

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 750**

51 Int. Cl.:
C07K 16/10 (2006.01)
A61P 1/06 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08786407 .0**
96 Fecha de presentación: **24.07.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2181122**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.05.2010**

54 Título: **DominioVHH monomérico derivado de anticuerpos de camélidos anti-VP6, dominio dimérico, método de inmunización, método de detección de rotavirus, composición, métodos de prevención y tratamiento de infecciones por rotavirus**

30 Prioridad:
27.07.2007 AR P070103331

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.08.2012

73 Titular/es:
**ALTERNATIVE GENE EXPRESSION, S.L.
(ALGENEX)
CAMPUS DE PUERTA DE HIERRO I AUTOVIA A6
KM. 7 5
28040 MADRID, ES y
INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA
AGROPECUARIA (INTA)**

72 Inventor/es:
**Surrey, Thomas;
Olichon, Aurelien; Garaicoechea, L. Laura;
Marcoppido, G. Ariana; Parreño, G. Viviana;
Gómez Sebastián, Silvia; Martínez Escribano, J.
Angel y
Wigdorovitz, Andrés**

74 Agente/Representante:
Illescas Taboada, Manuel

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).

ES 2 386 750 T3

DESCRIPCIÓN

Dominio VHH monomérico derivado de anticuerpos de camélidos anti-VP6, dominio dimérico, método de inmunización, método de detección de rotavirus, composición, métodos de prevención y tratamiento de infecciones por rotavirus.

La presente invención se refiere a un dominio VHH monomérico derivado de anticuerpos de camélidos anti-VP6, dominio dimérico, método de inmunización, método de detección de rotavirus, composiciones, métodos de prevención y tratamiento de infecciones con rotavirus. Más específicamente se refiere a un dominio (VHH) monomérico derivado de anticuerpos de camélidos, en donde dicho dominio puede ser cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, y en donde dichos dominios se unen a la proteína VP6 de rotavirus del grupo A.

Antecedentes de la invención

Rotavirus (RV) Grupo A es la principal causa de diarrea severa en niños y en las crías de muchas especies animales de interés económico (bovinos, porcinos, equinos, camélidos Sudamericanos, etc). Como problema de salud pública, RV es la tercera causa de muerte más común asociada con diarrea severa en los países en desarrollo (2 millones de muertes por año). Por otro lado, la diarrea inducida por RV en animales para consumo, por ejemplo terneros jóvenes, provoca elevados gastos relacionados con la prevención o el tratamiento.

Los RV Grupo A son partículas conformadas por una triple cápside proteica. La superficie de la cápside externa esta conformada por las proteínas VP4 y VP7, ambos antígenos altamente variables; hasta el momento se han descrito al menos 27 variantes de VP4 (P-tipos) y 16 variantes de VP7 (G-tipos). Cada combinación de G-P tipo induce anticuerpos neutralizantes de baja reactividad cruzada con otros G-P tipos, por lo cual es necesario incluir en las vacunas las distintas cepas circulantes en la especie destino.

La cápside intermedia esta constituida por la proteína trimérica VP6, que representa el 51% de la masa del virión. Dependiendo de la presencia o ausencia de dos epítomos diferentes en la proteína VP6 (reconocidos por los anticuerpos monoclonales mAb 255/60 y 631/9), las cepas de RV grupo A son adicionalmente clasificadas como subgrupos (Sb) I, II, I+II y nol noll. Los RV humanos son usualmente Sb II, mientras que los RV animales son principalmente Sb I. La proteína VP6 es altamente inmunogénica; los humanos y animales infectados de manera natural desarrollan una fuerte respuesta humoral contra los epítomos de VP6. Independientemente de los subgrupos mencionados anteriormente, VP6 es una proteína altamente conservada dentro de todos los RV Grupo A (>90% de homología de aminoácidos), y los antígenos comunes compartidos pueden ser detectados por antiseros policlonales o por anticuerpos monoclonales ampliamente reactivos. Por lo tanto, VP6 es el antígeno blanco de la mayoría de los exámenes de inmunodiagnóstico diseñados para la detección de RV Grupo A. Los anticuerpos dirigidos contra esta proteína no poseen actividad neutralizante *in vitro*. Sin embargo anticuerpos monoclonales IgA logran bloquear la replicación viral intracelularmente en ratones.

Actualmente, la prevención de diarrea en animales inducida por RV se basa en la inmunización pasiva, mientras que en seres humanos se utiliza la inmunización activa. En los animales, se aplican vacunas parenterales de virus inactivados en las hembras preñadas, para proteger a los recién nacidos a través de la transferencia de anticuerpos maternos vía calostro y leche. Esta estrategia es altamente efectiva para prevenir los síntomas de la diarrea severa y para reducir la morbilidad y mortalidad en los ganados afectados, pero no logra prevenir la infección por RV porque no reduce significativamente la cantidad de virus excretado por los animales infectados (Parreno, V., C. *et al.*, Vet Immunol Immunopathol 100:7-24, 2004). Solamente la presencia continua de títulos elevados de anticuerpos pasivos contra RV en el lumen del intestino, (naturalmente producidos o artificialmente agregados a la leche) protege completamente contra la diarrea y reduce significativamente la excreción viral (Fernandez, F. M., *et al.*, Vaccine 16:507-16, 1998; Saif, L. J., *et al.*, Infect Immun 41:1118-31, 1983 y Saif, L. J., *et al.*, Adv Exp Med Biol 216B:1815-23, 1987).

En niños, se han aprobado dos vacunas de virus vivos atenuados mediante reasociación genética. Ambos productos han demostrado tener buena eficacia contra la diarrea severa inducida por RV. Sin embargo, dados los antecedentes de intususcepción asociados a una vacuna previamente utilizada en humanos (Murphy, T. V., *et al.*, J Infect Dis 187:1309-13, 2003) y el descubrimiento reciente de viremia de RV en niños infectados de manera natural (Ray, P., *et al.*, J Infect Dis 194:588-93, 2006 y Blutt, S. E., *et al.*, Lancet 362:1445-9, 2003) se ha puesto en discusión la inocuidad de dichas vacunas, especialmente en niños prematuros, inmunosuprimidos y desnutridos. Por lo tanto, se necesitan estrategias alternativas y complementarias para la prevención y el tratamiento de la diarrea inducida por RV.

Las estrategias de inmunidad pasiva, tales como el amamantamiento, la administración de anticuerpos anti-RV purificados del calostro bovino o huevos (IgG anti-RV humana y bovina o IgY de la yema de huevo de gallina), mostraron reducir la enfermedad diarreica tanto en humanos como en animales. Pero la posibilidad de producir grandes cantidades de anticuerpos de una manera costo-eficiente y con propiedades reproducibles es baja. Es por lo tanto necesario generar anticuerpos diseñados para inmunización pasiva de animales y seres humanos contra

RV, particularmente anticuerpos que puedan producirse a escala industrial, que no produzcan reacciones inmunológicas, que sean suficientemente pequeños para acceder eficientemente a los epítomos de proteínas internas, conservadas y, que sean capaces de reconocer e inhibir la replicación de cepas de diferentes genotipos (polirreactivos).

5 El dominio VHH de la cadena pesada de los anticuerpos de los camélidos es, con un peso de 15 kDa, el dominio natural más pequeño conocido con capacidad completa de unión al antígeno, es ideal para la generación de bibliotecas de ADN codificante para fragmentos de cadena única con capacidad natural de reconocimiento de antígenos. Además, se pueden usar estrategias de inmunización de la llama para enriquecer la biblioteca de VHH en aquellos dirigidos contra un antígeno de interés. Debido a sus propiedades particulares, los dominios VHH derivados de cadenas pesadas de anticuerpos de llama son herramientas muy versátiles para el desarrollo de reactivos de diagnóstico y productos diseñados para prevenir o tratar la diarrea inducida por RV. Por ejemplo, se ha reportado recientemente que un VHH dirigido contra una cepa de RV de G-tipo G3, producido en levaduras, mostró actividad neutralizante *in vitro*, y que el VHH purificado fue capaz de reducir la aparición y la duración de la diarrea inducida por RV en ratones lactantes, (Pant, N., *et al.*, J Infect Dis 194:1580-8, 2006 y van der Vaart JM, *et al.*, Vaccine. May 8; 24(19):4130-7, 2006). Sin embargo estos autores no han podido identificar contra qué proteína viral están dirigidos los VHH obtenidos y suponen que estarían dirigidos contra epítomos conformacionales de las proteínas externas.

20 El documento de patente WO 2006/056306 divulga la producción y el uso de dominios VHH o fragmentos de los mismos para terapia de las infecciones producidas por microorganismos entero-patógenos, por ejemplo RV. Se muestra la producción de dichos VHH o su uso en un sistema de liberación sitio específico. Por ejemplo, se divulga la liberación de los VHH específicos en el sistema gastrointestinal mediante su encapsulación en alginato. Se propone además como método de liberación el uso de microorganismos probióticos transgénicos que liberan los anticuerpos VHH específicos y en donde dichos microorganismos pueden colonizar el intestino humano. Se proponen diferentes estrategias de elaboración de medicamentos o alimentos empleando los anticuerpos VHH encapsulados o expresados por microorganismos probióticos. Los VHH producidos no se unen a VP6, no serían neutralizantes y tampoco son empleados solos, sino que se emplean en un sistema de liberación controlada.

30 El documento de patente US 20050054001 de Muyldermans Serge divulga anticuerpos de cadenas pesadas, dominios funcionales de anticuerpos de cadena pesada, dominios funcionales VH, o fragmentos de los mismos que comprenden determinadas secuencias de aminoácidos modificadas o mutadas. No se divulgan secuencias que correspondan a dominios VHH que se unan a VP6 de RV.

35 El documento de patente WO 00/65057 divulga proteínas monovalentes que comprenden un único dominio variable, las cuales se unen a antígenos virales, particularmente al bacteriófago P2 de *Lactococcus*. Sólo se divulgan secuencias de VHH que inhiben a dicho bacteriófago.

40 El documento de patente US 2007/0009512 de Hamers y colaboradores, y los documentos anteriores de los mismos inventores divulgan fragmentos de cadenas pesadas de inmunoglobulinas y el uso de los mismos para tratamientos veterinarios, por ejemplo inmunoterapia pasiva o seroterapia. Los VHH descritos sólo reconocen a la toxina del tétanos. El método utilizado para obtener los VHH es a partir de ARNm de camélidos inmunizados.

Breve descripción de la invención

45 Es un objeto de la presente invención proveer un dominio (VHH) monomérico derivado de anticuerpos de camélidos, en donde dicho dominio puede ser una de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, y en donde dichos dominios se unen a la proteína VP6 de RV grupo A.

50 Es otro objeto de la presente invención proveer un dominio dimérico que se une a la proteína VP6 de RV grupo A, en donde dicha proteína de fusión comprende al menos una secuencia monomérica mostrada en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En una realización preferida la proteína de fusión comprende a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.

55 Es otro objeto de la presente invención proveer un método de inmunodetección de rotavirus que comprende contactar una muestra que contenga RV con una de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o combinaciones de las mismas; y revelar.

60 Dicho método de inmunodetección puede llevarse a cabo por cualquiera de las técnicas conocidas en el estado de la materia, por ejemplo: ensayos basados en inmunocaptura ELISA, ELISPOT, ELISA de competición, perlas magnéticas o test de campo *in situ* (a pie de establo).

65 Es otro objeto de la presente invención proveer una composición para otorgar inmunidad pasiva a un mamífero que comprende cualquiera de las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9, excipiente e inmunomoduladores.

Es otro objeto de la presente invención proveer un método de prevención de las infecciones producidas por RV que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad eficaz de una secuencia cualquiera de las mostradas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o combinaciones de las mismas, en donde dichas secuencias se encuentran solas o combinadas con sustancias que encapsulen y las protejan de la degradación en el tracto gastrointestinal.

Es otro objeto de la presente invención proveer un método para el tratamiento de las infecciones producidas por RV, en donde dicho método comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad eficaz de una secuencia de aminoácidos cualquiera de las mostradas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y combinaciones de las mismas, solas o combinadas con sustancias que encapsulen y protejan a los anticuerpos de su degradación en el tracto gastrointestinal.

Descripción de las figuras

Figura 1. Inmunización de llamas. Cronograma de inmunización, recolección de muestras, sangrado final y evaluación de respuesta de anticuerpo de rotavirus en suero durante el ciclo temporal de inmunización: titulaciones de anticuerpos medidas por (i) ELISA usando VP6 recombinante, (ii) ELISA usando rotavirus (IND; Sb I P[5]G6), (iii) neutralización de virus y (iv) ELISPOT usando el mismo rotavirus (IND; Sb I P[5]G6). Los puntos temporales de vacunación se representan mediante flechas.

Figura 2. Detección de proteína VP6 nativa y recombinante mediante Western blot. BRV IND (**A**) o VP6 recombinante (**B**) procesados en condiciones reductoras; o en condiciones no reductoras y detectados con: Carriles 1 y 8- suero policlonal bovino anti RV de grupo A; 2 y 9- Mab anti VP6 (RG25A10); 3 y 10- VHH 2KA4 anti VP6; 4 y 11- VHH 2KD1 anti VP6; 5 y 12- VHH 3B2 anti VP6; 6 y 13- VHH 3A6 anti VP6; 7 y 14- VHH no relacionado.

Figura 3. ELISA-VHH: detección de cepas de rotavirus con diferente reactividad de subgrupo y especificidades de tipo G/P, de diferentes especies animales.

A) VHH monomérico capturado por anticuerpo 2KA4, 2KD1, 3A6 (2 µg/pocillo).
B) Recubrimiento directo con VHH bivalente biv2KA4, biv2KD1, biv3A6 (1 µg/pocillo). Sobrenadante de cultivo tisular de rotavirus bovino IND (Sbl; P[5]G6), C486 (Sbl; P[1]G6); y B223 (Sbl; P[11]G10); rotavirus humano Wa (Sbl; P[8]G1) y rotavirus equino H2 (Sb nº I, nº II; P[12]G3); heces positivas: muestra fecal correspondiente al pico de excreción viral de un ternero infectado experimentalmente con rotavirus IND; MA-104: sobrenadante de células pseudo-infectadas. PBS: (blanco de la reacción), heces negativas: muestra de materia fecal de ternero negativa para rotavirus.

Las barras de error indican la desviación estándar de dos mediciones independientes;

Figura 4. Ensayo *in vitro* de reducción de focos fluorescentes de rotavirus. Se mezcló una dilución de cada VHH monovalente 2KA4, 2KD1, 3A6 y 3B2, diluidos cuatro veces, con el mismo volumen de rotavirus que contiene 100 UFF. La concentración de VHH que genera >80% de reducción de la tasa de infección se considera protectora.

A. Rotavirus bovino C486 (homólogo a Ag usado en vacunación y presentación a ratones);
 B. Rotavirus bovino IND (homólogo a Ag usado en selección de agente de unión);
 C. Rotavirus bovino B223;
 D. Rotavirus humano Wa;
 E. Rotavirus equino H2.

Las gráficas representan el sumario de los resultados de dos ensayos independientes.

Figura 5. Tasa de protección contra la diarrea conseguida por VHH monovalente 2KA4, 2KD1, 3A6 y 3B2 en ratones neonatos infectados con rotavirus. Los ratones lactantes fueron alimentados con 100 µg (100 µl) de cada VHH desde el día 0 al 5, una vez al día por vía intragástrica. Al día 1 los lactantes fueron infectados también en forma intragástrica con RV 2 horas después de su alimentación rutinaria. Se evaluó la diarrea diariamente hasta 96 h post-infección.

A. Exposición: 30 DD50 (6x10⁵ UFF) de rotavirus bovino C486. El experimento se llevó a cabo en tres ensayos independientes de 5 ratones por grupo.
 B. Exposición: 316 DD50 de rotavirus murino ECw. El experimento se llevó a cabo en dos ensayos independientes de 5 ratones por grupo.
 C. Excreción viral cuantificada por ELISA en los homogeneizados del intestino delgado 10% p/v.

El símbolo # significa el porcentaje de animales afectados que difiere significativamente del grupo no tratado/infectado, Ensayo Exacto de Fisher, p<0,05.

Las barras representan la media de las absorbancias de ELISA a 405 nm por grupo. Las barras de error indican \pm Desviación Estándar. Valor de corte de ELISA: 0,200.

5 **Figura 6 A.** Muestra la expresión de VHH en larvas de T.ni. Los niveles de expresión son suficientemente altos para detectar dos bandas del peso molecular esperado en la tinción de coomassie. **B.** muestra una cuantificación del VHH expresado en el sistema de larvas.

10 **Figura 7** muestra técnica de ELISA usando VHH de larvas. Se usaron proteínas solubles totales (TSP) de larvas que expresan VP6 [Ag(+)] o de larvas infectadas con un baculovirus recombinante no inserto [Ag(-)] para recubrir microplacas de ELISA (Polysorp, Nunc, Dinamarca) con diluciones seriadas que comienzan a 40 μ g/pocillo en tampón de bicarbonato/carbonato 50 mM, pH 9,6 y se incubaron O.N a 4 °C.

Descripción detallada de la invención

15 A los efectos de la presente solicitud, el término “dominio” es una parte de secuencia y estructura de proteína (anticuerpo) que puede evolucionar, actuar y existir de forma independiente del resto de la cadena proteica. Cada dominio forma una estructura tridimensional compacta y con frecuencia puede ser de forma independiente estable y plegada. Muchas proteínas consisten en varios dominios estructurales. Un dominio puede aparecer en una diversidad de proteínas relacionadas de forma evolutiva. Los dominios varían en longitud entre aproximadamente 25
20 aminoácidos y hasta 500 aminoácidos de longitud. Los dominios son capaces de unirse a epítomos. Los dominios de la presente solicitud se unen a la proteína VP6 de RV de grupo A.

A los efectos de la presente solicitud se considera que las expresiones “VHH”, “dominio VHH”, “VHH monomérico” y “monómero VHH” tienen el mismo significado y son intercambiables.

25 A los efectos de la presente solicitud se considera que las expresiones “proteína VP6”, “antígeno VP6” y “VP6” tienen el mismo significado y son intercambiables.

30 A los efectos de la presente solicitud se considera que las expresiones “dominio dimérico”, “dímeros VHH” y “VHH diméricos” tienen el mismo significado y son intercambiables.

El término “homodímero” se define como una proteína o polipéptido formado por dos dominios monoméricos idénticos, con o sin una secuencia conectora.

35 El término “heterodímero” se define como una proteína o polipéptido formado por dos dominios monoméricos diferentes, con o sin una secuencia conectora.

40 La expresión “condiciones de crecimiento apropiadas” se refiere al ambiente adecuado establecido para mejorar el crecimiento de las células transgénicas (transformadas, transfectadas o infectadas por el vector definido en la invención). Por ejemplo, las larvas infectadas se mantienen en cámaras de crecimiento a 28 °C y se recogen en los tiempos indicados.

45 A los efectos de la presente invención “vacuna” es una preparación que se usa para transmitir inmunidad a una enfermedad particular. Una composición diseñada para conferir inmunidad pasiva a un mamífero, caracterizada porque comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, y combinaciones de las mismas; excipiente e inmunomoduladores.

50 La expresión “cantidad eficaz de una secuencia de aminoácidos (polipéptido)” para administrar en un mamífero para prevenir la infección producida por RV, se refiere a una cantidad previamente estimada de la secuencia de aminoácidos (polipéptido) necesaria para unir el epítomo y bloquear la acción del patógeno (virus) que con el tiempo infectará el organismo hospedador.

55 La expresión “cantidad eficaz de una secuencia de aminoácidos (polipéptido)” para administrar en un mamífero para tratar la infección producida por RV, se refiere a la cantidad de la secuencia de aminoácidos (polipéptido) necesaria para unir el epítomo y bloquear la acción del patógeno (virus) que ya ha infectado el organismo hospedador.

60 A los efectos de la presente invención el término “mamífero” se refiere, en general, a miembros de la Clase *Mammalia*, por ejemplo: seres humanos, bovinos, caprinos, ovinos, cerdos y equinos.

Se define como secuencia conectora una secuencia de aminoácidos que une dos dominios monoméricos.

65 Se describe la selección, obtención y caracterización de anticuerpos VHH dirigidos hacia la proteína de la cápside intermedia de los RV grupo A, VP6. Se muestra que los VHH de la invención son proteínas ampliamente reactivas que pueden ser manipuladas para su uso en un ensayo de inmuno-diagnóstico universal para la detección de los RV grupo A. Adicionalmente, se muestra que algunos de los VHH anti-VP6 seleccionados tienen una amplia actividad

neutralizante *in vitro*, y que algunos de dichos VHH protegen contra el desafío viral *in vivo*. En base a su conocimiento los inventores creen que los VHH de la invención son las primeras moléculas descritas que se unen a la proteína VP6 y que tienen actividad neutralizante.

5 Para obtener los dominios VHH de la invención se llevó a cabo el cronograma de inmunización de los animales que se muestra en la Figura 1. Para evaluar la respuesta inmune de la llama se analizaron los títulos de anticuerpos
10 contra RV y VP6 mediante ELISA, ensayos de neutralización de virus (VN) y células secretoras de anticuerpos
específicos circulantes en sangre periférica mediante ELISPOT. Tal como se podía esperar al día 0 post inoculación
(DPI), las llamas eran positivas para anticuerpos anti RV indicando el contacto previo con el antígeno. Sin embargo,
15 no había células secretoras de anticuerpos circulantes en sangre. Al día 7 post-inyección el título de anticuerpos
contra IND RV o VP6 determinado por ELISA era elevado y se detectó un pico de células secretoras de anticuerpos
específicas para RV en sangre periférica (16 células productoras de IgG anti-RV/5x10⁵ células mononucleares). La
respuesta humoral alcanzó una meseta a partir del día 14 post-inyección, con altos títulos de anticuerpos tanto para
20 el virus entero como para la proteína VP6. En cambio, los títulos de anticuerpos neutralizantes permanecieron
similares y muy bajos para todos los diferentes RV estudiados (IND, B223, Wa y H2). Aunque se obtuvieron títulos
de anticuerpos muy elevados en el suero, la cantidad de células secretoras de anticuerpos anti-RV detectada en
sangre fue decreciendo con cada refuerzo (Figura 1). Por esta razón, y con el objeto de dar suficiente tiempo para
favorecer la maduración de la afinidad de los anticuerpos, la llama no recibió la dosis final de VP6 hasta mucho más
25 tarde, el día 246 post-inyección (aproximadamente 7 meses después de la 4^a dosis). Finalmente, se tomaron
muestras sanguíneas de la llama 4 días después del último refuerzo, alcanzando valores de 26,8 células secretoras
de IgG anti-RV/5x10⁵ células mononucleares. Se extrajeron a partir de 900 ml de sangre 6x10⁸ células
mononucleares (que contenían al menos 32.160 células secretoras de anticuerpos IgG específicas para RV, de
acuerdo a los resultados de ELISPOT). A partir del ARN procesado (210µg) se generó una biblioteca de fagos de
30 VHH que contenía 6 x 10⁷ clones. El esquema de vacunación empleado mostró que para obtener los VHH de la
invención es más importante alcanzar altos valores de células secretoras de anticuerpos específicos en vez de altos
títulos de anticuerpos dirigidos contra los antígenos de interés. En el esquema de vacunación utilizado fue posible
obtener suficientes cantidades de células secretoras de anticuerpos específicos. Los resultados obtenidos durante el
transcurso de la inmunización permiten destacar que el mejor método para seguir la respuesta inmune de una llama
35 inmunizada para la construcción de una biblioteca de VHH, es seleccionar una técnica que evalúe la cantidad de
células secretoras de anticuerpos específicas circulantes en la sangre periférica, en lugar de los títulos de
anticuerpos séricos contra el antígeno de interés. De acuerdo con el patrón de células secretoras de anticuerpos
obtenido, se demostró que un régimen de vacunación con un largo intervalo entre las dos últimas dosis promueve la
circulación de mayor cantidad de células secretoras de anticuerpos específicas en la sangre periférica. También se
demostró que a los 4 días post inoculación hay mayor número de células secretoras de anticuerpos circulantes
40 contra el antígeno de interés que a los 7 días post inoculación. El esquema de inmunización deberá realizarse de
manera tal que la dosis de refuerzo se aplique a las llamas al menos 5 meses después de la última dosis y se lleva a
cabo la generación de las colonias de fagos cuando se alcance en sangre periférica una cantidad en el orden de 20
células secretoras de anticuerpos IgG anti- antígeno diana. Preferentemente, para VHH anti VP6 la cantidad de
células secretoras de anticuerpos IgG en sangre periférica deberá estar un orden de alrededor de 30 células
45 secretoras de anticuerpos IgG anti-rt completo. Los expertos en la técnica saben que se pueden utilizar otros
esquemas de inmunización para obtener VHH adecuados para ser utilizados en los métodos y composiciones de la
presente invención.

Para seleccionar los fagos que expresaban VHH anti-RV se realizaron tres rondas de selección *in vitro* empleando
45 IND RV como antígeno. Se seleccionaron 192 clones. Se realizaron los análisis de restricción de todos los clones
que indicaban una gran diversidad de unión a VP6 en la biblioteca de VHH, esto último determinado por ELISA de
fagos. Los clones también fueron ensayados mediante ELISA para determinar su capacidad para unirse a RV y VP6.
A partir de 14 clones con diferentes secuencias se seleccionaron 10 clones que mostraban una unión específica más
fuerte a RV y VP6, y fueron sub-clonados en un vector de expresión que provee una cola de hexahistidinas carboxi-
50 terminal para facilitar su purificación (Tabla 1)

Tabla 1
Resumen de los resultados de la evaluación cualitativa para la selección de los dominios VHH

Monómeros de VHH	Ronda de <i>biopanning</i> / condición	ELISA de fagos RV	ELISA de fagos VP6	Prueba de expresión		Detección de RV por ELISA	
				Apariencia del cultivo de VHH	Nivel de expresión	VHH como anticuerpo de captura ¹	VHH como anticuerpo secundario
2RE4	2º A	++	+	normal	+++	++	+++
2KA4	2º B	+++	+++	normal	+++	++	+++
2KA5	2º B	+++	-	Lisis	+	++	+++
2KA10	2º B	+++	+++	Lisis	No purificado	++	+++
2KD1	2º B	+++	+++	normal	+++	++	+++
3A6	3º B	++	+	normal	+++	++	+++
3B2	3º B	+++	++	normal	++	++	+++
3C10	3º B	+++	-	normal	++	++	+++
3D9	3º B	+++	+++	normal	+++	++	fondo
3H1	3º B	+++	-	Lisis	No purificado	++	+++

¹ Unido a la placa usando anticuerpo anti-histidina.

5 Se seleccionaron cuatro clones que se unían más fuertemente a las cepas de RV que correspondían a diferentes subgrupos, dichos clones se denominaron 2KA4 (SEQ ID NO: 1), 2KD1 (SEQ ID NO: 2), 3A6 (SEQ ID NO: 3) y 3B2 (SEQ ID NO: 4), los cuales reconocían a VP6 recombinante y su homóloga nativa de IND RV evaluado mediante Western blot, lo que indica que dichos VHH se unen a epítomos conformacionales de esta la proteína VP6 (Figura 2). De aquí en adelante los VHH denominados 2KA4, 2KD1, 3A6 y 3B2 son los dominios VHH de la invención.

Las secuencias de ADN que codificaban a cada uno de los dominios VHH fueron las siguientes:

15 SEQ ID NO: 5 codifica el dominio SEQ ID NO: 1;
SEQ ID NO: 6 codifica el dominio SEQ ID NO: 2;
SEQ ID NO: 7 codifica el dominio SEQ ID NO: 3;
SEQ ID NO: 8 codifica el dominio SEQ ID NO: 4;

20 Los expertos en la técnica saben que cualquier secuencia de ADN que codifica dichos dominios cae dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 puede ser codificada por la secuencia de ADN SEQ ID NO: 5 u otra secuencia de ADN que difiere de la SEQ ID NO: 5 debido a la degeneración del código genético. Vale el mismo ejemplo para cada una de las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NOs: 2, 3 y 4,) codificadas por las respectivas secuencias de ADN (SEQ ID NOs: 6, 7 y 8).

25 Los VHH específicos anti-VP6 de la invención resultaron muy eficientes como reactivos para el inmunodiagnóstico de RV. Las formas monoméricas de los VHH de la invención fueron ensayadas en ELISA como anticuerpos de captura, como anticuerpos secundarios o inmovilizados mediante anticuerpos anti-His. Los VHH de la invención fueron capaces de detectar cepas de RV de origen humano o animal con diferentes subgrupos específicos y diferentes tipos G y P (Figura 3A).

30 Por otra parte, se construyeron vectores de expresión para producir los VHH diméricos de la invención que se unen específicamente a VP6, los cuales constituyen genes VHH idénticos unidos con una secuencia conectora similar a la secuencia bisagra de IgA humana. Los VHH diméricos de la invención también fueron evaluados en ELISA como captura directa, mostrando señales claras y reproducibles para todas las cepas de RV estudiadas (Figura 3B). Los VHH diméricos de la invención pueden ser usados para la sensibilización de las placas de ELISA eliminando la necesidad de utilizar anticuerpos de captura del VHH y muestran mejores resultados de detección de RV que su homólogo monomérico.

40 Es importante destacar que los rendimientos de los VHH monoméricos expresados en el periplasma de *E. coli* fueron comparables con aquellos reportados por otros autores en *E. coli* y levaduras.

45 Los VHH monoméricos y diméricos de la presente invención han mostrado ser muy útiles para el diagnóstico de RV y pueden ser por lo tanto empleados como anticuerpos monoclonales recombinantes en cualquier inmunodiagnóstico conocido por los expertos en la técnica. Es evidente para los expertos en la técnica que los dominios VHH monoméricos y diméricos de la invención pueden ser empleados para cualquier tipo de ensayo de inmunodiagnóstico para la detección de RV, y que dichos ensayos caen dentro del alcance de la presente invención.

Los dominios anti-VP6 de la invención pueden utilizarse para construir dímeros como los descritos en la presente, por ejemplo homodímeros, o pueden fusionarse formando heterodímeros, por ejemplo fusionando el dominio 3B2 y el dominio 3A6 o fusiones de dos cualesquiera de los monómeros VHH de la invención. Es más, también se pueden fusionar o combinar tres o más monómeros VHH de la invención generando homotrímeros u heterotrímeros. Todas las formas multiméricas que surgen de la combinación de monómeros VHH de la invención que contengan o no una secuencia conectora caen dentro del alcance de la presente invención. En una realización preferida los dímeros VHH de la invención tienen las secuencias divulgadas como SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12. Por ejemplo los dímeros pueden comprender una secuencia de aminoácidos conectora tal como la mostrada en la SEQ ID NO: 13 o cualquier otra secuencia que funcione como secuencia bisagra.

En la siguiente Tabla se muestran algunas características de los VHH diméricos y monoméricos de la invención

Tabla 2

15 Características

Monómeros	Especificidad de la proteína ¹	Rendimiento de la producción a gran escala (mg/L) ²	Polirreactivos para RV (ELISA) ³	Neutralización de la infectividad de RV <i>in vitro</i> (□g/100 UFF RV)
2KA4	VP6	52,1	sí	NO
2KD1	VP6	21,3	sí	Alto
3A6	VP6	18,6	sí	Medio
3B23	VP6	16,9	sí	Alto
VHH no relacionado	Proteína celular	7.2	NO	NO
Dímeros				
Biv2A4	ND	0,90	sí	NO*
Biv2KD1	ND	0,50	sí	Bajo
Biv3A6	ND	1,72	sí	Bajo y dependiente de la cepa

¹ Determinado por WB contra IND RV y VP6 recombinante.

² Basado en un conjunto de 6 cultivos de 0,5 L cada uno, purificado por medio de una columna anti-cola de histidina.

³ Detección de cepas de RV Sb I, Sb II, Sb no I; no II.

Los dominios VHH anti VP6 de la invención fueron capaces de neutralizar diferentes cepas de RV *in vitro*. Tres de los cuatro monómeros de la invención (2KD1, 3A6 y 3B2) mostraron actividad ampliamente neutralizante *in vitro*. La capacidad neutralizante de cada VHH fue homogénea para todas las cepas de RV evaluadas. Las concentraciones de monómero a partir de 3,9 µg/ml fueron capaces de neutralizar completamente la infectividad generada por 100 UFF de las cepas de RV C486 (P[1]G6), IND (P[5]G6), B223 (P[11]G10), Wa P[8]G1 y H2 (P[12]G3), *in vitro*. En la tabla 3 se detalla el título neutralizante contra diferentes cepas de RV, de una solución con una concentración de 2 mg/ml para cada monómero.

Table 3

25 Título de neutralización de los diferentes dominios VHH monoméricos y diméricos

Dominio VHH	Concentracación de VHH ensayado	VN título de anticuerpo ¹				
		IND Sbl P[5]G6	C486 Sbl P[1]G6	B223 Sbl P[11]G10	Wa SblII P[8]G1	H2 Sbl nol, noll P[12]G3
2KA4		<8	<8	<8	<8	<8
2KD1	2 mg/ml	2048	2048	2048	8192	512
3A6		1024	1024	256	2048	128
3B2		1024	1024	2048	8192	512
VHH no relacionado	0,4 mg/ml	<8	<8	<8	<8	<8
Dímeros						
Biv2KA4	0,5 mg/ ml	<8	<8	<8	32	<8
Biv2KD1	0,5 mg/ ml	32	128	8	128	32
Biv3A6	2 mg/ml	128	512	8	512	128

¹ Títulos de anticuerpos neutralizantes de diferentes cepas de RV, expresados como la inversa de la dilución de VHH más alta que reduce >80% de las unidades formadoras de focos generadas por 100 UFF de cada cepa de RV.

Por tanto, los monómeros de VHH fueron capaces de neutralizar cepas de RV pertenecientes a diferentes combinaciones de tipos G/P que normalmente no inducen neutralización cruzada. El monómero VHH con la mayor

capacidad de neutralización fue el monómero 2KD1. Por otro lado, aunque el monómero 2KA4 fue capaz de reconocer apropiadamente todos los RV en el ELISA, no neutralizó ninguna de las cepas estudiadas. La capacidad de los VHH de la invención de neutralizar en altos títulos a cepas de RV antigénicamente diferentes es de gran importancia y los haría moléculas polineutralizantes, esta propiedad los transforma en potenciales herramientas de prevención o tratamiento de la diarrea por RV independientemente del serotipo (27 P-tipos y 16 G-tipos)

Los VHH diméricos mostraron menor actividad de neutralización que sus homólogos monoméricos.

Se evaluó la capacidad de los monómeros VHH de la invención para el tratamiento y la prevención de las diarreas producidas por la infección de RV. Para ello se administró en ratones neonatos una dosis diaria intragástrica de VHH durante 5 días (día 0 a 4). Los ratones fueron infectados el día 1 con la cepa viral C486 también por vía intragástrica (Fig. 5). El 60% de los ratones tratados con el VHH monomérico de la invención 3B2 fueron protegidos contra la diarrea inducida por RV. Esta protección fue significativamente mayor cuando se compararon los ratones tratados con los ratones no tratados o los tratados con VHH no relacionado ($p=0,0108$), en los cuales todos los ratones resultaron afectados de diarrea (Tabla 4 y Figura 5). Además la severidad y la duración de la diarrea en los animales tratados con el VHH de la invención estaban significativamente reducidos en comparación con los grupos controles.

Tabla 4
Protección contra el desafío con Rotavirus en ratones lactantes

Tratamiento (100 µg de VHH I.G. una vez al día durante 4 días:0-5) Infección el día 1: C486 (2×10^5 UFF)	n	Diarrea					
		Duración media en el grupo	Severidad media en el grupo	% animales afectados	Comienzo	Duración media de la diarrea en animales afectados.	Severidad de la diarrea en animales afectados
2KA4	10	2A B	3,7 B	80 AB	1,25 A	2,5 AB	4,12 B
2KD1	10	1,4 B	3,25 B	70 AB	1,28 A	2,0 B	3,78 B
3A6	10	2,2 AB	4,15 AB	90 AB	1,22 A	2,4 AB	4,39 AB
3B2	10	0,8 B	2,65 B	40 B	1,25 A	2,0 B	3,62 B
VHH no relacionado	5	2,4 AB	4,4	100 A	1,2 A	2,4 AB	4,4 AB
Suero policlonal positivo	5	0 B	2,1 B	0 B	na	na	na
Suero policlonal normal	5	2,4 AB	4,25 AB	100 A	1,2 A	2,4 AB	4,25 AB
No tratados /infectados	15	3 A	5,3 A	100 A	1,05 A	3,3 A	5,31 A
No tratados/no infectados	5	0 B	na	0 B	na	na	na

na: no aplicable

Los valores medios de las mismas columnas con diferentes letras difieren significativamente (Kruskal Wallis, $p < 0,05$).

Los porcentajes de animales afectados con diferentes letras difieren significativamente (Fisher Exact Test, $p < 0,05$).

Es importante destacar que el mayor título de neutralización se obtuvo contra la cepa de RV heteróloga humana (Wa, SblI, P[8]G1), la cual es considerada la cepa más común asociada con la gastroenteritis en niños a nivel mundial.

La producción y purificación de estos fragmentos de anticuerpos puede ser realizada con altos rendimientos, resultando en un menor costo de producción. Esto es especialmente relevante para países en desarrollo, donde la magnitud de infección y morbilidad/mortalidad por RV es enorme, y los costos de tratamiento y prevención son factores limitantes críticos.

Cualquier experto en la técnica sabe que los dominios VHH de la invención a partir de lo divulgado en la presente pueden ser producidos mediante síntesis de la secuencia de nucleótidos correspondiente y su expresión en cualquier célula huésped, sin la necesidad de crear una biblioteca de fagos.

Es evidente para cualquier experto en la materia que se pueden usar diferentes combinaciones y mezclas de los monómeros VHH, dímeros VHH o multímeros VHH de la invención para inmunodiagnóstico, prevención de infecciones con RV y tratamiento de mamíferos infectados con RV sin alterar el espíritu de la presente invención, y en donde todas las combinaciones y mezclas posibles caen dentro del alcance de la presente invención.

Tal como se ha mencionado anteriormente, se seleccionaron cuatro clones que se unieron más fuertemente a las cepas de RV que correspondían a diferentes subgrupos. Estos clones se denominaron 2KA4 (SEQ ID NO: 1), 2KD1 (SEQ ID NO: 2), 3A6 (SEQ ID NO: 3) y 3B2 (SEQ ID NO: 4), que reconoció una VP6 y su homóloga nativa de RV IND evaluada mediante Western blot, lo que indica que dicho VHH se une a epítotos lineales de esta proteína VP6.

5 Dichos dominios de la invención (SEQ ID NOs: 1 a 4) o las secuencias de nucleótidos que los codifican (SEQ ID NOs: 5 a 8) pueden insertarse en un vector recombinante apropiado, tal como un vector de expresión. Por lo tanto, la presente invención se refiere adicionalmente a un vector de expresión que comprende dichas secuencias. La elección del vector es una función del tipo de célula hospedadora en la que se va a introducir el vector. De forma
10 ilustrativa, el vector puede ser un plásmido o un vector que, una vez que se ha introducido en la célula hospedadora, se integra o no en el genoma de dicha célula hospedadora. Dicho vector puede obtenerse usando cualquier método comprendido en el estado de la técnica [Sambrook *et al.* 1989]. En una realización preferida, el vector de la invención puede usarse para insertarse en el genoma de células vegetales o animales. Por lo tanto, el vector de la invención puede ser, por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* o un vector viral capaz de expresarse en células vegetales o
15 animales. En una realización particular, el vector viral usado en la presente invención es *Baculovirus* (véase ejemplo 5).

El vector puede usarse para transformar, transfectar o infectar células vegetales, de algas o animales, preferiblemente células de insectos o larvas. Por lo tanto, la presente invención se refiere adicionalmente a las células transformadas, transfectadas o infectadas por el vector de la invención.

20 En una realización preferida de la invención, la célula transgénica es una célula animal, preferiblemente una célula de insecto y más preferiblemente una larva de dicha célula de insecto. Por lo tanto la invención se refiere adicionalmente a un animal no humano transgénico, tal como un insecto transgénico o larva transgénica que expresa el péptido caracterizado por la SEC ID 1 a 4 en un alto rendimiento.

25 Por lo tanto el vector de la invención puede usarse para producir y/o almacenar los dominios de la invención caracterizada por la SEQ ID NOs: 1 a 4 y/o 9 a 12. En consecuencia, la presente invención se refiere adicionalmente a un método para producir dominios de la invención que comprende cultivar la célula o el organismo transfectado, transformado o infectado con el vector de la invención en condiciones que permiten la producción de dichos
30 dominios. Las condiciones para optimización del cultivo de la célula u organismo transgénico dependerán del tipo de célula u organismo usado. Si se desea, el método para producir los dominios de la invención comprende adicionalmente su aislamiento y purificación después de cualquiera de los métodos conocidos en la técnica.

35 En una realización preferida, la presente invención se refiere a anticuerpos caracterizados por comprender cualquiera de los dominios de la invención:

40 Un dominio VHH monomérico derivado de anticuerpos de camélido, caracterizado porque comprende las secuencias seleccionadas del grupo formado por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, en el que dichos dominios se unen a la proteína VP6 de rotavirus del grupo A (RV).

Un dominio VHH dimérico que se une a proteína VP6 de RV del grupo A, caracterizado porque comprende al menos una secuencia monomérica seleccionada del grupo formado por las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

45 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para inmunodetección de RV que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, y combinaciones de las mismas.

50 La invención se refiere adicionalmente a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y combinaciones de las mismas, para su uso en un método para la prevención de infecciones producidas por RV. En otras palabras, la invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y combinaciones de las mismas, para la preparación de una composición para la prevención de
55 infecciones producidas por RV.

Además la invención se refiere adicionalmente a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y combinaciones de las mismas, para su uso en un método para la tratar infecciones producidas por RV. En otras palabras, la invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y combinaciones de las mismas, para la preparación de una composición para tratar infecciones producidas por RV.

65 Finalmente, la presente invención se refiere a un método para inmunización que comprende la inoculación de una cantidad eficaz de los anticuerpos anteriormente definidos en el cuerpo humano o animal.

Depósito de microorganismos de acuerdo con el tratado de Budapest

5 Se depositó el plásmido pFBMeIVHH (véase Ejemplo 5) en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT);
 5 Universidad de Valencia, España con el número de acceso CECT7431, en la fecha 02.07.08.

Ejemplos

10 La presente invención se ilustra por los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Obtención y purificación de los VHH monoméricos y diméricos de la invención

Obtención de la biblioteca de VHH de la invención:

15 Se utilizó la cepa de referencia de RV bovina IND (Sbl; P[5]G6) como antígeno en el proceso de “*biopanning*” para la
 selección de los VHH. A fin de tener un panel de RV que represente diferentes reactividades de subgrupos con
 diferentes combinaciones de tipos G y P de diferentes especies animales y de humanos, se incluyeron las cepas de
 referencia RV detalladas en la Tabla 4 en los diferentes ensayos llevados a cabo para la producción de VHH. Los
 20 virus fueron propagados en células de riñón de mono (MA-104). También se incluyó una muestra de materia fecal de
 ternero neonato privado de calostro infectado con la cepa IND al momento de la preinoculación y en el pico de
 esparcimiento del virus.

Tabla 5
 Cepas de rotavirus de referencia utilizadas en los diferentes procedimientos realizados durante la producción y
 caracterización de los VHH de la invención

Cepa RV	Especie de origen	Subgrupo	Tipo G-P	Procedimiento
C486	Bovino	I	P[1]G6	Antígeno VP6 recombinante utilizado para vacunación y para el ELISA específico Respuesta de anticuerpos de Llama (VN) Caracterización de la unión (VN, ELISA) Exposición en ratones
IND	Bovino	I	P[5]G6	Selección de unión (<i>Biopanning</i> ; ELISA de fagos Caracterización de la unión (VN, ELISA) Respuesta de anticuerpos de Llama (VN, ELISA, ELISPOT)
B223	Bovino	I	P[11]G10	Respuesta de anticuerpos de Llama (VN) Caracterización de la unión (VN, ELISA)
Wa	Humano	II	P[8]G1	Respuesta de anticuerpos de Llama (VN) Caracterización de la unión (VN, ELISA)
H2	Equino	no I; no II	P[12]G3	Respuesta de anticuerpos de Llama (VN) Caracterización de la unión (VN, ELISA)

25 *Inmunización de las llamas:* La proteína VP6 derivada de la cepa de RV bovina

C486 (SblP[1]G6), fue producida en células Sf9 infectadas con un baculovirus recombinante. Una llama macho de
 30 un año de edad recibió cinco dosis de extracto celular crudo que contenía 500 µg de VP6 mezclado con aceite
 adyuvante INTA (Marcol:Arcel:Span:Tween) a los días 0, 21, 28, 35 y 246. Se tomaron muestras de suero y sangre a
 los días 0, 4 y 7 posteriores a cada inoculación. La respuesta humoral fue evaluada por ELISA y neutralización viral
 (NV) (ver más abajo). Para evaluar la respuesta efectora de células B, se adaptó un ensayo ELISPOT que determina
 35 el número de células secretoras de anticuerpos específicos de RV en sangre periférica en la llama inoculada, a partir
 de ensayos previos de ELISPOT llevados a cabo en cerdos y terneros (Parreno, V., C. *et al.*, *Vet Immunol*
Immunopathol 100:7-24, 2004 y Parreno, V., V. *et al.*, *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 48:713-20, 2001,
 incorporada a la presente solo a modo de referencia). Brevemente, se fijaron células MA-104 infectadas con IND
 BRV (con más del 80% de infección detectada por inmunofluorescencia), crecidas en placas de 96 pocillos, con
 40 acetona 70%, se secaron con aire y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Se agregaron a los pocillos
 suspensiones de células mononucleares (CMN) derivadas de sangre periférica (SP) de la llama inoculada (1 x 10⁶;
 5 x 10⁵; 2,5 x 10⁵ y 1,25 x 10⁵ células/pocillo). Después de centrifugar a 500 g por 5 minutos, las placas fueron
 incubadas por 12 a 14 horas a 37 °C en 5% CO₂. Las placas fueron lavadas con PBS con 0,05% de Tween-20 para
 retirar las células adherentes y las manchas fueron generadas por la adición del mismo conjugado usado en el
 ELISA en una dilución de 1/1.500 durante 2 horas a 37 °C seguido por 50 µl del sistema de sustrato de peroxidasa
 45 TMB (KLP, Maryland, Estados Unidos).

El manejo, inoculación y recolección de muestras de la llama fue llevado a cabo por personal entrenado bajo
 supervisión de un veterinario, de acuerdo con protocolos aprobados por el comité de ética de cuidado animal del
 INTA.

Producción de la biblioteca de VHH y selección de los VHH que se unen a VP6 de la invención:

A partir de un total de 900 ml de sangre recolectada 4 días después de la última inyección, se extrajeron 6×10^8 células mononucleares por centrifugación en gradiente de Ficoll Paque, luego fueron centrifugadas, congeladas en nitrógeno líquido, y posteriormente conservadas a -80°C . El RNA total fue extraído usando un equipo de extracción de RNA (Macherey Nagel; Nucleospin RNA II), obteniendo 250 μg de RNA. Posteriormente, se sintetizó la primera cadena de cDNA usando el equipo Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), con cebadores OligodT (12-18) (Invitrogen) o cebadores aleatorios (Invitrogen). En una mezcla de reacción de 20 μl , se usaron 0,2; 1 ó 5 μg de RNA total. El cDNA que codifica para VHH y VH fue amplificado específicamente por PCR usando los cebadores CALL01 (SEQ ID NO: 14) y CALL02 (SEQ ID NO: 15) que hibridan con las secuencias líderes y CH2. El fragmento de 600 pb (exones VHH-CH2 sin el exón CH1) fue eluido a partir de un gel de agarosa al 1,6%, tras separarlo del fragmento de 900 pb (exones VH-CH1-CH2). Luego, los VHHs fueron amplificados por una PCR anidada adicional con cebadores que hibridan con la región marco 1 (SEQ ID NO: 16) y la región marco 4 (SEQ ID NO: 17), y con cebadores que contienen sitios de restricción para los pasos de clonado posteriores: VHHfor2: (SEQ ID NO: 18) con sitios de restricción para NcoI y PstI y VHHrev2 (SEQ ID NO: 19) con un sitio de restricción para NotI. Los fragmentos finales de PCR fueron ligados usando los sitios de restricción río arriba NcoI o PstI y el sitio de restricción río abajo NotI, en el vector fagémido pAO-Lib, una versión modificada de pHEN4 (Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camelheavy-chain antibodies. FEBS Lett. 1997 Sep 15;414(3):521-6.), que contiene una secuencia irrelevante larga, la cual es retirada tras la inserción de VHH, de manera que se retrase la propagación potencial del vector sin el inserto VHH. Se transformaron células de *Escherichia coli* (TG1) con el material ligado y las células fueron sembradas. Las colonias fueron raspadas de las placas, lavadas y conservadas a -80°C en medio LB suplementado con glicerol (50% de concentración final).

Los VHH específicos fueron seleccionados de la biblioteca usando la tecnología de muestra de fagos. La biblioteca de VHH fue infectada con fagos ayudantes M13 (Invitrogen), y las partículas de fagos que expresan el repertorio de VHH fueron rescatadas y precipitadas con PEG, tal como lo describe Marks, J. D. Hoogenboom, H. R. Bonnert, T. P. McCafferty, J. Griffiths, A. D. Winter, G. JMB 1991. El enriquecimiento en VHH específicos fue llevado a cabo por dos a tres rondas de selección *in vitro*, es decir, por la técnica conocida como "biopanning". Se cubrieron inmunotubos toda la noche a 4°C con una dilución 1/50 de BRV IND semipurificado (Sbl; P[5]G6) o con una dilución 1/5.000 de un antisuero policlonal anti-RV de cobaya en tampón carbonato a pH 9,6 seguido por un paso de bloqueo, y se capturó una dilución 1/50 del mismo BRV IND. Los fagos rescatados fueron incubados con el BRV IND en forma directa o previamente capturado, lavado, y las partículas de fagos unidas fueron eluidas con trietilamina 100 mM a pH 10,0 e inmediatamente neutralizadas con Tris pH 7,4. Los fagos eluidos fueron usados para infectar células TG1 en crecimiento exponencial. Después de la segunda o tercera ronda de "biopanning", las colonias individuales fueron cultivadas y los clones correspondientes de VHH fueron analizados por ELISA de fagos.

Expresión y purificación de VHH monoméricos y diméricos de la invención:

Los cDNA de VHH de los clones que fueron positivos en el ELISA, fueron re-clonados usando las enzimas de restricción NcoI y NotI en el vector de expresión pHEN6 (Conrath, K. E., M. *et al.* Antimicrob Agents Chemother 45:2807-12, 2001, incorporada a la presente solo a modo de referencia), el cual provee una secuencia localizadora pelB para el periplasma y una cola de 6 histidinas carboxi-terminal. Los VHH bivalentes fueron construidos por amplificación por PCR de la secuencia de VHH usando los cebadores Bivfor2 (SEQ ID NO: 20) y Bivrev2 (SEQ ID NO: 21) (SEQ ID NO: 22) que codifican un conector relacionado con la bisagra de la IgA humana. El producto de PCR y el vector pHEN6 que contiene el VHH molde fueron digeridos con NcoI y PstI, y ligados para producir el vector pAO-biv que contiene el VHH bivalente. Para la producción de los VHH monovalentes o bivalentes se transformaron células de *E. coli* XL1 Blue con las diferentes construcciones de plásmidos. La expresión de VHH fue inducida con isopropil-D-tiogalactopiranosido 1 mM durante 16 horas a 27°C (Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001 Molecular Cloning). Después de centrifugar las células, las proteínas periplásmicas fueron extraídas por choque osmótico. Los VHH fueron purificados del extracto periplásmico usando una columna quelante N-High-Trap HP (Amersham Biosciences).

Ejemplo 2: Caracterización de los VHH de la invención

Western blot: Concentrados de VP6 expresados en un sistema de baculovirus y concentrados de BRV IND fueron resuspendidos en un tampón para muestras Laemmli, hervidos durante 10 minutos. Luego se los hizo correr en una columna SDS-PAGE al 12% y fueron transferidos a una membrana Immobilon P (Millipore, Bedford, MA). Se bloqueó la membrana durante 45 min con PBS/Tween (0,05%), que contenía 10% de leche descremada y se incubaron cada uno de los VHH (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), durante 2 h a temperatura ambiente. Luego la membrana fue lavada con PBS/Tween (0,05%) e incubada una noche a 4°C con el anticuerpo anti-pentahistidina (dilución 1/500 en PBS/Tween (0,05%) BSA (3%)). Finalmente, se incubaron con IgG de cabra anti-ratón conjugada con HRP (dilución 1/5.000) (Amersham, Pharmacia, Biotech) durante 40 min a temperatura ambiente. Los ensayos se revelaron con ECL (Amersham Biosciences).

Secuenciamiento de los VHH de la invención: Para secuenciar los VHH se utilizaron los oligonucleótidos "M13

directo” y “M13 inverso” usando el siguiente método: Big Die Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) en un secuenciador automático ABI-Prims 377 DNA (Perkin Elmer, Applied Biosystems).

Ejemplo 3: Ensayos de inmunodetección de RV empleando los VHH de la invención:

Inmunoensayo enzimático (ELISA) y Western blot: Los experimentos de ELISA fueron llevados a cabo en placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc), por sensibilización directa con RV o por captura de RV o de VP6 recombinante con un anticuerpo policlonal producido en cerdo gnotobiótico. Como antígenos para el control negativo, se usaron células MA-104 pseudo-infectadas y una proteína no relacionada expresada en baculovirus (proteína E2 del virus de la diarrea bovina). Se usó PBS como blanco, y como captura negativa se usó suero de una cobaya no inmunizada.

Se analizó la presencia de anticuerpos anti-RV en el suero de la llama como se describe en Parreno, V., C. *et al.* Vet Immunol Immunopathol 100:7-24, 2004 y de anticuerpos anti-VP6 con un protocolo adaptado de Fernández *et al.* (Fernandez, F. M., *et al.*, Vaccine 16:507-16, 1998). Las IgG de llama fueron detectadas usando una IgG (H+L) anti-llama de cabra marcada con peroxidasa (Bethyl, lab inc, Montgomery, CA, USA), en una dilución 1/2000.

Los fagos derivados de los clones individuales obtenidos por “*biopanning*” fueron analizados por ELISA de fagos. Brevemente, se infectaron clones de *E. coli* TG1 individuales en crecimiento exponencial, que contenían los distintos genes de VHH en el vector phen4, con fagos ayudantes M13 para producir partículas de fago que expresan VHH fusionado a la proteína de superficie, y se ensayó el sobrenadante de cultivo que contenía la progenie de fagos en placas de ELISA sensibilizadas con BRV IND o VP6. Los fagos unidos fueron detectados usando una dilución 1/5000 de un anticuerpo anti-M13p8 conjugado a HRP (Amersham, Pharmacia, Biotech) durante 40 minutos a temperatura ambiente. Los ensayos fueron revelados usando H₂O₂/ABTS (Zymed).

Primero, los VHH monovalentes o bivalentes purificados con la cola carboxi-terminal de 6 His fueron estudiados como reactivos para la detección de RV o de VP6 por ELISA, como se describió arriba, revelados por un anticuerpo monoclonal contra pentahistidina (Qiagen, 1/5000) y un anticuerpo anti-ratón producido en cabra conjugado con HRP. Segundo, éstos fueron analizados como un reactivo de captura de RV, tanto por sensibilización directa de 10 µg/ml de VHH a la placa de ELISA, como también capturados por 10 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-histidina y luego 20 µg/ml de VHH. Los ensayos fueron revelados usando un antisuero policlonal de RV hecho en un ternero descalostrado hiperinmunizado con BRV IND (dilución 1/2000) y una IgG (H+L) anti-bovino marcada con peroxidasa (KPL, Gaithersburg, Maryland, USA) en una dilución 1/5000.

Los VHH diméricos fueron ensayados por ELISA como un reactivo de captura de RV a 10 µg/ml.

Los VHH monoméricos también fueron ensayados como anticuerpos secundarios y el ELISA fue revelado con anticuerpos monoclonales anti pentahistidina y anticuerpos de cabra anti-ratón conjugados con HRP (dilución 1:1000) (Amersham, Pharmacia, Biotech).

Ensayos de neutralización viral: Los títulos de anticuerpos neutralizantes de los virus IND, C486, B223, Wa y H2 en muestras de suero de llama y VHH purificado fueron determinados mediante neutralización del foco fluorescente (FFN), como se describe en To, T. L., *et al.*, (J Gen Virol 79 (Pt 11):2661-72, 1998). Brevemente, 100 µl de diluciones seriadas del suero de llama, monómeros o dímeros de VHH purificados seleccionados fueron mezclados con igual volumen de virus de manera que se obtienen 100 unidades formadoras de focos (UFF)/100µl de mezcla, e incubados por una hora a 37 °C. Se sembraron en placas 100 µl de la mezcla anticuerpo-virus en monocapas de MA-104 (4 replicados) y fueron incubados durante 48 horas a 37 °C. Las placas fueron fijadas con acetona al 70% y el ensayo se reveló usando un anticuerpo anti-RV marcado con FITC derivado de un ternero descalostrado hiperinmunizado con RV. El título de VN se expresó como el recíproco de la dilución más alta de la muestra que resultó en una reducción de >80% del número de focos fluorescentes.

Ejemplo 4: Uso de los VHH monoméricos y diméricos de la invención para la prevención y/o tratamiento de mamíferos

Ensayos de protección de RV en ratones neonatos:

Se administraron 100 µg de cada monómero de VHH anti-VP6 en 100 µl, a ratones Balb/c de cuatro días de edad, usando una sonda intra-gástrica, una vez por día, comenzando el día 0, y durante 5 días. Los ratones lactantes fueron infectados con 100 µl de BRV C486 (Sbl; P[1]G6) conteniendo 2 x 10⁶ UFF/ml en el día uno, 2 horas después de la dosis de rutina de VHH, después con 20 µl de una solución de bicarbonato al 5% también por vía intra-gástrica. El inóculo fue capaz de producir diarrea en el 100% de los ratones controles no tratados. Los grupos de control usados en el experimento fueron: (i) ratones inoculados con RV y no tratados con anticuerpos; ii) ratones tratados con la misma cantidad de VHH no relacionado, dirigido contra una proteína celular; iii) ratones tratados con 450 µg de IgG purificada por afinidad derivada de un suero policlonal hecho en cobaya con un título de VN de 2048 contra el RV homólogo; iv) ratones tratados con la misma cantidad de IgG de una cobaya control seronegativa; v) ratones no infectados y tratados. Se evaluó clínicamente la diarrea inducida por RV, por palpado directo del abdomen de los

ratones durante los 5 días de estudio. La severidad de la diarrea fue analizada diariamente, asignando un valor numérico basado en el color y la consistencia de las deposiciones, tal como lo describe VanCott, J. L., *et al.*, J Virol 80:4949-61, 2006. Se usó la prueba exacta de Fisher para comparar, entre los grupos, las proporciones de ratones con diarrea. Se usó el test no paramétrico de Kruskal Wallis para comparar los promedios de inicio, duración y la severidad de la diarrea entre los grupos tratados.

Ejemplo 5: generación de baculovirus recombinante

Se generó baculovirus BacMeIVHH a partir del plásmido phen 6 que contenía la secuencia completa de VHH 3B2. La proteína se amplificó por PCR a partir del plásmido phen 6 usando los siguientes cebadores: SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24. Este amplicón se clonó después en el vector pFastMeIB2 en fase con una secuencia señal de insecto derivada de la melitina de miel de abeja, usando los sitios de restricción BamHI y XbaI incluidos en los cebadores correspondientes. El plásmido pFBMeIVHH resultante se caracterizó por secuenciación automática y se usó para generar el baculovirus recombinante BacMeIVHH usando el sistema de Baculovirus Bac-to-Bac® (Invitrogen, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se propagó baculovirus recombinante y se amplificó en células de insecto sf21 para alcanzar títulos infecciosos entre 10⁷ y 10⁹ ufp/ml y se mantuvieron reservas a 4 °C para su uso diario y -80 °C para almacenamiento a largo plazo.

Condiciones de crecimiento de insectos e inoculación

Para experimentos de expresión, se inyectaron a larvas de quinta fase (larvas de última fase antes de la pupación) de aproximadamente 250 mg de peso los baculovirus recombinantes cerca de la falsa pata (hacia adelante en la cavidad corporal) usando dosis de ufp/larva conocidas. Las larvas se congelaron inmediatamente y se mantuvieron a -20 °C hasta su procesamiento.

También se infectaron cultivos de células de insectos usando dosis conocidas. Las células infectadas se mantuvieron a 28 °C durante 72 h. Finalmente se recogieron los cultivos infectados y los sedimentos celulares también se congelaron inmediatamente y se mantuvieron a -20 °C hasta su procesamiento.

Preparación de extractos proteicos

Se obtuvieron proteínas solubles totales (TSP) de larvas T.ni inclinando las larvas congeladas en un tampón de extracción que contenía tritón 0,01%; DTT 25 mM y un cóctel inhibidor de proteínas (Complete, Roche, Alemania) en PBS 1X.

Análisis de extractos proteicos

Se realizaron una tinción de azul de Coomassie y un análisis de inmunotransferencia para la cuantificación y detección de la proteína VHH específica contenida en la TSP. Por lo tanto, se cargaron 20 µg de TSP por carril en geles de SDS-poliacrilamida 12%. Después de electroforesis, los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) para realizar un Western blot.

Para ensayos de Western blot SDS-PAGE (12%) se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Estados Unidos). La membrana se bloqueó durante una noche a 4 °C con PBS-Tween 20 0,05% (PBST), leche descremada (tampón de bloqueo, BF) y después se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 1 h usando un suero anti VHH de conejo (1:100 en BF). La membrana se lavó 3 veces con PBST y finalmente se añadió IgG anti conejo marcado con HRP conjugado (1:2000 en BF, Sigma, Estados Unidos) durante 1 h como anticuerpo secundario. Después de lavado exhaustivo con PBST, se detectaron bandas proteicas usando el sistema de detección para Western blot en ECL mediante películas Hyperfilm ECL (Amersham, Estados Unidos) (véase Figura 6A).

Análisis funcional

Se usaron extractos de TSP de larvas que expresan VP6 (una proteína de rotavirus bovino) [Ag(+)] o de larvas infectadas con un baculovirus recombinante sin inserto para recubrir microplacas de ELISA (Polysorp, Nunc, Dinamarca) con diluciones seriadas comenzando a 40 µg/pocillo en tampón de carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6 y se incubaron O.N a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBST cuatro veces. Las placas se incubaron secuencialmente durante 1 hora a 37 °C en agitación constante, con solución de bloqueo (PBST-BSA 2%, 100 µl/pocillo) durante 30 minutos. Después, con extractos de TSP de larvas que expresan VHH a dilución 2,5 µg/pocillo en tampón de bloqueo durante 1 h. Las placas se lavaron después 4 veces con PBST y se bloquearon de nuevo durante 30 minutos. Después se añadieron 100 µl/pocillo de un anticuerpo policlonal (diluido 1:100) frente al VHH realizado en conejo y se incubó durante 1 h a 37 °C. Las placas se lavaron 4 veces con PBST. Finalmente, se añadieron 100 µl/pocillo de IgG anti conejo marcado con HRP conjugado diluido 1:2000 en solución de bloqueo. Para reacción de sustratos, las placas se lavaron cuatro veces y se añadieron 100 µl/pocillo de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ABTS, (KPL, Estados Unidos) a las placas. Se permitió que la reacción de peroxidasa

se desarrollara durante 5-10 minutos a temperatura ambiente y las reacciones se leyeron a 405 nm en un lector de microplacas de ELISA (Multiskan EX, Thermo Electron Corp, Estados Unidos) (véase Figura 7).

Listado de secuencias

- 5 <110> INTA
- <120> Domino VHH monomérico derivado de anticuerpos de camélidos anti-VP6, dominio dimérico, método de inmunización, método de detección de rotavirus, composición, métodos de prevención y tratamiento de infecciones con rotavirus
- 10 <130> 123
- <160> 22
- <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- <211> 129
- 15 <212> PRT
- <213> Lama glama
- <400> 1

```

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

- 20 <210> 2
- <211> 126
- <212> PRT
- <213> Lama glama
- <400> 2

ES 2 386 750 T3

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

<210> 3
 <211> 127
 <212> PRT
 5 <213> Lama glama
 <400> 3

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

10 <210> 4
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 4

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

<210> 5

<211> 411

5 <212> ADN

<213> Lama glama

<400> 5

atggctgatg tgcagctgca ggcgtctggg ggaggattgg tgcaggctgg ggactctctg 60
 agactctcct gtgtacaatc tggaccgggc aggtatggcg tgggctggtt ccgccaggct 120
 ccagggaaag agcgtgaatt tgtggcagct gtgagcggga gtggtggttc gaaatattat 180
 ggagactccg tacagggccg atcaccatc tccaaagacg acgccaagaa cacggtgtat 240
 ctgcaaatga acaacctgaa acctgaggac acggccggtt attactgtgc agtccggaga 300
 acctatagtg gtagtaacct ttggcacaga tcggatgagt atgactcctg gggcccgggg 360
 acccagggtca ccgtctccag cggccgccac caccatcacc atcactaata g 411

10 <210> 6

<211> 402

<212> ADN

<213> Lama glama

<400> 6

atggctgatg tgcagctgca ggcgtctggg ggaggatttg tgcagcctgg agattctctg 60
 agtctctcct gtgcagcctc tggaggcacc tttagtagct attccattgg ctggttccgc 120
 caggttccag ggaaggagcg tgagttcgtg gctactatca gttcagatga tagtccgtgg 180
 tatggagagc ccgcgaaggg ccgattcacc gtcgccagag ttaacgcaa gaatcggcg 240
 tatctgcact tgaacagggt gaaacctgag gacacggcca cttattattg tgcagccggt 300
 agtgtacaac acatggcgaa tgagaatgag tatgtctatt ggggccaggg gaccagggtc 360
 accgtctcca gcggccgcca ccaccatcac catcactaat ag 402

15

ES 2 386 750 T3

<210> 7
<211> 405
<212> ADN
<213> Lama glama
<400> 7

5

atggctgagg tccagctgca ggcgtctggg ggaggatttg ttcaacctgg gggctctctg 60
agtcctcct gtgccgtctc tggacgcagc ttcggtgacg atgcatggg ctggttccgc 120
caggctccag ggaaggagcg tgaatttga tcagctatta gggtcaggag taacagccca 180
tttatggcg accccgggaa gggccgattc accatcgcca gagacagcg caaggacagc 240
gtgtatctgc acatgtaccg cctgagacct gacgacagcg ccgtatatta ctgtgccgta 300
ggagatggtg ccttgtgaa tcgcgctcc gactatacgt actggggcca ggggaccag 360

gtcaccgtct ccagcggccg ccaccacat caccatcact aatag 405

<210> 8
<211> 408
<212> ADN
<213> Lama glama
<400> 8

10

atggctgatg tgcagctgca ggcgtctggg ggaggtttg cgcaggctgg ggactctctg 60
acactctcct gtgcagcctc tggacgcacc tcagtgggtt atgtcgtggg ctggttccgc 120
caggctccag gggcggagcg tgagtttga ggagctatta gatggtcaga agatagcaca 180
tggtatggag actccatgaa gggccgaatt ctcactcca gaaacaatat caagaacagc 240
gtgaatctgc aaatgtcaa tctaaaacct gaagacacgg ccgtgtacgt ctgtgcagca 300
ggggccgggg atatagtgac tactgagact tctataatt actggggccg ggggaccag 360
gtcaccgtct cctcacgcgg ccgccaccac caccacatc actaatag 408

15 <210> 9
<211> 266
<212> PRT
<213> Lama glama
<400> 9

20

ES 2 386 750 T3

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

 Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Pro
 115 120 125
 Ser Thr Pro Pro Arg Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ser Asp Val Gln
 130 135 140
 Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Phe Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Ser
 145 150 155 160
 Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Gly Asp Asp Val Met Gly
 165 170 175
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ser Ala Ile
 180 185 190
 Arg Phe Arg Ser Asn Ser Pro Phe Tyr Gly Asp Pro Gly Lys Gly Arg
 195 200 205
 Phe Thr Ile Ala Arg Asp Ser Ala Lys Asp Thr Val Tyr Leu His Met
 210 215 220
 Tyr Arg Leu Arg Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Val Gly
 225 230 235 240
 Asp Gly Ala Leu Val Asn Arg Ala Ser Asp Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln
 245 250 255
 Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Arg
 260 265

5 <210> 10
 <211> 264
 <212> PRT

ES 2 386 750 T3

<213> Lama glama
<400> 10

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

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

5

<210> 11

ES 2 386 750 T3

<211> 267
 <212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 11

5

Met Ala Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Ala
 1 5 10 15

Gly Asp Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser
 20 25 30

Gly Tyr Val Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Ala Glu Arg Glu
 35 40 45

Phe Val Gly Ala Ile Arg Trp Ser Glu Asp Ser Thr Trp Tyr Gly Asp
 50 55 60

Ser Met Lys Gly Arg Ile Leu Ile Ser Arg Asn Asn Ile Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Val Asn Leu Gln Met Phe Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Val Cys Ala Ala Gly Ala Gly Asp Ile Val Thr Thr Glu Thr Ser Tyr
 100 105 110

Asn Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Pro
 115 120 125

Ser Thr Pro Pro Arg Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ser Asp Val Gln
 130 135 140

Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Ala Gly Asp Ser Leu Thr
 145 150 155 160

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Gly Tyr Val Val Gly
 165 170 175

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Ala Glu Arg Glu Phe Val Gly Ala Ile
 180 185 190

Arg Trp Ser Glu Asp Ser Thr Trp Tyr Gly Asp Ser Met Lys Gly Arg
 195 200 205

Ile Leu Ile Ser Arg Asn Asn Ile Lys Asn Thr Val Asn Leu Gln Met
 210 215 220

Phe Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Val Cys Ala Ala Gly
 225 230 235 240

Ala Gly Asp Ile Val Thr Thr Glu Thr Ser Tyr Asn Tyr Trp Gly Arg
 245 250 255

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Arg Gly Arg
 260 265

ES 2 386 750 T3

<210> 12
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 12

5

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

 Ser Trp Gly Pro Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Arg
 260 265 270

ES 2 386 750 T3

5 <210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

Ser Gly Pro Ser Thr Pro Pro Arg Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ser
 1 5 10 15

10 <210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador de amplificacion de VHH
 <400> 14
 15 gtctggctg ctctctaca agg 23

20 <210> 15
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador para ampificar VHH
 <400> 15
 25 ggtacgtgct gttgaactgt tcc 23

30 <210> 16
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador para amplificar VHH
 <400> 16

aacatgcat gactcgggc tcaaccggcc atggctgagk tbcagctgca ggcgtctggr 60
 ggagg 65

35 <210> 17
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cebador para amplificar VHH
 <400> 17
 attattattc agattattag tgcggccgcg tgaggagacg gtgaccwggg tcc 53

45 <210> 18
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador para incorporar sitios de restriccion
 50 <400> 18
 ggctgagktb cagctgcagg cgtctgrrgg agg 33

55 <210> 19
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador para incorporar sitios de restriccion

ES 2 386 750 T3

<400> 19
gttattatta ttcagattat tagtgcggcc gctggagagt gaccwgggtc c 51

5 <210> 20
<211> 48
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> cebador para amplificación de secuencias diméricas
<400> 20
ctcgcggccc agccggccat ggcggatgtg cagcttcagg cgtctggg 48

15 <210> 21
<211> 46
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador para amplificar secuencias diméricas

20 <400> 21
gcattggttc tgcagttgca catctgacgg cggggtggac ggagac 46

<210> 22
<211> 43

25 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 22
gccgcggcgg ggtagacggg cccgatgagg agacggtgac ctg 43

30 <210> 23
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial
<400> 23

35 gcttggatcc tatggctgat gtgcagctgc 30

<210> 24
<211> 29
<212> ADN

40 <213> Artificial
<400> 24
cgtatctaga gcggccgcgt gaggagacg 29

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dominio VHH monomérico o dimérico **caracterizado por que** comprende al menos una secuencia capaz de unirse a proteína de rotavirus VP6 seleccionada del grupo: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
2. El dominio, de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** deriva de anticuerpos de camélidos seleccionados del grupo: *Lama glama*, *Lama pacos*, *Lama guanicoe* y *Vicugna vicugna*.
- 10 3. El dominio, de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** se une a un epítipo lineal del antígeno VP6 presente en grupo A de rotavirus.
4. Dominio dimérico, de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** comprende dos secuencias, idénticas o diferentes, seleccionadas del grupo: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
- 15 5. Dominio dimérico, de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** comprende además un enlace de SEQ ID NO: 13.
6. Dominio dimérico, de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además una secuencia seleccionada del grupo: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.
- 20 7. Un método de inmunodetección de rotavirus **caracterizado por que** comprende: a) poner en contacto una muestra que contenga rotavirus con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o combinaciones de las mismas; y b) revelar.
- 25 8. El método, de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** se selecciona del grupo: ensayos basados en inmunocaptura ELISA, ELISPOT, ELISA de competición, perlas magnéticas y test de campo *in situ* (a pie de establo).
- 30 9. Una composición diseñada para otorgar inmunidad pasiva a un mamífero, **caracterizada por que** comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, o combinaciones de las mismas; excipiente e inmunomoduladores.
- 35 10. Plásmido pFBMeIVHH, depositado con el número de acceso CECT7431 el 02.07.08, **caracterizado por** comprender una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los dominios monoméricos o diméricos de las reivindicaciones 1 a 6.
- 40 11. Vector de expresión recombinante **caracterizado por** comprender el plásmido de la reivindicación 10.
12. Vector de expresión recombinante, de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizada por que** dicho vector es un virus, particularmente un *Baculovirus*.
- 45 13. Células transgénicas transformadas, transfectadas o infectadas con el vector de las reivindicaciones 11 o 12, **caracterizadas por que** expresan el ADN incluido en el plásmido de la reivindicación 10.
14. Método para la producción de los dominios de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende las siguientes etapas:
- 50 a) Transformar, transfectar o infectar células hospedadoras en cultivo o en larvas de insectos con el vector recombinante de las reivindicaciones 11 o 12.
b) Mantener las células creciendo en condiciones apropiadas.
c) Aislar y purificar los dominios.
- 55 15. Anticuerpos **caracterizados por** comprender cualquiera de los dominios de las reivindicaciones 1 a 6.
16. Un kit para inmunodetección de rotavirus que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o combinaciones de las mismas.
- 60 17. Secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, o combinaciones de las mismas, para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de infecciones producidas por rotavirus.

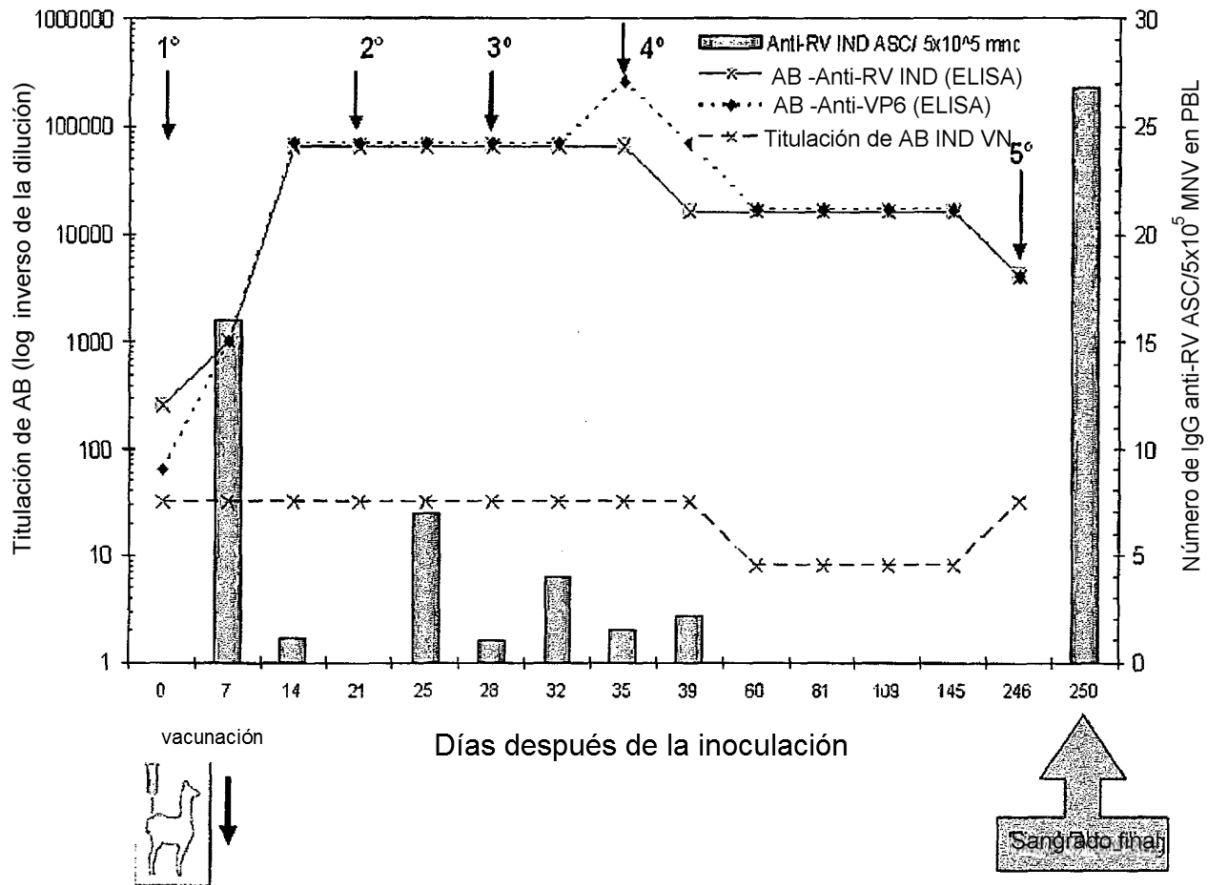


FIG. 1

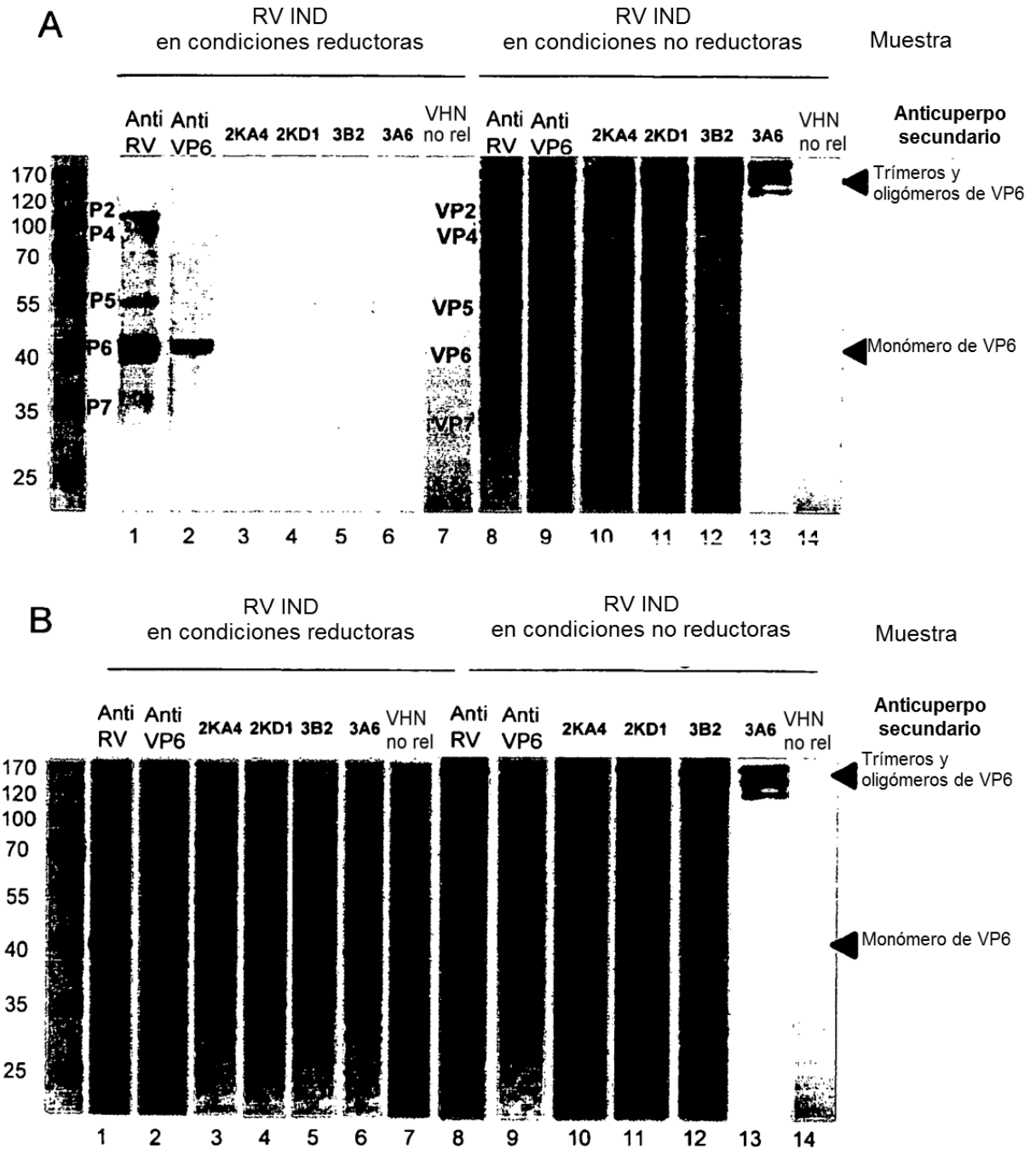
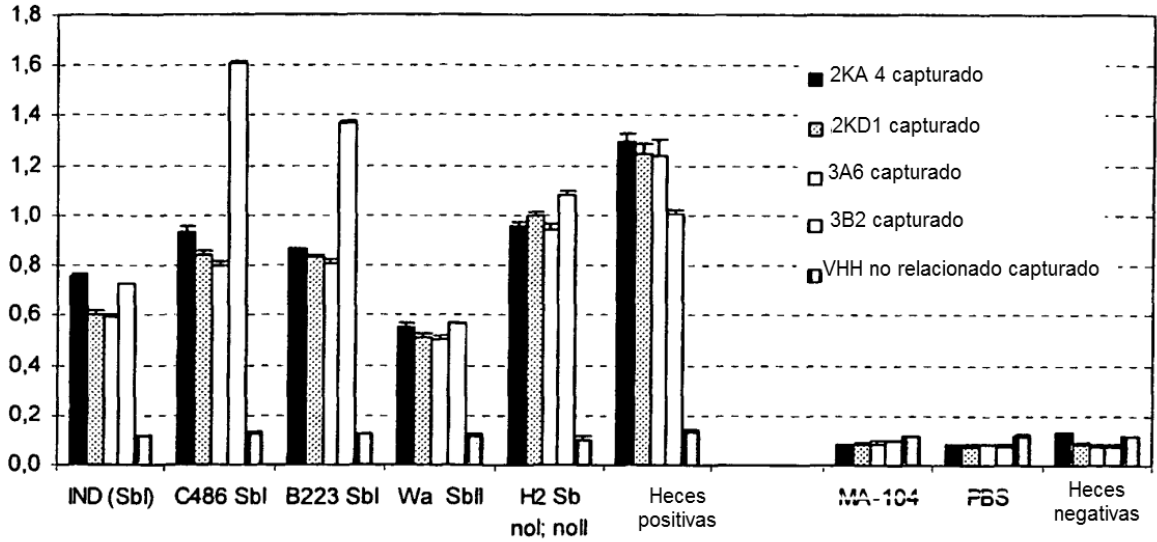
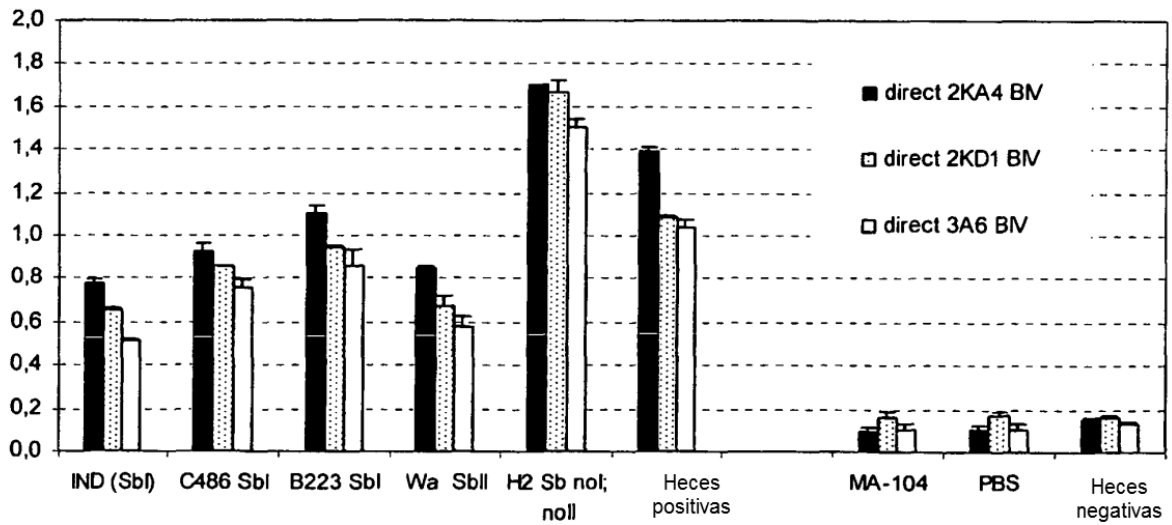


FIG. 2



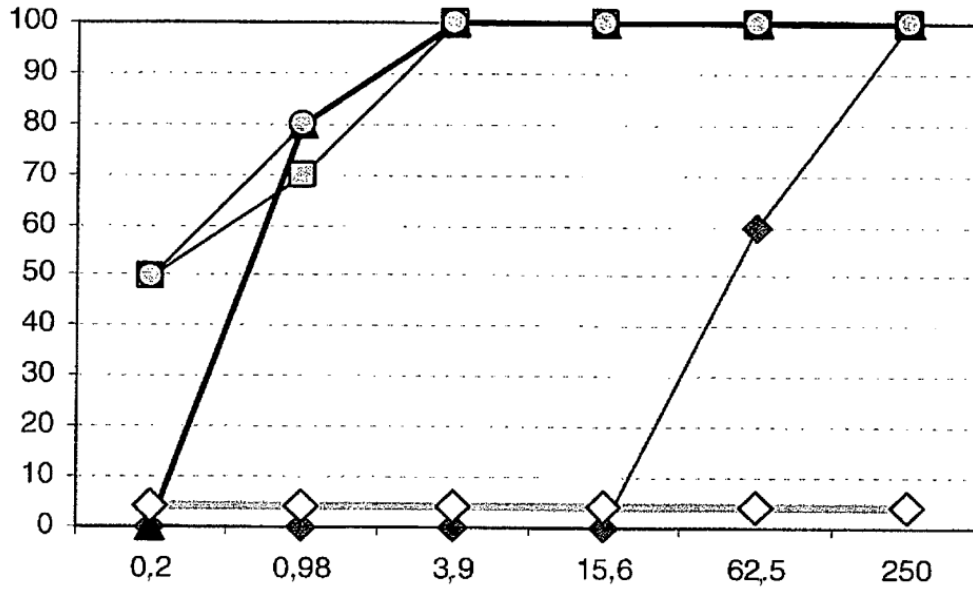
Cepas de Rotavirus



Cepas de Rotavirus

FIG. 3

A



B

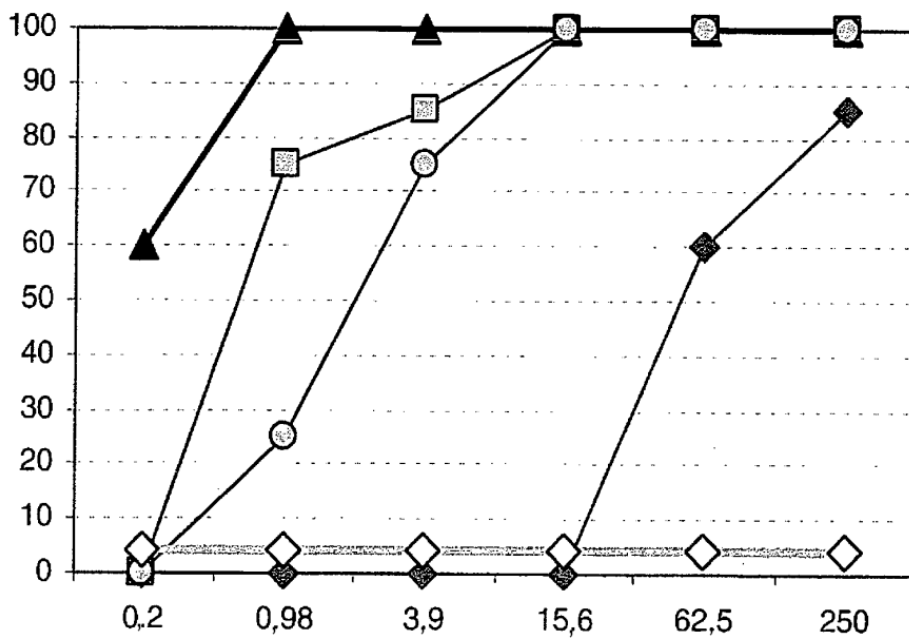
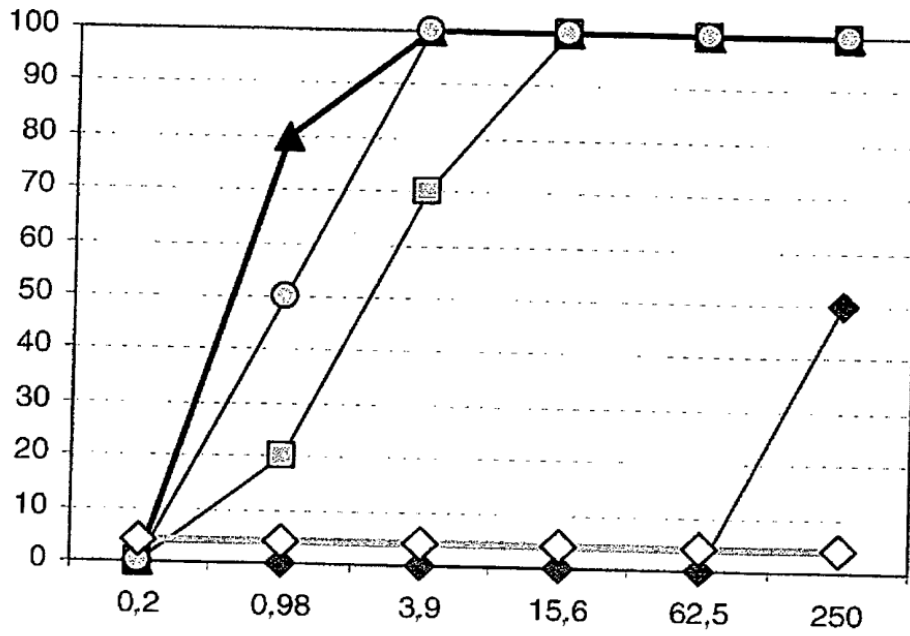


FIG. 4 (A, B)

C



D

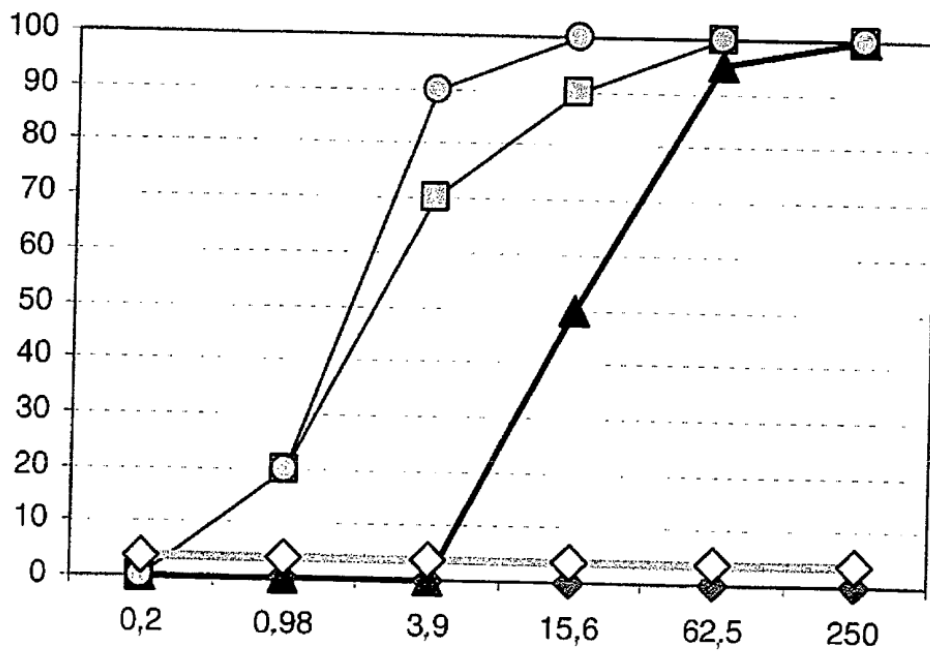


FIG. 4 (C, D)

E

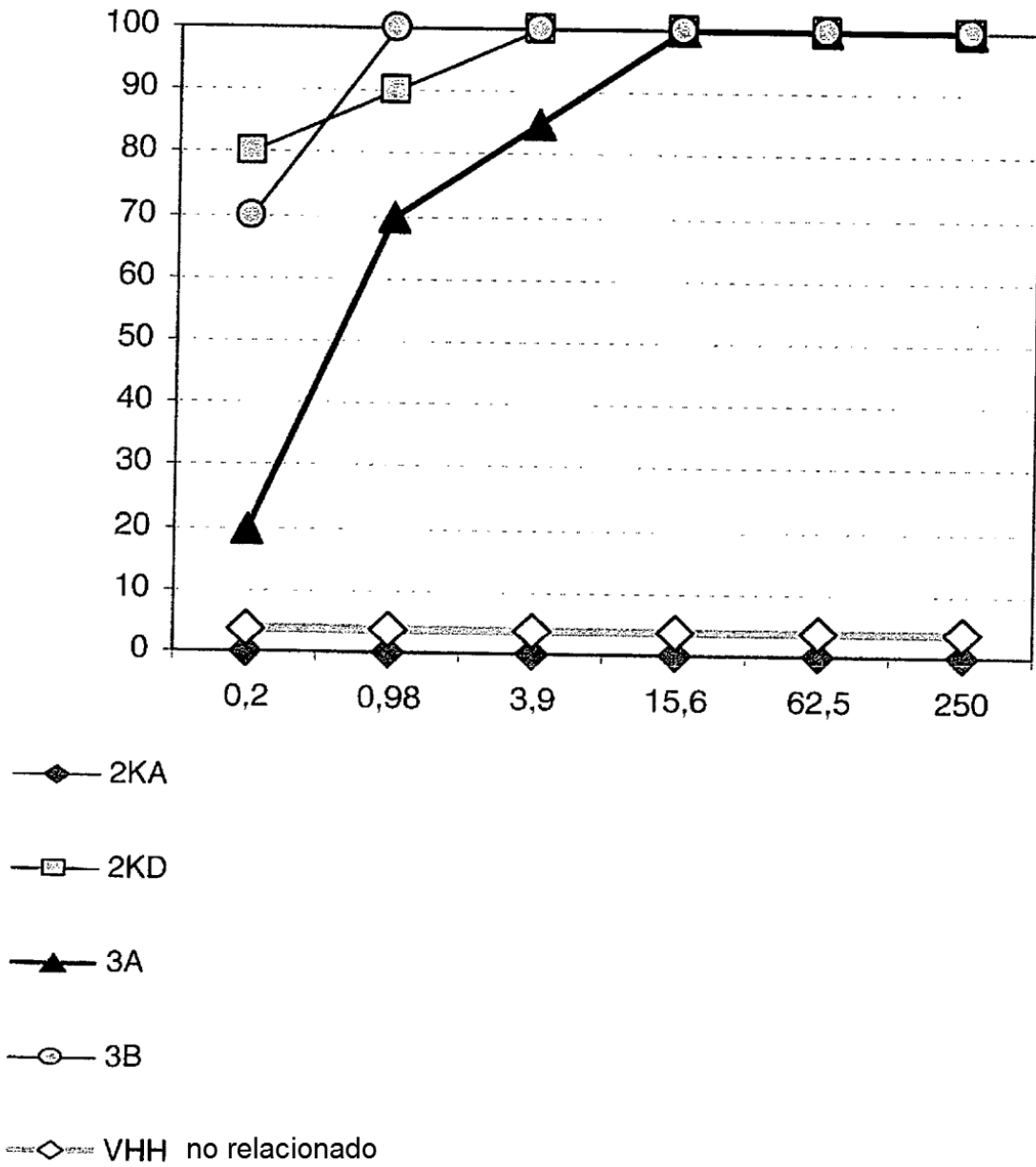


FIG. 4 (E)

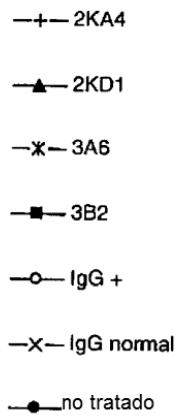
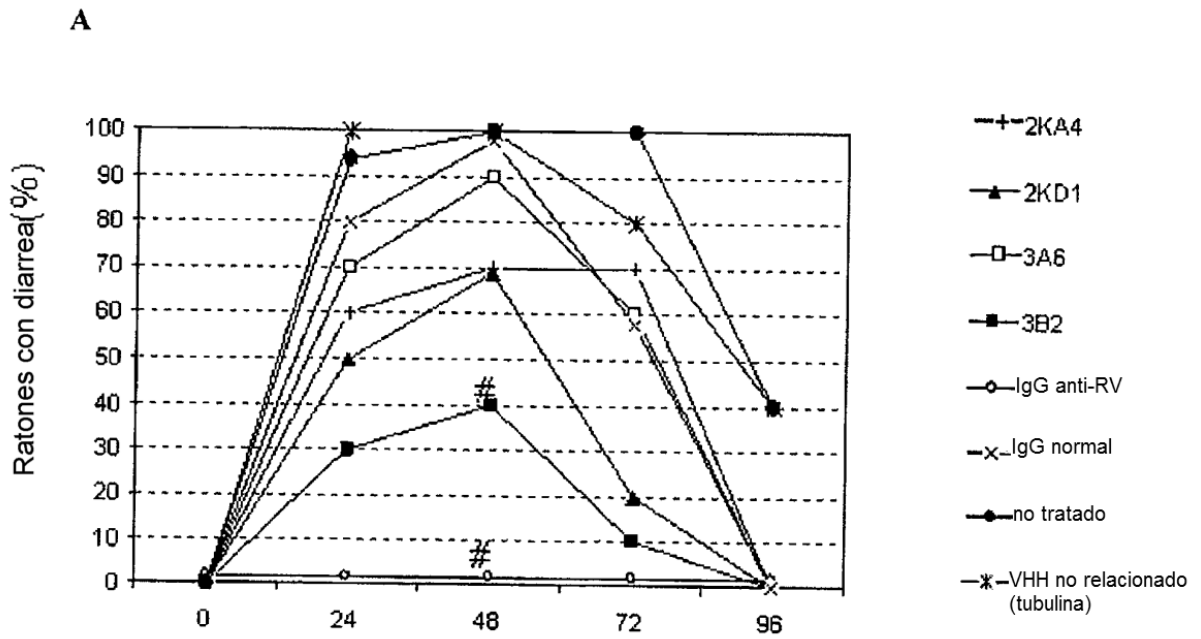
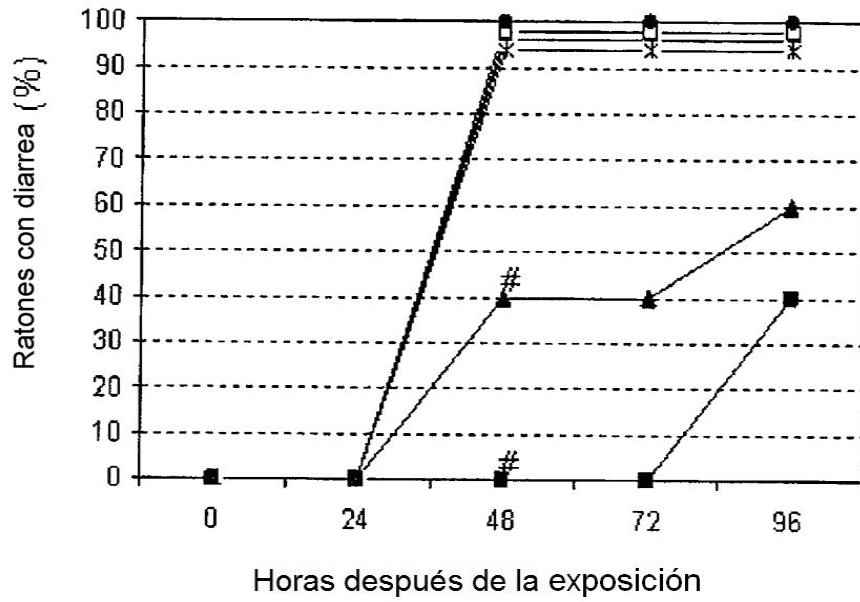


FIG. 5 (A)

B



C

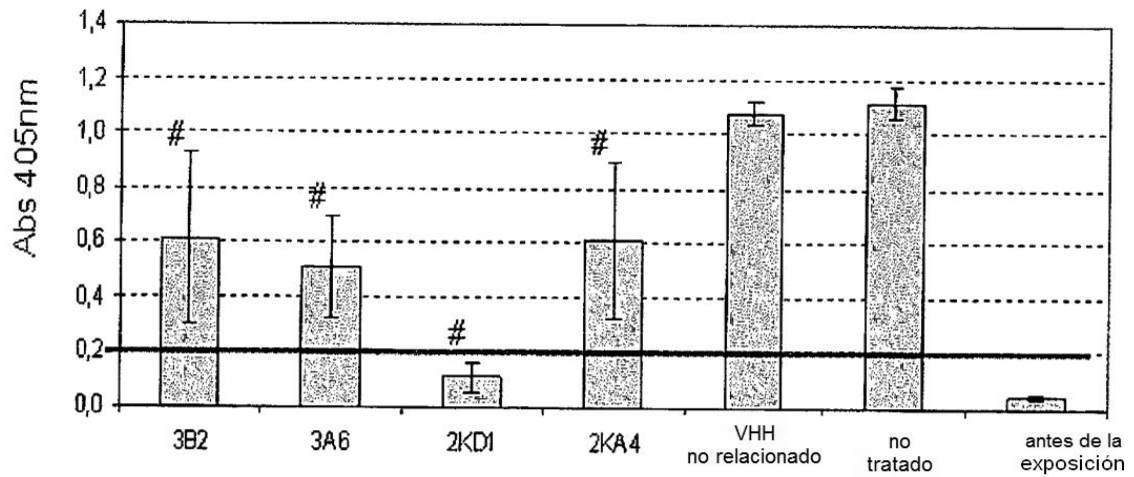


FIG. 5 (B, C)

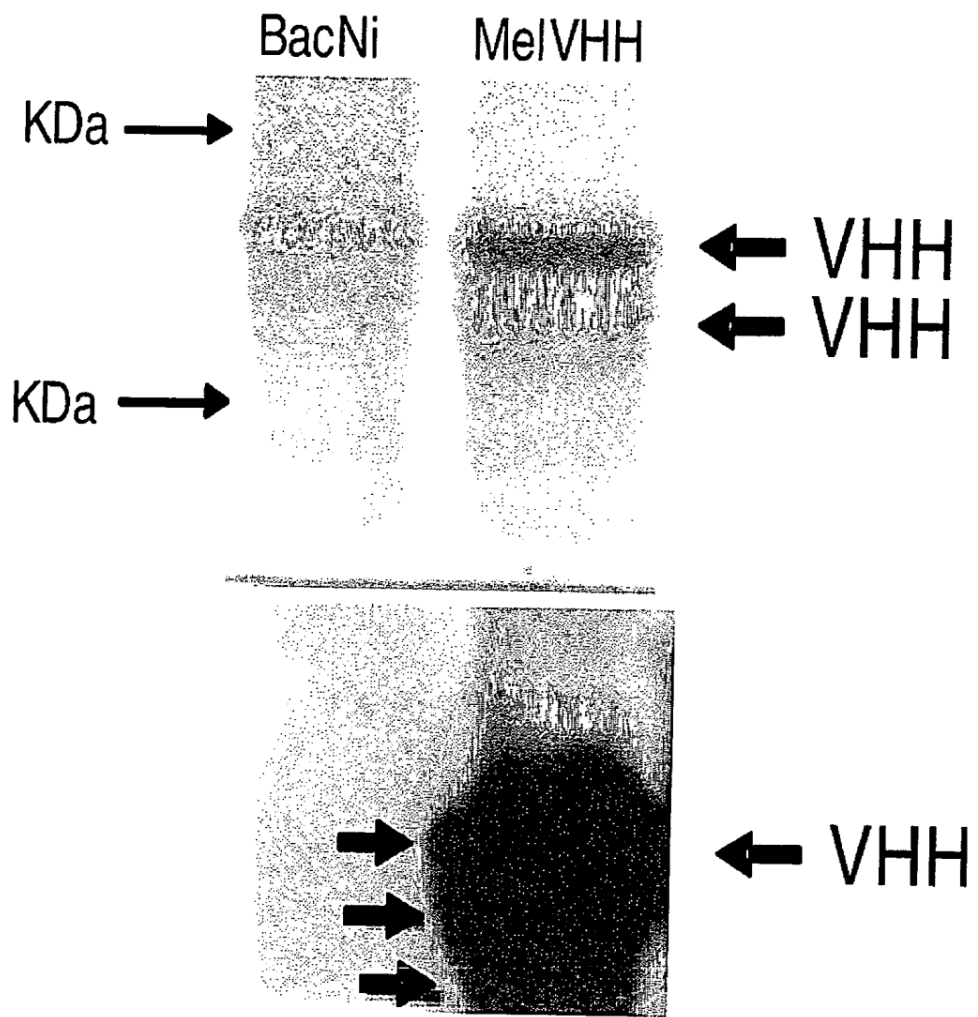


FIG. 6A

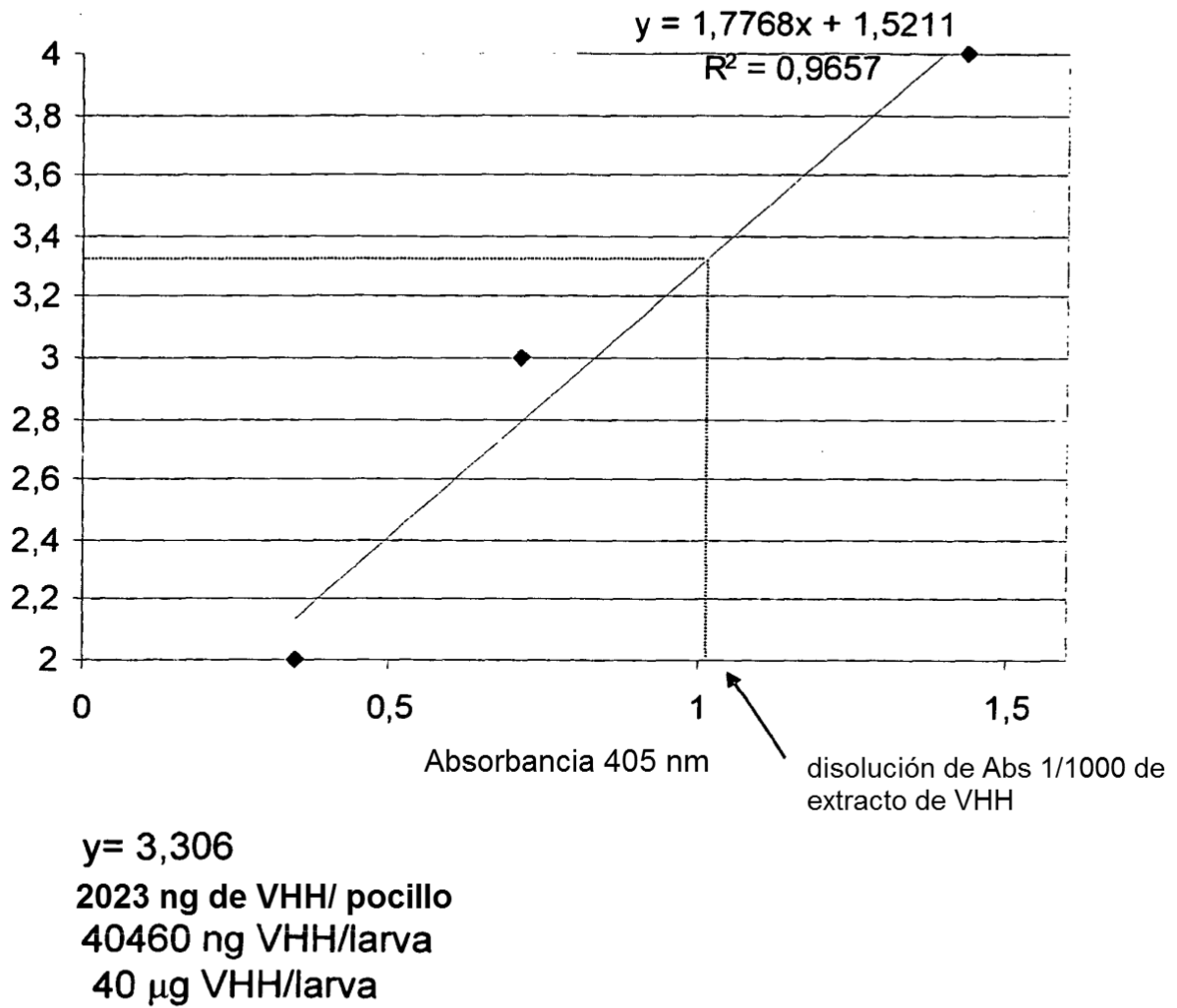


FIG. 6B

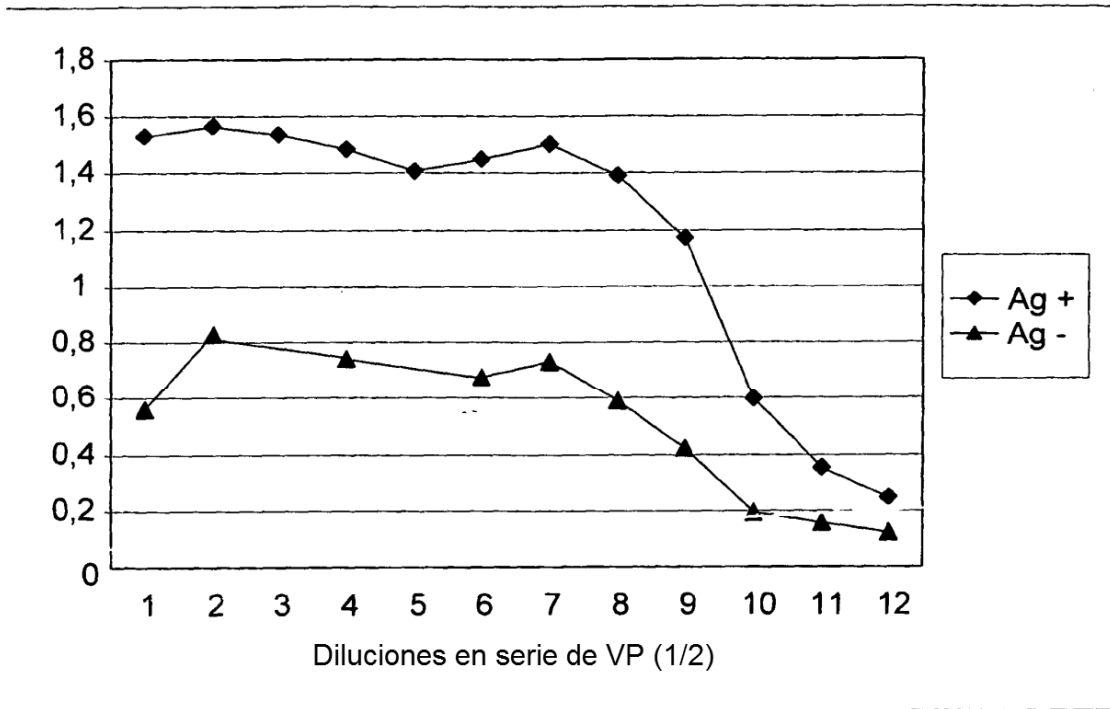


FIG. 7

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 2006056306 A [0009]
- US 20050054001 A, Muyldermans Serge [0010]
- WO 0065057 A [0011]
- US 20070009512 A, Hamers [0012]

10 Literatura no patente citada en la descripción

- **PARRENO, V.C. et al.** *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, vol. 100, 7-24 [0005]
- **FERNANDEZ, F.M. et al.** *Vaccine*, 1998, vol. 16, 507-16 [0005] [0076]
- **SAIF, L.J. et al.** *Infect Immun*, 1983, vol. 41, 1118-31 [0005]
- **SAIF, L.J. et al.** *Adv Exp Med Biol*, 1987, vol. 216B, 1815-23 [0005]
- **MURPHY, T.V. et al.** *J Infect Dis*, 2003, vol. 187, 1309-13 [0006]
- **RAY, P. et al.** *J Infect Dis*, 2006, vol. 194, 588-93 [0006]
- **BLUTT, S.E. et al.** *Lancet*, 2003, vol. 362, 1445-9 [0006]
- **PANT, N. et al.** *J Infect Dis*, 2006, vol. 194, 1580-8 [0008]
- **VAN DER VAART J.M. et al.** *Vaccine*, 08 May 2006, vol. 24 (19), 4130-7 [0008]
- **PARRENO, V.C.** *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, vol. 100, 7-24 [0068] [0076]
- **PARRENO, V.V.** *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2001, vol. 48, 713-20 [0068]
- **ARBABI GHARROUDI M ; DESMYTER A ; WYNLS L ; HAMERS R ; MUYLDERMANS S.** Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.*, 15 September 1997, vol. 414 (3), 521-6 [0070]
- **MARKS, J.D. ; HOOGENBOOM, H.R. ; BONNERT, T.P. ; MCCAFFERTY, J. ; GRIFFITHS, A.D. ; WINTER, G.** *JMB*, 1991 [0071]
- **CONRATH, K.E.M.** *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, vol. 45, 2807-12 [0072]
- **SAMBROOK, J. ; RUSSELL, D.W.** *Molecular Cloning*, 2001 [0072]
- **TO, T.L. et al.** *J Gen Virol*, 1998, vol. 79, 2661-72 [0081]
- **VANCOTT, J.L. et al.** *J Virol*, 2006, vol. 80, 4949-61 [0082]