mezcla de resina se centrifugó durante 2 minutos a

50 *750 rpm y se recogió el sobrenadante. ELISA confirmó la reducción de anticuerpos anti-BmHSP en el sobrenadante como se describe en esta invención.*

Anticuerpos Anti-BmHSP IgG1, anti-BmHSP IgG2a, anti-BmHSP IgG2b, anti-BmHSP IgG3 y anti-BmHSP IgG4 de

55 *sueros agrupados de sujetos EN y sueros agrupados de ratones inmunizados se redujeron usando resina NHS (N-hidroxisuccinimidilo) (Thermo Fisher Scientific). Brevemente, 1 µg de los anticuerpos monoclonales respectivos se acoplaron a la columna de resina NHS. Después de lavar la resina dos veces con PBS (pH 8), se pasaron 100 µl de suero a través de la columna. El flujo a través se recogió a medida que el anticuerpo reducía los sueros. La reducción del isotipo específico de anticuerpo se confirmó mediante un ELISA específico de isotipo como se describe en esta*

60 *invención. Después de lavar la columna tres veces con PBS (pH 7,4), los anticuerpos unidos se eluyeron usando tampón glicina-HCl (pH 2,7) de la resina y el pH se ajustó a 7,4 con tampón Tris 1 M (pH 8). El eluido recuperado contenía el anticuerpo específico según confirmado nuevamente por un ELISA. Los sueros reducidos por anticuerpos*

también se reconstituyeron con los anticuerpos eluidos. Una parte alícuota de sueros agotados se reconstituyó con los anticuerpos eluidos a su concentración original usando valores determinados por un ELISA anterior en las muestras de suero puro. Los sueros reducidos por anticuerpos, los anticuerpos eluidos y las muestras de sueros reconstituidos se usaron en un ensayo de ADCC.

5

Ensayo de Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos (ADCC). El ensayo *in vitro* de ADCC se realizó según procedimientos conocidos (Chandrasekhar, y col. (1985) *Parasite Immunol.* 7: 633-641). Brevemente, se incubaron diez (10) L3 de *B. malayi* con 2×10^5 células peritoneales (PEC) recogidas de ratones normales, 50 μ l de muestras de suero de ratón agrupadas y 50 μ l de medio RPMI 1640 en una placa de cultivo de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific).

10 Después de 48 horas de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, se determinó la viabilidad larval a 400X usando un microscopio óptico. Las larvas límpidas y dañadas se contaron como muertas. Además, las larvas muertas también tenían grupos de células adheridas y eran más transparentes que las vivas. Las larvas que estaban activas, enrolladas y translúcidas se contaron como vivas. El ADCC se estimó como el porcentaje de muerte larval calculado con la fórmula:

15

$$\text{Número de larvas muertas} \div \text{Número total de larvas} \times 100\%$$

El ensayo ADCC también se realizó con muestras de suero humano agrupadas como se describe en esta invención, excepto que las muestras de suero humano se incubaron con 2×10^5 PBMC recogidas de sujetos sanos normales y 6-12 *B. malayi* L3 para 48 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. La viabilidad y la muerte larval se determinaron como se describió anteriormente.

Estudios de Protección en Ratones. El potencial de vacuna de BmHSP se evaluó en un modelo de ratón de infección por exposición. Los ratones se inmunizaron como se describió anteriormente usando la estrategia de refuerzo principal, ADN solo o proteína sola. El grupo de vectores y alumbre sirvió como controles negativos. Los animales inmunizados y de control se expusieron usando un procedimiento de cámara de microporos como se conoce en la técnica (Abraham, y col. (1986) *Immunology* 57: 165-169). Brevemente, se ensamblaron cámaras de microporos usando anillos PLEXI de 14 x 2 mm (Millipore Corporations, Bedford, MA) y membranas de policarbonato de nucleoporos de 5,0 μ m (Millipore Corporations). Las membranas se unieron a los anillos PLEXIGLASS con adhesivo cianoacrílico y cemento dental.

25 Las cámaras se sumergieron durante la noche a 37 °C en medio RPMI estéril que contenía gentamicina y solución antimicótica. Antes de los experimentos de exposición, se introdujeron 20 L3 infecciosas vivas suspendidas en medio RPMI 1640 suplementado con 15 % de suero de ternera fetal inactivado por calor (FCS) en las cámaras de microporos y la abertura se selló con cemento dental. La cámara de microporos conteniendo los L3 se implantó quirúrgicamente en la cavidad peritoneal de cada ratón bajo anestesia. Se siguieron condiciones asépticas para los procedimientos

30 quirúrgicos. Después de 48 horas de implantación, los animales fueron sacrificados y las cámaras se recuperaron de la cavidad peritoneal. El contenido de cada cámara se vació y las larvas se examinaron microscópicamente para determinar la adherencia de las células y la muerte de las larvas. Las larvas muertas y vivas se identificaron como se describió anteriormente en ADCC. El porcentaje de protección se expresó como el número de parásitos muertos \div número de parásitos totales recuperados \times 100.

40

Ensayo de proliferación de esplenocitos. Se recogieron bazos de todos los ratones del experimento anterior y se preparó la suspensión unicelular de células de bazo. Aproximadamente 2×10^5 células/pocillo en suspensión en RPMI completo 1640 suplementado con inactivado por calor al 10 % de FCS se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 72 horas con rBmHSP (1 μ g/ml), ConA (1 μ g/ml) o con medio solo. Después de la incubación, se determinó la proliferación celular usando el kit de conteo celular (CCK-8) adquirido de Dojindo Molecular Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD).

45 El índice de estimulación de la proliferación de células del bazo se calculó utilizando la fórmula: Absorbancia de las células estimuladas \div Absorbancia de las células no estimuladas.

Análisis de citoquinas. Las células del bazo de ratones inmunizados y control se cultivaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 72 horas con rBmHSP (1 μ g/ml), ConA (1 μ g/ml) o con medio solo como se describió anteriormente. Después de 72 horas, los sobrenadantes de cultivo y los sedimentos celulares se recogieron por separado para el análisis de citoquinas. Para medir el ARNm de citoquina, se suspendieron los sedimentos celulares en el reactivo TRIZOL (GIBCO-BRL, Life technologies, Carlsbad, CA) y se extrajo el ARN total según las instrucciones del fabricante. Después del lavado con etanol, los sedimentos de ARN se disolvieron en agua libre de RNasa (Sigma) y se trataron

55 con DNasa I antes de determinar la concentración total de ARN utilizando un espectrofotómetro Beckman a 260 nm. La transcripción inversa del ARN total se realizó utilizando el kit de síntesis de ADNc de primera cadena (SABiosciences, Frederick, MD) según las recomendaciones del fabricante. La cuantificación relativa de la expresión de genes de interés se midió en una máquina de PCR en tiempo real Applied BioSystem 7300 (Applied BioSystems, Foster City, CA). Las amplificaciones por PCR se realizaron con la mezcla LightCycler-DNA SYBR green

60 (SABiosciences). La reacción se realizó usando las siguientes condiciones de PCR: etapa de activación de 15 minutos a 95 °C durante un ciclo, etapa de desnaturalización de 15 segundos a 95 °C, recocido de cebadores durante 20 segundos a 50 °C y etapa de alargamiento durante 15 segundos a 72 °C. El ADN se amplificó durante 50 ciclos. Se

monitorizó el colorante fluorescente de unión a ADN SYBR green. El conjunto de matriz de datos RT-PCR se generó y analizó utilizando el sistema de análisis de datos basado en web SABiosciences.

Los sobrenadantes de cultivo se recogieron de cultivos de esplenocitos 72 horas después de la incubación con rBmHSP (1 µg/ml), ConA (1 µg/ml) o con medio solo. Los niveles secretados de proteína IL-2, IL-4, IFN-γ e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo se determinaron usando un kit ELISA sandwich adquirido de ThermoFisher Scientific. La concentración de cada citocina se determinó a partir de una curva estándar trazada usando IL-2, IL-4, IFN-γ o IL-10 de ratón recombinante.

10 *Análisis Estadístico.* El análisis estadístico se realizó con el software XL STAT v. 7. 5. 2 (Kovach Computing Services, Anglesey, Reino Unido). La significación estadística entre grupos comparables se estimó utilizando pruebas no paramétricas apropiadas, con el nivel de significación establecido en $p < 0,05$.

15 *Expresión de BmHSP12. 6 recombinante (BmHSP).* BmHSP se clonó en el vector pRSET A y se expresó como una proteína de fusión marcada con histidina (etiquetada con his) en *E. coli*/BL21 (DE3) PLYS. La proteína BmHSP recombinante se purificó posteriormente usando una columna IMAC. Se descubrió que la masa molecular de la proteína de fusión recombinante his-tag purificada era de aproximadamente 18 kDa. La proteína recombinante purificada en columna apareció como una sola banda en SDS-PAGE.

20 *Estructura tridimensional prevista de BmHSP.* Las secuencias de aminoácidos de la cadena A alfa cristalina humana comparten un 42 % de similitud con BmHSP. Como la estructura cristalina de la cadena A alfa cristalina humana ya está disponible, se utilizó como plantilla para modelar la estructura putativa de BmHSP utilizando el programa Modeller 9v6. El análisis PROCHECK se utilizó para seleccionar el mejor modelo que mostró una puntuación de -0,41 en comparación con la plantilla (Laskowski, y col. (1993) *J. Appl. Cryst.* 26: 283-29). También se realizó un análisis de la trama de Ramachandran en la secuencia BmHSP. Estos análisis mostraron que el 92 % de los residuos estaban en la región más favorable sin impedimento estérico. Se encontraron aproximadamente 6. 7 % de residuos en la región permitida adicional. Los modelos que mostraron más del 90 % de residuos en las regiones más favorecidas se predijeron como el modelo tridimensional más ideal según lo predicho el diagrama de Ramachandran (Balazs, y col. (2001) *Protein Eng. Des. Sci.* 14: 875-880). El análisis de predicción de estructura secundaria también se realizó en la proteína BmHSP usando el servidor PDBsum en EMBL. Este análisis mostró que cada dominio alfa-cristalino del monómero BmHSP tenía un núcleo de inmunoglobulina compuesto por siete cadenas β dispuestas en dos láminas antiparalelas. La predicción de la estructura secundaria de BmHSP mostró dos láminas, cuatro horquillas beta, una protuberancia beta, siete cadenas, dos hélices, siete vueltas beta y una vuelta gamma en la estructura de BmHSP.

35 Estudios anteriores mostraron que BmHSP se une a la cadena α del receptor de IL-10 humano I (Gnanasekar, y col. (2008) *Mol. Biochem. Parasit.* 159: 98-103). Para identificar el sitio de unión al receptor de IL-10 en BmHSP, se realizó un análisis predictivo de interacción proteína-proteína (Ofrañ & Rost (2007) *Bioinformatics* 23: e13-e16). Los resultados del análisis de predicción mostraron que el fragmento N-terminal de BmHSP (aminoácidos de Met1 a Asn26) tenía una región de interacción proteína-proteína fuerte. El análisis adicional de la secuencia de esta región mostró que las secuencias de aminoácidos de Val5 a Glu42 tenían una identidad de secuencia significativa con la región de unión a IL-10R humana de IL-10 humana. Estos resultados confirman que la región N-terminal de BmHSP puede estar involucrada en la unión de BmHSP a la cadena α I del receptor de IL-10 humano.

45 *Análisis de motivo y filogenético en BmHSP.* El análisis de motivo realizado en PROSITE mostró varios sitios de modificación post-traslación putativa, como los sitios de N-glicosilación (residuos 11 a 14 y 98 a 101), sitios de fosforilación de proteína quinasa-c (residuos 83 a 85 y 100 a 102), sitios de fosforilación de caseína quinasa II (residuos 68 a 71 y 88 a 91) y sitios de N-miristilación (residuos 40 a 45) en BmHSP. También se observaron motivos similares en IL-10 humana, lo que indica que BmHSP puede imitar la función de la IL-10 humana (Gnansekar, y col. (2008) *supra*). El mapeo de epítomos en BmHSP reveló la presencia de regiones de epítomos de células B, células T y CTL, lo que indica que BmHSP es potencialmente una proteína altamente inmunogénica (Tabla 2).

TABLA 2

Epítomo predicho	Posición del epítomo en la secuencia de aminoácidos	Secuencia de Péptidos	SEQ ID NO:
Epítomos de Células B	12 - 23	WSAEQWDWPLQH	3
	26 - 35	EVIKTNNDK	4
	67 - 74	SRAEHYGE	5
	84 - 94	KLPSDVDTKTL	6
Epítomos de	45 - 53	FTPKEIEVK	7

Epítipo predicho	Posición del epítipo en la secuencia de aminoácidos	Secuencia Péptidos	de SEQ NO:	ID
Células T	50 - 57	IEVKVAGD	8	
	38 - 45	VGLDASFF	9	
	39 - 47	GLDASFFTP	10	
	52 - 60	VKVAGDNLV	11	
	84 - 92	KLPSDVDTK	12	
	92 - 100	KTLTSLTK	13	
	27 - 35	VIKTNTNDK	14	
	90 - 98	DTKTLTSLN	15	
	44 - 52	FFTPKEIEV	16	
	38 - 46	VGLDASFFT	17	
	100 - 108	KRGHLVIAA	18	
	73 - 81	GEIKREISR	19	
	43 - 51	SFFTPKEIE	20	
	Epítipos CTL	78 - 86	REISRTYKL	21
74 - 82		GEIKREISR	22	
70 - 78		AEHYGEIKR	23	

Un análisis filogenético realizado usando secuencias representativas de sHSP de diferentes grupos de organismos mostró que BmHSP, *C. elegans*HSP y *C. remani*HSP forman un grupo monofilético, separado de los otros grupos de 5 organismos.

BmHSP es una Chaperona. La mayoría de las proteínas de choque térmico informadas hasta la fecha tienen función de chaperona. Para determinar si BmHSP también tiene una función de chaperona similar, se realizó una reacción de 10 agregación térmica utilizando un sustrato modelo, Citrulina sintasa (CS). La incubación de CS a 42 °C dio como resultado el despliegue de la proteína y la agregación posterior en 10 minutos. La adición de BmHSP a la proteína CS (en una relación molar de 1: 2), antes del tratamiento térmico, inhibió significativamente ($P < 0,01$) la agregación térmica de la proteína CS. Una proteína de control no chaperona, BSA, no tuvo ningún efecto sobre la agregación inducida por el calor de la proteína CS.

15 Otra función de las proteínas chaperonas es que pueden unirse específicamente a proteínas desnaturalizadas. Para determinar si BmHSP puede unirse específicamente a proteínas desnaturalizadas, se incubó rBmHSP con CS nativos y desnaturalizados o sustratos de luciferasa nativos y desnaturalizados. Estos estudios mostraron que rBmHSP se une preferentemente a sustratos de proteínas desnaturalizadas en comparación con las proteínas nativas o de control. Estos resultados confirmaron que BmHSP puede actuar como una chaperona molecular que potencialmente protege 20 las proteínas celulares del parásito de los efectos dañinos del huésped.

Respuestas de *anticuerpos en humanos.* Los resultados presentados en esta invención indican que BmHSP tiene varios epítipos de células T y células B. Por lo tanto, se evaluó si las personas infectadas con filariasis tienen anticuerpos contra BmHSP. Por consiguiente, se midió el título de anticuerpos IgG anti-BmHSP en los sueros de 25 sujetos EN, CP, Mf y NEN. Los resultados mostraron que los sujetos con EN tenían los niveles más altos de anticuerpos anti-BmHSP ($p < 0,001$). El análisis de isotipo posterior de los anticuerpos IgG mostró que, en comparación con los grupos infectados (Mf y CP) de individuos, los sueros de sujetos EN tenían títulos elevados de anticuerpos IgG1 e IgG3 anti-BmHSP. Los portadores de Mf tenían solo niveles significativos de anticuerpos anti-BmHSP IgG2 en sus sueros. Del mismo modo, individuos con PC solo tenían niveles significativos de anticuerpos anti-BmHSP IgG4 en sus 30 sueros. Los niveles de IgG1 e IgG3 anti-BmHSP fueron muy bajos en los sueros de estos individuos con Mf y CP. Los anticuerpos anti-BmHSP no fueron detectables en el suero de sujetos NEN.

Resultados del ensayo ADCC. Dado que los anticuerpos contra BmHSP estaban presentes en todos los grupos de individuos infectados (Mf y CP) y sujetos EN, se determinó si estos anticuerpos eran funcionales. Utilizando un ensayo 35 de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, se probó si los anticuerpos IgG anti-BmHSP12.6 tenían alguna función protectora contra *B. malayi*. Estos estudios mostraron que los sueros EN agrupados promovieron la adherencia

de PBMC a L3 e indujeron la muerte significativa (77. 37 %) de *B. malayi*L3 *in vitro* (Tabla 3), mientras que los sueros agrupados de Mf y CP no pudieron participar en la función ADCC. Estos resultados indicaron que los sueros EN tienen actividades antiparasitarias. Para determinar si esta función está asociada con anticuerpos, se realizaron estudios de reducción de anticuerpos. La reducción de los anticuerpos anti-BmHSP de los sueros EN resultó en una reducción significativa (21. 42 %) en la muerte larval (Tabla 3) confirmando que los anticuerpos anti-BmHSP en los sueros de los sujetos EN, pero no los sujetos Mf o CP, participan en la muerte de las larvas.

TABLA 3

Grupos	Muerto L3	Vivo L3	L3 total	% de muerte larval (Media ± DE*)
Sueros endémicos normales (EN)	5	1	6	77,37 ± 8,41
	5	2	7	
Sueros EN reducidos de anticuerpos anti-rBmHSP	2	5	7	21,42 ± 10,12
	1	6	7	
Sueros normales no endémicos (NEN)	1	5	6	19. 44±3. 92
	2	7	9	

* Los valores representan la media ± DE de tres pocillos.

10

Otros estudios de reducción mostraron que el efecto antiparasitario de los anticuerpos anti-BmHSP estaba asociado con el isotipo de anticuerpos IgG1. La reducción de anticuerpos IgG1 de los sueros EN inhibió significativamente (40 %) la función ADCC (Tabla 4). La reconstitución de sueros EN reducidos con anticuerpos anti-BmHSP con anticuerpos IgG1 anti-BmHSP eluidos recuperó la función ADCC (Tabla 3). Estos resultados indicaron que los anticuerpos anti-

15 BmHSP IgG1 son críticos para la función ADCC.

TABLA 4

Sueros EN		% de muerte larval
Sueros puros		72
Reducido de:	IgG1	40
	IgG2	71,43
	IgG3	60
	IgG4	62,5
Reconstituido con:	IgG1	70
	IgG2	69,23
	IgG3	66,67
	IgG4	54,55

* Valores representan la media de tres pocillos.

20 *Respuestas de Anticuerpos en Ratones.* Los ratones inmunizados con rBmHSP desarrollaron niveles significativos de anticuerpos IgG anti-BmHSP. Más específicamente, el régimen de vacuna de refuerzo principal indujo un título significativamente más alto de anticuerpos IgG en comparación con el grupo de vacuna de ADN solo ($p < 0. 05$). Sin embargo, la vacuna de proteína rBmHSP indujo el título más alto de anticuerpos IgG. El análisis del isotipo de los anticuerpos anti-BmHSP IgG mostró que predominantemente los anticuerpos anti-BmHSP IgG1, IgG2a e IgG2b

25 estaban presentes en los sueros de los animales vacunados. El ensayo ADCC también se realizó con suero de ratón. Estos estudios mostraron que los sueros de ratones vacunados con BmHSP promovieron la adherencia de las células del exudado peritoneal a L3 y participaron en la función ADCC (83. 02 % de eliminación de larvas) en comparación con los sueros de control (13 %) ($p < 0. 002$) (Tabla 5).

30

TABLA 5

Régimen de Inmunización	% de muerte larval
<i>Bmhs</i> ADN principal y rBmHSP refuerzo de proteína	83,02 ± 3,62

Régimen de Inmunización	% de muerte larval
<i>Bmhs</i> p ADN	43,7 ± 8,12
proteína rBmHSP	55,08 ± 1,15
pVAX & control de alumbre	13 ± 2,35
* Valores representan la media ± DE de tres pocillos.	

Similar a sueros humanos, el isotipo individual de los anticuerpos IgG se redujeron de los sueros de los ratones vacunados para determinar el isotipo de los anticuerpos anti-BmHSP que participan en la función ADCC. Los resultados de estos estudios mostraron que, de forma similar a la observada con los sueros EN, los anticuerpos anti-BmHSP IgG1 también participaron en la muerte de L3 mediada por ADCC en ratones (Tabla 6).

TABLA 6

Ratones inmunizados Sera	% de muerte larval	
Sueros puros de BmHSP refuerzo principal	80,16	
Reducido de:	IgG1	37
	IgG2a	72
	IgG2b	71
	IgG3	80
Reconstituido con:	IgG1	80
	IgG2a	63
	IgG2b	87
	IgG3	71
* Valores representan la media de tres pocillos.		

10

Potencial de vacuna de BmHSP en ratones. El potencial de vacuna de BmHSP se evaluó en ratones Balb/c utilizando un procedimiento de cámara de microporos. Los resultados mostraron que los ratones inmunizados usando el régimen de vacunación de refuerzo principal y la vacuna de proteína de BmHSP exhibieron casi un 72 % y 58 % de mortalidad, respectivamente, de L3 implantados en la cavidad peritoneal de los ratones inmunizados (Tabla 7). Si bien las cámaras implantadas en los grupos de animales de control mostraron solo un 7 % de mortalidad del parásito, la diferencia entre la protección del grupo de control de los ratones y los ratones vacunados fue significativa ($P < 0,001$). Por otro lado, los ratones inmunizados solo con la vacuna de ADN indujeron solo un 31 % de protección. Por lo tanto, el régimen de vacunación de refuerzo principal parecía ser altamente eficiente para conferir protección inducida por la vacuna contra una infección por exposición en comparación con los protocolos de inmunización de ADN solo o proteína sola.

15

20

TABLA 7

Régimen de Inmunización	% de muerte larval
<i>Bmhs</i> pADN principal y rBmHSP refuerzo de proteína	72 ± 10,22
<i>Bmhs</i> p ADN	31 ± 5,23
proteína rBmHSP12. 6	58 ± 7,76
pVAX & control de alumbre	7 ± 5,2
Valores representan media ± DE. N=5. Los datos provienen de uno de dos experimentos similares que muestran resultados comparables.	

Respuestas inmunes en ratones vacunados con BmHSP. Para determinar las respuestas inmunes celulares a BmHSP en los ratones vacunados, se cultivaron células de bazo de ratones vacunados y de control en presencia de proteína rBmHSP y se evaluaron sus respuestas proliferativas y los perfiles de citocinas. La respuesta proliferativa de las células del bazo de los animales inmunizados con el régimen de vacuna de refuerzo principal fue significativamente ($P > 0,05$) mayor (índice de estimulación de $3,35 \pm 0,176$) en comparación con el grupo de vacunación de proteína sola rBmHSP (índice de estimulación de $2,22 \pm 0,018$) o *Bmhs*p grupo de vacunación de ADN solo (índice de estimulación de $3,53$

25

± 0,102). Las células de bazo del grupo de control de animales no proliferaron en respuesta a rBmHSP (índice de estimulación de $0,98 \pm 0,013$) y fue similar a los controles de medio solo. Dado que las células del bazo de los animales vacunados proliferaban significativamente para recordar la respuesta a rBmHSP, se midieron los niveles de citocinas en los sobrenadantes del cultivo. Estos resultados mostraron que IFN- γ era la citocina predominante secretada por las células del bazo de los animales vacunados a las 72 horas después de la estimulación con rBmHSP. Se realizó una matriz de genes de citocinas de PCR en tiempo real en ARNm recogido de las células del bazo estimuladas con rBmHSP. Estos resultados mostraron que los genes de citocinas Th1 (IFN- γ , CD-28, IL-12, IL-2) y Th2 (IL-4, IL-5, IL-1R) aumentaron significativamente en los animales vacunados.

10 Ejemplo comparativo 2: rBmALT-2 + rBmHSP Vacuna multivalente

Parásito. L3 de *Brugia malayi* se obtuvieron del NIAID/NIH Filariasis Research Reagent Resource Center (FR3) en la Universidad de Georgia, Atenas, GA.

15 *Construcción de vacunas de ADN monovalentes y multivalentes.* La vacuna de ADN monovalente estaba compuesta de Bmbsp o Bmalt-2 en el vector pVAX1. Para preparar la vacuna monovalente, los genes Bmbsp o Bmalt-2 optimizados con codón se clonaron en el vector de expresión eucariota pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando cebadores específicos de inserto (Gnanasekar, y col. (2004) *supra*). La vacuna multivalente estaba compuesta de genes Bmbsp y Bmalt-2 en el mismo vector pVAX1. El gen Bmbsp optimizado con codón se clonó primero en el vector pVAX1 sin codón de parada en el cebador inverso (5'-CCG GAA TTC TCA CTT GTC GTT GGT G-3'; SEQ ID NO: 24) pero contenía un sitio PstI. Luego se insertó el gen Bmalt-2 optimizado con codón en este clon usando cebadores específicos del gen (Gnanasekar, y col. (2004) *supra*). Los parámetros de PCR para todas las tres construcciones eran: 94 °C de desnaturalización durante 30 segundos, 50 °C de recocido del cebador durante 30 segundos, 72 °C de extensión del cebador durante 30 segundos durante 30 ciclos; y se realizó una extensión final de 5 minutos a 72 °C. El ADN del inserto finalmente fue secuenciado para asegurar la autenticidad de la secuencia de nucleótidos clonada en ambas cadenas. Los plásmidos se mantuvieron y se propagaron en células *E. coli*/TOP10F'. Los plásmidos se purificaron usando un kit de extracción de plásmidos sin endotoxina (Qiagen, Valencia, CA). El ADN se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó en un espectrofotómetro (DO 260/280, relación > 1,8).

30 *Expresión y Purificación de Proteínas Recombinantes.* Todos los genes fueron clonados en el vector pRSET-A (con una etiqueta de hexahistidina N-terminal) para producir proteínas recombinantes. Las construcciones Bmbsp y Bmalt-2 se transformaron en BL21 (DE3) que contiene pLysS *E. coli*/huésped (Invitrogen) para minimizar la toxicidad debida a la proteína. Cuando la absorbancia de los cultivos alcanzó un valor de 0,6 OD, se añadió 1 mM de IPTG (isopropil tio-d-galacto piranosido) a los cultivos y se incubó durante 3 horas adicionales para inducir la expresión génica. Después de lisar las células, las proteínas totales se separaron en SDS-PAGE al 15 % y al 12 % para confirmar la expresión de las proteínas recombinantes BmHSP (rBmHSP) y rBmALT-2 his-tag. Las proteínas recombinantes se purificaron luego usando una cromatografía en columna de afinidad de metal cobalto inmovilizado (Clontech, Mountain View, CA) según las recomendaciones del fabricante. Las proteínas recombinantes se separaron luego en SDS-PAGE y se tiñeron con azul brillante de COOMASSIE R250 y tinción con plata. Estos estudios mostraron que se obtuvo una sola banda después de la purificación de la columna. Las endotoxinas, si hay alguna en las preparaciones recombinantes, se eliminaron pasando las proteínas recombinantes a través de columnas de afinidad de polimixina B (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) y los niveles de endotoxina en las preparaciones finales se determinaron usando un kit E-TOXATE (Sigma, St Louis, MO) según las instrucciones del fabricante. Los niveles de endotoxina estaban por debajo de los límites de detección en estas preparaciones de proteínas recombinantes.

50 *Inmunización de Ratones.* En estos experimentos se usaron ratones Balb/c machos de seis semanas de edad comprados en Charles River Laboratories. El uso humano de animales en este estudio y el protocolo fue aprobado por el comité de IACUC en la Facultad de Medicina de la Universidad de Illinois Rockford. Los ratones se dividieron en cuatro (4) grupos de cinco (5) animales cada uno. Todos los ratones se inmunizaron por vía subcutánea usando un régimen de vacuna de refuerzo de proteína de ADN prime. Todos los grupos experimentales de ratones se prepararon con dos inyecciones de ADN optimizado con codón libre de endotoxina administrado en un volumen de 50 μ l y se potenciaron con dos dosis de proteínas recombinantes suspendidas en alumbre (50 μ l cada una) administradas a intervalos de dos semanas.

55 Los ratones del grupo A fueron cebados con 100 μ g de pVAXBmbsp y reforzados con 15 μ g de rBmHSP; los ratones del grupo B se cebaron con 100 μ g de pVAX Bmalt-2 y se potenciaron con 15 μ g de rBmALT-2; los ratones del grupo C fueron cebados con 100 μ g de pVAXBmbsp/Bmalt-2 DNA y reforzados con 15 μ g de rBmHSP y 15 μ g de rBmALT-2. Los ratones del grupo D recibieron 100 μ g de vector pVAX1 más 50 μ l de alumbre y sirvieron como controles. Se recogieron muestras de sangre de cada ratón antes de la inmunización y un mes después de la última dosis de refuerzo. Los sueros se separaron y almacenaron a -80 °C.

Evaluación de respuestas de anticuerpos en ratones. Los niveles de anticuerpos anti-BmHSP y anti-BmALT-2 se midieron en los sueros de grupos de ratones inmunizados y de control usando un ELISA indirecto según procedimientos establecidos (Veerapathran, y col. (2009) *supra*; gnanasekar, y col. (2004) *supra*). Brevemente, los pocillos de las placas de microtitulación de 96 pocillos se revistieron con rBmHSP, rBmALT-2 o rBmHSP (1 µg/ml) en tampón de carbonato (pH 9,6) durante la noche a 4 °C. Después de lavar los pocillos, los sitios no unidos se bloquearon con BSA al 3 % durante 1 hora a 37 °C. Las muestras de suero diluido se añadieron a los pocillos y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después de lavar los pocillos, se añadió IgG anti-ratón de conejo marcada con HRP (1: 5000) y se incubó adicionalmente durante 1 hora a 37 °C. El color se desarrolló usando sustrato ABTS (2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)). La absorbancia se midió a 405 nm en un lector de microplacas (BIO-RAD, Hercules, CA).

Estudios de Protección en Ratones. El potencial de vacuna de las formulaciones de vacuna monovalente y multivalente se evaluó luego en un modelo de ratón. Los ratones se inmunizaron como se describió anteriormente usando la estrategia de refuerzo principal. El grupo de vectores más alumbre sirvió como controles negativos. Los animales inmunizados y de control se expusieron usando un procedimiento de cámara de microporos conocido en la técnica (Abraham, y col. (1989) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40(6) : 598-604). Brevemente, se ensamblaron cámaras de microporos usando anillos de PLEXIGLASS de 14 x 2 mm (Millipore Corporations, Bedford, MA) y membranas de policarbonato de nucleoporo de 5,0 µm (Millipore Corporation) que se unieron a los anillos de PLEXIGLASS con adhesivo cianoacrílico y cemento dental. Las cámaras se sumergieron durante la noche a 37 °C en medio RPMI estéril que contenía gentamicina y solución antimicótica. Antes de los experimentos de exposición, se introdujeron 20 L3 infecciosas vivas suspendidas en medio RPMI1640 suplementado con 15 % de suero de ternera fetal inactivado por calor (FCS), en las cámaras de microporos y la abertura se selló con cemento dental. La cámara de microporos conteniendo los L3 se implantó quirúrgicamente en la cavidad peritoneal de cada ratón bajo anestesia. Se siguieron condiciones asépticas para los procedimientos quirúrgicos. Después de 48 horas de implantación, los animales fueron sacrificados y las cámaras se recuperaron de la cavidad peritoneal. El contenido de cada cámara se vació y las larvas se examinaron microscópicamente para determinar la adherencia de las células y la muerte de las larvas. La viabilidad larval se determinó microscópicamente a 100 x. El porcentaje de protección se expresó como el número de parásitos muertos ÷ número de parásitos totales recuperados x 100.

Análisis de citoquinas en ratones. El porcentaje de células secretoras de interferón-γ (IFN-γ) e interleucina-4 (IL-4) específicas de rBmHSP y rBmALT-2 se determinó en el bazo de los ratones control y vacunados utilizando un ensayo ELISPOT. En resumen, las placas de filtro MILLIPORE MultiScreen HTS se revistieron con anticuerpos monoclonales de rata anti-ratón IFN-γ o monoclonal de rata anti-ratón IL-4 (BD Pharmigen, San Diego, CA) a una concentración de 10 µg/ml en tampón PBS. Después de lavar las placas, los sitios no específicos se bloquearon incubando los pocillos en RPMI completo con suero de ternera fetal al 10 % durante una hora a temperatura ambiente. Aproximadamente 3 x 10⁶ células de bazo suspendidas en medio RPMI1640 completo suplementado con 10 % de FCS inactivado por calor se añadieron a cada pocillo. Las células fueron estimuladas con rBmHSP o rBmALT-2 (1 µg/ml). Las células no estimuladas sirvieron como controles. Cuarenta y ocho horas después de la incubación a 37 °C en humidificado 5 % de CO₂, las placas se lavaron y se incubaron adicionalmente durante 1 hora a temperatura ambiente con 2µg de rata biotinilado anti-ratón de IFN-γ o biotinilado de rata anti-ratón de IL-4 anticuerpos (BD Pharmigen). Después de lavar las placas, se añadió peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina (Thermo Fisher Scientific) (1: 800) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Las placas se lavaron y se desarrollaron en color usando sustrato DAB (Thermo Fisher Scientific). El número total de manchas se contó bajo un microscopio de disección.

Análisis Estadístico. El análisis estadístico se realizó con el software XL STAT v. 7. 5. 2 (Kovach Computing Services, Anglesey, Reino Unido). La significación estadística entre grupos comparables se estimó utilizando pruebas no paramétricas apropiadas, con el nivel de significación establecido en p <0,05.

Respuestas de Anticuerpos en Ratones. Primero se determinó si la vacuna multivalente podría provocar anticuerpos significativos contra cada uno de los componentes antigénicos. Estudios anteriores han demostrado que ratones vacunados de manera similar con antígenos de *B. malayi* provocaron anticuerpos IgG protectores de *huésped* significativos (Veerapathran, y col. (2009) *supra*). Por lo tanto, se analizaron los títulos de anticuerpos IgG. Los resultados de este análisis indicaron que la inmunización monovalente con BmHSP + rBmHSP y BmALT-2 + rBmALT-2 provocó títulos significativos (p <0,005) de anticuerpos IgG anti-BmHSP y anti-BmALT-2 (Figura 1). La vacuna multivalente también provocó títulos de anticuerpos IgG significativos. Después de la vacuna multivalente, los ratones produjeron anticuerpos IgG contra BmHSP y BmALT-2 por igual, lo que sugiere que los antígenos no interfieren ni compiten por el dominio. Un resultado interesante fue que la vacuna multivalente provocó títulos de anticuerpos IgG de 1,5 a 1,75 veces mayores (p <0,005) en comparación con la vacuna monovalente (Figura 1). Estos resultados indicaron que los dos antígenos en la formulación multivalente pueden actuar de forma sinérgica al aumentar las respuestas de anticuerpos inducidas por la vacuna contra cada antígeno en los ratones vacunados. Los resultados también indicaron que la combinación de estos dos antígenos en la formulación de la vacuna tiene una gran ventaja.

Dadas las respuestas robustas de anticuerpos IgG inducidas después de la vacunación, también es posible que se pueda reducir la concentración de los antígenos componentes en la preparación multivalente.

Vacuna Multivalente Induce una Protección Significativa en Ratones. Los resultados en esta invención mostraron que se produjeron anticuerpos IgG significativos después de la vacunación con preparaciones de vacuna monovalentes y multivalentes. Para probar si las respuestas inmunitarias obtenidas después de la vacunación fueron protectoras, los animales vacunados fueron expuestos a larvas infecciosas de tercera etapa vivas (L3) de *B. malayi*. Dado que los parásitos no alcanzan la madurez en estos animales, se obtiene una *mejor* recuperación de los gusanos si los parásitos se implantan quirúrgicamente en los animales. Un procedimiento estándar de exposición a cámara de microporos (Abraham, y col. (1989) *supra*). Estos estudios mostraron que se podía lograr una protección cercana al 61 % en ratones inmunizados con una vacuna monovalente (Tabla 8). Esto fue altamente significativo ($p < 0,001$) en comparación con los controles negativos. Este resultado también mostró que rBmHSP y rBmALT-2 son útiles en vacunas para la filariasis linfática. Los experimentos de exposición en ratones inmunizados con vacuna multivalente mostraron que se podía lograr una protección significativamente ($p < 0,005$) mayor en comparación con la vacunación monovalente (Tabla 8). Estos resultados también se correlacionan claramente con el título más alto de anticuerpos IgG en estos animales y respaldan el resultado anterior de que rBmALT-2 y rBmHSP pueden mejorar sinérgicamente las respuestas inmunes protectoras en animales vacunados cuando se administran como un régimen de refuerzo principal (Tabla 8).

20 TABLA 8

Régimen de vacunación	Porcentaje de muerte larval ^a	Grupos
<i>Bmhsp</i> ADN principal y rBmHSP refuerzo de proteína	61 ± 4,24	Monovalente
<i>Bmalt-2</i> DNA principal y rBmALT-2 refuerzo de proteína	76 ± 8,21	Monovalente
<i>Bmhsp+Bmalt-2</i> principal y rBmHSP y rBmALT-2 refuerzo de proteína	90 ± 7,53	Multivalente
pVAX más control de alumbre	22 ± 10,41	Control

^avalores son media + DE. N=5. Los datos provienen de uno de dos experimentos similares que muestran resultados comparables.

Para demostrar aún más la eficacia, los ratones fueron inmunizados con varias combinaciones de refuerzo primario. Como se muestra en la Figura 3, se puede lograr una protección del 100 % en ratones después de la inmunización con proteína híbrida HAT o después de la inmunización de refuerzo principal con ADN híbrido HAT y proteína híbrida HAT.

Respuestas de citoquinas. Las características inmunológicas de las respuestas protectoras en ratones vacunados se determinaron evaluando las respuestas de citocinas secretadas de las células del bazo en respuesta a los antígenos de la vacuna. Cuando las células del bazo se estimularon con rBmHSP o rBmALT, hubo una proliferación significativa específica de antígeno de las células del bazo, lo que sugiere una fuerte respuesta celular de retirada a los antígenos. Para identificar el perfil de citocinas de estas células que responden al antígeno, se contaron las células secretoras de IFN- γ e IL-4 usando un ensayo ELISPOT. Los resultados de estos estudios mostraron que las células del bazo de ratones vacunados con la vacuna multivalente secretaban predominantemente IL-4 (Figura 2). El número de células secretoras de IFN- γ fue muy bajo. En general, estos resultados indicaron que la protección inducida por la vacuna estuvo mediada en gran medida por las respuestas de tipo Th2.

Ejemplo Comparativo 3: Vacuna Multivalente BmVal-1+BmALT-2

Sueros. Las muestras de suero utilizadas en este estudio fueron de muestras archivadas almacenadas en el Instituto de Ciencias Médicas Mahatma Gandhi, Sevagram, India. Estas muestras fueron recolectadas como parte de estudios epidemiológicos en Wardha y sus alrededores, un área endémica para filariasis linfática.

No hubo datos demográficos disponibles para este estudio, excepto que las muestras de suero se clasificaron en microfilaremia (MF), patología crónica (CP) o normales endémicas (EN) basadas en la detección de parásitos circulantes, parásitos antígenos o evaluando los síntomas clínicos de la filariasis linfática. Se detectaron microfilarias circulantes en la sangre de los sujetos según procedimientos conocidos (Haslbeck, y col. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 842-846; Yoo, y col. (2005) *Biotechnol. Lett.* 27: 443-448). La presencia de antígeno circulante se detectó utilizando un kit Og4C3 y un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) basado en WbSXP. Los sujetos sin antígeno circulante o microfilarias se clasificaron como EN, mientras que los sujetos con microfilarias circulantes y/o antígeno

circulante, según lo detectado por ELISA, se consideraron como MF. Los sujetos que mostraban linfedema y otros síntomas clínicos visibles de filariasis se agruparon en PC. Se recogieron sueros de control normales no endémicos (NEN) en la Clínica de la Universidad de Illinois en Rockford, IL.

- 5 *Parásitos. L3 de Brugia malayi* se obtuvieron del NIAID/NIH Filariasis Research Reagent Resource Center (FR3) en la Universidad de Georgia, Atenas, GA.

Construcción de vacunas de ADN monovalente y multivalente. Para preparar vacuna monovalente, genes optimizados con codón *BmVAL-1* (Ace: AF042088) o *Bmalt-2* (Ace: U84723) fueron clonados en el vector de expresión eucariota pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) utilizando cebadores específicos de inserto (Yoo, y col. (2005) *supra*; Huang, y col. (2005) *Immunol. Lett.* 101: 71-80). Para preparar la vacuna multivalente, el gen *BmVAL-1* optimizado con codón se clonó primero en el vector pVAX1 sin codón de parada usando secuencias cebadoras ya publicadas con un sitio PstI. El gen *Bmalt-2* optimizado con codón fue a continuación insertado en este clon usando cebadores específicos de genes. Los parámetros de PCR para todas las construcciones eran: 94 °C de desnaturalización durante 30 segundos, 50 °C de recocido del cebador durante 30 segundos, 72 °C de extensión del cebador durante 30 segundos durante 30 ciclos; y se realizó una extensión final de 5 minutos a 72 °C. El inserto de ADN fue secuenciado para asegurar la autenticidad de la secuencia de nucleótidos clonada en ambas cadenas. Los plásmidos se mantuvieron y se propagaron en células *E. coli* TOP10F'. Los plásmidos se purificaron usando un kit de extracción de plásmidos sin endotoxina (Qiagen, Valencia, CA). El ADN se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó en un espectrofotómetro (DO 260/280, relación > 1,8).

Expresión y Purificación de Proteínas Recombinantes. Los recombinantes BmVAL-1 y rBmALT-2 se expresaron en el vector pRSET-A y se purificaron usando una cromatografía en columna de afinidad de cobalto metálico inmovilizado según los procedimientos publicados (Norimine, y col. (2004) *Infect. Immun* 72: 1096-1106; Shinnick y col. (1988) *Infect. Immun* 56: 446-451). La endotoxina en las preparaciones recombinantes se eliminó pasando las proteínas recombinantes a través de columnas de afinidad de polimixina B (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) y los niveles de endotoxina en las preparaciones finales se determinaron usando un kit E-TOXATE (Sigma, St Louis, MO) según las instrucciones del fabricante. Los niveles de endotoxina en las preparaciones finales (0,005 EU/ml) estaban por debajo de los límites de detección en estas preparaciones de proteínas recombinantes.

Inmunorreactividad de sueros humanos. Para determinar si las muestras de suero humano portaban anticuerpos contra BmVAL-1 o BmALT-2, se realizó un ELISA (Haslbeck, y col. (2005) *supra*; Yoo, y col. (2005) *supra*). Para el ELISA específico de isotipo, se usaron IgG1 antihumana de cabra conjugada con fosfatasa alcalina, IgG2 antihumana, IgG3 antihumana e IgG4 antihumana (Sigma) como anticuerpos secundarios.

Protocolo de inmunización para ratones y meriones. En estos experimentos se utilizaron ratones Balb/c machos de seis semanas de edad y jerbos mangólicos machos (meriones) de 35-40 gm adquiridos en Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Los animales fueron tratados según las pautas de la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Dos modelos animales diferentes fueron utilizados debido a que el parásito *B. malayi* madura en adultos en ratones, por lo que la protección inducida por la vacuna contra las etapas L3 se puede evaluar en el modelo de ratón. Además, se pueden medir parámetros inmunológicos significativos en ratones. A la inversa, el parásito *B. malayi* se convierte en gusanos maduros adultos en meriones. Por lo tanto, la protección inducida por la vacuna se puede evaluar contra el establecimiento de gusanos adultos en meriones.

Se realizaron tres conjuntos de experimentos: (1) vacunación monovalente BmVAL-1, (2) vacunación monovalente BmALT-2 y (3) vacunación multivalente mVAL-1/BmALT-2. Cada conjunto experimental tenía cuatro grupos (a) ADN principal más ADN refuerzo (homólogo), (b) proteína principal más proteína refuerzo (homólogo), (c) ADN principal más proteína refuerzo (heterólogo) y pVAX más controles de alumbre. Cada grupo incluía diez (10) animales cada uno. Todos los animales se inmunizaron por vía subcutánea con ADN optimizado con codón (100 µg) en 50 µl de volumen o con proteína recombinante (150 µg) más alumbre en 50 µl de volumen. El grupo de control recibió 100 µg de vector blanco pVAX1 o 50 µl de alumbre. Se recogieron muestras de sangre a intervalos frecuentes, los sueros se separaron y se almacenaron a -80 °C. El protocolo utilizado para inmunizar ratones y meriones fue el siguiente. Los animales fueron premezclados y se les administró una primera dosis el día 0. Se administró una segunda dosis el día 14 y posteriormente se sangraron. La tercera y cuarta dosis se administraron los días 28 y 42, respectivamente, y los animales se sangraron posteriormente. Los ratones fueron expuestos el día 56 y la protección se determinó el día 58. Los meriones fueron expuestos el día 60 y la protección se determinó el día 155.

Estudios de Protección en Ratones. Estudios de exposición se realizaron en ratones implantando quirúrgicamente veinte L3 de *B. malayi* vivos, infecciosos en la cavidad peritoneal en una cámara de microporos (Veerapathran, y col. (2009) *supra*; Abraham, y col. (1988) *supra*). Se siguieron condiciones asépticas para los procedimientos quirúrgicos. Cuarenta y ocho horas después de la implantación, se recuperaron las cámaras de la cavidad peritoneal y se determinó la viabilidad de las larvas con un microscopio óptico. El porcentaje de protección se expresó como el número de

parásitos muertos + número de parásitos totales recuperados x 100.

Proliferación de esplenocitos y ensayos de citoquinas. Se prepararon suspensiones unicelulares de células de bazo (0,5 x 10⁶ células por pocillo suspendido en 200 µl de medio) de cada ratón y se cultivaron en pocillos por triplicado con (1) 1 µg/ml de rBmVAL-1, (2) 1 µg/ml de rBmALT-2, (3) 1 µg/ml de rBmVAL-1 + BmALT-2, (4) una proteína recombinante no específica (1 µg/ml de proteína de unión a *Schistosoma mansoni* G) o (5) se dejaron sin estimular en los medios. Todas las células se incubaron durante 3 días a 37 °C con 5 % de CO₂. Después de 3 días, se añadió ³H-timidina (0,5 ICi por pocillo, Amersham Biosciences) a cada pocillo y se incubó adicionalmente. Las células se recogieron 16 horas más tarde y la captación de ³H-timidina se midió en un contador de centelleo líquido y se expresó como índice de estimulación (SI) = (recuentos por minuto de cultivos estimulados / recuentos por minuto de cultivos no estimulados). Los sobrenadantes de cultivo celular recogidos de los cultivos de bazo se analizaron para IFN-γ, IL-4, IL-5 e IL-10 usando un kit ELISA adquirido de eBioscience Inc. (San Diego, CA).

Anticuerpos IgG específicos de BmVAL-1 y BmALT-2 en los sueros de ratones inmunizados. El título de anticuerpos específicos anti-BmVAL-1- y anti-BmALT-2 se determinó en los sueros de ratones inmunizados usando un ELISA (Veerapathran, y col. (2009) *supra*; gnanasekar, y col. (2004) *Infect. Immun.* 72: 4707-15). Los sueros preinmunes sirvieron como controles. Se usó IgG anti-ratón de cabra conjugada con HRP como anticuerpo secundario (Thermo Fisher Scientific) para ensayos de ratón. Se utilizó OPD (Sigma) como sustrato y se midió la densidad óptica (OD) a 405 nm.

Se determinaron anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgG4 específicos de anti-BmVAL-1- y anti-BmALT-2 en el suero de ratón usando un kit de isotipado de anticuerpo de ratón adquirido de Thermo Fisher Scientific. Todos los ELISA se realizaron según las recomendaciones del fabricante y la absorbancia se leyó a 405 nm. Se usó el anticuerpo isotipo anti-IgG de cabra marcado con HRP respectivo como anticuerpos secundarios y se desarrolló el color usando sustrato OPD.

Estudios de exposición en meriones. Meriones se expusieron a 100 L3 de *B. malayi* y el establecimiento de gusanos se determinó el día 95 después de la exposición según los procedimientos establecidos (Weil, y col. (1992) *supra*). Los meriones son huéspedes permisivos para *B. malayi* y los gusanos maduran en machos y hembras adultos en aproximadamente 75 días. La presencia de gusanos maduros en el grupo de control de meriones se confirmó demostrando microfilarias en su sangre el día 80 después de la exposición. La reducción porcentual en el establecimiento de gusanos se calculó utilizando la fórmula: número promedio de gusanos recuperados de gusanos de control - número promedio de gusanos recuperados de animales vacunados / número promedio de gusanos recuperados de animales de control x 100.

Análisis Estadístico. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SIGMASTAT (Jandel Scientific, San Rafael, California) y el software STATVIEW (SAS Institute, Cary, NC). La prueba de rango con signo de Wilcoxon se utilizó para comparar datos emparejados; la comparación entre los grupos se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney. El valor de p <0,05 se consideró estadísticamente significativa.

Individuos EN llevan un alto título de anticuerpos contra BmVAL-1 y BmALT-2. Los anticuerpos IgG anti-BmVAL-1 y anti-BmALT-2 significativos estaban presentes en el suero de los sujetos EN en comparación con los sujetos MF (p <0,01) y los sujetos CP (p <0,005). Los sujetos NEN no portaban anticuerpos IgG contra ninguno de los antígenos. El análisis posterior del isotipo IgG de anticuerpos en el suero de sujetos EN mostró que los anticuerpos anti-BmVAL-1 y anti-BmALT-2 eran predominantemente de isotipos IgG1 e IgG3.

Título alto de respuestas de anticuerpos en los sueros de ratones inmunizados. Se ha demostrado que los ratones vacunados con antígenos de *B. malayi* provocan anticuerpos IgG protectores del huésped significativos. Por lo tanto, se determinaron los títulos de anticuerpos IgG en los sueros de ratones inmunizados. La inmunización monovalente con BmVal-1 y la inmunización monovalente con BmAlt-2 produjeron títulos significativos (p <0,005) de anticuerpos IgG anti-BmVAL-1 y anti-BmALT-2 en el suero de ratones. En comparación con los controles, el grupo inmunizado de refuerzo principal proporcionó el título máximo de anticuerpos seguido de grupos inmunizados con proteínas e inmunizados con ADN. La inmunización con la formulación de vacuna multivalente (BmVAL-1+BmALT-2) también provocó títulos de anticuerpos IgG significativos contra rBmVAL-1 y rBmALT-2 y los títulos fueron comparables, lo que indica que los antígenos no interfieren entre sí ni compiten por el dominio. Un resultado interesante fue que la vacuna multivalente provocó un título significativamente más alto (p <0,001) de anticuerpos IgG en ratones en comparación con cualquiera de las vacunas monovalentes. Estos resultados indicaron que los dos antígenos en la formulación multivalente aumentaron sinérgicamente las respuestas de anticuerpos inducidas por la vacuna.

En general, la vacunación de proteínas provocó un mayor título de anticuerpos IgG en comparación con las vacunas de ADN, lo que indica que las vacunas de proteínas eran altamente inmunogénicas. Otra observación fue que una estrategia de refuerzo principal heterólogo dio una mayor seroconversión que la estrategia de refuerzo principal

homólogo. Por lo tanto, la estrategia global de refuerzo principal heterólogo pareció estimular el título más alto de anticuerpos.

El análisis del subconjunto de anticuerpos IgG mostró que la vacuna BmVAL-1 provocó principalmente el isotipo de anticuerpos IgG1 e IgG2a, mientras que la vacuna BmALT-2 indujo el isotipo IgG1, IgG2a e IgG3 de respuestas de anticuerpo específicas de antígeno. Las respuestas de anticuerpos IgG4 específicas de antígeno no fueron evidentes. La estrategia de refuerzo principal amplificó significativamente las respuestas del isotipo IgG. Después del régimen de vacunación multivalente IgG1, IgG2a e IgG3 subconjunto de anticuerpos específicos de antígeno estaban presentes en los sueros de ratón.

10

Respuestas específicas de antígeno en el bazo de ratones. Las células de bazo de ratones inmunizados estimulados con rBmVAL-1 o rBmALT-2 proliferaron significativamente (SI 10. 8 ± 1. 1 y SI 14. 6 ± 1. 2, respectivamente) en comparación con el control de medios (SI 2. 1 ± 0. 9). Las células de bazo de ratones inmunizados con la construcción multivalente respondieron tanto a rBmVAL-1 (SI 18. 9 ± 2. 6) como a rBmALT-2 (SI 23. 5 ± 3. 1), lo que indica que se generó una fuerte respuesta celular de recuerdo para BmVAL-1 y BmALT-2 después de la vacunación con la construcción multivalente.

15

Análisis de citocinas de sobrenadantes de cultivo proliferado. Para identificar el perfil de citoquinas de las células que responden al antígeno, se recogió el sobrenadante de cultivo de células de bazo de ratón estimuladas con el antígeno respectivo (rBmVAL-1 o rBmALT-2) y el nivel de IFN-γ, IL-4, IL-5 e IL-10 fue medido. Estos resultados mostraron que las células del bazo secretaban niveles significativos de IL-5 e IFN-γ en respuesta a rBmVAL-1. Las células del bazo estimuladas con rBmALT-2 secretan predominantemente IL-4 e IL-5.

20

Vacuna Multivalente Induce una Protección Significativa en Ratones y Meriones. Los resultados en esta invención mostraron que se produjeron anticuerpos IgG significativos después de la vacunación con preparaciones de vacuna monovalentes y multivalentes. Para probar si las respuestas inmunes obtenidas después de la vacunación fueron protectoras, los animales vacunados se expusieron a larvas infecciosas de tercera etapa (L3) vivas de *B. malayi*. Como los parásitos no alcanzan la madurez en ratones, se utilizó un procedimiento estándar de exposición con cámara de microporos (Gnanasekar, y col. (2004) *supra*). Estos estudios mostraron que se logró una protección del 39 % al 74 % en ratones después de la inmunización con la vacuna monovalente (Tabla 9).

25

30

TABLA 9

Grupo de vacunación	Media ± DE L3 Vivo	Porcentaje de protección
pVAXBmVAL-1ADN monovalente homólogo	12,2 ± 4,5	39,0±1,7 %**
rBmVAL-1 homólogo monovalente de proteína	10,4 ± 3,1	48,0±2,1 %*
pVAXBmVAL-1 ADN más rBmVAL-1 heterólogo monovalente	9,2 ± 2,2	54,0±3,1 %*
pVAXBmALT-2 ADN monovalente homólogo	9,8 ± 2,1	51,0±2,5 %*
rBmALT-2 homólogo monovalente de proteína	7,0 ± 1,1	65,0±4,2 %*
pVAXBmALT-2 ADN más rBmALT-2 heterólogo monovalente	5,1 ± 0,5	74,5±3,1 %*
pVAXBmVAL-1/ALT-2 ADN homólogo multivalente	8,6 ± 0,1	57,0±2,2 %*
rBmVAL-1/rBmALT-2 homólogo multivalente de proteína	5,2 ± 1,1	74,0±3,3 %*
pVAXBmVAL-1/BmALT-2 ADN más rBmVAL-1/rBmALT-2 heterólogo multivalente	4,4 ± 0,4	82,0±2,2 %*
pVAX + Control de alumbre	20 ± 0	0 %
Significación, * p<0,01, **p<0,05 comparado a control.		

La vacunación con proteínas dio mejores resultados que la vacunación con ADN. El régimen de refuerzo principal dio los mejores resultados en general. La vacunación con BmALT-2 proporcionó un mayor porcentaje de protección en comparación con BmVAL-1. Del mismo modo, el régimen de vacunación multivalente proporcionó una protección del 57 % al 82 % en comparación con el régimen de vacunación monovalente. Estos resultados indicaron que BmVAL-1 y BmALT-2 aumentan sinérgicamente las respuestas inmunes protectoras en animales vacunados cuando se administran como una vacuna multivalente.

40

El análisis del frotis de sangre espesa preparado a partir del grupo de control de meriones en el día 80 después de la exposición mostró que los cinco meriones fueron positivos para microfilaria, mientras que no se detectaron microfilaria en la sangre periférica de meriones vacunados. Quince (15) días después se sacrificaron los animales y se contaron los gusanos machos y hembras en las cavidades peritoneales, pélvicas y pleurales y se compararon los resultados entre los controles y los grupos vacunados (Tabla 10). Los resultados de la vacunación de meriones también confirmaron que el régimen de refuerzo principal multivalente dio la tasa más alta de protección. No se recuperaron gusanos hembras de los animales vacunados multivalentes.

TABLA 10

Grupo de Vacunación	Por ciento de Producción
pVAXBmVAL-1ADN monovalente homólogo	50±3,7 %
rBmVAL-1 homólogo monovalente de proteína	40,0±3,1 %
pVAXBmVAL-1 ADN más rBmVAL-1 heterólogo monovalente	52,4±2,5 %
pVAXBmALT-2 ADN monovalente homólogo	58,3±2,1 %
rBmALT-2 homólogo monovalente de proteína	72,0±5,5 %
pVAXBmALT-2 ADN más rBmALT-2 heterólogo monovalente	78,5±3,2 %
pVAXBmVAL-1/ALT-2 ADN homólogo multivalente	77,1±2,0 %
rBmVAL-1/rBmALT-2 homólogo multivalente de proteína	79,9±3,5 %
pVAXBmVAL-1/BmALT-2 ADN más rBmVAL-1/rBmALT-2 heterólogo multivalente	85,0±1,4 %
pVAX + Control de alumbre	0

Significación, p<0,01, comparada a control.

10

Ejemplo 4: WbHSP + WbALT-2 + WbTSP Vacuna multivalente

Parásitos. L3 de *Brugia malayi* se obtuvieron del NIAID/NIH Filariasis Research Reagent Resource Center (FR3) en la Universidad de Georgia, Atenas, GA.

Construcción de Vacuna pVAX Wbhsp + Wbalt2+Wbtsp ADN. La secuencia de ADN con codón optimizado que codifica Bmhsp se amplificó con el cebador directo 5'-CGC GGA TCC ACC GTG ATC CAT TGT CG-3 '(SEQ ID NO: 25) que contiene el sitio de restricción BamHI y el cebador inverso 5'-AAC TGC AGC TGC AGC TGT TTT CCA TTT CCA TTC-3 '(SEQ ID NO: 26) que contiene el sitio de restricción PstI sin el codón de parada y clonado en el vector pVAX. El plásmido resultante se designó como pVAX Wbhsp *. El gen Wbalt-2 optimizado con codón se amplificó con el cebador directo 5'-AAC TGC AGA TGG GTA ACA AGC TCC TCA TCG-3 '(SEQ ID NO: 27) y el cebador inverso sin el codón de parada 5'-CGC GAA TTC GGC GCA CTG CCA ACC TGC-3 '(SEQ ID NO: 28). Las secuencias subrayadas indican sitios de restricción PstI y EcoRI en los cebadores directo e inverso, respectivamente. El inserto de ADN Wbalt-2 amplificado se subclonó luego en el plásmido pVAX Wbhsp * en los sitios de restricción PstI y EcoRI, dando como resultado el plásmido pVAX Wbhsp + Wbalt-2 *. Para clonar el producto final del plásmido pVAXWbhsp + Wbalt-2 + Wbtsp, la secuencia del gen que codifica el dominio Wbtsp ECL solo se amplificó con el cebador directo 5'-CGC GAA TTC ACC ATG GTC CTG GAG-3 '(SEQ ID NO: 29) que contiene el sitio de restricción EcoRI y el cebador inverso con codón de parada 5'-GCT CTA GAT CAG TCC TTC TGG CTA G-3 '(SEQ ID NO: 30) que contiene el sitio de restricción XbaI y se clonó en el plásmido pVAX Wbhsp + Wbalt-2 *. Las construcciones bivalentes de HSP + TSP, TSP + ALT y HSP + ALT también se construyeron con sus respectivos cebadores.

Construcción de pRSETA Wbhsp + Wbalt2 + Wbtsp, unaproteína de fusión multivalente. pRSETA WbHSP + WbALT-2 + WbTSP se construyó de la misma manera que anteriormente. Las secuencias del cebador de HSP, ALT-2 y TSP fueron las siguientes. WbHSP, cebador directo, 5'-CGG GAT CCA TGG AAG AAA AGG TAG TG-3 '(SEQ ID NO: 31) que contiene BamHI y cebador inverso, 5'-CCC TCG AGT GCT TTC TTT TTG GCA GC-3' (SEQ ID NO: 32) que contiene XhoI. WbALT-2, cebador directo, 5'-CCC TCG AG A TGA ATA AAC TTT TAA TAG CAT-3 '(SEQ ID NO: 33) que contiene XhoI y cebador inverso, 5'-GGG TAC CCG CGC ATT GCC AAC CC-3' (SEQ ID NO: 34) que contiene KpnI. WbTSP, cebador directo, 5'-GGG GTA CCC CGG CAA GGA TCA ATT TAA AA-3 '(SEQ ID NO: 35) que contiene KpnI y cebador inverso, 5'-CGG AAT TCT CAA TCT TTT TGA GAT GAA T-3 '(SEQ ID NO: 36) que contiene EcoRI. De manera similar, las construcciones bivalentes (HA, HT y TA) también se clonaron individualmente en un vector pRSETA.

40

- Inmunización de animales.* Se inmunizaron ratones Balb/C de seis semanas de edad con 100µg de ADN por vía intradérmica (i. d.) como vacuna de ADN o con 15µg de proteína recombinante por vía subcutánea (sc) como vacuna de proteína o con dos dosis de ADN y dos dosis de proteína como vacuna de refuerzo principal. Los ratones se dividieron aleatoriamente en 15 grupos con 5 ratones por grupo. Los animales de los grupos 1-3 se inmunizaron con HSP + ALT-2 (HA). Los grupos 4-6 se inmunizaron con HSP + TSP (HT), y 7-9 se inmunizaron con TSP + ALT-2 (TA). Los ratones de los grupos 10-12 se inmunizaron con la vacuna multivalente HSP + ALT-2 + TSP (HAT). El grupo control de animales recibió el vector pVAX y/o alumbre (Instituto de Investigación de Enfermedades Infecciosas (IDRI)). Este experimento se repitió dos veces con todos los grupos.
- 10 *Análisis de la respuesta de anticuerpos en animales inmunizados.* Los niveles de anticuerpos IgG en los sueros de grupos de animales inmunizados y de control contra las tres proteínas se determinaron usando un ELISA indirecto (Anandharaman, y col. (2009) *supra*). Brevemente, los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos se revistieron con proteínas recombinantes (rHSP, rALT-2 o rTSP; 1 µg/ml) en tampón de carbonato, pH 9,6, durante la noche a 4 °C y se bloquearon con BSA al 3 % durante 1 hora a 37 °C. Se agregaron muestras de suero a los pocillos
- 15 y las placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Después de lavar los pocillos, se añadió IgG anti-humano de ratón marcado con HRP (1: 5000) y se incubó adicionalmente durante 1 hora a 37 °C. El color se desarrolló con sustrato OPD (o-fenilendiamina) (Sigma Aldrich, EE. UU.). La absorbancia se midió a 450 nm en un lector de microplacas (BIORAD, Hercules, CA).
- 20 El análisis de inmunotransferencia también se realizó con los sueros de ratones inmunizados. Se usaron muestras de suero de los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes (rHAT, rALT2, rTSP o rWbHAT) para el estudio de inmunotransferencia. El color de la mancha se desarrolló con el sustrato de diaminobencidina (DAB).
- Ensayo ADCC.* Para evaluar la eficacia de la protección de las combinaciones de antígenos, se realizó ADCC *in vitro* con los sueros de los ratones inmunizados con construcciones de vacunas bivalentes y trivalentes. En ensayo ADCC *in vitro* fue realizado según procedimientos conocidos (Chandrasekhar, y col. (1990) *supra*). Brevemente, se recogieron células de exudados peritoneales (PEC) de ratones Balb/c normales lavando la cavidad peritoneal con medio RPMI 1640 estéril. Las células se lavaron y suspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con suero de ternera fetal al 10 % (FCS). Diez L₃ de *B. malayi* se añadieron a 2 x 10⁵ células peritoneales exudadas (PEC)/pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientifics, EE. UU.), 50µl de los sueros de ratones inmunizados y 50µl de RPMI se añadieron a los pocillos por triplicado y se incubaron durante 48 horas en 5 % de CO₂ a 37 °C. La viabilidad larval se determinó microscópicamente después de 48 horas de incubación. Las larvas que estaban límpidas, dañadas y con los grupos de células adheridas se contaban como muertas. El ADCC se estimó como el porcentaje de muerte larval calculado con la fórmula: Número de larvas muertas ÷ Número total de larvas x 100.
- 35 *Reducción de anticuerpos IgG de Muestras de Suero.* Los sueros de ratones inmunizados con vacuna multivalente se redujeron de anticuerpos IgG específicos de antígeno recombinante usando resina IMAC de cobalto junto con antígenos recombinantes etiquetados con his (Anandharaman, y col (2009) *supra*). Brevemente, 1 mg de proteína recombinante etiquetada con his (rHSP) se acopló a un volumen de lecho de 2 ml de resina IMAC durante 2 horas a 37 °C. La columna de cobalto se lavó con diez volúmenes de lecho de PBS (pH 8) y se incubó durante la noche a 4 °C con 200µl de suero agrupado de los ratones inmunizados con la vacuna multivalente. El sobrenadante que contiene los sueros reducidos se recogió por centrifugación. El suero anti-HSP-reducido se incubó durante la noche a 4 °C en una columna acoplada a rALT-2. El sobrenadante que contenía suero reducido anti-HSP y anti-ALT-2 se recogió e incubó en una columna acoplada a rTSP. Se recogió y usó suero anti-HSP-, anti-ALT-2- y anti-TSP reducido. ELISA
- 40 confirmó la reducción de anticuerpos IgG contra antígenos específicos como se describió anteriormente. Se usaron sueros reducidos con anticuerpos en un ensayo de ADCC.
- Análisis de citotoxicidad in situ contra larvas de L3 en ratones inmunizados (técnica de cámara de microporos).* La eficacia protectora de la vacunación se analizó exponiendo a los animales inmunizados a L3 infecciosa usando el procedimiento de cámara de microporos (Abraham, y col. (1989) *supra*). Las cámaras de microporos se ensamblaron utilizando anillos PLEXI de 14 x 2 mm y membranas de policarbonato de nucleoporo de 5,0 µm (Millipore Corporations, Bedford, MA). Después de 48 horas de implantación, los animales fueron sacrificados y las cámaras se recuperaron de la cavidad peritoneal. El contenido de cada cámara se examinó microscópicamente para determinar la adherencia celular y la muerte de L3 infecciosas. El parásito se consideraba muerto si no era móvil y límpido, y tenía varias células adherentes en la superficie. El porcentaje de protección se calculó utilizando la fórmula: número de parásitos muertos ÷ número de parásitos recuperados x 100. Este experimento se repitió dos veces con cinco animales en cada grupo.
- 55 *Proliferación de esplenocitos.* Los ratones vacunados y de control se sacrificaron el día 60 y los bazo se retiraron asépticamente. Se prepararon suspensiones de células individuales en medio RPMI 1640 suplementado con FCS inactivado por calor al 10 %, pasado a través de una malla de NYLON (BD Biosciences, Bedford, EE. UU.). Después de determinar la viabilidad de las células usando exclusión del colorante azul tripano, aproximadamente 2 x 10⁶ células por pocillo por triplicado fueron colocadas en placas de 96 pocillos de cultivo (ThermoFisher, EE. UU.). Los
- 60

esplenocitos se estimularon con $1\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ /pocillo de proteínas recombinantes (rHSP, rALT-2 o rTSP) o ConA o con medio solo (no estimulado) durante 72 horas a 37°C en atmósfera de 5 % de CO_2 . La proliferación celular se determinó usando el kit de recuento celular (CCK-8) adquirido en Dojindo Molecular Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD). El índice de estimulación de la proliferación de células del bazo se calculó utilizando la fórmula: Absorbancia de células estimuladas \div Absorbancia de células no estimuladas. Todos los cultivos se tomaron por triplicado y los resultados se expresaron como media $\text{SI} \pm \text{SEM}$.

PCR en tiempo real (RT-PCR). Los niveles de citocinas en el ARNm de los pellets de células de bazo se analizaron por PCR en tiempo real. Las células de bazo de ratones grupo vacunado y control se cultivaron como anteriormente a una concentración de 2×10^6 células/ $100\mu\text{l}$ /pocillo en placas de 96 pocillos y se estimularon con antígenos recombinantes ($1\mu\text{g}/\text{ml}$). Después de 72 horas, las células se centrifugaron (1000 rpm durante 5 minutos) y se extrajo el ARN total de los gránulos celulares usando el reactivo TRIZOL (Invitrogen) según la descripción del fabricante. Seguido de extracción de ARN, el ADNc de primera cadena se sintetizó mediante el kit de primera cadena RT2 (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD). El análisis de matriz de PCR se realizó según el protocolo del fabricante con RT2 Real-Time TM SYBR Green PCR Master Mix. Se agregaron alícuotas de esta mezcla a una placa de 96 pocillos, donde cada pocillo contenía conjuntos de cebadores específicos de genes predispensados. La cuantificación relativa de los genes de interés que se expresaron se midió en una máquina de PCR en tiempo real Applied BioSystems 7300 (Applied BioSystems, Foster City, CA). Los parámetros del ciclo fueron los siguientes: 95°C durante 10 minutos para la activación del ADN polimerasa HOTSTART, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y extensión del cebador a 60°C durante 1 minuto. El conjunto de matriz de datos RT-PCR se generó y analizó utilizando el sistema de análisis de datos basado en web SABiosciences. Los resultados se expresaron en términos de cambio de veces de los ratones inmunizados en comparación con los ratones control mediante la normalización de la expresión de genes de mantenimiento.

Ensayo de Citoquinas. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular de esplenocitos después de 72 horas de incubación estimulados con antígenos recombinantes ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) o con medio solo. Los niveles secretados de citocinas IL-4 e IFN- γ en los sobrenadantes del cultivo se determinaron utilizando un kit ELISA sandwich adquirido de Thermo Scientific, EE. UU. Todas las concentraciones se derivaron de curvas estándar y datos expresados en pg/ml .

Construcción de Plásmido cHAT y Expresión de Proteínas de Fusión. Como la región N-terminal de HSP está implicada en la unión de IL-10, esta región se eliminó y la proteína recombinante cHAT se preparó como proteína etiquetada con His de 37 KDa.

Construcción de Plásmidos Recombinantes y Expresión de Proteínas de Fusión. Los genes *hsp*, *alt-2* y *tsp* de longitud completa de etapa L3 de *B. malayi* se construyeron con el tamaño esperado (850 pb). Estos fragmentos se clonaron adicionalmente direccionalmente en los vectores de expresión pVAX1 y pRSETA con los sitios de corte de enzimas de restricción especificados. Los resultados del análisis de la secuencia de ADN confirmaron la dirección de inserción del gen. rWbHAT se expresó como una proteína de fusión etiquetada con His de 45 KDa, que se purificó y analizó en SDS-PAGE. Los resultados indicaron que la proteína de fusión era pura sin ninguna proteína contaminante. La presencia de anticuerpos contra los tres antígenos se confirmó mediante análisis de inmunotransferencia.

Título de anticuerpos en los sueros de ratones inmunizados. El título medio máximo de anticuerpos de las muestras de suero de los ratones inmunizados con el primer refuerzo o vacuna de proteína fue significativamente mayor ($p < 0,001$) en comparación con el grupo de ADN. Los sueros recolectados de animales inmunizados con rWbHAT mostraron el título máximo de 30.000 contra el antígeno rALT-2, mientras que el título de anticuerpos contra el antígeno rHSP o rTSP estuvo en el intervalo de 18.000-20.000. Del mismo modo, los ratones inmunizados con la vacuna bivalente mostraron el título máximo de 30.000 contra el antígeno ALT-2, mientras que los anticuerpos anti-HSP y anti-TSP estaban en el intervalo de 8.000-15.000.

Citotoxicidad Mediada por Células Dependiente de Anticuerpos. La adherencia mediada por anticuerpos y la citotoxicidad de las células inmunes a las larvas L3 de *B. malayi* se observó después de 48 horas de incubación de parásitos, con los sueros y las células inmunes normales. ADCC mostró una citotoxicidad máxima de aproximadamente 90 % ($p < 0,001$) en los sueros de ratones inmunizados con construcciones de vacunas rWbHAT o rWbHA (Tabla 11). Las construcciones de vacunas bivalentes de rWbHT y rWbTA también proporcionaron una mejor protección del 82 % y 87 %, respectivamente, lo cual fue significativo en comparación con los animales vacunados monovalentes y los animales de control ($p < 0,001$). Para evaluar la protección mediada por los anticuerpos generados contra los antígenos HSP, ALT y TSP, los anticuerpos IgG se redujeron de los sueros inmunizados y se usaron en ADCC. Los anticuerpos reducidos mostraron solo un 6 % de protección contra L3.

Grupos	% Citotoxicidad
H+A	90±2,4*
H+T	82,30±12,9*
T+A	87,06±9,8*
H+A+T	88,69±7,5*
anticuerpos anti-HSP + anti-ALT + anti-TSP reducidos de sueros inmunizados con HAT	5,55±1,5

Los valores representan la media ± DE de tres pocillos. * Muerte larval significativa (P <0,001) en comparación con otros grupos de ratones.

Estudio de Protección in situ. Dos semanas después de la inmunización final, la capacidad de los candidatos a la vacuna para matar los parásitos filariales en los animales inmunizados se evaluó mediante estudios de cámara de microporos in situ. Los datos se combinaron de los dos experimentos similares y se representaron como recuento medio ± SEM. El análisis de la reducción porcentual en la carga de gusanos en comparación con el control mostró que la vacuna multivalente (HAT) confirió la protección máxima de 100 % y 94 % para las proteínas y la vacuna de refuerzo principal, que fue una protección muy significativa (Tabla 12) (P <0,0001) en comparación con los grupos de control (5 %). Curiosamente, el porcentaje de reducción de gusanos de las vacunas bivalentes HA, TA y HT fue del 90 %, 80 % y 82 %, respectivamente, que también fue significativamente alto en comparación con el control. En todo el grupo de vacunas bivalentes, la vacunación de refuerzo principal fue más protectora en comparación con la vacunación de ADN y proteínas.

TABLA 12

Prueba 1 Vacuna de ADN		Prueba 2 Vacuna de Proteínas		Prueba 3 Vacuna Principal-Refuerzo	
Grupo	% Citotoxicidad	Grupo	% Citotoxicidad	Grupo	% Citotoxicidad
pVAX	5 ± 4,23	Alumbre	3 ± 4,23	pVAX Alum +	5,9 ± 4,23
H+A	81 ± 11,23*	H+A	78 ± 11,23*	H+A	90 ± 11,23*
H+T	72 ± 12,03*	H+T	69 ± 12,03*	H+T	80 ± 12,03*
T+A	74 ± 11,21*	T+A	66 ± 11,21*	T+A	82 ± 11,21*
H+A+T	91 ± 11,92*	H+A+T	100 ± 0*	H+A+T	94 ± 11,92*

Valores son media ± DE. N=5. Los datos provienen de uno de dos experimentos similares que muestran resultados comparables. * Muerte larval significativa (P <0,001) en comparación con otros grupos de ratones.

15

Proliferación de Esplenocitos. Las células de bazo aisladas de animales vacunados y de control se estimularon *in vitro* individualmente con rHSP, rALT-2 o rTSP para analizar la proliferación de células T específicas de proteína en animales vacunados. Los ratones inmunizados con el régimen de refuerzo principal en todas las combinaciones de vacunas y HAT como vacuna proteica dieron la mayor protección. Por lo tanto, los esplenocitos se recolectaron solo de estos animales analizados para la respuesta inmune. Los esplenocitos de animales vacunados bivalentes y trivalentes estimulados con proteínas recombinantes respectivas mostraron una proliferación significativamente alta (P <0,001) (S. I. medio = 4,25-5,8) en comparación con los controles monovalentes y no estimulados. El índice de proliferación de las células del bazo inmunizadas con la construcción monovalente mostró una proliferación significativa. La estimulación de las células fue comparable a los controles positivos.

Matriz de RT-PCR. Para determinar las respuestas inmunes celulares a construcciones multivalentes en los ratones vacunados, se cultivaron células de bazo recogidas de ratones vacunados y de control en presencia de proteínas recombinantes respectivas y se evaluaron sus respuestas proliferativas y perfiles de citocinas. Como las células del bazo de los animales vacunados proliferaban significativamente para recordar la respuesta, se midieron los niveles de ARNm de citocina. Se realizó una matriz de genes de citocinas RT-PCR en ARNm recogido de las células del bazo estimuladas con proteínas recombinantes. Estos resultados mostraron que tanto los genes de citocinas Th1 (IFN-γ, IL-2) como Th2 (IL-4) aumentaron significativamente en los animales vacunados.

30

Niveles de citoquinas. Después de identificar la presencia de expresión de citocinas IFN- γ e IL-4 en el ARNm aislado de las células del bazo vacunado, se investigó la secreción de las mismas citocinas en el sobrenadante. Los datos se normalizaron con los controles no estimulados. Curiosamente, los perfiles de citoquinas observados en el sobrenadante exhibieron niveles significativamente más altos de IFN- γ mostrando una respuesta inmune sesgada por Th1. Estos resultados demostraron que las proteínas recombinantes estimulaban la producción de IFN- γ e inducían una respuesta protectora mediada por Th1.

Ejemplo 5: Análisis de la vacuna cCHAT en diversas formulaciones adyuvantes

10 *Preparación de cCHAT.* Estudios previos mostraron que la secuencia N-terminal de BmHSP12.6 puede unirse al receptor de IL-10 humano y desencadenar respuestas mediadas por IL-10 (Gnanasekar, y col. (2008) Mol. Biochem. Parasitol. 159(2): 98-103. Como IL-10 es un agente inmunosupresor, las secuencias de unión al receptor de IL-10 se eliminaron de HSP. La secuencia truncada se denominó cHSP. El cHSP se utilizó luego para reemplazar el gen HSP y la proteína HSP en la vacuna híbrida HAT multivalente. Por lo tanto, la nueva vacuna resultante se llamó cCHAT.

15 *Estudios de protección usando la vacuna de proteína de fusión a cCHAT en ratones.* Los ratones fueron inmunizados con cuatro dosis de proteína de fusión a cCHAT a intervalos de dos semanas. Un mes después de la inmunización final, la capacidad de los candidatos a la vacuna para matar los parásitos filariales se evaluó mediante estudios de cámara de microporos *in situ*. Los resultados mostraron que cuando los ratones se inmunizaron con proteína de fusión cCHAT con alumbre como adyuvante, la vacuna confirió un 81 % de protección (Tabla 13) ($P < 0,0001$) en comparación con los grupos de control (2 %) que recibieron solo solución salina tamponada con fosfato (PBS) y alumbre. Luego se probaron diferentes adyuvantes para ver si cambiar el adyuvante mejoraría la capacidad de protección de cCHAT. Se probaron dos adyuvantes adicionales: alumbre que contiene un agonista TLR4 (comprado en el Instituto de Investigación de Enfermedades Infecciosas, Seattle, Washington) y ALHYDROGEL (comprado en Sigma, St. Louis, MO). cCHAT sin adyuvantes permaneció como control. Los resultados de estos estudios (Tabla 13) mostraron que se logró una protección del 78 % con alumbre más agonista de TLR4 y el cCHAT administrado en el adyuvante ALHYDROGEL proporcionó una protección del 70 %. Un resultado interesante en estos estudios fue que cCHAT sin ningún adyuvante también proporcionó un 72 % de protección, lo que indica que la vacuna de proteína de fusión cCHAT podría administrarse sin ningún adyuvante y aun así obtener una protección significativa.

30

TABLA 13

Grupo	% Muerte Larval (Media \pm DE)
cCHAT + Alumbre	81 \pm 7,8
PBS + Alumbre Control	1,7 + 1,3
cCHAT + Alum con agonista TLR4	78 \pm 8,4
cCHAT + ALHYDROGEL	70 \pm 13
cCHAT sin adyuvante	72 \pm 12

Valores son media \pm DE. N=5. Los datos provienen de uno de dos experimentos similares que muestran resultados comparables. *Muerte larval significativa ($P < 0,001$) en comparación con otros grupos de ratones.

Ejemplo 6: Homólogos de HSP, ALT-2 y TSP

35

Los homólogos de los antígenos de la vacuna, HSP, ALT-2 y Tetraspanina están presentes en *O. volvulus* y *L. loa*. Comparación de la secuencia de nucleótidos de HSP, ALT-2 y Tetraspanin de *O. volvulus* y *L. loa* muestran que existe una homología de secuencia significativa (> 90 %) entre las proteínas de todos los parásitos filariales. Estos resultados indican que la vacuna de proteína de fusión cCHAT desarrollada en el Ejemplo 5 puede usarse como una vacuna contra *O. volvulus* y *L. loa*.

40

Como un ejemplo, *O. volvulus* tetraspanina fue clonada de biblioteca de ADNc de L3 de *O. volvulus* y fueron preparadas proteínas recombinantes. Se usó una muestra de suero de ratones vacunados con la vacuna cCHAT que dio el 81 % de protección en la Tabla 13 para probar la *O. volvulus* tetraspanina recombinante después de separar la proteína en un gel SDS-PAGE al 12 %. Se usó *B. malayi* tetraspanina como control positivo. Los resultados mostraron que la muestra de suero reaccionó significativamente con *O. volvulus* tetraspanina (Figura 4), lo que indica que la vacuna cCHAT desarrollada en el Ejemplo 5 es de uso como vacuna contra *O. volvulus*.

45

LISTA DE SECUENCIAS

<110> The Board of Trustees of the University of Illinois

5 Kalyanasundaram, Ramaswamy

<120> Vacuna Multivalente para Filariasis

<130> UIC0030US. NP

10

<150> US 61/413,681

<151> 2010-11-15

<150> US 61/449,954

15

<151> 2011-03-07

<150> US 61/522,079

<151> 10/08/2011

20

<150> PCT/US2011/059501

<151> 2011-11-07

<160> 69

25

<170> PatentIn versión 3. 5

<210> 1

<211> 27

<212> ADN

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

35

<400> 1

cgcgatcca tggaagagaa ggtggtg 27

<210> 2

40

<211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 2

ccggaattct cactgtcgt tggtg 25

50

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Brugia malayi

55

<400> 3

Trp Ser Ala Glu Gln Trp Asp Trp Pro Leu Gln His
1 5 10

60

<210> 4

<211> 10

ES 2 800 984 T3

<212> PRT
<213> Brugia malayi

<400> 4

5

Glu Val Ile Lys Thr Asn Thr Asn Asp Lys
1 5 10

<210> 5

<211> 8

10 <212> PRT
<213> Brugia malayi

<400> 5

15

Ser Arg Ala Glu His Tyr Gly Glu
1 5

<210> 6

<211> 11

20 <212> PRT
<213> Brugia malayi

<400> 6

25

Lys Leu Pro Ser Asp Val Asp Thr Lys Thr Leu
1 5 10

<210> 7

<211> 9

30 <212> PRT
<213> Brugia malayi

<400> 7

Phe Thr Pro Lys Glu Ile Glu Val Lys
1 5

35 <210> 8

<211> 8

<212> PRT
<213> Brugia malayi

40 <400> 8

Ile Glu Val Lys Val Ala Gly Asp
1 5

<210> 9

45 <211> 8

<212> PRT
<213> Brugia malayi

<400> 9

50

Val Gly Leu Asp Ala Ser Phe Phe
1 5

<210> 10

<211> 9

55 <212> PRT
<213> Brugia malayi

ES 2 800 984 T3

<400> 10

Gly Leu Asp Ala Ser Phe Phe Thr Pro
1 5

5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Brugia malayi

10

<400> 11

Val Lys Val Ala Gly Asp Asn Leu Val
1 5

15

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Brugia malayi

20

<400> 12

Lys Leu Pro Ser Asp Val Asp Thr Lys
1 5

25

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Brugia malayi

30

<400> 13

Lys Thr Leu Thr Ser Asn Leu Thr Lys
1 5

35

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Brugia malayi

<400> 14

40

Val Ile Lys Thr Asn Thr Asn Asp Lys
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

45

<213> Brugia malayi

<400> 15

50

Asp Thr Lys Thr Leu Thr Ser Asn Leu
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

55

<213> Brugia malayi

ES 2 800 984 T3

<400> 16

Phe Phe Thr Pro Lys Glu Ile Glu Val
1 5

5 <210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Brugia malayi

10 <400> 17

Val Gly Leu Asp Ala Ser Phe Phe Thr
1 5

<210> 18
15 <211> 9
<212> PRT
<213> Brugia malayi

<400> 18

20

Lys Arg Gly His Leu Val Ile Ala Ala
1 5

<210> 19
<211> 9
25 <212> PRT
<213> Brugia malayi

<400> 19

30 Gly Glu Ile Lys Arg Glu Ile Ser Arg
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
35 <213> Brugia malayi

<400> 20

40 Ser Phe Phe Thr Pro Lys Glu Ile Glu
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Brugia malayi

45

<400> 21

Arg Glu Ile Ser Arg Thr Tyr Lys Leu
1 5

50 <210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Brugia malayi

55 <400> 22

ES 2 800 984 T3

Gly Glu Ile Lys Arg Glu Ile Ser Arg
1 5

<210> 23

<211> 9

5 <212> **PRT**

<213> Brugia malayi

<400> 23

Ala Glu His Tyr Gly Glu Ile Lys Arg
1 5

10

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 24

ccggaattct cactgtcgt tggcg 25

<210> 25

25 <211> 26

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 25

cgcgatcca ccgtgatcca ttgtcg 26

35

<210> 26

<211> 27

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 26

45

aactgcagct gtttcatt tccattc 27

<210> 27

<211> 30

50 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

55

<400> 27

aactgcagat gggaacaag ctccatcgcg 30

60 <210> 28

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 28
 10 cgccaattcg gcgcactgcc aacctgc 27
 <210> 29
 <211> 24
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <400> 29
 cgccaattca ccatgtctct ggag 24
 <210> 30
 25 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 30
 gctctagatc agtccttctg gctag 25
 35 <210> 31
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 31
 45 cgggatccat ggaagaaaag gtagtg 26
 <210> 32
 <211> 26
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55 <400> 32
 ccctcgagtg ctttctttt ggcagc 26
 60 <210> 33
 <211> 30
 <212> DNA

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5 <400> 33
 ccctcgagat gaataaactt ttaatagcat 30
 10 <210> 34
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 34
 20 ggtaccgc gcattgcaa ccc 23
 <210> 35
 <211> 29
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 30 <400> 35
 ggggtacccc ggcaaggatc aatttaaaa 29
 <210> 36
 35 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 36
 cggaattctc aatcttttg agatgaat 28
 45 <210> 37
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Brugia malayi
 50 <400> 37

ES 2 800 984 T3

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

<210> 38

<211> 572

5 <212> DNA

<213> Brugia malayi

<400> 38

ggtttattac cccaagtttg agggaggaga aaatgaataa acttttaata gcattcgggt 60
 tggttaattct ttttgtgaca ctcccgtgtg tatcagaatc agacgaagag ttcgatgact 120
 ccgcagccga tgacaccgac gacagcgagg ccggagggtg tagtgaagga ggtgatgaat 180
 atgtaaccaa aggggaatth gttgaaactg atggcaaaaa gaaagagtgc tcttcgcacg 240
 aagcttgcta cgatcaacgt gaaccacaag cgtggtgcag actgagcgag aatcaggcat 300
 ggactgacag aggctgcttc tgcgaagata agttgcattc gtgcgtcatc gaaagaacga 360
 acaatggtaa attggagtat tcgtactgtg cacctgaagc aggttggcaa tgcgcatagg 420
 aatgaatcag tctttgatac taccaacttt ccatccattt cctacacttt tcaaatttaa 480
 ttctttctaa caaataacat ttaactttgg ttttaccggt attttattaa atattggaaa 540
 10 tatgtgcgac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 572

<210> 39

<211> 126

<212> PRT

15 <213> Brugia malayi

<400> 39

ES 2 800 984 T3

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

<210> 40
 <211> 381
 5 <212> DNA
 <213> Brugia malayi

<400> 40

atgaataatc tattgatagc aatcagttta gtaattcttc ttgtgatatt cccatcaaaa 60
 tcagatttag aaattgatga ttcctcagac agtgattatg ctcatagcaa tgacgacgat 120
 tacaatgaag aagaagatga atatacgacc aaaggagaat ttggtgaaac tgatggcaaa 180
 tggaagaatt gcagttctca tgcagattgc tatgattatc gtgaaccaat agcttggtgc 240
 aaaccactg caaatcaatt ttggacagac aaaggttgct tctgtgaaga tatgttgtat 300
 tcatgtgtga tcgaaagaac gaacaatggc aaattagaat attcatattg tacatccaaa 360
 10 gaaaactggc aatgtttata a 381

<210> 41
 <211> 128
 <212> PRT
 15 <213> Wuchereria bancrofti

<400> 41

ES 2 800 984 T3

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

<210> 42

<211> 387

5 <212> DNA

<213> Wuchereria bancrofti

<400> 42

atgaataaac ttttaatagc attcggttta gtaattcttc ttgtgacact tccgtgtgca 60
 tcagaatcag acgaagagtt cgatgacggc tcaaatgatg agaccgacga caaagaggac 120
 gaaghtaata gtgaaggagg tgatgaatat gtaaccaaag gagaagttgt tgaaactgat 180
 ggcaagaaga aagagtgctc ttcgcacgaa gcttgttacg atcaactgga accacaagcg 240
 tgggtgtagac cgaacgagaa tcagtcgtgg actgacaaag gttgcttctg cgaagataag 300
 ttgcattcgt gcgtcatcga aagaaagaac aacggtaaat tggagtattc gtattgcgca 360
 10 cctgaagcgg gttggcaatg cgcgtag 387

<210> 43

<211> 83

<212> PRT

15 <213> Loa loa

<400> 43

Met Ile His Asn Gly Gly Tyr Gln Lys Leu Lys Val Lys Leu Arg Lys

20

ES 2 800 984 T3

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

<210> 44
 <211> 252
 5 <212> ADN
 <213> Loa loa

<400> 44

atgattcata acggtggata ccaaaaatta aaagtcaaat tgaggaagaa agaatgcaag 60
 tctcatgaag cttgctacga tcaacgtgaa ccacaagact ggtgcagatt gaacgaaaat 120
 caatcgtgga cagacaaaagg ttgctactgt gacgataagt tgcattcatg cattattgag 180
 cgcaagaacg gtggcaagtt ggaatatgcg cactgtgctg ctgaacaagg atggaaatgt 240
 10 ccaagcaagt aa 252

<210> 45
 <211> 229
 <212> PRT
 15 <213> Brugia malayi

<400> 45

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

20

ES 2 800 984 T3

Gly Leu Trp Leu Leu Ile Ile Ile Gly Ala Ser Ile Phe Leu Val Gly
65 70 75 80

Phe Leu Gly Cys Cys Gly Ala Ile Cys Glu Ser Thr Lys Leu Leu Ala
85 90 95

Leu Phe Ser Ile Ile Val Leu Ile Leu Ala Ile Leu Glu Val Ala Ser
100 105 110

Ile Val Leu Ile Ile Ala Gly Lys Asp Gln Phe Lys Asn Ala Leu Tyr
115 120 125

Asn Leu Leu Ser Lys Thr Gly Glu Ser Glu Asp Glu Met Gln His Phe
130 135 140

Lys Pro Ile Glu Asp Leu Phe Gln Cys Cys Gly Pro Thr Asn Glu Thr
145 150 155 160

Met Val Arg Tyr Ile Glu Asn Gly Leu Cys Glu Asp Glu Leu Arg Asn
165 170 175

Lys Pro Asn Cys Phe Ala Val Ile Ser Asp His Phe Asp Ser Ser Gln
180 185 190

Lys Asp Ile Ile Lys Ile Ser Val Val Leu Ile Ile Ile Asp Leu Leu
195 200 205

Ala Leu Phe Ser Thr Ser Met Leu Tyr Lys Ala Phe Arg Tyr Gln Thr
210 215 220

Pro Tyr Tyr Tyr Ala
225

<210> 46

<211> 690

5 <212> DNA

<213> Brugia malayi

<400> 46

atggttcacg gctgtggttaa tcgaacattg aaatTTTTat ttttCactgc aaatttatta 60

acttgtgcat ttggtgcact tctttttggc atttcattat gggcttatca tgatgaaaat 120

tttttgcaaa aattagaaaa agtacaggaa atacataaag aatattctoc tgaactaaca 180

caacatcaaa taggattgtg gttattaata attattggtg catccatatt tcttgttggg 240

tttctcgggtt gttgtggtgc gatatgtgaa agtaccaagc tattggcttt attttctatt 300

attgtattaa ttcttgcaat acttgaagtt gcttcgatag tacttataat tgctggcaag 360

gatcaattta aaaatgcttt atataattta ctatcaaaaa ctggcgaatc agaagatgaa 420

10

ES 2 800 984 T3

```

atgcaacatt ttaaacctat cgaagattta ttccaatggt gtggtccaac aaatgaaaca      480
atggttcgat acatcgagaa tggcttatgt gaggatgaat taagaaataa accgaattgt      540
ttcgcagtaa tatccgatca ttttgattca tctcaaaaag atatcattaa aatttccgtc      600
gttttaataa ttattgattt gcttgcatta ttttctacat ctatgcttta taaagcattt      660
cgctatcaaa caccatacta ttatgcttaa      690

```

<210> 47
 <211> 230
 5 <212> PRT
 <213> Loa loa

<400> 47

```

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

```

10

ES 2 800 984 T3

Asn Lys Pro Asp Cys Phe Thr Ala Ile Ser Asp Tyr Leu Glu Ser Thr
 180 185 190

Gly Glu Ala Val Val Val Phe Ala Phe Phe Leu Leu Ile Ile Glu Leu
 195 200 205

Phe Ala Leu Val Ser Thr Cys Ile Leu Cys Lys Ala Phe Arg Tyr Gly
 210 215 220

Arg Pro Tyr Tyr Tyr Ala
 225 230

<210> 48
 <211> 693
 5 <212> DNA
 <213> Loa loa

<400> 48

atggttcacg gttgtggcaa tcgaatggtg aaatTTTTat ttttCactgc aaatTTactg 60
 atctgtttat ttggcgcaact tatttttggc ttctcattat gggctaattt ggatgaagat 120
 ttTcgctaa agctggaaga aacgagaaaa atacataaag aagattttaa tgtgctggca 180
 agatatcaag cagcattttg ggtattgggt gttattgggg cattcttgtt tctcgttggt 240
 ttCctcggt gttgtggtgc aatgtgtgaa aatatcatgt tgttgactgc atttttcatc 300
 ataatactaa ttcttacaac aatcgaagtt ggcgcggtaa tatttgcaat cactagcaag 360
 ggccaattta aaagtgtttt acataggcta ctatcagaag ctggtaaagc agaagacaaa 420
 tacttgccga atttaaaacc catcgaagat ctgttttatt gctgtggtgc aacgcaagaa 480
 acgatgaacc ggtacatgga acatggctta tgtgaaggag aattgaagaa taagccggac 540
 tgcttcacgg caatatcgga ttatttgag tcaaccggag aagcggtcgt cgtatttgca 600
 ttctttttgc taattatcga gttgtttgct ttagtttcca catgtatact atgtaaagca 660
 10 ttccgttatg gaaggccata ctactatgct taa 693

<210> 49
 <211> 113
 <212> PRT
 15 <213> Brugia malayi

<400> 49

Met Glu Glu Lys Val Val Glu Leu Thr His Asn Trp Ser Ala Glu Gln
 1 5 10 15

Trp Asp Trp Pro Leu Gln His Asn Asp Glu Val Ile Lys Val Thr Asn
 20 25 30

Thr Asn Asp Lys Phe Glu Val Gly Leu Asp Ala Ser Phe Phe Thr Pro

20

ES 2 800 984 T3

	35		40		45														
Lys	Glu	Ile	Glu	Val	Lys	Val	Ala	Gly	Asp	Asn	Leu	Val	Ile	His	Cys				
	50					55					60								
Arg	His	Glu	Ser	Arg	Ala	Glu	His	Tyr	Gly	Glu	Ile	Lys	Arg	Glu	Ile				
	65				70					75					80				
Ser	Arg	Thr	Tyr	Lys	Leu	Pro	Ser	Asp	Val	Asp	Thr	Lys	Thr	Leu	Thr				
				85					90					95					
Ser	Asn	Leu	Thr	Lys	Arg	Gly	His	Leu	Val	Ile	Ala	Ala	Lys	Lys	Lys				
			100					105					110						

Ala

<210> 50
 <211> 342
 5 <212> DNA
 <213> Brugia malayi

<400> 50

	atggaagaaa	aggtagtgga	actaacgcac	aactggagtg	cggagcagtg	ggattggccc	60
	ttacagcaca	acgatgaggt	gattaaagta	accaacacga	atgataagtt	tgaagtcggt	120
	ttggatgcat	cattcttcac	gccgaaggaa	atcgaggtaa	aagttgctgg	cgataatctg	180
	gtcattcact	gcagacatga	atcacgtgcc	gagcattatg	gagaaattaa	acgtgaaatt	240
	agtcgtacct	ataagcttcc	gtcggatgta	gatacgaaga	ctctgacatc	aaatttgacc	300
10	aagcgaggac	atttgggtcat	cgctgccaaa	aagaaagcat	ga		342

<210> 51
 <211> 165
 <212> PRT
 15 <213> Onchocerca volvulus

<400> 51

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

20

ES 2 800 984 T3

His Phe His Pro Lys Glu Leu Ser Val Ser Val Arg Asp Arg Glu Leu
 65 70 75 80
 Val Ile Glu Gly His His Glu Glu Arg Thr Asp Pro Ala Gly His Gly
 85 90 95
 Ser Ile Glu Arg His Phe Ile Arg Lys Tyr Val Leu Pro Glu Glu Val
 100 105 110
 Gln Pro Asp Thr Ile Glu Ser His Leu Ser Asp Lys Gly Val Leu Thr
 115 120 125
 Ile Ser Ala Asn Lys Thr Ala Ile Gly Thr Thr Ala Ser Arg Asn Ile
 130 135 140
 Pro Ile Arg Ala Ser Pro Lys Glu Pro Glu Ala Asn Gln Lys Ser Ala
 145 150 155 160
 Ile Asn Asp Ala Lys
 165

<210> 52

<211> 574

5 <212> DNA

<213> Onchocerca volvulus

<400> 52

caaacttcac cgatggaacg tttcatagtg aaccttcttg acagtacatt cgatgacaga 60
 tcatctcgac cgctccattc tgttgcaacca tattggcttc atcaaccgga actgaatgaa 120
 tgtaatatcg gaaattctct cggcgaggta ataaatgaga aagacaagtt tgcagttcga 180
 gctgatgttt ctcatattcca tccgaaggaa ctttcggtgt cggttcgaga tcgtgaacta 240
 gttattgaag gtcacatga agagcgtacc gatccggcag gacatggtag tattgaacgt 300
 cacttcattc gaaaatatgt cttgccagaa gaagtgcagc ctgacacgat cgaatcacat 360
 ttgtccgata aaggagtgtt gacaattagc gcaaacaaaa cagctattgg cacgactgca 420
 tcacgaaaca ttccaattcg agcatctcca aaagaaccgg aagcaaatca gaaatcggca 480
 ataaatgatg caaagtaaaa agaagtagaa attccggata tatttcattc tttatattat 540
 10 acgctttttt tttctttttt tgttcatttt aaag 574

<210> 53

<211> 113

<212> PRT

15 <213> Loa loa

<400> 53

ES 2 800 984 T3

Met Glu Glu Lys Val Leu Glu Leu Thr His Asn Trp Ser Ala Glu Gln
 1 5 10 15

Trp Asp Trp Pro Leu Gln His Asn Asp Asp Val Ile Lys Val Thr Asn
 20 25 30

Thr Asn Asp Lys Phe Glu Val Ser Leu Asp Ala Ser Phe Phe Thr Pro
 35 40 45

Lys Glu Ile Glu Val Lys Val Ala Gly Asp Asn Leu Val Ile His Cys
 50 55 60

Arg His Glu Ser Arg Ala Asp Gln Tyr Gly Glu Ile Lys Arg Glu Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Thr Tyr Lys Leu Pro Ser Asp Ile Asp Thr Lys Thr Leu Thr
 85 90 95

Ser Thr Leu Thr Lys Arg Gly His Leu Val Ile Val Ala Lys Lys Lys
 100 105 110

Ala

<210> 54
 <211> 342
 5 <212> DNA
 <213> Loa loa

<400> 54

atggaagaaa aggtattgga actaacgcat aattggagtg ccgagcagtg ggattggccc 60
 ttgcagcata acgatgacgt gattaaagtg accaatacga atgataagtt tgaagtcagt 120
 ctggatgctt cattcttcac accgaaggaa atcgaggatga aagttgctgg tgataatctg 180
 gtcattcact gcagacatga atcacgtgcc gaccaatacg gtgaaattaa acgtgaaatt 240
 agtcgtacct ataagcttcc gtcggatatt gatacgaaga ccctgacatc aactttgacc 300
 10 aaaagaggac atctggtcat cgttgccaaa aagaaggcat ga 342

<210> 55
 <211> 220
 <212> PRT
 15 <213> Brugia malayi

<400> 55

Met Leu Phe Phe Val Ile Phe Ser Ile Thr Ile Ala Val Val Ala Gly
 1 5 10 15

20

ES 2 800 984 T3

Phe Glu Cys Pro Gly Gly Arg Leu Thr Pro Gln Gln Arg Lys Asp Ile
 20 25 30

Val Arg Gln Asn Asn Lys Phe Arg Ser Leu Leu Ile His Gly Lys Leu
 35 40 45

Lys Asn Arg Asn Gly Thr Tyr Met Pro Arg Gly Lys Asn Met Leu Leu
 50 55 60

Leu Lys Trp Ser Cys Gln Leu Glu Asn Ser Ala Gln Arg Trp Ala Asn
 65 70 75 80

Gln Cys Val Phe Gly His Ser Pro Arg Asn Gln Arg Gln Gly Ile Gly
 85 90 95

Glu Asn Val Tyr Ala Tyr Trp Ser Ser Glu Ser Val Glu Lys Leu Arg
 100 105 110

Asn Thr Ala Gly Thr Glu Ala Gly Lys Ser Trp Trp Ser Glu Leu Pro
 115 120 125

Lys Leu Tyr Lys Gln Asn Pro Ser Asn Asn Leu Thr Asp Asp Val Ala
 130 135 140

Arg Gln Gly Val Leu His Phe Thr Gln Met Ala Trp Gly Lys Thr His
 145 150 155 160

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

Ile Ala Ile Cys His Tyr Ser Pro Ala Gly Asn Met Leu Lys Glu Leu
 180 185 190

Ile Tyr Glu Leu Gly Glu Pro Cys Lys Thr Asp Ser Asp Cys Asn Thr
 195 200 205

Lys Lys Cys Ala Lys Lys Ser Gly Leu Cys Arg Lys
 210 215 220

<210> 56

<211> 897

5 <212> DNA

<213> Brugia malayi

<400> 56

gcacgagata ttttcaaagc taacagtata cattccacca aaaaactcgg caaaatgtta 60

tttttcgta tattttccat cacgattgct gttgtggcag gttttgaatg tccaggaggt 120

cgactaacac cacagcaacg taaagatata gttcgtcaga acaataaatt tcgttcatta 180

ES 2 800 984 T3

ctaattcatg gaaaacttaa aataggaat ggtacatata tgccacgagg caagaatatg 240
 ttgctactga agtggagttg tcagttagaa aattctgagc aaagatgggc aatcaatgc 300
 gtctttgggc actctccgag aatcaaaga caaggaatcg gtgaaaatgt ctatgcctac 360
 tggatcatcag aaagcgtcga aaagcttaga aataccgctg gtacggaagc cggcaaaagt 420
 tggtggtcag aacttccgaa actgtacaaa cagaatcctt cgaacaatct gactgatgat 480
 gttgccagac aagggtgtttt acatttcaca cagatggcct ggggtaaaac gcataaaatt 540
 ggttgtggta tagcaacaaa ctgcatgggt ggtcgcacac tcatagctat ttgccattat 600
 tcaccocgctg gaaatatgct aaaagaactg atatatgagc ttggcgaacc atgcaaaacg 660
 gatagcgatt gtaacacaaa gaaatgtgcc aaaaaatctg gattgtgtag aaaaatgaaag 720
 agagtttaaa gtttcacttt ttgcaactctt aattttgggt ttatattata aaactgagaa 780
 ttattacaaa catatatttt ggctattata agataaaaaa gttccttgaa attctttctca 840
 aataaaattt ctctctgata aaagcatgaa acaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 897

<210> 57

<211> 220

5 <212> PRT

<213> Wuchereria bancrofti

<400> 57

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

10

ES 2 800 984 T3

Glu Leu Tyr Lys His Asn Pro Ser Asn Asn Leu Thr Asp Asp Val Ser
 130 135 140

Arg Gln Gly Val Leu His Phe Thr Gln Met Ala Trp Gly Lys Thr His
 145 150 155 160

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

Ile Thr Ile Cys His Tyr Ser Pro Ala Gly Asn Ile Leu Lys Asn Leu
 180 185 190

Ile Tyr Glu Leu Gly Glu Pro Cys Lys Lys Asp Gly Asp Cys Asn Thr
 195 200 205

Lys Lys Cys Ala Lys Lys Ser Gly Leu Cys Arg Lys
 210 215 220

<210> 58

<211> 873

5 <212> DNA

<213> Wuchereria bancrofti

<400> 58

ggaattcggc acgagcgaca tcttctgtta tcaaatatat tttcaaagct aacagtgtac 60

attctgccag aaaatccgc aaaatgttac ttttcgtcat attttctgca actattgttg 120

ctgtggcggc ttttgaatgt ccaggaggtc aactaacacc gcaacaacgt aaagatatcg 180

ttcgtcagaa caataaattt cgttcattac tgattcgtgg aaaacttaa aataggaatg 240

gtacatatat gccacgcggc aagaatatgt tgcaactgac atggagtgtg cagttagaaa 300

attctgcgca aagatgggca aatcagtgcg tctttggaca ctcaccgaga aatcaaagac 360

aaggaatcgg tgaaaatggt tacgcttact ggtcgtcagc aagcgttgaa aatcttagaa 420

aaaccgctgg tacggaagcc ggcaaaagt ggtggtcaga acttccggaa ctgtacaaac 480

acaatccttc gaacaatctg actgacgatg tttccaggca aggtgttttg catttcacac 540

agatggcttg gggtaaaacg cataaaattg gttgtggtat tgctacaaac tgtgatggtg 600

gtcgcacact cataactatt tgccattatt cgcccgtgg aaatatactg aaaaatctga 660

tatatgagct tggcgaaccg tgcaaaaagg atggcgattg taacacaaag aatgtgcca 720

aaaaatctgg attgtgcaga aagtgaaga atttgaagag tttcaccttc tcatttctaa 780

ttttggtttt gtatcataaa actgacaatt attacaaaca tatttattgg ctattatggg 840

10 ataaagaagt ttcttgaaaa aaaaaaaaaa aaa 873

<210> 59

<211> 220

<212> PRT

15 <213> Onchocerca volvulus

<400> 59

ES 2 800 984 T3

Met Ile Leu Phe Ile Ile Phe Pro Ala Ile Val Val Ala Val Thr Gly
 1 5 10 15

Tyr Asn Cys Pro Gly Gly Lys Leu Thr Ala Leu Glu Arg Lys Lys Ile
 20 25 30

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

Lys Asn Arg Asn Gly Thr Tyr Met Pro Arg Gly Lys Asn Met Leu Glu
 50 55 60

Leu Thr Trp Asp Cys Lys Leu Glu Ser Ser Ala Gln Arg Trp Ala Asn
 65 70 75 80

Gln Cys Ile Phe Gly His Ser Pro Arg Gln Gln Arg Glu Gly Val Gly
 85 90 95

Glu Asn Val Tyr Ala Tyr Trp Ser Ser Val Ser Val Glu Gly Leu Lys
 100 105 110

Lys Thr Ala Gly Thr Asp Ala Gly Lys Ser Trp Trp Ser Lys Leu Pro
 115 120 125

Lys Leu Tyr Glu Asn Asn Pro Ser Asn Asn Met Thr Trp Lys Val Ala
 130 135 140

Gly Gln Gly Val Leu His Phe Thr Gln Met Ala Trp Gly Lys Thr Tyr
 145 150 155 160

Lys Ile Gly Cys Gly Val Ala Thr Gln Cys Asp Gly Gly Arg Thr Leu
 165 170 175

Ile Val Ile Cys His Tyr Ser Pro Gly Gly Asn Met Val Gly Glu Val
 180 185 190

Ile Tyr His Arg Gly Asn Pro Cys Lys Val Asp Lys Asp Cys Tyr Thr
 195 200 205

Lys Lys Cys Leu Ser Lys Ser Gly Leu Cys Arg Lys
 210 215 220

<210> 60

5 <211> 883

<212> DNA

<213> Onchocerca volvulus

<400> 60

10

ES 2 800 984 T3

```

gcattttcta aagtgacatc ttctgttatt atcaaatata tttctgagat taacagctta      60
tattctatcg gaaaattccg caaaatgata cttttcatca tcttcctgc aattgtcgtc      120
gcggtgacgg gttataattg tccaggagggt aaactaacag cactggaacg taaaaaaatc      180
gttggtcaga ataataaata tcgttcggat ttgattaatg gaaagcttaa gaatagaaat      240
ggtacataca tgccaagagg caagaatatg ttggaactga catgggattg taaattggaa      300
agttcggcac aaaggtgggc caatcagtgt atctttggac attcaccaag acaacaaaga      360
gagggagttg gtgaaaatgt ttatgcgtac tggatcatcag tatcagttga aggtcttaaa      420
aaaactgctg gtacggatgc tgggaaaagc tgggtggcaca agcttcctaaa attatatgaa      480
aataaccctt cgaataatat gacttggaaa gttgccggtc aaggtgtttt gcatttcaca      540
caaatggcctt ggggtaagac ttataaaatt ggttgccggtg ttgcaacaca atgtgatggt      600
ggtagaacac ttattgttat ttgtcactat tctcctgggtg gaaatatggt tggagaggtg      660
atataccacc gaggtaatcc gtgtaaagtc gacaaagatt gctatacgaa aaaatgttta      720
tcaaaatctg gactgtgcag aaaatgaaaa tttttcgctt ttcttcattt aattctcggc      780
tatatatctc ctatattaat ttttcagcaa aaaagctata aagaaatatt cataattaa      840
taaatatagt aattattatg aaataaaaaa ttaagttctg ctc                          883

```

<210> 61

<211> 220

5 <212> PRT

<213> Loa loa

<400> 61

```

Met Leu Cys Ser Phe Met Phe Ala Ala Ile Ile Ile Ala Val Glu Gly
1           5           10           15

Tyr Arg Cys Gln Gly Gly Arg Leu Thr Pro Glu Gln Arg Lys Ala Ile
          20           25           30

Val Ile Gln Asn Asn Lys Phe Arg Ser Gln Leu Ile Arg Gly Glu Leu
          35           40           45

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

Met Arg Trp Ser Cys Ser Leu Glu Tyr Ser Ala Gln Arg Trp Ala Asp
65           70           75           80

```

10

ES 2 800 984 T3

Arg Cys Ile Phe Gly His Ser Pro Arg Asp Gln Arg Asn Asn Ile Gly
85 90 95

Glu Asn Val Tyr Ala Tyr Trp Ser Ser Gly Ser Val Glu Gly His Arg
100 105 110

Lys Thr Ala Gly Thr Asp Ala Gly Lys Asn Trp Trp Ser Glu Leu Pro
115 120 125

Glu Arg Tyr Gly Ser Asn Pro Ser Asn Asn Leu Thr Ala Gln Val Ser
130 135 140

Ser Gln Gly Val Leu His Phe Thr Gln Met Ala Trp Gly Lys Thr Tyr
145 150 155 160

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

Met Val Ile Cys His Tyr Ser Pro Ala Gly Asn Met Leu Lys Glu Leu
180 185 190

Ile Tyr Glu Leu Gly Glu Pro Cys Lys Lys Asn Asn Asp Cys Tyr Thr
195 200 205

Lys Lys Cys Ser Val Lys Ser Gly Leu Cys Asn Lys
210 215 220

<210> 62

<211> 663

5 <212> DNA

<213> Loa loa

<400> 62

atgttatggt ccttcatggt tgcagcaatt atcattgctg tggaaggta tcgatgtcaa 60

ggaggtcgac taacaccgga gcaacgtaaa gcaatcgta ttcaaaataa taaattccgt 120

tcgcaactga tccgtggcga gcttaagaac aaagctggtg aatttatgcc acgtggcaag 180

aatatggtga gaatgagatg gagttgttcg ctggaatatt ccgcgagag atgggcagat 240

agatgtatct ttggacactc accaagagat caaagaaaca atatcgggta aaatgtctat 300

gcttactggt catcaggaag cgttgaaggc catagaaaaa ctgctggtac agatgctggt 360

aaaattggt ggtcagaact tccggaacgg tacggatcta atccttcaa taatttgact 420

gctcaagttt ccagccaagg tgttttgcat ttcacacaga tggcttgggg taaaacgtac 480

aaaattggct gtggtattgc tacaaactgc gatggtggca ggacactaat ggtcatttgc 540

10 cattattcgc cagctgggaa tatgttgaaa gagcttatat atgagcttgg cgaaccatgc 600

aagaagaaca atgattgta taccaagaag tgttcagtca agtctggatt gtgcaacaag 660

tga 663

ES 2 800 984 T3

<210> 63
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Wuchereria bancrofti

5

<400> 63

```

Met Ile Leu Glu Val Ala Ser Ile Val Leu Ile Ile Ala Gly Lys Asp
 1                               5                               10                               15

Gln Phe Lys Asn Ala Leu Tyr Asn Leu Leu Ser Lys Thr Gly Glu Ser
                               20                               25                               30

Glu Asp Glu Met Gln His Phe Lys Pro Ile Glu Asp Leu Phe Gln Cys
                               35                               40                               45

Cys Gly Pro Thr Asn Glu Thr Met Val Arg Tyr Ile Glu Asn Gly Leu
                               50                               55                               60

Cys Glu Asp Glu Leu Arg Asn Lys Pro Asn Cys Phe Ala Val Ile Ser
 65                               70                               75                               80

Asp His Phe Asp Ser Ser Gln Lys Asp
                               85
    
```

10 <210> 64
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Wuchereria bancrofti

15 <400> 64

```

Val Ile His Cys Arg His Glu Ser Arg Ala Glu His Tyr Gly Glu Ile
 1                               5                               10                               15

Lys Arg Glu Ile Ser Arg Thr Tyr Lys Leu Pro Ser Asp Val Asp Thr
                               20                               25                               30

Lys Thr Leu Thr Ser Asn Leu Thr Lys Arg Gly His Leu Val Ile Ala
                               35                               40                               45

Ala Lys Lys Lys Ala
                               50
    
```

<210> 65
 20 <211> 267
 <212> **DNA**
 <213> Wuchereria bancrofti

<400> 65

25

ES 2 800 984 T3

atgatcctgg aggtggcctc catcgtgctg atcatcgccg gcaaggacca gttcaagaac 60
 gctctgtaca acctgctgtc taagacaggg gagagcgagg acgagatgca gcacttcaag 120
 cctatcgagg acctgttcca gtgctgcggc cctaccaacg agaccatggt gaggtacatc 180
 gagaacggac tgtgcgagga cgagctgagg aacaagccta actgtttcgc cgtgatctct 240
 gaccaattcg attctagcca gaaggac 267
 <210> 66
 <211> 162
 5 <212> **DNA**
 <213> Wuchereria bancrofti
 <400> 66
 gtcattcact gcagacatga atcacgtgcc gagcattatg gagaaattaa acgtgaaatt 60
 agtcgtacct ataagcttcc gtcggatgta gatacgaaga ctctgacatc aaatttgacc 120
 10 aagcgaggac atttggatcat cgctgccaaa aagaaagcat ga 162
 <210> 67
 <211> 387
 <212> **DNA**
 15 <213> Brugia malayi
 <400> 67
 atgggtaaca agtcctcat cgctttcggg ctcgtgatcc tgtttgtcac cctgccttgc 60
 gtcagtgaga gcgacgagga gtttcatgac tctgccgctg acgacaccga cgattccgag 120
 gccggtggcg gctctgaggg gggcgacgag tacgtgacta agggggagtt tgtggagacc 180
 gatggaaaga agaaagagtg ctccagccac gaggcctggt atgaccagcg ggagcctcag 240
 gcttggtgca ggctgtctga gaatcaggcc tggactgata gaggctgttt ctgtgaggac 300
 aagctgcatt cttgcgtgat tgagcggact aataatggca agctggaata cagctactgc 360
 gctcccagag caggttggca gtgcgcc 387
 20 <210> 68
 <211> 153
 <212> **DNA**
 <213> Wuchereria bancrofti
 25 <400> 68
 atggtcattc actgcaggca cgagagcaga gccgagcact acggcgagat caaaagagag 60
 atcagcagga catacaagct gccctcagac gtggacacta agactctgac tagcaatctg 120
 accaagaggg gccacctggt catcgtgcc aag 153
 30 <210> 69
 <211> 267
 <212> **DNA**
 <213> Wuchereria bancrofti
 35 <400> 69

ES 2 800 984 T3

```
atgatcctgg aggtggcctc catcgtgctg atcatcgccg gcaaggacca gttcaagaac      60
gctctgtaca acctgctgtc taagacaggg gagagcgagg acgagatgca gcacttcaag     120
cctatcgagg acctggtcca gtgctgcggc cctaccaacg agaccatggt gaggtacatc     180
gagaacggac tgtgcgagga cgagctgagg aacaagccta actgtttcgc cgtgatctct     240
gaccaattcg attctagcca gaaggac                                           267
```

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende tres o más antígenos aislados unidos covalentemente de uno o más nematodos filariales, donde los antígenos comprenden Transcripción Larval Abundante (ALT-2), Tetraspanina y proteína de choque térmico pequeña (HSP) 12.6, o fragmentos de los mismos, donde el fragmento se selecciona del grupo de SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64.
2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, donde los nematodos filariales son seleccionados del grupo de *Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti*, *Onchocerca volvulus*, *Loa loa* y *Brugia timori*.
3. Un ácido nucleico aislado que codifica la proteína de fusión de cualquier reivindicación precedente.
4. Un vector recombinante que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 3.
5. El vector recombinante de la reivindicación 4, donde el ácido nucleico se selecciona del grupo de SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 y SEQ ID NO: 69.
6. Una célula huésped recombinante que comprende el vector recombinante de la reivindicación 4 o 5.
7. La proteína de fusión de la reivindicación 1 para su uso en la inmunización de un animal contra la filariasis, el uso que comprende administrar a un animal que lo necesite la proteína de fusión de la reivindicación 1.
8. Una vacuna multivalente que comprende al menos una de las proteínas de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, o el ácido nucleico de la reivindicación 3.
9. La vacuna multivalente de la reivindicación 8 para uso en la inmunización de un animal contra la filariasis, el uso comprende administrar a un animal que lo necesite la vacuna multivalente de la reivindicación 8.

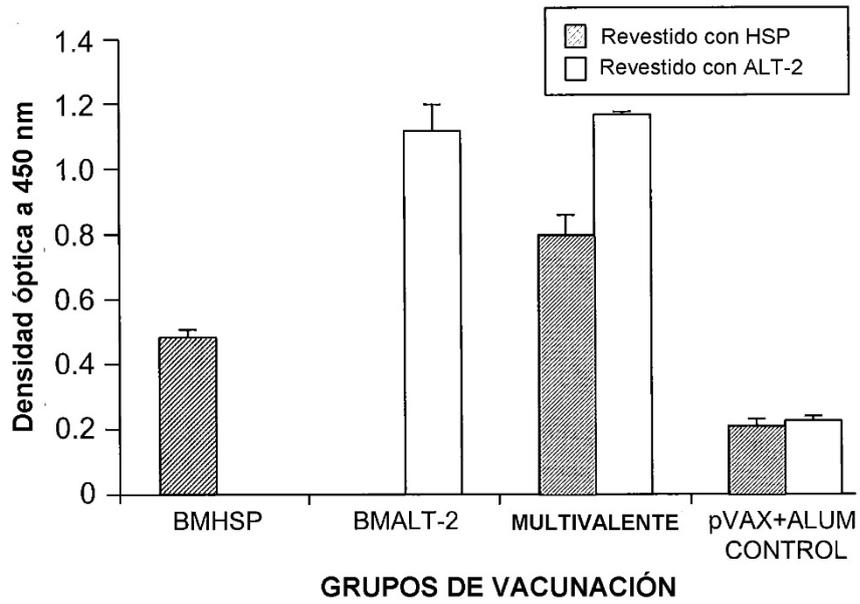


FIG. 1

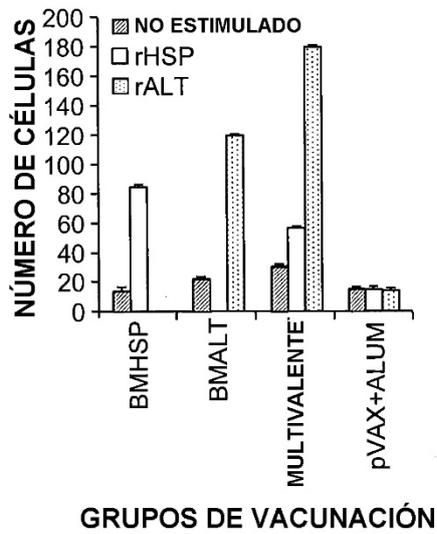


FIG. 2A

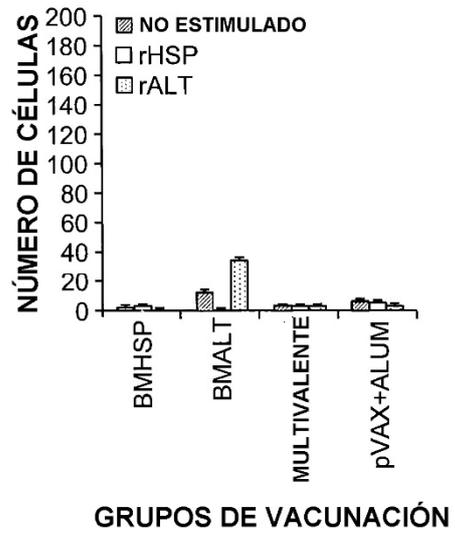


FIG. 2B

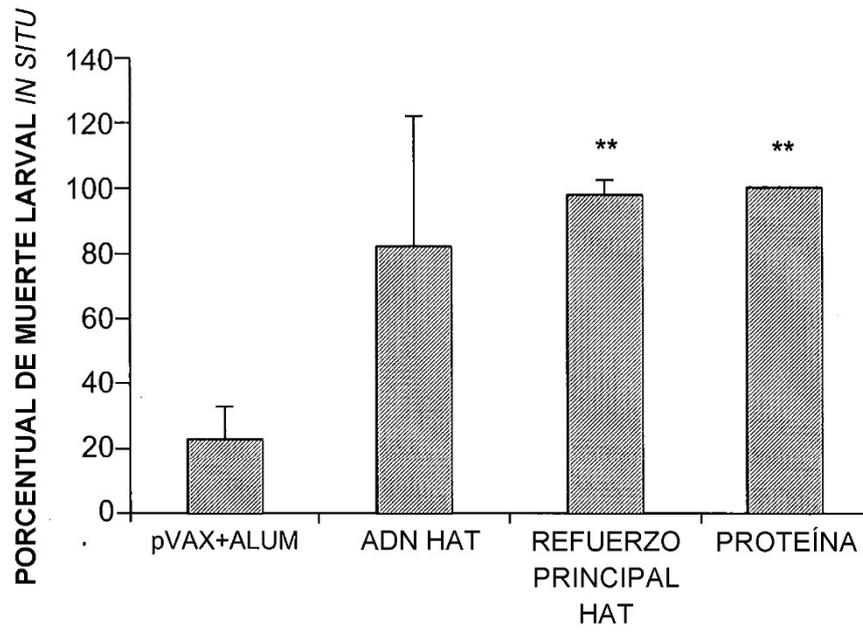


FIG. 3

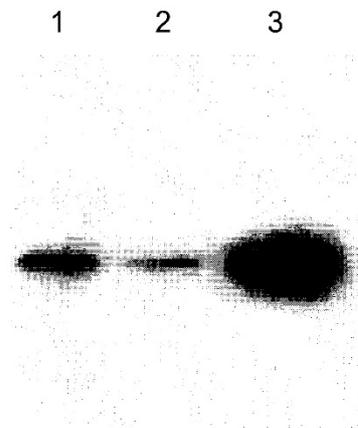


FIG. 4