

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 833 156**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2014** **PCT/US2014/056703**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2015** **WO15042498**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2014** **E 14845566 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2020** **EP 3049112**

54 Título: **Vacuna y terapia contra la gripe**

30 Prioridad:

23.09.2013 US 201361881325 P

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

14.06.2021

73 Titular/es:

**ENGEN BIO, LLC (100.0%)
61 Avondale Avenue
Redwood City, CA 94062, US**

72 Inventor/es:

**ALFENITO, MARK;
BAER, MARK y
BUCHER, DORIS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 833 156 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 y terapia contra la gripe

La presente invención se refiere a vacunas contra la gripe que contienen polipéptidos de M1 específicos y a usos de los mismos.

- 5 La gripe es una enfermedad respiratoria aguda y contagiosa provocada por los virus de la gripe, que se transmiten a través de la transmisión respiratoria por gotitas. La gripe sin complicaciones se caracteriza por el inicio repentino de síntomas inespecíficos y respiratorios que habitualmente se resuelven en una semana. En determinadas personas, la gripe puede agravar las afecciones existentes y conducir a complicaciones potencialmente mortales. Los virus de la gripe son uno de los virus más ubicuos del mundo, afectando a los seres humanos, los cánidos, las aves, los murciélagos y el ganado. La gripe también tiene un impacto significativo en los ancianos y en los muy jóvenes. La gripe da como resultado en un coste económico, una morbilidad e incluso una mortalidad, que son importantes.

- 10 Los virus de la gripe son virus envueltos, de ARN de sentido negativo, con un genoma segmentado, que pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Se clasifican sobre la base de sus proteínas centrales en tres tipos distintos: A, B y C (Cox, N. J. y Fukuda K., *Influenza*. Infect. Dis. Clin. North Am. 12:27-38, 1998). Los virus de la gripe A pueden infectar una variedad de especies de mamíferos y aves, mientras que los tipos B (gama de hospedadores, seres humanos y focas) y C están esencialmente restringidos a los seres humanos. Los virus de la gripe A y B son los principales responsables de la enfermedad humana, siendo el tipo A el más patógeno. Los principales determinantes antigénicos de los virus de la gripe A y B son dos glucoproteínas de superficie: la neuraminidasa (NA) y la hemaglutinina (HA), ambas capaces de suscitar una respuesta inmunitaria en los seres humanos. La HA está implicada en la unión al receptor y la fusión de membranas. La NA facilita la escisión de la progenie del virus de las células infectadas, previene la agregación vírica y ayuda al movimiento a través del epitelio mucoso de las vías respiratorias.

- 15 Actualmente se conocen tres tipos de virus de la gripe (A, B y C), los virus de tipo A son responsables de las afecciones animales y humanas, mientras que los virus de tipo B y tipo C son especialmente patógenos para los seres humanos. Los virus de tipo A se subdividen en subtipos según la estructura antigénica de la hemaglutinina (HA) y de la neuraminidasa (NA), que son las principales glucoproteínas de la envoltura vírica. Se destacan dieciocho subtipos de HA (H1 a H18) y 9 subtipos de NA (N1 a N11). Por lo tanto, el subtipo de un virus de tipo A se define por el subtipo de HA y el subtipo de NA que están presentes en la envoltura vírica. Las aves silvestres y los murciélagos constituyen el reservorio de todos los subtipos de gripe A. Determinados subtipos del virus de la gripe de tipo A infectan de forma endémica o epidémica (epidemias anuales) aves domésticas (diversos subtipos, incluidos H5N1 y H9N2), caballos (principalmente H3N8), cerdos (principalmente H1N1, H3N2 y H1N2) y también seres humanos (principalmente H1N1 y H3N2). Los perros, los gatos y otras especies silvestres también pueden ocasionalmente infectarse con determinados subtipos (H3N8 y H5N1 en perros; H5N1 en gatos).

- 20 Las vacunas contra la gripe interpandémica se preparan a partir de virus que se cultivan en huevos de gallina fértiles y son vacunas contra la gripe inactivadas o atenuadas elaboradas con microbios vivos. Las vacunas antigripales inactivadas se componen de tres formas posibles de preparación de antígeno: virus completo inactivado, subviriones donde las partículas de virus purificadas se rompen con detergentes u otros reactivos para solubilizar la envoltura lipídica (la denominada vacuna "fraccionada") o HA y NA purificadas (vacuna de subunidades). Estas vacunas inactivadas se administran actualmente por vía intramuscular (i.m.), por vía subcutánea (s.c.) o por vía intranasal (i.n.). En conformidad con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las vacunas contra la gripe estacional habitualmente contienen 45 µg de antígeno HA de tres cepas humanas que circulan conjuntamente (medido por inmunodifusión radial simple (IRS) (Wood, J.M. *et al.*, "An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza hemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines", J. Biol. Stand. 5:237-247, 1977; Wood, J.M. *et al.*, "International collaborative study of single radial diffusion and immunoelectrophoresis techniques for the assay of hemagglutinin antigen of influenza virus", J. Biol. Stand. 9:317-330, 1981). Generalmente, contienen antígenos procedentes de dos cepas del virus de la gripe A y una cepa de la gripe B (p. ej., H1N1, H3N2 y B). Una dosis inyectable convencional de 0,5 ml en la mayoría de los casos contiene (al menos) 15 µg de componente de antígeno hemagglutinina de cada cepa. La vacunación desempeña un papel fundamental en el control de las epidemias anuales de gripe. Adicionalmente, durante una pandemia, es posible que los fármacos antivíricos no sean suficientes o eficaces para cubrir las necesidades y el número de personas en riesgo de contraer gripe será mayor que en los periodos interpandémicos. Es un objeto de la invención el desarrollo de una vacuna de larga duración, ampliamente protectora con potencial para producirse en grandes cantidades y con un potencial de distribución y administración eficaces.

- 25 El virus de la gripe infecta a millones cada año, lo que conduce a más de 200.000 hospitalizaciones y 20.000 muertes en los EE.UU. Además, en ocasiones surgen cepas letales de gripe (p. ej., la gripe española de 1918), con pocos medios de tratamiento eficaces. Las vacunas contra la gripe estacional brindan cierta protección, siempre que las cepas causales no hayan cambiado desde el momento de la formulación de la vacuna. La alta variabilidad en las proteínas víricas expresadas en la superficie hemagglutinina y neuraminidasa exige una reformulación anual. La población debe ser reinmunizada cada año para una protección eficaz. Esta necesidad significa que el costo de producción es alto y la disponibilidad depende del título de cada componente vírico de la vacuna (hasta 4 virus distintos comprenden la vacuna actual).

Actualmente se han estado empleado métodos de cultivo celular recombinante para la producción de antígenos en lugar de huevos de gallina, y recientemente la FDA (forma siglada de *Food and Drug Administration*: Administración de Fármacos y Alimentos de los EE.UU.) ha aprobado dos productos de vacuna. Flucelvax es una preparación de virus recombinante (3 virus inactivados) elaborada mediante el cultivo de células de mamífero. Flubloc® es una vacuna de HA recombinante (3 proteínas HA distintas) elaborada mediante el cultivo de células de insectos. Estos productos buscan resolver los problemas de suministro de vacunas, pero no abordan los problemas de las variaciones antigénicas menores que se asocian con las vacunas basadas en la HA.

En este contexto, Vitelli *et al.* (Vitelli, A. *et al.*; PLOS ONE, 8(3); 2013; página e55435) describe la vacunación contra antígenos de gripe conservados en ratones utilizando un nuevo vector de adenovirus de simio, PanAd3, obtenido del bonobo *Pan paniscus*. Además, la patente europea EP 3 045 915 A1 describe un método para medir en un muestra el virus de la gripe A mediante un inmunoensayo que utiliza la reacción de antígeno-anticuerpo entre un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con la proteína de matriz (M1) del virus de la gripe A o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y el virus de la gripe A. Adicionalmente, Guo *et al.* (Guo, J. *et al.*; Chinese Journal of Biotechnology, 27(6); 2011; págs. 876-883) describe la evaluación de la respuesta inmunitaria frente a la vacuna de ADN recombinante y la vacuna adenovírica que coexpresan los genes de M1 y HA del virus de la gripe H5N1 en ratones.

Es un objeto de la presente invención superar la necesidad y el costo del desarrollo anual de una vacuna contra la gripe proporcionando una nueva vacuna contra la gripe que mantendrá la potencia año tras año. Es también un objeto de la invención proporcionar una vacuna contra la gripe que proporcionará protección contra nuevas cepas de la gripe. Otro objeto de la invención es proporcionar una terapia contra la gripe para el tratamiento de individuos ya infectados con virus de la gripe o para el tratamiento profiláctico de individuos.

Es también un objeto de la invención reducir la gravedad de una infección por virus de la gripe en un paciente infectado y/o reducir la duración de los síntomas de la gripe en un paciente infectado con virus de la gripe, utilizando una composición que comprenda un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un polipéptido de M1.

La presente invención se refiere a los siguientes puntos:

1. Una vacuna contra la gripe que comprende un polipéptido, en donde el polipéptido consiste en
 - (i) 30 a 38 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2, o
 - (ii) una secuencia de aminoácidos según una de las SEQ ID NO: 3 a 15, 18 a 33, y 35; en donde dicha vacuna contra la gripe es capaz de inducir una respuesta humoral en términos de anticuerpos neutralizantes contra la gripe.
2. La vacuna del punto 1, que comprende además un adyuvante.
3. Una vacuna del punto 1 para su uso en un método de vacunación de un ser humano contra una infección por el virus de la gripe.
4. La vacuna para su uso según el punto 3, en donde la vacuna genera una respuesta de linfocitos B.
5. La vacuna para su uso según el punto 3, en donde la vacuna genera una respuesta inmunitaria de memoria.
6. La vacuna para su uso según el punto 3, en donde la administración se realiza mediante una inyección intradural, una inyección subcutánea, una inyección intravenosa, una administración oral, una administración mucosa, una administración intranasal o una administración pulmonar.

En la presente memoria se describen polipéptidos que corresponden a una porción de una proteína M1 del virus de la gripe. Estos polipéptidos corresponden a secuencias de M1 procedentes de la región C-terminal de la proteína M1. La porción C-terminal de la secuencia polipeptídica de M1, que está expuesta en la superficie del virus de la gripe, puede ser la diana para la protección inmunitaria. Los polipéptidos pueden estar dentro del tramo de restos de aminoácido 215 a 252 de la porción C-terminal de la proteína M1. Los polipéptidos pueden estar dentro del tramo de restos de aminoácido 215 a 241 de la proteína M1. Los polipéptidos de M1 también pueden estar dentro del tramo de restos de aminoácido 220-238 de la proteína M1. El polipéptido de M1 puede comprender 7-37 aminoácidos contiguos del polipéptido de M1 que se encuentra en el tramo de restos 215-252 de la proteína M1. Los polipéptidos de M1 pueden comprender al menos 15-50 aminoácidos. Los polipéptidos de M1 pueden comprender 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y/o 50 aminoácidos. Los polipéptidos de M1 pueden utilizarse para producir una respuesta inmunitaria protectora/terapéutica en un organismo susceptible a la gripe. El organismo puede ser un ser humano, un canino, o un ganado comercialmente valioso. El organismo puede ser un ser humano. La composición del polipéptido de M1 puede ser capaz de inducir al menos uno de: una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta inmunitaria de linfocitos T tal como una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4 y una respuesta de memoria de linfocitos B contra dicho polipéptido de M1.

Además, en la presente memoria se describen anticuerpos específicos para las secuencias polipeptídicas de M1 descritas en la presente memoria. Los anticuerpos anti-polipéptido de M1 se pueden utilizar para el tratamiento o la prevención de la gripe en organismos que están o pueden estar infectados por el virus de la gripe. El organismo puede ser un ser humano, un canino, o un ganado comercialmente valioso. El organismo puede ser un ser humano. El tratamiento del organismo con un anticuerpo o anticuerpos anti-polipéptido de M1 puede reducir la gravedad de los síntomas de la gripe y/o el período de tiempo de los síntomas de la gripe.

Los anticuerpos anti-polipéptido de M1 pueden utilizarse en el tratamiento de organismos para prevenir la infección por virus de la gripe o para mejorar una futura infección por virus de la gripe. El organismo puede ser un ser humano, un canino, o un ganado comercialmente valioso. El organismo puede ser un ser humano. Los anticuerpos anti-polipéptido de M1 pueden utilizarse de forma profiláctica para generar inmunidad pasiva en un organismo.

Los anticuerpos anti-polipéptido de M1 pueden tener en un organismo una semivida de 1-4 semanas o más. Los anticuerpos anti-polipéptido de M1 pueden tener en un organismo una semivida de 2 semanas. La inmunidad pasiva generada en un organismo a partir del anticuerpo anti-polipéptido de M1 puede durar al menos 2-3 semividas. La inmunidad pasiva generada en un organismo a partir del anticuerpo anti-polipéptido de M1 puede durar 1-6 semanas, o 2, 3, 4, 5 o 6 meses.

Los anticuerpos anti-polipéptido de M1 se pueden diseñar técnicamente para que tengan una semivida de 4-12 semanas. Los anticuerpos anti-polipéptido de M1 pueden ser quiméricos, humanizados o humaneered®, o son anticuerpos humanos. Los anticuerpos anti-polipéptido de M1 pueden conjugarse con moléculas que aumentan la semivida en un organismo. Los anticuerpos anti-polipéptido de M1 pueden conjugarse con polietilenglicol u otro polímero adecuado para aumentar la semivida del anticuerpo.

Las figuras muestran:

La FIG. 1 muestra un ensayo de inhibición de placas de PR/8 mediante 2B-B10-G9.

La FIG. 2 muestra un ensayo de inhibición de placas de cepas de la gripe adicionales mediante 2B-B10-G9.

Definiciones

Como se emplea en esta memoria, un "anticuerpo" se refiere a una proteína definida funcionalmente como una proteína de unión y definida estructuralmente como comprendiendo una secuencia de aminoácidos que se reconoce como obtenida de la región marco conservada de un gen que codifica una inmunoglobulina. Un anticuerpo puede consistir en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulinas o fragmentos de genes de inmunoglobulinas. Los genes de inmunoglobulinas reconocidos incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como una infinidad de genes de región variable de inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Se sabe que una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) gamma típica comprende un tetrámero. Cada tetrámero se compone de dos parejas idénticas de cadenas polipeptídicas, teniendo cada pareja una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento de antígenos. Las expresiones cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligera y pesada, respectivamente.

Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados. Por lo tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región de bisagra para producir F(ab')₂, un dímero de Fab' que es de forma natural, él mismo, una cadena ligera unida a las V_H-CH1-bisagra mediante un enlace disulfuro. El F(ab')₂ se puede reducir en condiciones suaves para romper el enlace (o enlaces) disulfuro en la región bisagra, convirtiendo de este modo el dímero (Fab')₂ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpos). Si bien se definen diversos fragmentos de anticuerpos en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que los fragmentos se pueden sintetizar químicamente *de novo* o utilizando la metodología del ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se emplea en esta memoria, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o sintetizados utilizando metodologías del ADN recombinante. Los anticuerpos preferidos incluyen dímeros V_H-V_L, entre ellos anticuerpos monocatenarios (anticuerpos que existen como una única cadena polipeptídica), tales como anticuerpos Fv monocatenarios (sFv o scFv) en los que una región pesada variable y una región ligera variable se unen (directamente o mediante un enlazador peptídico) para formar un polipéptido continuo. El anticuerpo Fv monocatenario es un heterodímero V_H-V_L unido covalentemente que puede expresarse a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias codificantes de V_H y V_L unidas directamente o unidas por un enlazador que codifica un péptido (p. ej., Huston *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 85:5879-5883, 1988). Si bien los V_H y la V_L están conectadas a cada uno como una única cadena polipeptídica, los dominios V_H y V_L se asocian de forma no covalente. Como alternativa, el anticuerpo puede ser otro fragmento. Además se pueden generar otros

fragmentos, incluyendo mediante el uso de técnicas recombinantes. Por ejemplo, las moléculas de Fab se pueden presentar en fagos si una de las cadenas (pesada o ligera) se fusiona con la proteína de la cápside g3 y la cadena complementaria se exporta al periplasma como una molécula soluble. Las dos cadenas pueden estar codificadas en el mismo o en distintos replicones; las dos cadenas de anticuerpos en cada molécula de Fab se ensamblan postraduccionalmente y el dímero se incorpora a la partícula del fago a través del enlace de una de las cadenas a g3p (véase, p. ej., la patente de EE.UU. N.º: 5.733.743). Los expertos en la técnica conocen los anticuerpos scFv y una serie de otras estructuras que convierten las cadenas polipeptídicas ligera y pesada agregadas de forma natural pero químicamente separadas de una región V de anticuerpo en una molécula que se pliega en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión al antígeno (véase, p. ej., las patentes de EE.UU. N.º 5.091.513; 5.132.405; y 4.956.778). Los anticuerpos particularmente preferidos incluyen todos los que se han presentado en fagos o generado mediante tecnología recombinante utilizando vectores en que las cadenas se secretan como proteínas solubles, p. ej., scFv, Fv, Fab, (Fab')₂. Los anticuerpos también pueden incluir diacuerpos y minicuerpos.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria también incluyen dímeros de cadenas pesadas, tales como los anticuerpos de camélidos. Dado que en un camélido la región V_H de una IgG de dímero de cadenas pesadas no tiene que realizar interacciones hidrófobas con una cadena ligera, en un camélido la región de la cadena pesada que normalmente se pone en contacto con una cadena ligera se cambia a restos de aminoácidos hidrófilos. Los dominios V_H de las IgG de dímeros de cadenas pesadas se llaman dominios V_{Hh}.

En los camélidos, la diversidad del repertorio de anticuerpos está determinada por las regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 en las regiones V_H o V_{Hh}. La CDR3 en la región V_{Hh} de camello se caracteriza por su longitud relativamente larga, con un promedio de 16 aminoácidos (Muyldermans *et al.*, Protein Engineering 7(9): 1129, 1994). Esto contrasta con las regiones CDR3 de anticuerpos de muchas otras especies. Por ejemplo, la CDR3 de la V_H de ratón tiene un promedio de 9 aminoácidos.

Las bibliotecas de regiones variables de anticuerpos procedentes de camélidos, que mantienen la diversidad *in vivo* de las regiones variables de un camélido, pueden ser fabricarse mediante, por ejemplo, los métodos descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US20050037421, publicada el 17 de febrero de 2005.

La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo de acción importante de los anticuerpos. La ADCC puede potenciarse mediante varios métodos, muchos de los cuales implican un producto final de anticuerpo con una unión Fc-receptor mejorada. Se ha demostrado que las sustituciones de aminoácidos en la región Fc del anticuerpo aumentan la afinidad de unión al Fc para el receptor FcγRIIIa en las células NK (Natsume *et al.*, Drug Design, Development and Therapy, 2009, vol. 3, págs. 7-16) y mejoran la actividad de ADCC. Otro método para mejorar la ADCC es cambiar la composición de azúcares de la glucosilación de los anticuerpos. Esto se hace fabricando anticuerpos que carecen de restos de fucosa, lo que es decir, un anticuerpo 'afucosilado' o 'desfucosilado'. Un método implica cambiar/modificar el sitio de glucosilación del anticuerpo para que no se pueda añadir fucosa al anticuerpo (patente de EE. UU. N.º 6.194.551, del 27 de febrero de 2001). Otro método es eliminar una fucosa preexistente en un anticuerpo mediante, por ejemplo, degradación enzimática o eliminación de la fucosa por cualquier otro medio. Otro método implica la ingeniería genética del sistema de expresión del hospedador para que la fucosa no se pueda transferir ni añadir al anticuerpo, por ejemplo, mediante la supresión o delección de la actividad de fucosil transferasa (publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N.º: 20070134759, del 14 de junio de 2007; y 20080166756, del 10 de julio de 2008).

Como se emplea en esta memoria, la expresión "de origen natural" significa que los componentes están codificados por un único gen que no fue alterado por medios recombinantes y que preexiste en un organismo, p. ej., en una biblioteca de anticuerpos que se creó a partir de células vírgenes o de células expuestas a un antígeno.

Como se emplea en esta memoria, el término "antígeno" se refiere a sustancias que son capaces, en condiciones apropiadas, de inducir una respuesta inmunitaria específica y de reaccionar con los productos de esa respuesta, tales como, con anticuerpos específicos o linfocitos T sensibilizados de forma específica, o ambos. Los antígenos pueden ser sustancias solubles, tales como toxinas y proteínas extrañas, o partículas, tales como bacterias y células de tejidos; sin embargo, sólo la porción de la molécula proteica o de polisacárido conocida como determinante antigénico (epítopos) se combina con el anticuerpo o un receptor específico en un linfocito. De manera más amplia, el término "antígeno" puede utilizarse para referirse a cualquier sustancia a la que se une un anticuerpo, o para la cual se desean anticuerpos, independientemente de si la sustancia es inmunogénica. Para tales antígenos, los anticuerpos pueden identificarse mediante métodos recombinantes, independientemente de cualquier respuesta inmunitaria.

Como se emplea en esta memoria, el término "epítopo" se refiere al sitio en un antígeno o hapteno al que responden linfocitos B y/o linfocitos T específicos. El término también se utiliza indistintamente con "determinante antigénico" o "sitio determinante antigénico". Los epítopos incluyen la porción de un antígeno u otra macromolécula capaz de formar una interacción de unión que interactúa con el bolsillo de unión de la región variable de un anticuerpo.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "especificidad de unión" de un anticuerpo se refiere a la identidad del antígeno al que se une el anticuerpo, preferiblemente a la identidad del epítopo al que se une el anticuerpo.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "polinucleótido quimérico" significa que el polinucleótido comprende regiones que son de tipo silvestre y regiones que están mutadas. Además, puede significar que el polinucleótido comprende regiones de tipo silvestre de un polinucleótido y regiones de tipo silvestre de otro polinucleótido relacionado.

- 5 Como se emplea en esta memoria, la expresión "región determinante de complementariedad" o "CDR" se refiere al término reconocido en la técnica como lo ejemplifican Kabat y Chothia. Las CDR también se conocen generalmente como regiones hipervariables o bucles hipervariables (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987; Chothia *et al.*, *Nature* 342: 877, 1989; E. A. Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md.) (1987); y Tramontano *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:175, 1990). "Región marco conservada" o "FR" se refiere a la región del dominio V que flanquea las CDR. Las posiciones de las CDR y de las regiones marco conservadas se pueden determinar utilizando diversas definiciones bien conocidas en la técnica, p. ej., Kabat, Chotia, base de datos internacional ImMunoGeneTics (IMGT) y AbM (ver, p. ej., Johnson *et al.*, citado anteriormente; Chothia y Fesk, "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins", *J. Mol. Biol.* 196, 901-917, 1987; Chothia C. *et al.*, "Conformations of immunoglobulin hypervariable regions", *Nature* 342:877-883, 1989; Chothia C. *et al.*, "Structural repertoire of the human VH segments", *J. Mol. Biol.* 227:799-817, 1992; Al-Fazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273(4):927-48, 1997). Las definiciones de los sitios de combinación de antígenos también se describen en lo siguiente: Ruiz *et al.*, "IMGT, the international ImMunoGeneTics database", *Nucleic Acids Res.*, 28:219-221, 2000; Fefranc, M.-P., "IMGT, the international ImMunoGeneTics database", *Nucleic Acids Res.* 29(1):207-9, 2001; MacCallum *et al.*, "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography", *J. Mol. Biol.*, 262(5):732-745, 1996; Martin *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86:9268-72, 1989; Martin *et al.*, *Methods Enzymol.*, 203:121-153, 1991; Pedersen *et al.*, *Immunomethods*, 1:126, 1992; y Rees *et al.*, En Sternberg M. J. E. (ed.), *Protein Structure Prediction*. Oxford University Press, Oxford, pág. 141-172 (1996)).

- 25 Como se emplea en esta memoria, el término "hapteno" es una pequeña molécula que, cuando se une a un transportador más grande, tal como una proteína, puede suscitar una respuesta inmunitaria en un organismo, p. ej., tal como la producción de anticuerpos que se unen específicamente a él (en estado libre o combinado). Un "hapteno" es capaz de unirse a un anticuerpo preformado, pero puede no estimular la generación de anticuerpos por sí solo. En el contexto de la presente descripción, el término "hapteno" incluye aminoácidos modificados, ya sea de origen natural o no natural. Por lo tanto, por ejemplo, el término "hapteno" incluye aminoácidos de origen natural modificados tales como fosfotirosina, fosfotreonina, fosfoserina, o restos sulfatados tales como tirosina sulfatada (sulfotirosina), serina sulfatada (sulfoserina) o treonina sulfatada (sulfotreonina); y también incluye aminoácidos de origen no natural modificados tales como p-nitrofenilalanina.

- 35 Como se emplea en esta memoria, la expresión "célula hospedadora" se refiere a una célula procariota o eucariota en la que se pueden introducir, expresar y/o propagar los vectores descritos en la presente memoria. Una célula hospedadora microbiana es una célula de un microorganismo procariota o eucariota, incluyendo bacterias, levaduras, hongos microscópicos y fases microscópicas en el ciclo de vida de hongos y mohos limosos. Las células hospedadoras procariotas típicas incluyen diversas cepas de *E. coli*. Las células hospedadoras eucariotas típicas son levaduras u hongos filamentosos, o células de mamífero, tales como las células de ovario de hámster chino, los fibroblastos murinos NIH 3T3, las células 193 de riñón embrionario humano, o células de mieloma o hibridoma de roedor.

- 40 Como se emplea en esta memoria, la expresión "respuesta inmunológica" frente a una composición o vacuna es el desarrollo en el hospedador de una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos y/o celular frente a una composición o vacuna de interés. Habitualmente, una "respuesta inmunológica" incluye, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, linfocitos B, linfocitos T auxiliares y/o linfocitos T citotóxicos, dirigidos específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el hospedador presentará una respuesta inmunológica terapéutica o protectora de modo que se potenciará la resistencia a una nueva infección y/o se reducirá la gravedad clínica de la enfermedad. Dicha protección se demostrará mediante la reducción o la ausencia de los síntomas que normalmente presenta un hospedador infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título vírico reducido en el hospedador infectado.

- 50 Como se emplea en esta memoria, el término "aislado" se refiere a un ácido nucleico o polipéptido separado no solo de otros ácidos nucleicos o polipéptidos que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico o polipéptido, sino también de polipéptidos, y preferiblemente se refiere a un ácido nucleico o polipéptido que se encuentra en presencia de (si acaso) un solo un disolvente, tampón, ion, u otro componente normalmente presente en una solución del mismo. Los términos "aislado" y "purificado" no abarcan ácidos nucleicos o polipéptidos presentes en su fuente natural.

- 55 Como se emplea en esta memoria, el término "purificado" significa que el ácido nucleico o polipéptido indicado está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas, p. ej., polinucleótidos, proteínas y similares. El polinucleótido o polipéptido se puede purificar de manera que constituya al menos el 95 % en peso, más preferiblemente al menos el 99,8 % en peso, de las macromoléculas biológicas indicadas presentes (pero pueden estar presentes agua, tampones y otras moléculas pequeñas, especialmente moléculas que tienen un peso molecular de menos de 1000 daltons).

- 60 Como se emplea en esta memoria, la expresión "ácido nucleico recombinante" se refiere a un ácido nucleico en una forma que normalmente no se encuentra en la naturaleza. Es decir, un ácido nucleico recombinante está flanqueado

por una secuencia nucleotídica que no flanquea naturalmente al ácido nucleico o tiene una secuencia que normalmente no se encuentra en la naturaleza. Los ácidos nucleicos recombinantes se pueden formar originalmente *in vitro* mediante la manipulación del ácido nucleico mediante endonucleasas de restricción, o alternativamente utilizando técnicas tales como la reacción en cadena de la polimerasa. Se entiende que una vez que se fabrica un

5 ácido nucleico recombinante y se reintroduce en una célula u organismo hospedador, se replicará de forma no recombinante, es decir, utilizando la maquinaria celular *in vivo* de la célula hospedadora en lugar de manipulaciones *in vitro*; sin embargo, tales ácidos nucleicos, una vez producidos de forma recombinante, aunque posteriormente se replican de forma no recombinante, todavía se consideran recombinantes a los efectos de la descripción.

10 Como se emplea en esta memoria, la expresión "polipéptido recombinante" se refiere a un polipéptido expresado a partir de un ácido nucleico recombinante, o un polipéptido que se sintetiza químicamente *in vitro*.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "variante recombinante" se refiere a cualquier polipéptido que difiera de los polipéptidos de origen natural por inserciones, supresiones y sustituciones de aminoácidos, creado utilizando técnicas del ADN recombinante. La orientación para determinar qué restos de aminoácido pueden reemplazarse, añadirse o eliminarse sin abolir actividades de interés, tales como las actividades enzimáticas o de unión, puede

15 encontrarse comparando la secuencia del polipéptido particular con la de péptidos homólogos y minimizando el número de cambios de secuencia de aminoácidos realizados en regiones de alta homología.

Preferiblemente, las "sustituciones" de aminoácidos pueden ser el resultado de reemplazar un aminoácido por otro aminoácido que tenga propiedades estructurales y/o químicas similares, es decir, reemplazos conservativos de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse basándose en la similitud en la polaridad, carga,

20 solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o en la naturaleza anfipática de los restos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; los aminoácidos con carga positiva (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y los aminoácidos con carga negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

25 Como se emplea en esta memoria, los términos "repertorio" o "biblioteca" se refieren a una biblioteca de genes que codifican anticuerpos o fragmentos de anticuerpos tales como Fab, scFv, Fd, LC, V_H o V_L, o un subfragmento de una región variable, p. ej., un casete de intercambio, que se obtiene de un conjunto natural, o "repertorio", de genes de anticuerpos presentes, p. ej., en donantes humanos, y obtenidos principalmente a partir de células de sangre periférica y bazo. Los donantes humanos pueden ser "no inmunes", es decir, no presenta síntomas de infección. En la descripción

30 actual, una biblioteca o repertorio a menudo comprende miembros que son casetes de intercambio de una porción dada de una región V. El término Fd significa la porción de la cadena pesada que está incluida en el fragmento Fab.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "biblioteca de anticuerpos sintéticos" se refiere a una biblioteca de genes que codifican uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos tales como Fab, scFv, Fd, LC, V_H o V_L, o un subfragmento de una región variable, p. ej., un casete de intercambio, en el que una o más de las regiones

35 determinantes de complementariedad (CDR) se han alterado parcial o totalmente, p. ej., mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos. "Aleatorizado" significa que parte o toda la secuencia que codifica la CDR se ha reemplazado por una secuencia que codifica aleatoriamente los veinte aminoácidos o algún subconjunto de los aminoácidos.

Como se emplea en esta memoria, el término "multivalente", significa que la vacuna contiene polipéptidos de M1 de al menos dos aislados de gripe que tienen distintas secuencias de aminoácidos, o que la vacuna contiene un

40 polipéptido de M1 de un aislado de gripe y una preparación antigénica de otro aislado de gripe distinto del aislado del polipéptido de M1.

Como se emplea en esta memoria, el término "mamífero" se refiere a animales vertebrados de sangre caliente, todos los cuales poseen pelo y amamantan a sus crías.

45 Como se emplea en esta memoria, el término "proteína", "péptido", "polipéptido" y "fragmento de polipéptido" se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a polímeros de restos de aminoácido de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados o análogos de aminoácidos, y puede estar interrumpido por fracciones químicas distintas de aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de manera natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como

50 conjugación con un componente de marcaje o bioactivo.

Como se emplea en esta memoria, el término "heterólogo", cuando se utiliza con referencia a porciones de un polinucleótido, indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce normalmente de forma recombinante, teniendo dos o más secuencias, p. ej., de genes no relacionados dispuestos para fabricar un nuevo ácido nucleico

55 funcional. De forma similar, un polipéptido o proteína "heteróloga" se refiere a dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza.

Los términos singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto claramente indique otra cosa. De forma similar, se pretende que la palabra "o/u" incluya a "y/e" a menos que el contexto indique claramente

lo otra cosa. Se pretende que las limitaciones numéricas proporcionadas con respecto a las concentraciones o niveles de una sustancia, tales como un antígeno, sean aproximadas. Por lo tanto, cuando se indica que una concentración es al menos (por ejemplo) de 200 µg, se pretende que se entienda que la concentración es al menos aproximadamente "como de" o "de alrededor de" 200 µg.

5 Polipéptidos de M1

En la presente memoria se describe un método para inducir una respuesta inmunitaria, en particular una respuesta inmunitaria primaria, contra el virus de la gripe en un individuo o población humana, comprendiendo dicho método la administración de una composición de polipéptido de M1 que comprende un polipéptido de M1 descrito en la presente memoria o una preparación antigénica del mismo. La respuesta inmunitaria puede obtenerse en un individuo o población humana sin exposición previa, inmunodeprimida o previamente infectada.

La proteína M, o proteína de matriz, M1, es un componente estructural principal del virus de la gripe (Zhang *et al.*, "Dissection of Influenza A Virus M1 Protein: pH-Dependent Oligomerization of N-Terminal Domain and Dimerization of C-Terminal Domain", PLoS ONE 7(5): e37786, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0037786). El gen de M codifica dos proteínas, M1 y M2. La proteína M1 está altamente conservada en todos los subtipos de virus de gripe de tipo A, que es el subtipo de gripe clínicamente más importante. Una porción C-terminal de la proteína M1 está expuesta extracelularmente en el virus y, considerando su alta conservación de secuencia, representa una excelente diana para un inmunógeno de una vacuna de subunidades universal.

Los polipéptidos de M1 diana pueden abarcar restos de aminoácido en el extremo C de la proteína M1, específicamente los restos de aminoácido 215-252, 215-240 o 220-238 de la proteína M1. El polipéptido de M1 puede ser GTHPSSSAGLKNDLLENLQ (SEQ ID NO: 1), AMRTIGTHPSSSAGLKNDLLENLQAYQKRMGVQMQRFK (SEQ ID NO:2) o un polipéptido que consiste en los aminoácidos contiguos de esta secuencia de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 y/o 38 aminoácidos. Los polipéptidos de M1 descritos en la presente memoria pueden incluir variantes de cepas de origen natural, tales como, por ejemplo, A/Bangkok/163/2000 (GTHPSSSTGLKNDLLENLQ) (SEQ ID NO:3); A/PR/8/34 (GTHPSSSAGLKNDLLENLQ) (SEQ ID NO:1); A/AA/Huston/1945 (GTHPSSSAGLKDDLLENLQ) (SEQ ID NO:4); A/Berlín/6/2006 (GTHPSSSTGLKNDLLDNLQ) (SEQ ID NO:5); A/Brandeburgo/1/2006 (GTHPNSSTGLKNDLLENLQ) (SEQ ID NO:6); A/Brevig Mission/1/1918 (GTHPSSSAGLKDDLLENLQ) (SEQ ID NO:7); A/Chile/8885/2001 (GTHPSSSTGLKDDLLENLQ) (SEQ ID NO:8); A/DaNang/DN311/2008 (GTHPSSSTGLRDDLLENLQ) (SEQ ID NO:9); A/FLW/1951 (GTRPSSSAGLKDDLLENLQ) (SEQ ID NO: 10); A/FW/1/1950 (GTHPRSSAGLKDDLLENLQ) (SEQ ID NO: 11); A/Fiyi/15899/83 (GTHPSSSAGLKNDLFENLQ) (SEQ ID NO: 12); A/Fort Monmouth/1-MA/1947 (GTHPSSSAGLKNDLLENLQ) (SEQ ID NO:13); A/Hanói/TX233/2008 (GTHPSSSTGLKSDLLENLQ) (SEQ ID NO: 14); A/Iowa/CEID23/2005 (GTHPNSSTGLKDDLLENLQ) (SEQ ID NO:15); A/Malasia/35164/2006 (GTHPSSSTGLKKDLDN) (SEQ ID NO:16); A/Managua/4086.04/2008 (GTHPSSSNGLKNDLLEN) (SEQ ID NO:17); A/Tejas/VR06-0502/2007 (GTHPSSSTGLRNDLLENLQ) (SEQ ID NO:18); A/WSN/1933 (GTHPSSSAGLKSDLLENLQ) (SEQ ID NO: 19); A/Colorado/18/2011 (GTHPSSSAGLRDDLLENLQ) (SEQ ID NO:20); A/Kentucky/04/2010 (GTHPNSSAGLKDDLLENLQ) (SEQ ID NO:21); A/Maryland/28/2009 (GTHPSSSAGLKDDLGNLQ) (SEQ ID NO:22); A/Nuevo México/05/2012 (GTHPSSSSGLRNDLLENLQ) (SEQ ID NO:23); A/Filipinas/TMC10-135/2010 (GTHPSSSAGLRDDLLENLQ) (SEQ ID NO:24); A/Singapur/GP4307/2010 (GTHPSSSAGLKDDLLENLQ) (SEQ ID NO:25); A/Singapur/GP489/2010 (GTHPSSSAGLKDALLENLQ) (SEQ ID NO:26); A/Boston/14/2007 (GTHPSSSTGLRDDLLEKLQ) (SEQ ID NO:27); A/Brisbane/09/2006 (GTHPSSSTGLRNDLLENLQ) (SEQ ID NO:28); A/Hong Kong/CUH34175/2002 (GTHPSSSNGLRDDLLENLQ) (SEQ ID NO:29); A/Kirguistán/WRAIR1256P/2008 (GTHPSSSTGLRDDLLGNLQ) (SEQ ID NO:30); A/Malasia/12550/1997 (GTHPSSSTGLRDDLLDNLQ) (SEQ ID NO:31); A/Nankín/1663/2010 (GTHPSSSTGLRGDDLLENLQ) (SEQ ID NO:32); A/Wyoming/08/2010 (GTHPSSSTGLRDDLLINLQ) (SEQ ID NO:33); A/Berkeley/1/1968 (GTHPSSSAGLKNDLLENLQ) (SEQ ID NO:34); A/Corea/426/1968 (GTHPSSSAGLKDDLLENLQ) (SEQ ID NO:35).

Los polipéptidos de M1 descritos en la presente memoria pueden comprender la secuencia 220-238 de la proteína M1, GTHPSSSAGLKNDLLENLQ (SEQ ID NO: 1), o variantes con una o más de las siguientes sustituciones: H en 222 cambiada a R o N, S en 224 cambiada a R o N, A en 227 cambiada a T o N, K a 230 cambiada a R, N en 231 cambiada a D, S o K, D en 232 cambiada a N o G, L en 234 cambiada a F o I, E en 235 cambiada a D, H o K, N en 236 cambiada a H o K.

220	238	
G	T	H P S S S A G L K N D L L E N L Q (SEQ ID NO:1)
	R	R T R D N F D H (SEQ ID NO:36)
	N	N N S G I H K
		K K

Los polipéptidos de M1 descritos en la presente memoria pueden abarcar las siguientes variantes de secuencia:

220

238

G T X P X S S X G L X X X L X X X L Q (SEQ ID NO:37),

en que X = cualquier aminoácido.

Los polipéptidos de M1 descritos en la presente memoria son capaces de proteger contra la gripe. Es decir, son capaces de estimular una respuesta inmunitaria en un animal. El antígeno puede comprender un polipéptido de M1 solo o conjugado con un transportador, o estar presentado en un armazón; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; un epítipo, un hapteno o cualquier combinación de los mismos.

Los polipéptidos de M1 descritos en la presente memoria abarcan fragmentos inmunogénicos y variantes de polipéptidos de M1. Por lo tanto, la expresión "polipéptido inmunogénico o antigénico" contempla además delecciones, adiciones y sustituciones en la secuencia, siempre que el polipéptido funcione para producir una respuesta inmunológica como se define en la presente memoria. El fragmento y las variantes pueden tener una o más delecciones, adiciones y sustituciones en la secuencia. El fragmento y las variantes pueden tener 1, 2, 3 o más delecciones, adiciones y/o sustituciones en la secuencia. Las adiciones y delecciones pueden estar en el interior, en el extremo carboxilo y/o el amino de la secuencia, donde la variante conserva la capacidad de producir una respuesta inmunológica como se define en la presente memoria. La expresión "variación conservativa" indica el reemplazo de un resto de aminoácido por otro resto biológicamente similar, o el reemplazo de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico de manera que el resto de aminoácido codificado no cambie o cambie a otro resto estructuralmente, químicamente o de otro modo funcionalmente similar. En este sentido, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservativa, es decir, las sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos generalmente se dividen en cuatro familias: (1) ácidos--aspartato y glutamato; (2) básicos--lisina, arginina, histidina; (3) no polares--alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga--glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina y tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican como aminoácidos aromáticos. Los ejemplos de variaciones conservativas incluyen la sustitución de un resto hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro resto hidrófobo, o la sustitución de un resto polar por otro resto polar, tal como la sustitución de lisina por arginina, de ácido aspártico por ácido glutámico o de asparagina por glutamina, y similares; o un reemplazo conservativo similar de un aminoácido por un aminoácido relacionado estructuralmente que no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de referencia pero que poseen sustituciones de aminoácidos menores que no afectan sustancialmente a la inmunogenicidad de la proteína están, por lo tanto, dentro de la definición del polipéptido de referencia. Todos los polipéptidos producidos por estas modificaciones están incluidos en la presente memoria. La expresión "variación conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido siempre que los anticuerpos producidos contra el polipéptido sustituido también inmunorreacten con el polipéptido no sustituido.

Se pretende que polipéptido de M1 "variante" signifique secuencias sustancialmente similares. Para polinucleótidos, una variante comprende una delección y/o adición de uno o más nucleótidos en uno o más sitios dentro del polinucleótido nativo y/o una sustitución de uno o más nucleótidos en uno o más sitios en el polinucleótido nativo. Como se emplea en esta memoria, un polinucleótido o polipéptido "nativo" comprende una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos de origen natural, respectivamente. Se pueden evaluar también variantes de un polinucleótido particular descrito en la presente memoria (es decir, el polinucleótido de referencia) mediante comparación del porcentaje de identidad de secuencia entre el polipéptido codificado por un polinucleótido variante y el polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Se pretende que proteína "variante" signifique una proteína obtenida de la proteína nativa mediante delección o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en la proteína nativa, y/o la sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en la proteína nativa. Las proteínas variantes abarcadas por la presente descripción son biológicamente activas, es decir, poseen la capacidad de suscitar una respuesta inmunitaria.

Se pretende que los homólogos de polipéptidos de M1 de otras cepas y subtipos del virus de la gripe estén dentro del alcance de la presente descripción. Como se emplea en esta memoria, el término "homólogos" incluye análogos y parálogos. El término "análogos" se refiere a dos polinucleótidos o polipéptidos que tienen la misma función o una función similar, pero que han evolucionado por separado en organismos hospedadores no relacionados. El término "parálogos" se refiere a dos polinucleótidos o polipéptidos que están relacionados por duplicación dentro de un genoma. Habitualmente los parálogos tienen distintas funciones, pero estas funciones pueden estar relacionadas. Los análogos y parálogos de un polipéptido del virus de la gripe de tipo silvestre pueden diferir del polipéptido del virus de la gripe de tipo silvestre por modificaciones postraduccionales, por diferencias en la secuencia de aminoácidos, o por ambos. En particular, los homólogos descritos en la presente memoria presentarán generalmente al menos el 80-85 %, 85-90 %, 90-95 %, o el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, con la totalidad o parte de las secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas del virus de la gripe de tipo silvestre, y presentarán una función similar. Las variantes incluyen variantes alélicas. La expresión "variante alélica" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que contiene polimorfismos que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de una proteína y que existen dentro de una población natural (p. ej., una especie o variedad de virus). Dichas variaciones alélicas naturales normalmente pueden dar como resultado una variación del 1-5 % en un polinucleótido o polipéptido. Las variantes alélicas pueden identificarse secuenciando la secuencia de ácido nucleico de interés en varias especies distintas, lo

que se puede llevar a cabo fácilmente utilizando sondas de hibridación para identificar el mismo locus genético en esas especies. Todas y cada una de tales variaciones de ácidos nucleicos y polimorfismos de aminoácidos resultantes o variaciones que son el resultado de una variación alélica natural y que no modifican la actividad funcional del gen de interés, están destinados a estar dentro del alcance de la descripción.

5 Como se emplea en esta memoria, el término "derivado" o "variante" se refiere a un polipéptido de M1, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de M1, que tiene una o más variaciones conservativas de aminoácido u otras modificaciones menores tales que (1) el polipéptido correspondiente tenga una función sustancialmente equivalente en comparación con el polipéptido de tipo silvestre o (2) un anticuerpo generado contra el polipéptido sea inmunorreactivo con el polipéptido de tipo silvestre. Estas variantes o derivados incluyen polipéptidos que tienen
10 modificaciones menores de las secuencias de aminoácidos primarias del polipéptido del virus de la gripe que pueden dar como resultado péptidos que tienen una actividad sustancialmente equivalente en comparación con el polipéptido homólogo no modificado. Dichas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida, o pueden ser espontáneas. El término "variante" contempla además delecciones, adiciones y sustituciones en la secuencia, siempre que el polipéptido funcione para producir una respuesta inmunológica como se define en la presente memoria. El término "variante" también incluye la modificación de un polipéptido en que el péptido señal
15 nativo se reemplaza por un péptido señal heterólogo para facilitar la expresión o secreción del polipéptido a partir de especie hospedadoras. El término "variante" también puede incluir "mimitopos", que son secuencia de proteínas completamente distintas pero de estructura similar, que también inducen inmunidad de reacción cruzada.

Los polipéptidos de M1 descritos en la presente memoria también pueden incluir secuencias de aminoácidos para introducir un sitio de glucosilación u otro sitio para la modificación o derivatización del polipéptido de M1. Los polipéptidos de M1 descritos en la presente memoria pueden incluir la secuencia de aminoácidos N-X-S o N-X-T, que puede actuar como un sitio de glucosilación. Durante la glucosilación, una cadena de oligosacárido se une a la asparagina (N) que se encuentra en la secuencia tripeptídica N-X-S o N-X-T, en que X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro. Esta secuencia se llama secuencia de glucosilación. Este sitio de glucosilación se puede colocar en el extremo N, en el extremo C, o dentro de la secuencia interna de la secuencia de la proteína M1 utilizada para el polipéptido de M1.
20

Cualquiera de los polipéptidos de M1 descritos en la presente memoria también se puede utilizar en un conjugado de hapteno. Dichos conjugados pueden utilizar un polipéptido transportador adecuado y/o un polipéptido de armazón para presentar el epitopo (o epitopos) del polipéptido de M1 al sistema inmunitario del organismo. Por ejemplo, el polipéptido de M1 puede insertarse en la CDR3 o reemplazar completamente la CDR3, de un anticuerpo monoclonal. En este caso, el mayor efecto adyuvante se logrará utilizando para la inmunización un armazón de anticuerpo monoclonal de una especie distinta a la del sujeto. Estos haptenos de polipéptidos de M1 pueden aumentar o crear una respuesta inmunitaria frente al polipéptido de M1. Las moléculas transportadoras adecuadas son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, KLH, ovoalbúmina, toxina colérica, toxina diftérica y toxina tetánica.
30

Las técnicas convencionales de biología molecular para preparar y purificar construcciones de ADN permiten la preparación de los conjugados de hapteno con los polipéptidos de M1 descritos en la presente memoria. Estas técnicas de biología molecular se pueden utilizar para preparar las construcciones de genes que codifican los conjugados de hapteno y para preparar construcciones de expresión para la fabricación del hapteno en células hospedadoras adecuadas. Como alternativa, los haptenos descritos en la presente memoria pueden prepararse utilizando técnicas de polipéptidos convencionales para la conjugación de polipéptidos de M1 descritos en la presente memoria con polipéptidos transportadores o de armazón. Por lo tanto, aunque las técnicas convencionales de biología molecular son suficientes para la producción de los haptenos descritos en la presente memoria, los haptenos específicos descritos proporcionan nuevas opciones terapéuticas.
40

En un aspecto descrito en la presente memoria, se proporciona una composición monovalente o multivalente, p. ej., bivalente, trivalente o cuadrivalente, que comprende un polipéptido (o polipéptidos) de M1 y también puede incluir un virus de la gripe inactivado o atenuado, o una preparación antigénica del mismo, para su uso en la reducción de la gravedad o la prevención de infecciones por virus de la gripe provocadas por una cepa del virus de la gripe que es una variante antigénica de la cepa presente en dicha composición inmunogénica primaria. Como se describe en la presente memoria, el virus de la gripe inactivado o atenuado de la composición multivalente puede ser para un virus de la gripe de serotipo **B**.
50

Respuesta inmunitaria y eficacia

La vacuna del polipéptido de M1 descrita en la presente memoria puede inducir una respuesta humoral en términos de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la gripe, medida por las medias geométricas de los títulos (MGT) de los títulos de anticuerpos neutralizantes y las tasas de seroconversión (TSC) para la respuesta de anticuerpos neutralizantes (definida como el porcentaje de vacunas sin anticuerpos detectables en el día 0 y un aumento a un título de 1:28, o con un aumento de 4 veces o más en el título de anticuerpos neutralizantes después de la vacunación).
55

En particular, dicha vacunación también o adicionalmente puede generar una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4 y/o una respuesta de memoria de linfocitos **B** contra la gripe. Específicamente, el paciente humano puede ser seronegativo o inmunológicamente virgen (es decir, no tiene inmunidad preexistente) para la cepa de la vacuna. La

administración de dicha composición de polipéptido de M1 de forma alternativa o adicional puede inducir una respuesta de linfocitos B de memoria, medido por la frecuencia de linfocitos B de sangre periférica capaces de diferenciarse en células plasmáticas secretoras de anticuerpos tras el encuentro con el antígeno.

El medicamento contra la gripe descrito en la presente memoria cumple convenientemente con determinados criterios internacionales para las vacunas. Las normas exigidas se aplican internacionalmente para medir la eficacia de las vacunas contra la gripe. Las variables serológicas se evalúan según los criterios de la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos de uso humano (CHMP/BWP/214/96, Comité de Especialidades Farmacéuticas (CPMP, forma siglada de *Committee for Proprietary Medicinal Products*). Nota para la armonización de los requisitos para las vacunas contra la gripe, 1997. CHMP/BWP/214/96 circular N.º 96-0666:1-22) para ensayos clínicos relacionados con los procedimientos de autorización anual de vacunas contra la gripe (Tabla 1A). Los requisitos son distintos para las poblaciones de adultos (18-60 años) y las poblaciones de ancianos (>60 años) (Tabla 1A). Para las vacunas contra la gripe inter pandémica, al menos una de las evaluaciones (factor de seroconversión, tasa de seroconversión, tasa de seroprotección) debe cumplir con los requisitos europeos, para todas las cepas de virus de la gripe incluidas en la vacuna. La proporción de títulos igual o superior a 1:40 se considera la más importante porque se espera que estos títulos sean el mejor indicador de protección disponible actualmente (Beyer W *et al.*, Clin Drug Invest.; 15:1-12, 1998).

El organismo oficial sanitario europeo (CHMP (forma siglada de *Committee for Medicinal Products for Human Use*-Comité para la Evaluación de Medicamentos de uso humano) define una tasa de seroprotección del 70 % como uno de los tres criterios que normalmente se deben cumplir para una vacuna anual contra la gripe estacional y que el CHMP también espera que una vacuna pandémica candidata cumpla.

Sin embargo, los modelos matemáticos han indicado que una vacuna, que es, a nivel de población, sólo el 30 % eficaz contra una o más cepas heterólogas con variaciones antigénicas menores también puede ser beneficiosa para ayudar a reducir la magnitud de una pandemia y que una campaña de vacunación en pandemia utilizando una vacuna (prepandémica) con el 30 % de eficacia contra la cepa pandémica (protección cruzada del 30 %) podría reducir de forma eficaz la tasa de ataque clínico en un 75 % y, en consecuencia, la morbilidad/mortalidad dentro de la población. Por consiguiente, la inmunización primaria acelerada descrita en la presente memoria es un método para lograr la mitigación temprana de una pandemia de gripe o la contención en la fuente de una cepa del virus de la gripe reciente aparición.

La FDA ha publicado un borrador de orientación (borrador de criterios CBER (forma siglada de *Center for Biologics Evaluation and Research*, Centro de Evaluación e Investigación Biológica) (disponible en el Departamento de Comunicación, Capacitación y Asistencia de Fabricantes (HFM-40), 1401 Rockville Pike, Suite 200N, Rockville, Md. 20852-1448, o llamando al 1-800-835-4709 o 301-827-1800, o desde Internet en www.fda.gov/cber/guidelines.htm) sobre los datos clínicos necesarios para avalar la autorización de las vacunas contra la gripe pandémica, y los criterios propuestos también se basan en los criterios del CHMP. La FDA utiliza puntos de corte de edad ligeramente distintos. Los criterios de valoración apropiados también incluyen: 1) el porcentaje de sujetos que lograron un título de anticuerpos de IH de 1:40, y 2) tasas de seroconversión, definido como un aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos de IH después de la vacunación. La media geométrica del título (MGT) debe incluirse en los resultados, pero los datos deben incluir no solo la estimación puntual, sino también el límite inferior del intervalo de confianza del 95 % de la tasa de incidencia de seroconversión, y la tasa de incidencia del día 42 de los títulos de IH de 1:40 deben cumplir o superar el valor objetivo. Por lo tanto, deben proporcionarse estos datos y los intervalos de confianza (IC) del 95 % de las estimaciones puntuales de estas evaluaciones. La orientación preliminar de la FDA exigir que se cumplan ambos objetivos.

Por consiguiente, en un aspecto descrito en la presente memoria, se proporciona una composición, método o uso según la presente memoria, en donde dicha respuesta inmunitaria o protección inducida por la administración de la composición de polipéptido de M1 cumple los tres criterios normativos de la UE para la eficacia de la vacuna contra la gripe. Convenientemente, se cumplen al menos uno, convenientemente dos, o tres de los siguientes criterios para la cepa de virus de la gripe de la composición: una tasa de seroconversión de >30 %, de >40 %, de >50 % en la población seronegativa; una tasa de seroprotección de >60 %, de >70 %, de >80 % en la población seronegativa; un factor de seroconversión de >2,0, de >2,5, de >3,0, de >4,0 en la población seronegativa.

Virus de la gripe

Los virus de la gripe A evolucionan continuamente y, como consecuencia, sufren variación antigénica (Johnson N P. y Mueller J., "Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic", Bull. Hist. Med. 76:105-115, 2002). Durante los períodos inter pandémicos, los virus de la gripe que circulan están relacionados con los de la epidemia anterior. Los virus se transmiten entre personas con niveles variables de inmunidad a partir de infecciones en etapas tempranas de la vida. Dicha circulación, habitualmente durante un período de 2-3 años, y la falta de una corrección de errores eficaz por parte de la ARN polimerasa vírica, conduce a una alta tasa de errores de transcripción que puede dar como resultado sustituciones de aminoácidos en las glucoproteínas de superficie y que propicia la selección de nuevas cepas que han cambiado lo suficiente como para provocar una nueva epidemia entre la población general; este proceso se denomina 'variación antigénica menor'.

El genoma vírico segmentado permite un segundo tipo de variación antigénica. A intervalos impredecibles, si dos o más virus de la gripe infectan simultáneamente una célula hospedadora, el reordenamiento genético dará como

resultado nuevos virus de gripe. En este caso, los antígenos resultantes pueden variar del 20 % al 50 % de la proteína correspondiente de las cepas que circulaban previamente en seres humanos. Este fenómeno, llamado "variación antigénica mayor", puede generar un virus nuevo con nuevas proteínas internas o de superficie que escapa a la 'inmunidad de grupo' y establece pandemias.

- 5 Estos cambios antigénicos, tanto los 'menores' como los 'mayores' son impredecibles y pueden tener un impacto dramático desde un punto de vista inmunológico, ya que inevitablemente conducen a la aparición de nuevas cepas del virus de la gripe que permiten que el virus escape del sistema inmunitario provocando las conocidas, epidemias casi anuales.

- 10 Además de las epidemias anuales, los virus de la gripe de reciente aparición, capaces de transmitirse eficazmente de persona a persona, han provocado pandemias en el pasado, es decir, epidemias globales repentinas en todos los grupos de edad, con mayores tasas de infectividad y mortalidad. El último siglo ha sido testigo de tres pandemias de gripe, la "gripe española" en 1918-1919, responsable de la muerte de 20 a 50 millones de personas en todo el mundo, la "gripe asiática" en 1957 y la "gripe de Hong Kong" en 1968.

- 15 Las características de una cepa del virus de la gripe pandémica son: contiene una nueva hemaglutinina en comparación con la hemaglutinina en las cepas que circulan en el momento, lo que puede o no ir acompañado de un cambio en el subtipo de neuraminidasa; es capaz de transmitirse horizontalmente en la población humana; y es patógena para los seres humanos. Una nueva hemaglutinina puede ser una que no ha sido evidente en la población humana durante un período de tiempo prolongado, probablemente durante al menos una década, tal como H2 que circuló por última vez en 1957, o puede ser una hemaglutinina que nunca antes ha estado circulando en la población humana, por ejemplo, H5, H9, H7 o H6 que habitualmente se encuentran en aves. En estos casos, una gran proporción (en el caso de H2, por ejemplo) o la totalidad (en el caso de H5, H7, H6 o H9) de la población es inmunológicamente virgen para la cepa del virus de la gripe pandémica. En el presente, el virus de la gripe A que ha sido identificado por la OMS como uno que potencialmente podría provocar una pandemia de gripe en seres humanos es el virus de la gripe aviar altamente patógeno H5N1. Por lo tanto, la vacuna para pandemia para su uso descrita en la presente memoria comprenderá convenientemente el virus H5N1. Otras cepas adecuadas para su inclusión en la composición reivindicada son H9N2, H7N1, H7N7 o H2N2.
- 20
- 25

- 30 Los polipéptidos de M1 descritos en la presente memoria son menos susceptibles a tal variación antigénica debido a que (1) el genoma del virus de la gripe de la región seleccionada que codifica los polipéptidos de M1 descritos en la presente memoria también codifica una porción de la proteína M2; y (2) las proteínas M1 y M2 del virus de la gripe son proteínas estructurales que están incluidas en gran parte en la partícula del virus. Por estas dos razones, las proteínas M1 tienen menos variación de secuencia entre las cepas del virus de la gripe y probablemente tendrán menos capacidad para sustentar la rápida variación antigénica menor observada en los antígenos expuestos a la superficie, tal como la hemaglutinina.

Vacunas de ADN y ARN

- 35 Los polipéptidos de M1 descritos en la presente memoria también pueden introducirse en un organismo como una vacuna de ADN o ARN. Las vacunas de ADN o ARN descritas en la presente memoria codificarán los polipéptidos de M1 descritos en la presente memoria. Estos polipéptidos de M1 codificados pueden estar presentes en una proteína de fusión codificada con un polipéptido transportador o estar fusionados en un polipéptido de almacén.

- 40 Las técnicas convencionales de biología molecular para la preparación y purificación de construcciones de ADN o ARN permiten la preparación de opciones terapéuticas de ADN o ARN descritas en la presente memoria. Aunque las técnicas convencionales de biología molecular son suficientes para la producción de los productos descritos en la presente memoria, los productos específicos descritos en la presente memoria proporcionan nuevas opciones terapéuticas.

- 45 La cantidad de ADN o ARN expresable que se va a introducir en un receptor de vacuna dependerá de la fuerza de los promotores transcripcionales y traduccionales utilizados en la construcción de ADN o ARN, y de la inmunogenicidad del producto génico expresado. En general, se administra una dosis inmunológica o profilácticamente eficaz de aproximadamente 1 µg a 1 mg, y preferiblemente de aproximadamente 10 µg a 300 µg directamente en el tejido muscular. Además, se contemplan la inyección subcutánea, la introducción intradérmica, la impresión a través de la piel, y otros modos de administración, tales como el suministro intraperitoneal, intravenoso o por inhalación. Además, se contempla que se proporcionen vacunaciones de refuerzo.
- 50

- 55 El ADN o el ARN puede estar desnudo, es decir, no asociado con ninguna proteína, adyuvantes u otros agentes, que afecten el sistema inmunológico del receptor. En este caso, es conveniente que el ADN o el ARN esté en una solución fisiológicamente aceptable, tal como, pero no se limita a, solución salina estéril o solución salina tamponada estéril. Como alternativa, el ADN o ARN puede estar asociado con liposomas, tales como liposomas de lecitina u otros liposomas conocidos en la técnica, como una mezcla de ADN-liposoma o una mezcla de ARN-liposoma (véase, por ejemplo, el documento de patente WO93/24640), o el ADN o ARN puede estar asociado con un adyuvante conocido en la técnica para estimular las respuestas inmunitarias, tal como una proteína u otro transportador. También se pueden utilizar con ventaja agentes que ayudan en la captación celular de ADN o ARN, tales como, pero no se limitan

a, iones calcio, proteínas víricas y otros agentes que facilitan la transfección. Estos agentes se denominan generalmente agentes facilitadores de la transfección y transportadores farmacéuticamente aceptables. Como se emplea en esta memoria, el término gen se refiere a un segmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido discreto. Las expresiones producto farmacéutico y vacuna se utilizan indistintamente para indicar composiciones útiles para inducir respuestas inmunitarias. Los términos construcción y plásmido se utilizan indistintamente. El término vector se utiliza para indicar un ADN o ARN en el que se pueden clonar genes para su uso según el método descrito en la presente memoria.

Formulaciones de vacuna de ADN que comprenden una solución desmetalada que contiene un tampón fisiológicamente aceptable dentro de un intervalo de pH de al menos más de aproximadamente 8,0 a aproximadamente al menos 9,5, una sal (que incluye, pero no se limita a, NaCl, KCl o LiCl) en el intervalo de hasta aproximadamente a 300 mM, y el quelante de iones metálicos EDTA (en el intervalo de hasta aproximadamente 5 mM) en combinación con el depurador de radicales libres etanol (en el intervalo de hasta aproximadamente el 3 %) y la concentración de ADN más alta apropiada en un vial de vidrio estéril, empaquetado para proteger el ADN exento de nucleasas, altamente purificado de la luz y en un tampón fisiológicamente aceptable. En un aspecto específico descrito en la presente memoria, las formulaciones de la vacuna de ADN comprenden una combinación de EDTA y etanol, NaCl a una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, EDTA en el intervalo de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 1 mM, etanol presente hasta aproximadamente el 2 %, todo en la concentración de ADN más alta apropiada en un vial de vidrio estéril, empaquetado para proteger el ADN exento de nucleasas, altamente purificado de la luz y en un tampón fisiológicamente aceptable.

Las vacunas de ADN o ARN de la descripción incluyen secuencias que son degeneradas como resultado del código genético, p. ej., el uso de codones optimizado para un anfitrión específico. Como se emplea en esta memoria, "optimizado" se refiere a un polinucleótido que está diseñado genéticamente para aumentar su expresión en una especie determinada. Para proporcionar polinucleótidos optimizados que codifiquen los polipéptidos de gripe, la secuencia de ADN o ARN del gen de la proteína de la gripe se puede modificar para 1) comprender codones preferidos por genes altamente expresados en una especie particular; 2) comprender un contenido de A+T o G+C en la composición de base nucleotídicas como el que se encuentra sustancialmente en dicha especie; 3) formar una secuencia de iniciación de dicha especie; o 4) eliminar secuencias que provoquen desestabilización, una poliadenilación, degradación y terminación de ARN inapropiadas, o que forman horquillas de estructura secundaria o sitios de corte y empalme de ARN. Se puede lograr una expresión aumentada de la proteína de gripe en dicha especie utilizando la frecuencia de distribución del uso de codones en eucariotas y procariotas, o en una especie particular. La expresión "frecuencia de uso preferido de codones" se refiere a la preferencia presentada por una célula hospedadora específica en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Existen 20 aminoácidos naturales, la mayoría de los cuales están especificados por más de un codón. Por lo tanto, todas las secuencias de nucleótidos degeneradas están incluidas en la descripción siempre que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la gripe codificado por la secuencia de nucleótidos permanezca funcionalmente inalterada.

Las reacciones de hibridación se pueden realizar en condiciones de distinta "rigurosidad". Las condiciones que aumentan la rigurosidad de una reacción de hibridación son muy conocidas. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª Ed., Sambrook *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

Los detalles adicionales sobre la preparación y administración de las vacunas de ADN descritas en la presente memoria se encuentran en la patente de EE.UU. N.º 7.927.870. Se encuentran detalles adicionales sobre la preparación y el uso de vacunas de ARN en Ulmer *et al.*, "RNA-based vaccines", Vaccine 30:4414-4418, 2012.

Preparación de vacunas

La preparación de polipéptidos de M1 es muy conocida en la técnica. El polipéptido de M1 en el grado de pureza deseado y en una concentración suficiente para inducir una respuesta inmunitaria se mezcla con un transportador fisiológicamente aceptable. Un transportador fisiológicamente aceptable no es tóxico para un receptor a la dosificación y concentración empleadas en la vacuna. En general, la vacuna está formulada para inyección, habitualmente inyección intramuscular o subcutánea. Los transportadores adecuados para inyección incluyen agua estéril, pero preferiblemente son soluciones salinas fisiológicas, tales como solución salina normal o soluciones salinas tamponadas, tal como solución salina tamponada con fosfato o lactato de ringer. La vacuna generalmente contiene un adyuvante. Los adyuvantes útiles incluyen QS21 (*Quillaja saponaria*, disponible en el mercado de Cambridge Biotech, Worcester, Mass.), que estimula los linfocitos T citotóxicos, y el alumbre (adyuvante de hidróxido de aluminio). Además, se pueden utilizar formulaciones con distintos adyuvantes que potencien la inmunidad celular o local. En particular, se pueden incluir en la vacuna inmunopotenciadores tales como citocinas. Los ejemplos de citocinas inmunopotenciadoras adecuadas incluyen interleucinas, tales como interleucina 2 (IL-2) e interleucina 12 (IL-12), y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

Los excipientes adicionales que pueden estar presentes en la vacuna incluyen polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos), proteínas, aminoácidos, hidratos de carbono, entre ellos glucosa o dextrano, agentes quelantes tales como EDTA y otros excipientes que estabilizan la proteína o inhiben el crecimiento de microorganismos.

Las vacunas descritas en la presente memoria también pueden contener uno o más virus manipulados técnicamente diseñados específicamente para expresar proteínas que induzcan una respuesta de linfocitos T citotóxicos. Los virus de diseños técnicamente adecuados se obtienen de, por ejemplo, el virus de la viruela de los canarios, virus de la variolovacuna, adenovirus, virus del herpes humano atenuados (tales como, p. ej., virus del herpes simple) y varicela zóster. Los virus técnicamente diseñados ilustrativos están modificados para expresar el polipéptido de M1 capaz de inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos. La inmunización con la vacuna del polipéptido de M1 puede ir seguida de la administración de una o más dosis de la secuencia (o secuencias) de polipéptido de M1 para reforzar la respuesta inmunitaria.

La composición primaria para uso descrita en la presente memoria puede tener adyuvantes. Específicamente, el adyuvante puede ser un adyuvante o sistema adyuvante basado en emulsión de aceite en agua. La emulsión de aceite en agua puede comprender un aceite metabolizable y un agente emulsionante, y opcionalmente un esteroide y/o un tocol tal como alfa-tocoferol. Específicamente, dicho adyuvante de emulsión de aceite en agua puede comprender al menos un aceite metabolizable en una cantidad del 0,5 % al 20 % del volumen total, y tiene gotitas de aceite de las cuales al menos el 70 % por intensidad tienen diámetros inferiores a 1 µm.

El significado de la expresión aceite metabolizable es muy conocido en la técnica. Metabolizable puede definirse como 'ser capaz de ser transformado por el metabolismo' (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 25ª Ed., W.B. Sanders Company (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que no sea tóxico para el receptor, y pueda ser transformado por metabolismo. Las nueces, las semillas y los cereales son fuentes habituales de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también son parte de la presente descripción y pueden incluir aceites disponibles en el mercado tales como NEOBEE™, y otros. Un aceite metabolizable particularmente adecuado es el escualeno. El escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexano) es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón y en cantidades más bajas en el aceite de oliva, el aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz y en la levadura, y es un aceite particularmente adecuado para su uso en la presente memoria. El escualeno es un aceite metabolizable en virtud del hecho de que se transforma enzimáticamente durante la biosíntesis del colesterol (Índice Merck, 10ª edición, entrada n.º 8619). El aceite metabolizable puede estar presente en una cantidad del 0,5 % al 20 % (concentración final) del volumen total de la composición inmunogénica, convenientemente, una cantidad del 1,0 % al 10 % del volumen total, convenientemente, en una cantidad del 2,0 % al 6,0 % del volumen total. Específicamente, el aceite metabolizable está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,25-1,25 % (v/v) del volumen total de la composición inmunogénica.

Convenientemente, los sistemas de emulsión de aceite en agua descritos en la presente memoria tienen un tamaño de gotita de aceite pequeño en el intervalo submicrométrico. Convenientemente, los tamaños de las gotitas estarán en el intervalo de 120 a 750 nm, convenientemente, tamaños de 120 a 600 nm de diámetro. Normalmente, la emulsión de aceite en agua contiene gotitas de aceite de las cuales al menos el 70 % por intensidad tienen menos de 500 nm de diámetro, en particular, al menos el 80 % por intensidad tienen menos de 300 nm de diámetro, convenientemente, al menos el 90 % en intensidad están en el intervalo de 120 a 200 nm de diámetro.

La emulsión de aceite en agua descrita en la presente memoria también puede comprender un esteroide y/o un tocol, tal como tocoferol, en particular alfa tocoferol. Los esteroides son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el colesterol es bien conocido y, por ejemplo, está descrito en el Índice Merck, 11ª Ed., página 341, como un esteroide de origen natural que se encuentra en la grasa animal. Otros esteroides adecuados incluyen β-sitosterol, estigmasterol, ergosterol y ergocalciferol. El esteroide está presente convenientemente en una cantidad de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 20 % (p/v) del volumen total de la composición inmunogénica, convenientemente en una cantidad de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 5 % (p/v). Convenientemente, cuando el esteroide es colesterol, está presente en una cantidad de entre aproximadamente el 0,02 % y aproximadamente el 0,2 % (p/v) del volumen total de la composición inmunogénica, normalmente en una cantidad de aproximadamente el 0,02 % (p/v) en un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml.

Los tocoles (p. ej., la vitamina E) también se utilizan a menudo en adyuvantes de emulsiones oleosas (patente europea EP 0 382 271 B1; patente de EE.UU. N.º 5.667.784; documentos de patente WO 95/17210). Los tocoles utilizados en las emulsiones oleosas (opcionalmente, emulsiones de aceite en agua) descritas en la presente memoria se pueden formular como se describe en la patente europea EP 0 382 271 B1, debido a que los tocoles pueden ser dispersiones de gotitas de tocol, que comprenden opcionalmente un emulsionante, de opcionalmente menos de 1 micrómetro de diámetro. Como alternativa, los tocoles se pueden utilizar en combinación con otro aceite, para formar la fase oleosa de una emulsión oleosa. En la presente memoria se describen ejemplos de emulsiones oleosas que se pueden utilizar en combinación con el tocol, tales como los aceites metabolizables descritos anteriormente.

La emulsión de aceite en agua comprende un agente emulsionante. El agente emulsionante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 5,0 % en peso de la composición inmunogénica (p/p), convenientemente presente en una cantidad de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 2,0 % en peso (p/p). Las concentraciones adecuadas son de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 1,5 % en peso (p/p) de la composición total.

El agente emulsionante puede ser convenientemente Monooleato de polioxietileno sorbitano (polisorbato 80 o Tween

80). Específicamente, un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml puede contener el 1 % (p/p) de Tween 80, y un volumen de dosis de vacuna de 0,7 ml contiene aproximadamente el 0,7 % (p/p) de Tween 80. Como alternativa, la concentración de Tween 80 puede ser de aproximadamente el 0,1 % o de aproximadamente el 0,2 % (p/p). En un aspecto, la cantidad de polisorbato 80 es de aproximadamente 4,9 mg por dosis de vacuna, convenientemente de aproximadamente 4,6 a aproximadamente 5,2 mg por dosis de vacuna. En otro aspecto, la cantidad de polisorbato 80 es de aproximadamente 2,4 mg por dosis de vacuna, convenientemente de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 2,8 mg por dosis de vacuna. En otro aspecto, la cantidad de polisorbato 80 es de aproximadamente 1,2 mg por dosis de vacuna, convenientemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 1,5 mg por dosis de vacuna. En otro aspecto, la cantidad de polisorbato 80 es de aproximadamente 0,6 mg por dosis de vacuna, convenientemente de aproximadamente 0,4-0,8 mg por dosis de vacuna.

El adyuvante de emulsión de aceite en agua se puede utilizar con otros adyuvantes o inmunoestimulantes y, por lo tanto, una característica importante descrita en la presente memoria es una formulación de aceite en agua que comprende escualeno u otro aceite metabolizable, un tocoferol, tal como alfa tocoferol y Tween 80. La emulsión de aceite en agua también puede contener Span 85 (trioleato de polioxietilen sorbitano) y/o lecitina. Normalmente, el aceite en agua comprenderá de aproximadamente el 2 a aproximadamente el 10 % de escualeno del volumen total de la composición inmunogénica, del 2 al 10 % de alfa tocoferol y de aproximadamente el 0,3 a aproximadamente el 3 % de Tween 80, y puede producirse según el procedimiento descrito en el documento de patente WO 95/17210. Convenientemente, la relación de escualeno:alfa tocoferol es igual o menor que 1 ya que esto proporciona una emulsión más estable. Span 85 también puede estar presente, por ejemplo, a un nivel de aproximadamente el 1 %.

La preparación de la vacuna contra la gripe puede prepararse en presencia de un conservante tal como tiomersal. Convenientemente, el conservante, en particular tiomersal, está presente en una concentración de alrededor de 100 µg/ml. Como alternativa, la preparación de la vacuna contra la gripe se prepara en presencia de un nivel bajo de conservante, en particular de tiomersal, tal como una concentración que no supere los 20 µg/ml o convenientemente de menos de 5 µg/ml. En otra alternativa adecuada, la preparación de la vacuna contra la gripe se prepara en ausencia de tiomersal. Convenientemente, la preparación de vacuna contra la gripe resultante es estable en ausencia de conservantes organomercuriales; en particular, la preparación no contiene tiomersal residual. En particular, la preparación de la vacuna contra la gripe comprende un antígeno de polipéptido de M1 estabilizado en ausencia de tiomersal, o en niveles bajos de tiomersal (generalmente de 5 µg/ml o menos). Específicamente, la estabilización de la cepa del virus de la gripe **B** se realiza mediante un derivado de alfa tocoferol, tal como succinato de alfa tocoferol (también conocido como succinato de vitamina E, es decir, SVE). Dichas preparaciones y métodos para prepararlas se describen en el documento de patente WO 02/097072.

El volumen de una dosis de la vacuna de polipéptido de M1 con adyuvante puede estar entre aproximadamente 0,25-1 ml y habitualmente corresponde a aproximadamente 0,5 ml para una formulación para adultos. Convenientemente, una dosis para adultos de 0,5 ml corresponde a aproximadamente 0,25 ml de adyuvante más aproximadamente 0,25 ml de antígeno). Cada dosis de vacuna puede contener aproximadamente 15 µg de polipéptido de M1. Como alternativa, cada dosis de vacuna contiene una cantidad baja de polipéptido de M1, tal como una cantidad de menos de aproximadamente 15 µg, convenientemente de menos de aproximadamente 10 µg. Las cantidades adecuadas son de aproximadamente 2 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 7,5 µg o aproximadamente 10 µg de polipéptido de M1, o cualquier cantidad adecuada de polipéptido de M1 menor de aproximadamente 15 µg, de manera que la composición de la vacuna cumpla al menos uno de los criterios de eficacia como se define en la presente memoria. Ventajosamente, una dosis de polipéptido de M1 de aproximadamente 1 µg o de incluso menos, tal como de aproximadamente 0,5 µg, que permitiría cumplir los criterios normativos definidos anteriormente. También es adecuada una dosis de vacuna de aproximadamente 1 ml (aproximadamente 0,5 ml de adyuvante más aproximadamente 0,5 ml de preparación de antígeno). También es adecuada una dosis de vacuna de aproximadamente 0,25 ml (p. ej. de aproximadamente 0,125 ml de adyuvante más aproximadamente 0,125 ml de preparación de antígeno), especialmente para la población pediátrica. El volumen de una dosis de la vacuna de polipéptido de M1 puede estar entre aproximadamente 0,25-1 ml y habitualmente corresponde a aproximadamente 0,5 ml para una formulación para adultos. Convenientemente, una dosis para adultos de 0,5 ml corresponde a aproximadamente 0,25 ml de adyuvante más aproximadamente 0,25 ml de antígeno. También es adecuada una dosis de vacuna de aproximadamente 1 ml (aproximadamente 0,5 ml de adyuvante más aproximadamente 0,5 ml de preparación de antígeno). También es adecuada una dosis de vacuna de aproximadamente 0,25 ml (p. ej. de aproximadamente 0,125 ml de adyuvante más aproximadamente 0,125 ml de preparación de antígeno), especialmente para la población pediátrica.

Inmunoestimulantes

La composición puede comprender un adyuvante adicional, en particular un adyuvante de ligando de TLR-4, adecuadamente un derivado no tóxico del lípido A. Un ligando de TLR-4 adecuado es el monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (3D-MPL). Otros ligandos de TLR-4 adecuados son los lipopolisacáridos (LPS) y derivados, el MDP (dipéptido de muramilo) y la proteína F del VSR.

La composición puede incluir adicionalmente un ligando del receptor de tipo Toll (TLR) 4, tal como un derivado no tóxico del lípido A, particularmente monofosforil lípido A o más particularmente monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (3D-MPL).

Dicho lipopolisacárido, que es preferiblemente 3D-MPL, puede utilizarse en cantidades de entre 1 y 50 µg, por dosis humana de la composición inmunogénica. Ventajosamente, el 3D-MPL se utiliza a un nivel de alrededor de 25 µg, por ejemplo de entre 20-30 µg, convenientemente de entre 21-29 µg o de entre 22 y 28 µg, o de entre 23 y 27 µg o de entre 24 y 26 µg, o de 25 µg. La dosis humana de la composición inmunogénica puede comprender 3D-MPL a un nivel de alrededor de 10 µg, por ejemplo de entre 5 y 15 µg, convenientemente de entre 6 y 14 µg, por ejemplo de entre 7 y 13 µg o de entre 8 y 12 µg, o de entre 9 y 11 µg, o de 10 µg. Además, la dosis humana de la composición inmunogénica puede comprender 3D-MPL a un nivel de alrededor de 5 µg, por ejemplo de entre 1 y 9 µg, o de entre 2 y 8 µg, o convenientemente de entre 3 y 7 µg, o de entre 4 y 6 µg, o de 5 µg.

La dosis de MPL puede convenientemente potenciar una respuesta inmunitaria frente a un antígeno en un ser humano. En particular, una cantidad adecuada de MPL es la que mejora el potencial inmunológico de la composición en comparación con la composición sin adyuvante, o en comparación con la composición con adyuvante con otra cantidad de MPL, siendo aceptable a partir de un perfil de reactividad.

Se conocen derivados sintéticos del lípido A, describiéndose algunos como agonistas de TLR-4, e incluyen, pero no se limitan a: OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-o-fos-fono-beta-D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-.alfa.-D-glucopiranosildihidrogenofosfato), (documento de patente WO 95/14026) OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1,10-bis(dihidrogenofosfato) (véanse, p. ej., los documentos de patente WO99/64301 y WO 00/0462) OM 197 MP-Ac DP (3S-,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino] decan-1,10-diol, 1-dihidrogenofosfato 10-(6-aminohexanoato) (véase el documento de patente WO 01/46127)

Otros ligandos de TLR4 que pueden utilizarse son los fosfatos de alquilglucosaminida (los AGP, forma siglada de *Alkyl Glucosaminide Phosphates*) tales como los descritos en el documento de patente WO9850399 o la patente de EE.UU. N.º 6.303.347 (también se describen procedimientos para la preparación de los AGP), o sales farmacéuticamente aceptables de los AGP, como se describe en la patente de EE.UU. N.º 6.764.840. Algunos AGP son agonistas de TLR4 y algunos son antagonistas de TLR4. Se cree que ambos son útiles como adyuvantes.

Otros ligandos de TLR-4 adecuados, capaces de provocar una respuesta de señalización a través del TLR-4 (Sabroe *et al*, J Immunol. 171(4): 1630-5, 2003) son, por ejemplo, el lipopolisacárido de bacterias gramnegativas y sus derivados, o fragmentos del mismo, en particular, un derivado no tóxico de LPS (como 3D-MPL). Otros agonistas del TLR adecuados son: proteína de choque térmico (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 o 90; proteína tensioactiva A, oligosacáridos de hialuronano, fragmentos de heparán sulfato, fragmentos de fibronectina, péptidos de fibrinógeno y b-defensina-2, dipéptido de muramilo (MDP) o proteína F del virus respiratorio sincicial. El agonista de TLR puede ser HSP 60, 70 o 90.

Los receptores tipo Toll (TLR) son receptores transmembrana de tipo I, conservados evolutivamente entre insectos y seres humanos. Hasta ahora se han establecido diez TLR (TLR 1-10) (Sabroe *et al*, J Immunol. 171(4): 1630-5, 2003). Los miembros de la familia TLR tienen dominios extracelulares e intracelulares similares; se ha demostrado que sus dominios extracelulares tienen secuencias repetidas ricas en leucina, y sus dominios intracelulares son similares a la región intracelular del receptor de interleucina 1 (IL-1R). Las células con TLR se expresan de forma diferencial entre las células inmunitarias y otras células (incluidas las células epiteliales vasculares, adipocitos, cardiomiocitos y células epiteliales intestinales). El dominio intracelular de los TLR puede interactuar con la proteína adaptadora Myd88, que también poseen el dominio IL-1R en su región citoplásmica, lo que conduce a la activación de citocinas mediante NF-KB; esta ruta de Myd88 es una de las formas en que la activación del TLR afecta a la liberación de citocinas. La principal expresión de los TLR se encuentra en tipos celulares tales como las células presentadoras de antígenos (p. ej., células dendríticas, macrófagos, etc.).

El adyuvante y la composición inmunogénica pueden comprender además un adyuvante de saponina. Una saponina particularmente adecuada para su uso en la presente memoria es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol sudamericano *Quillaja saponaria* Molina y fue la primera que describió Dalsgaard *et al.*, en "Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, pág. 243-254, Springer Verlag, Berlín (1974)) por tener actividad adyuvante. Se han aislado fragmentos purificados de Quil A mediante HPLC que conservan la actividad adyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (patente europea EP 0 362 278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocidos como QA7 y QA21). QS-21 es una saponina natural obtenida de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina, que induce linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+, linfocitos Th1 y una respuesta de anticuerpos IgG2a predominante, y es una saponina preferida en el contexto de la presente descripción. En una forma adecuada de la presente descripción, el adyuvante de saponina dentro de la composición inmunogénica es un derivado de saponina molina quil A, preferiblemente una fracción inmunológicamente activa de Quil A, tal como QS-17 o QS-21, convenientemente QS-21. Las composiciones descritas en la presente memoria pueden contener la fracción de saponina inmunológicamente activa en forma sustancialmente pura. Preferiblemente, las composiciones descritas en la presente memoria contienen QS21 en forma sustancialmente pura, o sea, QS21 tiene una pureza mínima del 90 %, por ejemplo al menos del 95 % pura, o al menos el 98 % pura.

Otras saponinas útiles se obtienen de las plantas *Aesculus hippocastanum* o *Gyophilla struthium*. Otras saponinas que se han descrito en la bibliografía incluyen Escina, que se ha descrito en el Índice Merck (12ª Ed: entrada 3737) como una mezcla de saponinas presentes en la semilla del castaño de indias, *Aesculus hippocastanum*. Su aislamiento se

describe por cromatografía y purificación (Fiedler, Arzneimittel-Forsch. 4, 213 (1953)), y por resinas de intercambio iónico (Erbring *et al.*, Patente de EE.UU. N.º 3.238.190). Se han purificado fracciones de esquejes y se ha demostrado que son biológicamente activas (Yoshikawa M. *et al.*, Chem Pharm Bull (Tokio) 44(8): 1454-1464, 1996). La Sapoalbina de *Gypsophilla struthium* (Vochten *et al.*, J. Pharm. Belg. 42:213-226, 1968) también es una opción.

- 5 La dosis de 3D-MPL y/o de QS21 puede convenientemente potenciar una respuesta inmunitaria frente a un antígeno en un ser humano. En particular, una cantidad adecuada de 3D-MPL y/o de QS21 es la que mejora el potencial inmunológico de la composición en comparación con la composición sin adyuvante, o en comparación con la composición con adyuvante con otra cantidad de 3D-MPL o de QS21, siendo aceptable a partir de un perfil de reactogenicidad. Normalmente, para la administración humana, la saponina (p. ej., QS21) y/o el derivado de LPS (p. ej., 3D-MPL) estarán presentes en una dosis humana de composición inmunogénica en el intervalo de 1 µg-200 µg, tal como de 10-50 µg, o de 1 µg-25 µg por dosis.

Los adyuvantes en donde se incluye opcionalmente un inmunoestimulante adicional son particularmente adecuados para formulaciones de vacunas para bebés y/o ancianos.

Vacunación

- 15 La composición descrita en la presente memoria puede administrarse mediante cualquier vía de suministro adecuada, tal como intradérmica, mucosa, p. ej., intranasal, oral, intramuscular, subcutánea, intradural, intravenosa, mucosa o pulmonar. Otras vías de suministro son bien conocidas en la técnica.

- 20 La vía de suministro intramuscular es particularmente adecuada para las composiciones de polipéptido de M1 descritas en la presente memoria. La composición descrita en la presente memoria puede presentarse en un recipiente monodosis, o alternativamente, un envase multidosis, particularmente adecuado para una vacuna para pandemia. En este caso, un conservante antimicrobiano como el tiomersal está normalmente presente para prevenir la contaminación durante el uso. La concentración de tiomersal puede ser de 25 µg/dosis de 0,5 ml (es decir, 50 µg/ml). Está convenientemente presente una concentración de tiomersal de 5 µg/dosis de 0,5 ml (es decir, 10 µg/ml) o de 10 µg/dosis de 0,5 ml (es decir, 20 µg/ml). Se podría utilizar un dispositivo de suministro i.m. adecuado, tal como un dispositivo de inyección de chorro de líquido sin aguja, por ejemplo, el Biojector 2000 (Bioject, Portland, Oregón). Alternativamente, podría utilizarse un dispositivo inyector de pluma. El uso de tales dispositivos de suministro puede ser particularmente adecuado para campañas de inmunización a gran escala, tales como las que se precisarían durante una pandemia.

- 30 La administración intradérmica es otra vía adecuada. Para la administración intradérmica puede utilizarse cualquier dispositivo adecuado, por ejemplo, dispositivos sin aguja o con aguja corta, tales como dispositivos que limitan la longitud de penetración efectiva de una aguja en la piel, tales como los descritos en el documento de patente WO99/34850 y la patente europea EP1092444, y equivalentes funcionales de los mismos. Además, son adecuados los dispositivos de inyección de chorro que suministran vacunas líquidas a la dermis mediante un inyector de chorro líquido o mediante una aguja que perfora el estrato córneo y produce un chorro que llega a la dermis. Además, son adecuados los dispositivos de suministro balístico de polvo/partículas que utilizan gas comprimido para acelerar la vacuna en forma de polvo a través de las capas externas de la piel hasta la dermis. Adicionalmente, pueden utilizarse jeringuillas convencionales en el método clásico de mantoux de administración intradérmica.

- 35 Otra vía de administración adecuada es la vía subcutánea. Para la administración subcutánea puede utilizarse cualquier dispositivo adecuado, por ejemplo, una aguja clásica o un servicio de inyector de chorro sin aguja. Convenientemente, dicho dispositivo está precargado con la formulación de vacuna líquida.

- 40 Alternativamente, la vacuna se administra por vía intranasal. Normalmente, la vacuna se administra localmente en el área nasofaríngea, convenientemente sin ser inhalada a los pulmones. Es conveniente utilizar un dispositivo de suministro intranasal que suministre la formulación de la vacuna en el área nasofaríngea, sin o sustancialmente sin que entre en los pulmones. Los dispositivos adecuados para la administración intranasal de las vacunas descritas en la presente memoria son dispositivos de pulverización que son bien conocidos en la técnica.

Como alternativa, la vía de vacunación epidérmica o transdérmica también se contempla en la presente descripción.

Anticuerpos

- 50 Los anticuerpos descritos en la presente memoria tendrán especificidad de unión para uno o más de los polipéptidos de M1 descritos en la presente memoria. Los anticuerpos descritos en la presente memoria abarcan todas las formas que se discutieron anteriormente. El anticuerpo se puede diseñar técnicamente para un organismo en particular. El organismo puede ser un ser humano, un cánido, o un ganado comercialmente valioso, tal como, por ejemplo, cerdos, caballos, perros, gatos, pollos u otras aves. Dicho diseño técnico del anticuerpo incluye, por ejemplo, humanización, humeización, quimerización o aislamiento de anticuerpos humanos (u otro organismo) utilizando cualquiera de las tecnologías de repertorio o tecnologías de monoclonales conocidas en la técnica.

- 55 Los métodos establecidos para el aislamiento de anticuerpos humanos específicos de antígeno incluyen el cribado de hibridomas de ratones que son transgénicos para los locus de inmunoglobulina humana (p. ej., Jakobavits, Adv Drug

Deliv Rev. 31:33-42, 1998), y métodos *in vitro* en los que se exploran bibliotecas recombinantes de fragmentos de anticuerpos humanos presentados y codificados en bacteriófagos filamentosos (p. ej., McCafferty *et al.*, Nature 348:552-4, 1990), células de levadura (por ejemplo, Boder y Wittrup, Nat Biotechnol 15:553-7, 1997) y ribosomas (p. ej., Hanes y Pluckthun, Proc Natl Acad Sci USA 94:4937-42, 1997) contra el antígeno inmovilizado. Estos métodos han producido muchos anticuerpos humanos útiles.

Los ratones transgénicos para los locus de inmunoglobulina humana generalmente no expresan el complemento completo de la diversidad humana, pero los anticuerpos humanos expresados en estos animales transgénicos pueden experimentar maduración por afinidad. A partir de estos ratones transgénicos pueden obtenerse anticuerpos de afinidades y especificidades más altas deseadas, mientras que los anticuerpos humanos obtenidos a partir de tecnologías de presentación estarán limitados por el repertorio de anticuerpos utilizado, ya que estos anticuerpos de presentación no experimentan una maduración de afinidad natural en los sistemas de presentación.

Los métodos más utilizados para minimizar la inmunogenicidad de los anticuerpos no humanos al tiempo que se conserva la especificidad y la afinidad, implican el injerto de las CDR del anticuerpo no humano en armazones humanos seleccionados normalmente por su homología estructural con el armazón no humano (Jones *et al.*, Nature 321:522-5, 1986; patente de EE.UU. N.º 5.225.539). Originalmente, estos métodos daban como resultado pérdidas drásticas de afinidad. Sin embargo, después se demostró que parte de la afinidad podría recuperarse restableciendo los restos no humanos en posiciones clave en el armazón que son necesarios para mantener las estructuras canónicas de las CDR 1 y 2 no humanas (Bajorath *et al.*, J Biol Chem. 270:22081-4, 1995; Martin *et al.*, Methods Enzymol. 203:121-53, 1991; Al-Lazikani, J Mol Biol. 273:927-48, 1997). Recuperar las conformaciones nativas de la CDR3 es una empresa mucho más incierta porque sus estructuras son más variables. Por tanto, determinar qué restos no humanos restablecer para recuperar la conformación funcional de CDR3 es en gran medida una cuestión de modelado, cuando sea posible, combinado con ensayo y error. Se describen métodos ilustrativos para la humanización de anticuerpos mediante injerto de CDR, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 6.180.370.

Las mejoras a los enfoques tradicionales de injerto de CDR utilizan diversos enfoques de selección de híbridos, en los que porciones del anticuerpo no humano se han combinado con bibliotecas de secuencias complementarias de anticuerpos humanos en sucesivas rondas de selección en cuanto a la unión al antígeno, en el transcurso de las cuales la mayoría de las secuencias no humanas se reemplazan gradualmente por secuencias humanas. Por ejemplo, en la técnica de reordenamiento de cadenas (Marks, *et al.*, Biotechnology 10:779-83, 1992) una cadena del anticuerpo no humano se combina con un repertorio humano virgen de la otra cadena sobre la base de que la afinidad de la cadena humana será suficiente para restringir la selección de un compañero humano al mismo epítipo del antígeno. A continuación, se utilizan compañeras humanas seleccionadas para guiar la selección de contrapartes humanas para las restantes cadenas no humanas.

Otras metodologías incluyen técnicas de reemplazo de cadena en que se retuvieron las CDR3 no humanas y solo el resto de las regiones V, entre ellas las regiones marco conservadas y las CDR 1 y 2, se reemplazaron individualmente en etapas realizadas secuencialmente (p. ej., Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20030166871; Rader, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 95:8910-15, 1998; Steinberger *et al.*, J. Biol. Chem. 275:36073-36078, 2000; Rader *et al.*, J. Biol. Chem. 275:13668-13676, 2000).

Las metodologías descritas anteriormente se pueden utilizar con los anticuerpos anti-polipéptido de M1 descritos en la presente memoria para cambiar la gama de hospedadores de los anticuerpos anti-polipéptido de M1 utilizando el hospedador deseado como donante de las secuencias de anticuerpo apropiadas.

Los anticuerpos anti-polipéptido de M1 descritos en la presente memoria pueden modificarse con moléculas que potencian la semivida del anticuerpo en el cuerpo de un organismo. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, PEGilación o derivatización con otros polímeros hidrófilos tales como el dextrano u otros policarbohidratos, PVP (polivinilpirrolidona), PVA (alcohol polivinílico), etc. Dichos polímeros para tal derivatización son muy conocidos en la técnica.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden incluir el anticuerpo monoclonal 2B-B10-G9 que se une a la región C-terminal de la proteína de matriz (M1) del virus de la gripe que abarca los aminoácidos 220-238. El hibridoma se generó contra la proteína M de PR/8 y su unión se ha mapeado en la secuencia GTHPSSSAGLKNLDLENLQ (SEQ ID NO: 1).

Métodos de tratamiento con anticuerpos

En la presente memoria se describe un método de terapia que comprende administrar a un animal una cantidad eficaz de anticuerpo anti-polipéptido de M1, de tal manera que se reduce en gravedad una infección posterior por el virus de la gripe y/o se reduce en la infección la duración de los síntomas de gripe. Puede administrarse una cantidad eficaz de anticuerpo anti-polipéptido de M1 a un animal después de que el animal esté infectado con el virus de la gripe. Puede administrarse una cantidad eficaz de anticuerpo anti-polipéptido de M1 a un animal antes de que el animal esté infectado con el virus de la gripe. La administración de una cantidad eficaz de anticuerpo anti-polipéptido de M1 en un animal infectado con el virus de la gripe puede reducir la gravedad de la infección por virus de la gripe y/o la duración de los síntomas de gripe en el animal. El animal tratado con la terapia de anticuerpos anti-polipéptido de M1 puede

ser un paciente humano.

Según el tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosificación inicial para la administración al paciente es de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (p. ej., 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo anti-polipéptido de M1, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosificación diaria típica puede oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de la necesidad del paciente. Las dosificaciones particularmente convenientes incluyen, por ejemplo, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg y 15 mg/kg. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se trata la infección por el virus de la gripe, según se mide mediante los métodos conocidos en la técnica. Pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. Por ejemplo, si el anticuerpo anti-polipéptido de M1 descrito en la presente memoria se administra una vez a la semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, o un período de tiempo más largo entre dosis en un intervalo de dosis de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, incluyendo, pero no se limitan a, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg o 15 mg/kg. La evolución de la terapia descrita en la presente memoria se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos anti-polipéptido de M1 utilizados en conformidad con la presente descripción se preparan para el almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con transportadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª Ed., Osol, A., ed. (1980)), generalmente en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Además, se contemplan los cristales de anticuerpos (véase la publicación de patente de EE.UU. n.º 2002/0136719). Los transportadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparaben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (p. ej. complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como Tween, Pluronic o polietilenglicol (PEG).

La formulación en la presente memoria también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para el tratamiento, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Los principios activos pueden también inmovilizarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (16ª Ed., Osol, A., ed. (1980)).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de EE.UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y .gamma, -etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™. (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Fabricación de polipéptidos

Las técnicas recombinantes para la fabricación de polipéptidos y/o anticuerpos de M1 descritos en la presente memoria son muy conocidas en la técnica. Los polipéptidos o anticuerpos de M1 descritos en la presente memoria se pueden fabricar en una diversidad de tipos de células hospedadoras, por ejemplo, en células de mamíferos, células fúngicas, células de levadura, células bacterianas, células de insecto, etc. Las técnicas para fabricar construcciones de expresión o vectores recombinantes para su uso en determinadas células hospedadoras, tales como levadura u hongos filamentosos, o células de mamífero, tales como las células de ovario de hámster chino, los fibroblastos murinos NIH 3T3, las células 193 de riñón embrionario humano, o células de mieloma o hibridoma de roedor, *E. coli*, determinadas células de insecto y otros sistemas de células hospedadoras disponibles en el mercado son muy conocidos en la técnica. Además, se sabe muy bien en la técnica expresar polipéptidos recombinantes en estas células hospedadoras y obtener polipéptidos recombinantes a partir de estas células hospedadoras. Los anticuerpos de longitud completa descritos en la presente memoria se pueden preparar en sistemas de células hospedadoras capaces de glucosilar el anticuerpo. La glucosilación puede ser la del organismo diana que se va a tratar con el anticuerpo. La glucosilación puede parecerse a la glucosilación del organismo diana que se va a tratar con el anticuerpo. Como alternativa, la glucosilación puede diferir de la del organismo a tratar de modo que la glucosilación proporcione un efecto adyuvante, pero no altera sustancialmente las funciones efectoras del anticuerpo.

Los polipéptidos de M1 descritos en la presente memoria también pueden prepararse mediante síntesis química utilizando un aparato de síntesis de polipéptidos (p. ej., en un tubo de ensayo).

Ejemplos

Ejemplo 1. Inhibición de la infección por virus de la gripe por el anticuerpo anti-polipéptido de M1

- 5 Se investigó la unión a un panel de cepas del virus de la gripe y la actividad de neutralización en ensayos de inhibición de placas del anticuerpo monoclonal 2B-B10-G9. El anticuerpo monoclonal 2B-B10-G9 se une a la región C-terminal de la proteína de matriz (M1) del virus de la gripe que abarca los aminoácidos 220-236. 2B-B10-G9 también puede unirse a la proteína M1 en los aminoácidos que abarcan 220-237, 220-238, 220-239, 220-240 o 220-241.
- 10 Se añadió 2B-B10-G9 en coberturas de agar a un césped parcialmente infectado de células MDCK y se incubó durante 3 días a 37 °C con CO₂ (FIG. 1). Los resultados indicaron que 15 µg de anticuerpo inhibieron completamente la formación de placas. Debido a que 2B-B10-G9 solo tiene acceso a las porciones expuestas de la proteína M en el virus o en las células infectadas, la prevención de la formación de placas indica que la región C-terminal de la proteína de Matrix de PR/8 debe ser accesible en la superficie. La inhibición de las placas víricas en un césped de células MDCK se analizó adicionalmente mediante dos métodos distintos. Las células se infectaron con virus y se incubaron durante 30 minutos antes de la adición de una cobertura de agar que contenía anticuerpo 2B-B10-G9. Como alternativa, el virus y el anticuerpo se mezclaron y se incubaron durante 30 minutos antes de infectar las células. Después de la infección y de una incubación adicional de 30 minutos, se añadió una cobertura de agar sin anticuerpo. Los resultados indicaron que no hubo diferencia en el total de placas inhibidas entre los dos experimentos. Estos resultados sugieren que la inhibición de la infección vírica está provocada por la unión de 2B-B10-G9 al virus y no por el impedimento de la gemación vírica en las células infectadas. Pruebas adicionales revelaron que 2B-B10-G9 inhibió la formación de placas de A/Dakota del Sur (H1N1) e inhibió parcialmente a A/Uruguay (H3N2) en ensayos de placas (FIG. 2). Una variación de aminoácido en la posición 231 puede ser responsable de la eficacia reducida del anticuerpo. Sin embargo, incluso la inhibición parcial indica que el extremo C-terminal extendido de la proteína M (en los restos de aminoácido 215-252) está expuesto en la superficie y es una diana viable para la inmunización. Se realizaron pruebas adicionales de virus con una asparagina o un ácido aspártico en la posición 231. La proteína M de PR/8 y de A/Dakota del Sur contiene una asparagina en la posición 231, mientras que A/Uruguay contiene un ácido aspártico en esta posición. Además, PR/8 y Dakota del Sur tienen glucoproteínas de superficie de H1N1, mientras que Uruguay tiene glucoproteínas de superficie H3N2. Para determinar si 2B-B10-G9 tiene una actividad ampliamente neutralizante, se llevaron a cabo una serie de experimentos de neutralización para analizar la eficacia contra la variación de asparagina y de ácido aspártico en la posición 231 en la configuración H1N1 y contra la configuración de ácido aspártico en la configuración de H3N2. La proteína M que contenía una asparagina en la posición 231 no se pudo analizar en un virus H3N2 ya que esta variación no parece estar presente en los virus de tipo silvestre. Dos virus, A/WSN/33 y A/Port Chalmers/1/73, se analizaron en el ensayo de inhibición de placas. A/WSN/33 es un virus H1N1 pero, a diferencia del PR/8, contiene un ácido aspártico en la posición 231 de la proteína M1. A/Port Chalmers/1/73 es un virus H3N2 que contiene un ácido aspártico en la posición 231. De forma simultánea, se probaron también dos virus de control: A/PR/8 y A/USSR/90/77. PR/8 y USSR/90 tienen la misma secuencia de aminoácidos de AA 220 a AA 236 pero tienen distintas proteínas H1N1. Los resultados demostraron que todos los virus fueron inhibidos por 2B-B10-G9 de una manera dependiente de la dosis. La inhibición de la formación de placas por 2B-B10-G9 no se vio afectada por la variación de aminoácidos en la posición 231 y tampoco se vio afectada por las glucoproteínas H3N2 o H1N1. Combinados los datos anteriores y un análisis de secuencias de proteínas M de tipo silvestre contenidas en la base de datos del NCBI, es razonable concluir que 2B-B10-G9 se une todas las variantes conocidas de M1. La presentación del péptido C-terminal 215-252 en un contexto de vacuna, generaría una respuesta policlonal aprovechando la potencia bien documentada conferida por una ávida respuesta de anticuerpos, lo que conduce a un aumento no lineal de la protección conferida por la vacuna al contrario que un anticuerpo monoclonal. Esta respuesta de anticuerpos policlonales proporcionaría al organismo vacunado protección universal contra cualquier virus de la gripe que posea la proteína de matriz de tipo A.

Ejemplo 2. Nuevos anticuerpos anti-polipéptido de M1

- Un polipéptido de M1 que comprende la secuencia de aminoácidos de 220-236 de la proteína M1 del virus de la gripe A/PR/8/38 se conjugó con proteínas transportadoras inmunogénicas (KLH, ovoalbúmina y BSA) y se inyectó en ratones BALB/c hembra de 10-12 semanas de edad. Este polipéptido de M1 tiene la secuencia de aminoácidos GTHPSSSAGLKNLDLEN (SEQ ID NO: 38). Se dieron dos refuerzos posteriores, un refuerzo a los 14 días y otro a los 28 días después de la inyección inicial. Se recogieron muestras de sangre para suero justo antes de la inoculación y 7 días después de cada una de las tres inyecciones. El análisis de los sueros recogidos indica una fuerte respuesta al polipéptido de M1 y a la propia proteína M1 completa después del segundo refuerzo.
- 55 El péptido, GTHPSSSAGLKNLDLEN (SEQ ID NO: 38), comprende la secuencia de aminoácidos de 220-236 de la proteína de matriz de A/PR/8. El péptido se conjugó químicamente con KLH, ovoalbúmina o BSA.

Se distribuyeron al azar en tres grupos para la inoculación ratones BALB/c hembra de 10-12 semanas de edad: Grupo A - Control (ratones 77-81), Grupo B - Conjugado de péptido (ratones 82-86), Grupo C - Solo péptido (ratones 87-91). Todos los ratones se inyectaron el día 1, el día 15 y el día 29. Las inyecciones del día 1 incluían adyuvante completo

de Freund y los refuerzos posteriores contenían adyuvante incompleto de Freund. A los ratones del Grupo A (control) se les inyectaron inicialmente 50 µg de KLH y se recibieron un refuerzo dos veces (días 15 y 29) con 50 µg de ovoalbúmina. Los ratones del Grupo B se inocularon con 50 µg de conjugado de KLH-péptido (día 1) y recibieron un refuerzo dos veces (días 15 y 29) con 50 µg de conjugado de ovoalbúmina-péptido. Los ratones del Grupo C se inyectaron y recibieron refuerzo con péptido (no conjugado) en cantidades que representan equivalentes molares a lo utilizado en el grupo B.

Se inocularon tres grupos de ratones solo con BSA (Grupo A, ratones 77-81), con conjugado de polipéptido de M1-BSA (Grupo B, ratones 82-86) o solo con polipéptido de M1 (Grupo C, ratones 87-91). Los ratones recibieron un refuerzo dos veces con solo con BSA (Grupo A), con conjugado de polipéptido de M1 (Grupo B) o solo con polipéptido de M1 (Grupo C). El suero recogido del Grupo A (solo BSA) no mostró unión a BSA, a conjugado de polipéptido de M1-BSA y a proteína M1 (Figura 1). El suero recogido del grupo B (conjugado de polipéptido de M1-BSA) muestra unión al conjugado de polipéptido de M1-BSA así como unión a la proteína M. No se observó unión a BSA, lo que indica que la unión al polipéptido de M1 era específica. El suero recogido de polipéptido de M1 solo (Grupo C) no presentó unión a BSA, a conjugado de polipéptido de M1-BSA o a proteína M.

Ejemplo 3. Polipéptidos de M1 con glucosilación

La comparación de la respuesta inmunológica y la protección utilizando formas glucosiladas y a-glucosiladas de polipéptidos de M1 se evalúa en modelos de ratón. Una variante importante en la posición 231 puede afectar la unión de los anticuerpos a este sitio antigénico; también se analizará la respuesta serológica a los polipéptidos de M1 con la mutación en la posición 231.

El polipéptido de M1 a-glucosilado purificado y el polipéptido de M1 con 231 mutante se combinan en proporciones iguales y se administran 50 µg con adyuvante de Freund a un grupo de ratones (10 ratones/grupo). Al mismo tiempo, los polipéptidos de M1 glucosilados se administran a un grupo adicional de ratones con adyuvante de Freund. Después de dos semanas cada grupo recibe un refuerzo con 10 µg de sus respectivos polipéptidos de M1. Un día antes de la inyección inicial, un día antes del refuerzo y siete días después del refuerzo se toman de cada ratón muestras de sangre de aproximadamente 100 µl. Se analiza la unión del suero de cada ratón al polipéptido de M1 (más y menos glucosilación), a proteína M1 y frente a un péptido inespecífico de control. Después de dos semanas, se administra un refuerzo adicional y se recoge el suero 7 días después del refuerzo. La respuesta sérica a las variantes del polipéptido de M1 permite la cuantificación de la respuesta a las formas glucosilada y a-glucosilada, y también determina los programas de inmunización para el experimento de exposición al virus.

Se inmunizan seis grupos de ratones (10 ratones/grupo) y reciben un refuerzo con polipéptido de M1 y polipéptido de M1 con 231 mutante. Tres grupos recibirán el polipéptido de M1 glucosilado combinado (grupos 1-3) y 3 grupos recibirán las formas a-glucosiladas (grupos 4-6) con adyuvante. Los ratones se expusieron tres días después del refuerzo final a una dosis letal del virus de la gripe. Los grupos se exponen a virus que representan las tres variantes identificadas de la proteína M: A/PR/8 (Grupos 1, 4), A/WSN o equivalente (Grupos 2, 5) y A/Dakota del Sur o equivalente (Grupos 3, 6). Se exponen tres grupos adicionales a cada virus como controles no inmunizados. Se miden durante 7 días la temperatura corporal y la supervivencia.

Ejemplo 4. Inhibición del virus de la gripe por el anticuerpo anti-polipéptido de M1

Debido a que la neutralización por anticuerpos *in vitro* demostró ser eficaz para bloquear la infección vírica, se analizó la capacidad de 2B-B10-G9 para bloquear la infección vírica en un organismo vivo. Se utilizaron huevos de gallina vivos enteros como un sustituto de los animales vivos basándose en la capacidad del anticuerpo para bloquear la replicación vírica en huevos vivos. Tradicionalmente, la infección del huevo con el virus de la gripe se utiliza para; (1) la selección de virus reagrupados de alto rendimiento como cepas semilla para la producción de vacunas y (2) la fabricación de cepas del virus de la gripe para la producción de vacunas. La fabricación de virus de la gripe basada en huevos de gallina se considera el método más sólido y el mejor para producir virus de la gripe. Por lo tanto, el bloqueo de la replicación vírica en este hospedador es un fuerte indicador de la potencia terapéutica. En este experimento, la prevención de la replicación en el huevo del virus se utiliza como ensayo para determinar la potencia terapéutica del anticuerpo 2B-B10-G9. Se mezclaron doscientas partículas víricas infecciosas (A/PR/8/34) en 750 µg/ml de anticuerpo 2B-B10-G9. A/PR/8/34 se utiliza tradicionalmente para la producción de virus semilla reagrupados debido a su capacidad para multiplicar rápidamente cantidades extremadamente altas de virus. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se inyectaron 100 µl de la mezcla de anticuerpo y virus en huevos de gallina fertilizados de 10 días. Además, se inyectó un control que consistía en virus sin anticuerpo en huevos de gallina fertilizados de 10 días. Los huevos se sellaron con parafina, se incubaron a 35 °C durante 40 horas y se recogieron los líquidos alantoideos. A continuación, se analizó la presencia de virus en el líquido alantoideo mediante un ensayo de hemaglutinación convencional. Las muestras se diluyeron en serie con factor 2 y se añadieron glóbulos rojos de pollo al 0,5 %. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente se puntuó la hemaglutinación de las muestras. Se realizaron dos experimentos separados e idénticos.

Tabla 1

		Factor de dilución											
		<u>2</u>	<u>4</u>	<u>8</u>	<u>16</u>	<u>32</u>	<u>64</u>	<u>128</u>	<u>256</u>	<u>512</u>	<u>1024</u>	<u>2048</u>	<u>4096</u>
Muestra	Control 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Control 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PR/8 + Ac1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PR/8 + Ac2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Control 1,2: solo PR/8/34, PR/8 +Ac1,2 : PR/8 + 2B-B10-G9 750 µg/ml. Los resultados mostraron que la adición del anticuerpo 2B-B10-G9 bloqueaba completamente la replicación vírica en el huevo (Tabla 1). El volumen de líquido alantoideo en huevos de gallina fertilizados de 10 días es de 10 ml, por lo tanto, la concentración final de anticuerpo en el huevo fue de 7,5 µg/ml.

5 Listado de secuencias

<110> ENGEN BIO, INC.

<120> VACUNA Y TERAPIA CONTRA LA INFLUENZA

<130> MOTOR.0005

<150> 61/881,325

10 <151> 2013-09-23

<160> 38

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 19

15 <212> PRT

<213> Virus de la influenza A

<400> 1

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

Asn Leu Gln

<210> 2

20 <211> 38

<212> PRT

<213> Virus de la influenza A

<400> 2

Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys
1 5 10 15

Asn Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val
20 25 30

Gln Met Gln Arg Phe Lys
35

25 <210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Virus de la influenza A

<400> 3

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

30 Asn Leu Gln

<210> 4
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A
 5 <400> 4
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Asn Leu Gln
 <210> 5
 <211> 19
 <212> PRT
 10 <213> Virus de la influenza A
 <400> 5
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Thr Gly Leu Lys Asn Asp Leu Leu Asp
 1 5 10 15
 Asn Leu Gln
 <210> 6
 <211> 19
 15 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A
 <400> 6
 Gly Thr His Pro Asn Ser Ser Thr Gly Leu Lys Asn Asp Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Asn Leu Gln
 <210> 7
 20 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A
 <400> 7
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Ile Glu
 1 5 10 15
 Asn Leu Gln
 25 <210> 8
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A
 <400> 8
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Thr Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Asn Leu Gln
 30 <210> 9
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A
 35 <400> 9
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Thr Gly Leu Arg Asp Asp Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Asn Leu Gln

<210> 10
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A
 5 <400> 10
 Gly Thr Arg Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Asn Leu Gln
 <210> 11
 <211> 19
 <212> PRT
 10 <213> Virus de la influenza A
 <400> 11
 Gly Thr His Pro Arg Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Asn Leu Gln
 <210> 12
 <211> 19
 15 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A
 <400> 12
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asn Asp Leu Phe Glu
 1 5 10 15
 Asn Leu Gln
 <210> 13
 <211> 19
 20 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A
 <400> 13
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asn Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Asn Leu Gln
 <210> 14
 <211> 19
 25 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A
 <400> 14
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Thr Gly Leu Lys Ser Asp Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Asn Leu Gln
 <210> 15
 <211> 19
 30 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A
 <400> 15
 Gly Thr His Pro Asn Ser Ser Thr Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Asn Leu Gln

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A

5 <400> 16
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Thr Gly Leu Lys Lys Asp Leu Leu Asp
 1 5 10 15

 Asn

10 <210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A

 <400> 17
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Asn Gly Leu Lys Asn Asp Leu Leu Glu
 1 5 10 15

 Asn

15 <210> 18
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A

 <400> 18
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Thr Gly Leu Arg Asn Asp Leu Leu Glu
 1 5 10 15

20 Asn Leu Gln

 <210> 19
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A

25 <400> 19
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Ser Asp Leu Leu Glu
 1 5 10 15

 Asn Leu Gln

30 <210> 20
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A

 <400> 20
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Arg Asp Asp Leu Leu Glu
 1 5 10 15

 Asn Leu Gln

35 <210> 21
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A

 <400> 21

ES 2 833 156 T3

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

Asn Leu Gln
 <210> 22
 <211> 19
 <212> PRT
 5 <213> Virus de la influenza A

<400> 22
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Asn Leu Gln
 <210> 23
 <211> 19
 10 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A

<400> 23
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ser Gly Leu Arg Asn Asp Leu Leu Glu
 1 5 10 15

Asn Leu Gln
 <210> 24
 15 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A

<400> 24
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Arg Asp Asp Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Asn Leu Gln
 20 <210> 25
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A

<400> 25
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Asp
 1 5 10 15

25 Asn Leu Gln
 <210> 26
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A

30 <400> 26
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Ala Leu Leu Glu
 1 5 10 15

Asn Leu Gln
 <210> 27
 <211> 19
 <212> PRT
 35 <213> Virus de la influenza A

ES 2 833 156 T3

<400> 27

Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Thr Gly Leu Arg Asp Asp Leu Leu Glu
1 5 10 15

Lys Leu Gln

<210> 28

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Virus de la influenza A

<400> 28

Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Thr Gly Leu Arg Asp Asn Leu Leu Glu
1 5 10 15

Asn Leu Gln

<210> 29

10 <211> 19

<212> PRT

<213> Virus de la influenza A

<400> 29

Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Asn Gly Leu Arg Asp Asp Leu Leu Glu
1 5 10 15

Asn Leu Gln

15 <210> 30

<211> 19

<212> PRT

<213> Virus de la influenza A

<400> 30

Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Thr Gly Leu Arg Asp Asp Leu Leu Gly
1 5 10 15

Asn Leu Gln

20 <210> 31

<211> 19

<212> PRT

<213> Virus de la influenza A

25 <400> 31

Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Thr Gly Leu Arg Asp Asp Leu Leu Asp
1 5 10 15

Asn Leu Gln

<210> 32

<211> 19

<212> PRT

30 <213> Virus de la influenza A

<400> 32

Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Thr Gly Leu Arg Asp Asp Leu Leu Ile
1 5 10 15

Asn Leu Gln

<210> 33

<211> 19

35 <212> PRT

<213> Virus de la influenza A

<400> 33
 Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Thr Gly Leu Arg Asp Asp Leu Leu Ile
 1 5 10 15

Asn Leu Gln

<210> 34
 <211> 19
 5 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A

<400> 34
 Gly Thr Pro Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asn Asp Leu Leu Glu
 1 5 10 15

Asn Leu Gln

10 <210> 35
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus de la influenza A

<400> 35
 Gly Thr Pro Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu
 1 5 10 15

Asn Leu Gln

15 <210> 36
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> secuencia sintética

<220>
 <221> misc_feature (características diversas)
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es His, Arg o Asn

25 <220>
 <221> misc_feature (características diversas)
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Ser, Arg o Asn

30 <220>
 <221> misc_feature (características diversas)
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es Ala, Thr o Asn

35 <220>
 <221> misc_feature (características diversas)
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es Lys o Arg

40 <220>
 <221> misc_feature (características diversas)
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa es Asn, Asp, Ser o Lys

<220>
 <221> misc_feature (características diversas)
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa es Asp, Asn o Gly

45 <220>

<221> misc_feature (características diversas)
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es Leu, Phe o Ile

 <220>
 5 <221> misc_feature (características diversas)
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa es Glu, Asp, His o Lys

 <220>
 10 <221> misc_feature (características diversas)
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa es Asn, His o Lys

 <400> 36
 Gly Thr Xaa Pro Xaa Ser Ser Xaa Gly Leu Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa
 1 5 10 15

 Xaa Leu Gln

 15 <210> 37
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia sintética

 20 <220>
 <221> misc_feature (características diversas)
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 <220>
 25 <221> misc_feature (características diversas)
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 <220>
 30 <221> misc_feature (características diversas)
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 <220>
 35 <221> misc_feature (características diversas)
 <222> (11)..(13)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 <220>
 <221> misc_feature (características diversas)
 <222> (15)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 40 <400> 37
 Gly Thr Xaa Pro Xaa Ser Ser Xaa Gly Leu Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa
 1 5 10 15

 Xaa Leu Gln

 <210> 38
 <211> 17
 <212> PRT
 45 <213> Virus de la influenza A

 <400> 38

ES 2 833 156 T3

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

Asn

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna contra la gripe que comprende un polipéptido, en donde el polipéptido consiste en
 - (i) 30 a 38 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2, o
 - (ii) una secuencia de aminoácidos según una de las SEQ ID NO: 3 a 15, 18 a 33, y 35;
- 5 en donde dicha vacuna contra la gripe es capaz de inducir una respuesta humoral en términos de anticuerpos neutralizantes contra la gripe.
2. La vacuna de la reivindicación 1, que comprende además un adyuvante.
3. Una vacuna de la reivindicación 1 para su uso en un método de vacunación de un ser humano contra una infección por el virus de la gripe.
- 10 4. La vacuna para su uso según la reivindicación 3, en donde la vacuna genera una respuesta de linfocitos B.
5. La vacuna para su uso según la reivindicación 3, en donde la vacuna genera una respuesta inmunitaria de memoria.
6. La vacuna para su uso según la reivindicación 3, en donde la administración se realiza mediante una inyección intradural, una inyección subcutánea, una inyección intravenosa, una administración oral, una administración mucosa, una administración intranasal o una administración pulmonar.

15

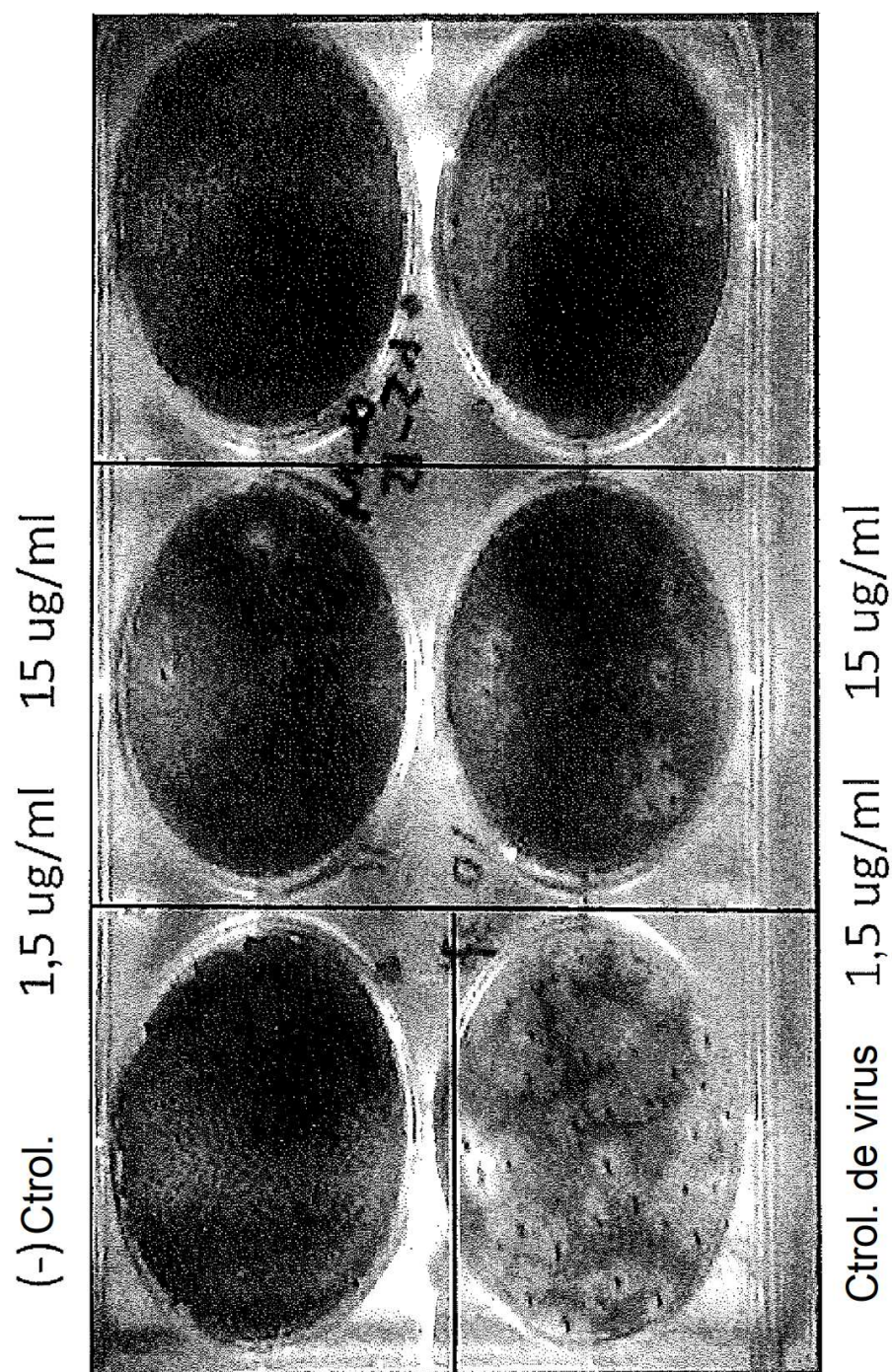


FIG. 1

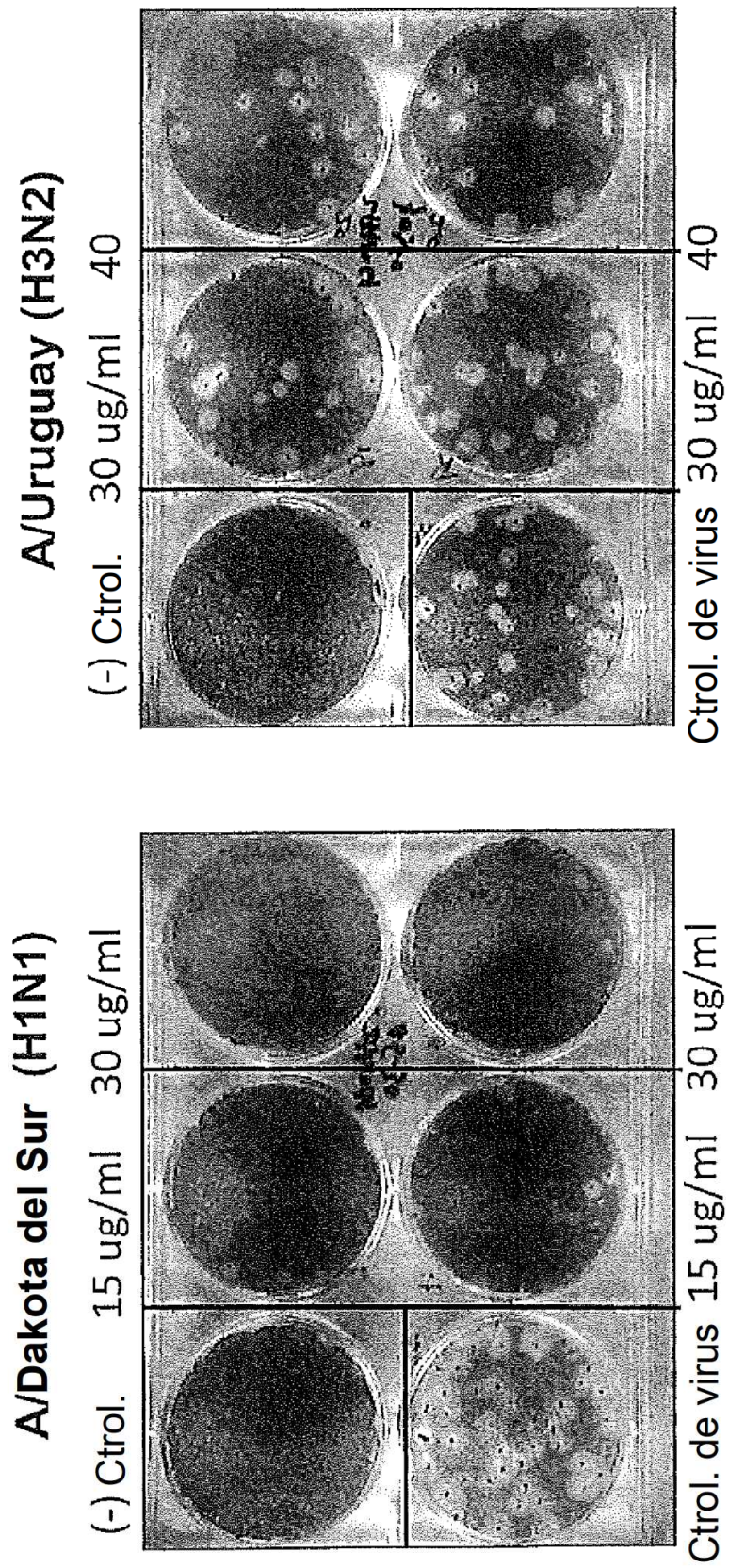


FIG. 2