

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 332**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/02** (2006.01)

**A61K 39/145** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2007 E 07752324 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 1991264**

54 Título: **Composiciones que incluyen hemaglutinina, métodos de preparación y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

**07.03.2006 US 779854 P**  
**20.03.2006 US 784497 P**  
**07.04.2006 US 790457 P**  
**16.06.2006 US 814292 P**  
**14.07.2006 US 830881 P**  
**16.08.2006 US 838007 P**  
**03.11.2006 US 856451 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.04.2015**

73 Titular/es:

**VAXINNATE CORPORATION (100.0%)**  
**3 CEDAR BROOK DRIVE**  
**CRANBURY NJ 08512, US**

72 Inventor/es:

**SONG, LANGZHOU;**  
**NAKAAR, VALERIAN;**  
**PRICE, ALBERT E.;**  
**TUSSEY, LYNDIA G.;**  
**HULEATT, JAMES W.;**  
**POWELL, THOMAS J. y**  
**EVANS, ROBERT K.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

Observaciones :

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

**ES 2 534 332 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones que incluyen hemaglutinina, métodos de preparación y métodos de uso de las mismas

**Antecedentes de la invención**

5 La infección por gripe vírica puede conducir a la enfermedad. Las estrategias para prevenir y gestionar la enfermedad asociada a la infección por gripe vírica pueden incluir vacunas con virus inactivados y fármacos. Sin embargo, en dichas estrategias puede ser costoso mantener el suministro a demanda y, por tanto, estar limitado su suministro; pueden dar como resultado una protección variable y un alivio menos que satisfactorio de los síntomas, previniendo o tratando así ineficazmente la enfermedad y, en algunos casos la muerte, consecuencia de la enfermedad asociada a infección por gripe vírica. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos métodos mejorados y eficaces de tratamiento para la prevención y gestión de la enfermedad asociada a infección por gripe vírica.

10 En Jeon Sung *et al.* ("Immunization with influenza virus hemagglutinin globular region containing the receptor-binding pocket", *VIRAL IMMUNOLOGY*, vol. 15, nº 1, 2002, página 165-176), el constructo de HA usado en D1 (HA91-261) da a conocer un constructo similar a la molécula HA1-3 descrita en la presente memoria (HA101-276, designada HA1-3). Este constructo comprende la cabeza globular de HA pero carece de la lámina  $\beta$  localizada por debajo en la estructura tridimensional de rayos X.

15 El constructo descrito por Jeon *et al.* induce una respuesta humoral e inmunitaria de linfocitos T auxiliares específica en ratones. Los anticuerpos generados tras la inmunización con ese constructo pueden reconocer también el virus intacto (pág. 170 y Fig. 2A) y muestran reactividad cruzada con otras dos cepas de la gripe (Fig. 2B).

20 Se evaluó la protección frente a la infección por exposición a una dosis subletal de virus de la gripe 4 días después de la última inmunización. Se sacrificaron los ratones 5 días después y se determinó la presencia de virus infecciosos en los pulmones. Se determinó que el nivel de protección era de aproximadamente un 80 %, en comparación con ratones no inmunizados (pág. 172 y Fig. 7).

**Sumario de la invención**

25 La presente invención se refiere a composiciones que estimulan una respuesta inmunitaria protectora y a métodos de preparación de proteínas que estimulan una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto.

El método de la invención se da en las reivindicaciones 1 a 14 y 23. Las composiciones se definen en las reivindicaciones 15 a 23. Los usos médicos de la invención se definen en las reivindicaciones 24 a 26.

30 Se describe un método de preparación de una proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto, que comprende las etapas de separar una porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural para formar así una porción de proteína, en el que la porción de proteína incluye al menos una porción de una cabeza globular y al menos una porción de al menos una estructura secundaria que causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria, y en el que la porción de proteína carece de un dominio de fusión con membrana, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático; transformar una secuencia de ácido nucleico que codifica la porción de proteína en una célula hospedadora procarionótica y cultivar la célula hospedadora procarionótica para preparar así la proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto.

35 Se describe también un método de preparación de una proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto, que comprende las etapas de separar una porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural para formar así una porción de proteína, en el que la porción de proteína incluye al menos una porción de una cabeza globular y al menos una porción de al menos una estructura secundaria que causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria, y en el que la porción de proteína carece de un dominio de fusión con membrana, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático; transfectar una secuencia de ácido nucleico que codifica la porción de proteína a una célula hospedadora eucariótica, en el que la célula hospedadora eucariótica no es una célula hospedadora eucariótica de *Pichia pastoris* y cultivar la célula hospedadora eucariótica para preparar así la proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto.

40 Se describe también un método de preparación de una proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto, que comprende las etapas de separar una porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural para formar así una porción de proteína, en el que la porción de proteína incluye al menos una porción de una cabeza globular y al menos una porción de al menos una estructura secundaria que causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria, y en el que la porción de proteína carece de un dominio de fusión con membrana, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático; transfectar una secuencia de ácido nucleico que codifica la porción de proteína a una célula hospedadora eucariótica, en el que la célula hospedadora eucariótica no es una célula hospedadora eucariótica de *Drosophila melanogaster* y cultivar la célula hospedadora eucariótica para preparar así la proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto.



Se describe también un método de preparación de una proteína hemaglutinina vírica que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto, que comprende las etapas de transformar una célula hospedadora procariótica con una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una hemaglutinina vírica que carece de un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático y cultivar la célula procariótica, preparando así la proteína.

5 Se describe también un método de estimulación de inmunidad protectora en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye una proteína preparada mediante un método que comprende las etapas de transformar una célula hospedadora procariótica con una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una hemaglutinina vírica que carece de un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático y cultivar la célula hospedadora procariótica, preparando así la proteína.

10 Se describe también un método de estimulación de inmunidad protectora en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye una proteína que tiene al menos una hemaglutinina vírica que carece de un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático, en el que la proteína se expresó en una célula procariótica.

15 Se describe también una composición que comprende al menos una porción de al menos un patrón molecular asociado a patógeno y una porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural, en la que la porción de hemaglutinina vírica de origen natural incluye al menos una porción de una cabeza globular y al menos una porción de al menos una estructura secundaria que causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria, y en la que la porción de hemaglutinina vírica de origen natural carece de un dominio de fusión con membrana, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático.

20 Se describe también una composición que comprende un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en la que el componente de flagelina incluye al menos un residuo de cisteína y activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.

25 Se describe también una composición que comprende un componente agonista de receptor de tipo Toll que es al menos una porción de un agonista de receptor de tipo Toll, en la que el componente agonista de receptor de tipo Toll incluye al menos un residuo de cisteína en una posición en que no aparece un residuo de cisteína en el agonista de receptor de tipo Toll nativo, activando el componente agonista de receptor de tipo Toll un receptor de tipo Toll.

Se describe también una composición que comprende un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en la que al menos una lisina del componente de flagelina se ha sustituido por al menos una arginina, activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.

30 Se describe también una composición que comprende un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en la que al menos una lisina del componente de flagelina se ha sustituido por al menos un residuo de serina, activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.

35 Se describe también una composición que comprende un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en la que al menos una lisina del componente de flagelina se ha sustituido por al menos una histidina, activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.

Se describe también un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en el que el componente de flagelina incluye al menos un residuo de cisteína y activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.

40 Se describe también un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en el que al menos una lisina del componente de flagelina se ha sustituido por al menos una arginina, activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.

45 Se describe también un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en el que al menos una lisina del componente de flagelina se ha sustituido por al menos un residuo de resina, activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.

50 Se describe también un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en el que al menos una lisina del componente de flagelina se ha sustituido por al menos un residuo de histidina, activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.

55 Se describe también un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye un componente agonista de receptor de tipo Toll que es al menos una porción de un agonista de receptor de tipo Toll, en el que el componente agonista de receptor de tipo Toll incluye al menos un residuo de cisteína en una posición en que no aparece un residuo de cisteína en el agonista de

receptor de tipo Toll nativo, activando el componente agonista de receptor de tipo Toll un agonista de receptor de tipo Toll.

5 Los métodos y composición de la invención pueden emplearse para estimular una respuesta inmunitaria, en particular una respuesta inmunitaria protectora, en un sujeto. Las ventajas de la invención reivindicada incluyen, por ejemplo, métodos económicos y composiciones que pueden producirse en cantidades relativamente grandes para uso en la prevención y el tratamiento de la enfermedad asociada a infección por gripe vírica. Los métodos y composiciones reivindicados pueden emplearse para prevenir o tratar la infección por gripe vírica y, por lo tanto, evitar una dolencia grave y muerte como consecuencia de la infección por gripe vírica.

### Breve descripción de las figuras

10 La Figura 1 representa un diagrama de cintas de la estructura cristalina de hemaglutinina A (HA) de la gripe PR8 (1 RU7). Las presentaciones esquemáticas de izquierda a derecha son trímero, monómero, dominio de cabeza globular y tres selecciones de candidatos a vacuna de HA. Las moléculas o dominios de interés están destacados por un círculo de puntos, tales como el monómero en la estructura trimérica y el dominio de cabeza globular en la estructura monomérica. Los límites de dominio de los tres candidatos a vacuna están marcados por cruces. Los números de residuo de cada selección están también marcados en la presentación de vacuna individual.

15 La Figura 2 representa un análisis gráfico de la hidrofobia de B/Lee/40 HA (SEQ ID NO: 36) usando ProtScale (<http://ca.expasy.org/tools> → Análisis de estructura primaria → ProtScale) para confirmar que los límites seleccionados estaban en las regiones hidrófilas de la proteína.

20 La Figura 3 representa un análisis ELISA de sándwich de proteínas STF2.HA de la cepa B. Se recubrieron las placas de ELISA con anticuerpo de flagelina, y se incubaron las proteínas indicadas para permitir la captura. Se detectaron las proteínas usando antisueros de hurón contra B/Malasia/2506/2004 y anticuerpos de cabra anti-hurón marcados enzimáticamente.

25 La Figura 4 representa la bioactividad de TLR de proteínas STF2.HA de la cepa B. Se incubaron células HEK293 (TLR5+) con las proteínas indicadas durante una noche, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo celular y se valoró la IL-8 mediante ELISA.

La Figura 5 representa la bioactividad de TLR de proteínas STF2.HA de la cepa B. Se incubaron células HEK293 (TLR5+) con las proteínas indicadas durante una noche, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo celular y se valoró la IL-8 mediante ELISA.

30 La Figura 6 representa la respuesta de anticuerpo dependiente de la dosis contra STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) en ratones BALB/c. Se inmunizaron los ratones (10/grupo) como se indica los días 0 y 14, y se extrajo sangre los días 12 y 21. Se examinaron las respuestas de IgG anti-HA el día 28 mediante ELISA. Se incluyeron antisueros de convalecientes (x) como control positivo. Los datos representan la media  $\pm$  DE de 10 sueros individuales por grupo.

35 La Figura 7 representa la reactividad sérica con células infectadas por la gripe *in vitro*. Se incubaron las muestras de suero del día 21 representadas en la Figura 6 con células MDCK infectadas ficticiamente y por PR/8/34. Los datos representan la media de  $DO_{450} \pm$  DE de 10 sueros individuales/grupo.

La Figura 8A representa la supervivencia de los ratones BALB/c inmunizados con STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90). Se expusieron los ratones de las Figuras 8 y 9 el día 28 a una  $DL_{90}$  ( $8 \times 10^3$  EID) de gripe A PR/8/34 administrada por vía intranasal (día 0 después de la exposición).

40 La Figura 8B representa los pesos de los ratones BALB/c inmunizados con STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90). Se expusieron los ratones de las Figuras 6 y 7 el día 28 a una  $DL_{90}$  ( $8 \times 10^3$  EID) de gripe A PR/8/34 administrada por vía intranasal (día 0 después de la exposición). La gráfica refleja el peso medio por grupo basado en animales individuales medido diariamente durante 19 días.

45 La Figura 8C representa la puntuación clínica de los ratones BALB/c inmunizados con STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90). Se expusieron los ratones de las Figuras 6 y 7 el día 28 a una  $DL_{90}$  ( $8 \times 10^3$  EID) de gripe A PR/8/34 administrada por vía intranasal (día 0 después de la exposición). La gráfica refleja la puntuación clínica media por grupo basada en animales individuales medida diariamente durante 19 días. Se valoraron las puntuaciones clínicas como sigue: 4 pts = sano, 3 pts = aseo reducido, 2 pts = actividad física reducida y 1, pt = moribundo.

50 La Figura 9 representa la actividad de neutralización de sueros inmunitarios de ratones BALB/c mice inmunizados con las dosis indicadas de STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) los días 0 y 14, y con extracción de sangre el día 21. Se calculó el título de criterio de valoración de cada muestra como el título que inhibía la lisis mediada por virus de las células al menos un 50 %. Se calcularon los títulos geométricos medios  $\pm$  DE para cada grupo de dosis y se representaron gráficamente.

Las Figuras 10A y 10B representan la respuesta de anticuerpo anti-HA de ratones BALB/c inmunizados con 3  $\mu$ g de STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90), o 3 o 0,3  $\mu$ g de STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95) por vía s.c. los días 0 y 14.

El día 21, se aislaron sueros y se examinó la reactividad (Figura 10A) con HA purificada a partir de gripe A/Viet Nam/1203/2004 (obtenida en BEI Resources nº de cat. NR-660)) y (Figura 10B) flagelina recombinante (STF2) (SEQ ID NO: 96) mediante ELISA.

5 La Figura 11 representa un diagrama de flujo de las etapas requeridas para expresar constructos de pFastBac usando el sistema de expresión de *Baculovirus* Bac-to-Bac.

10 Las Figuras 12A y 12B representan respuestas de IgG específicas anti-HA en ratones BALB/c inmunizados con proteínas de fusión STF2.HA1-1. Se inmunizaron los ratones (10/grupo) con las proteínas de fusión STF2.HA1-1 indicadas los días 0 y 14, y se extrajo sangre el día 21. Se examinaron las respuestas de IgG anti-HA y anti-flagelina mediante ELISA. Se incluyeron antisueros de convalecientes como control positivo. Los datos representan la media  $\pm$  DE de 10 sueros individuales por grupo.

La Figura 13A representa la supervivencia de ratones BALB/c inmunizados con proteínas STF2.HA1-1 recombinantes. El día 28, se expusieron los animales de la Figura 12 por vía i.n. a una DL<sub>90</sub> (8x10<sup>3</sup> EID) de gripe A PR/8/34. Se monitorizó la supervivencia de los ratones individuales durante 21 días después de la exposición.

15 La Figura 13B representa el peso de ratones BALB/c inmunizados con proteínas STF2.HA1-1 recombinantes. El día 28, se expusieron los animales de la Figura 12 por vía i.n. a una DL<sub>90</sub> (8x10<sup>3</sup> EID) de gripe A PR/8/34. La gráfica refleja el peso medio por grupo basado en animales individuales medido diariamente durante 21 días.

20 La Figura 13C representa la valoración clínica de ratones BALB/c inmunizados con proteínas STF2.HA1-1 recombinantes. El día 28, se expusieron los animales de la Figura 12 por vía intranasal (i.n.) a una DL<sub>90</sub> (8x10<sup>3</sup> EID) de gripe A PR/8/34. La gráfica refleja el peso medio por grupo basado en animales individuales medido diariamente durante 21 días. Se valoraron las puntuaciones clínicas como sigue: 4 pts = sano, 3 pts = aseo reducido, 2 pts = actividad física reducida y 1, pt = moribundo.

La Figura 14 representa los títulos de anticuerpo anti-HA de ratones después de inmunización con 10 µg de STF2.HA1-2(VN).

25 La Figura 15 representa los títulos de anticuerpo anti-HA de ratones después de inmunización con 3 µg de STF2.HA1-2(VN).

La Figura 16 representa los títulos de anticuerpo anti-HA de ratones después de inmunización con 1 µg de STF2.HA1-2(VN).

La Figura 17 representa la supervivencia de ratones después de exposición a 10 DL<sub>90</sub> de gripe A/Viet Nam/1203/04

30 La Figura 18 representa la secuencia aminoacídica de flagelina completa (STF2), destacando los dominios y residuos importantes.



= sitio de unión a TLR5 definido experimentalmente (Smith, *et al.*, 2003); **K** = residuos de lisina; subrayado= secuencias de flagelina correspondientes al constructo STF2Δ (ligador no mostrado).

La Figura 19 representa un modelo de relleno de espacios de flagelina (STF2) con el sitio de activación de TLR5 (panel izquierdo) y los residuos de lisina (panel derecho) destacados en gris.

35 La Figura 20 representa un modelo de relleno de espacios de flagelina (STF2) con los residuos retenidos en STF2Δ destacados en negro.

La Figura 21 representa una representación esquemática de la clonación por PCR en dos etapas de pMT/STF2Δ.

La Figura 22 representa el reconocimiento de epítopos de flagelina de proteínas STFΔ en ELISA.

40 La Figura 23 representa la secreción dependiente de TLR5 de IL-8 después de la estimulación de células HEK293 con las proteínas STF2Δ indicadas.

La Figura 24 representa el cromatograma S200 de STF2Δ.HingeCys:CysH1C1. Vacío= volumen de columna vacía; conjugado= pico de elución de proteína: conjugado peptídico; se indican A260, A280 y conductividad.

45 La Figura 25 representa la secreción dependiente de TLR5 de IL-8 después de la estimulación de células RAWhTLR5 (símbolos negros) o células RAW negativas de TLR5 (símbolos blancos) con STF2Δ.HingeCys (cuadrados), conjugado de STF2Δ.HingeCys:CysH1C1 (círculos) o STF2.OVA (triángulos).

La Figura 26 representa el cromatograma S200 de STF2.4xH1C1. vacío= volumen de columna vacía; conjugado= pico de elución de proteína: conjugado peptídico; se indican A260, A280 y conductividad.

- La Figura 27 representa la respuesta de anticuerpo anti-H1C1 de ratones BALB/c inmunizados con péptido H1C1 nativo o péptido Pam3Cys.H1C1.
- La Figura 28 representa una gráfica de la supervivencia de ratones BALB/c inmunizados con péptido H1C1 nativo o péptido Pam3Cys.H1C1 y después expuestos a una DL<sub>90</sub> de virus de la gripe A/Puerto Rico/8/34.
- 5 La Figura 29 representa la secuencia aminoacídica de flagelina de tipo 2 de *Salmonella typhimurium* (fljB/STF2) con la región de bisagra subrayada (SEQ ID NO: 498).
- La Figura 30 representa la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 499) que codifica la SEQ ID NO: 498. La secuencia de ácido nucleico que codifica la región de bisagra está subrayada.
- 10 La Figura 31 representa la secuencia aminoacídica de flagelina fljC de *E. coli* (a la que también se hace referencia en la presente memoria como "fljC de *E. coli*") con la región de bisagra subrayada (SEQ ID NO: 502).
- La Figura 32 representa la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 503) que codifica la SEQ ID NO: 502. La secuencia de ácido nucleico que codifica la región de bisagra está subrayada.
- La Figura 33 representa la secuencia aminoacídica de flagelina fljC de *S. muenchen* (a la que también se hace referencia en la presente memoria como "fljC de *S. muenchen*") con la región de bisagra subrayada (SEQ ID NO: 504).
- 15 La Figura 34 representa la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 505) que codifica la SEQ ID NO: 504 La secuencia de ácido nucleico que codifica la región de bisagra está subrayada.
- La Figura 35 representa la secuencia aminoacídica de pMT/STF2. El ligador está subrayado y la secuencia de la señal de secreción BiP está en negrita (SEQ ID NO: 506).
- 20 La Figura 36 representa la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 507) de SEQ ID NO: 506. La secuencia de ácido nucleico que codifica el ligador está subrayada y la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia BiP está en negrita.
- La Figura 37 representa la activación de una célula presentadora de antígeno (APC) por señalización de receptor de tipo Toll (TLR).
- 25 Las Figuras 38A y 38B representan constructos de plásmido para expresar el extremo amino de aislamientos víricos de gripe A de M2 (p.ej., SEQ ID NO: 510, 554) de H1 y H5 (SEQ ID NO: 536). pMT: vector de expresión basado en el promotor de metalotioneína. BiP: secuencia señal de secreción de proteína de unión a inmunoglobulina. STF2: flagelina completa de *S. typhimurium*. STF2Δ: STF2 con región de bisagra eliminada. MCS: sitio de clonación múltiple.
- 30 La Figura 39 representa constructos de plásmido diseñados para expresar HA de los aislamientos de virus de la gripe A H1 y H5. AOX1: promotor AOX1 del vector de expresión pPICZα (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). cf: secuencia señal de secreción de levadura. STF2: flagelina completa de *S. typhimurium*. STF2Δ: STF2 con región de bisagra eliminada. MCS: sitio de clonación múltiple.
- La Figura 40 representa la secuencia aminoacídica de pMT/STF2Δ (SEQ ID NO: 585). La secuencia ligadora está subrayada y la señal de secreción BiP está en negrita.
- 35 La Figura 41 representa la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 586) que codifica la SEQ ID NO: 585. La secuencia de ácido nucleico que codifica el ligador está subrayada y la secuencia de ácido nucleico que codifica la señal de secreción BiP está en negrita.
- La Figura 42 representa la secreción de IL-8 después de estimulación de células TLR5+.
- 40 La Figura 43 representa constructos de fusión en un vector pET24. T7: promotor T7; lacO: operador lac; STF2: flagelina de *Salmonella typhimurium*; STF2Δ = STF2 con la región de bisagra eliminada; EIII<sup>r</sup> es el dominio III de una proteína de envoltura del Nilo occidental con 6 aminoácidos de aminoácidos del dominio I.
- La Figura 44 representa las secuencias aminoacídicas (SEQ ID NO: 691-698) del empalme E1/EIII para virus del Nilo occidental, de encefalitis japonesa y del dengue (serotipos 1 a 4). El epítipo del Nilo occidental identificado usando antisueros de animales inmunizados con STF2Δ.EIIIs + está subrayado. Esta secuencia corresponde al péptido E2-21 (SEQ ID NO: 728).
- 45 La Figura 45 representa un péptido tripalmitoilado.
- La Figura 46 representa el dominio D1, el dominio D2, el dominio de activación de TLR5 e hipervariable (dominio D3) de flagelina.

La Figura 47 representa el dominio D1, el dominio D2, el dominio de activación de TLR5 e hipervariable (dominio D3) de flagelina (Yonekura, *et al.* Nature 424, 643-650 (2003)).

La Figura 48 representa los dominios D0, D1, D2 y D3 de flagelina y las regiones de los dominios D2 y D3 adecuadas para inserción o sustitución con antígenos (p.ej. sitio de escisión madurativa, HA, M2e).

- 5 La Figura 49 representa la secuencia aminoacídica de flagelina de *Pseudomonas aeruginosa* (SEQ ID NO: 815). Los residuos de lisina están indicados por asteriscos.

La Figura 50 representa la secuencia aminoacídica de flagelina de *S. typhimurium* (SEQ ID NO: 816). Los residuos de lisina están indicados por asteriscos.

- 10 La Figura 51 representa la secuencia aminoacídica (SEQ ID NO: 820) de flagelina de *Listeria monocytogenes* (nº de acceso a GenBank: Q92DW3). Los residuos de lisina están indicados por asteriscos.

### Descripción detallada de la invención

- 15 Se describirán ahora más particularmente los rasgos y otros detalles de la invención, como etapas de la invención o como combinaciones de partes de la invención, y se señalarán en las reivindicaciones. Se entenderá que las realizaciones particulares de la invención se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Los rasgos principales de esta invención pueden emplearse en diversas realizaciones sin apartarse del alcance de la invención.

La invención está dirigida en general a métodos de preparación de composiciones y a composiciones que estimulan una respuesta inmunitaria en un sujeto, tal como una respuesta inmunitaria protectora, y a métodos de tratamiento tales como por administración de la composición a un sujeto.

- 20 "Estimular una respuesta inmunitaria", como se usa en la presente memoria, hace referencia a la generación de anticuerpos y/o linfocitos T contra al menos una porción de un antígeno, tal como las porciones de proteína de hemaglutinina (HA) (p.ej., proteínas HA1-1, HA1-2) descritas en la presente memoria. Los anticuerpos y/o linfocitos T pueden generarse contra al menos una porción de una proteína vírica de la gripe (p.ej., proteínas H2 y M2 de gripe A, B y/o C).

- 25 Estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto puede incluir la producción de respuestas inmunitarias humorales y/o celulares que son reactivas contra el antígeno, tal como una proteína vírica, en particular una proteína vírica de la gripe.

- 30 En las composiciones de la invención para uso en los métodos para estimular respuestas inmunitarias en sujetos, puede evaluarse la capacidad de estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto usando métodos bien establecidos. Los métodos ejemplares para determinar si las composiciones de la invención estimulan una respuesta inmunitaria en un sujeto incluyen la medida de la producción de anticuerpos específicos del antígeno (p.ej., anticuerpos de IgG) por una técnica adecuada tal como ensayos ELISA; el potencial de inducir la potenciación dependiente de anticuerpo (ADE) de una infección secundaria; ensayos de tipo macrófago; neutralización valorada usando el ensayo de neutralización por reducción de placa (PRNT<sub>80</sub>) y la capacidad de generar anticuerpos séricos en modelos no humanos (p.ej. ratones, conejos, monos) (Putnak, *et al.*, Vaccine 23: 4442-4452 (2005)).

- 35 "Estimula una respuesta inmunitaria protectora", como se usa en la presente memoria, significa que la administración de las composiciones de la invención, tales como proteínas de hemaglutinina (HA) (p.ej., proteínas HA1-1, HA1-2 descritas en la presente memoria), da como resultado la producción de anticuerpos de la proteína, causando así que un sujeto sobreviva a la exposición a una dosis por lo demás letal de proteína vírica, tal como HA vírica. Las técnicas para determinar la dosis letal de un virus (p.ej. un virus de la gripe) son conocidas por el especialista en la materia (véase, por ejemplo, WHO/CDS/CSR/NCS2002.5 "WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance" Organización Mundial de la Salud, Departamento de vigilancia y respuesta de enfermedades transmisibles, Programa mundial de la gripe de la OMS; Harmon, M.W., *et al.*, J. Clin. Microbiol. 26: 333-337 (1988); Reed, L.J., *et al.*, Am. J. Hyg. 27: 493-497 (1938); Rose, T., *et al.*, J. Clin. Microbiol. 37: 937-943 (1999); Walls, H.H. *et al.*, J. Clin. Microbiol. 23: 240-245 (1986); "Current Protocols in Immunology", 19.11.1-19.11.32, Cottey, R., *et al.*, John Wiley & Sons, Inc (2001)). Las técnicas ejemplares para determinar una dosis letal pueden incluir la administración de dosis variables de virus y la determinación del porcentaje de sujetos que sobrevive después de la administración de la dosis de virus (p.ej., DL<sub>10</sub>, DL<sub>20</sub>, DL<sub>40</sub>, DL<sub>50</sub>, DL<sub>60</sub>, DL<sub>70</sub>, DL<sub>80</sub>, DL<sub>90</sub>). Por ejemplo, se hace referencia a una dosis letal de un virus que da como resultado la muerte del 50 % de una población de sujetos como una "DL<sub>50</sub>"; se hace referencia en la presente memoria a una dosis letal de un virus que da como resultado la muerte del 80 % de una población de sujetos como una "DL<sub>80</sub>"; se hace referencia en la presente memoria a una dosis letal de un virus que da como resultado la muerte del 90 % de una población de sujetos como una "DL<sub>90</sub>".

- 55 Por ejemplo, la determinación de la DL<sub>90</sub> puede realizarse en sujetos (p.ej. ratones) mediante la administración intranasal de dosis variables (p.ej. diluciones tales como diluciones logarítmicas y semilogarítmicas de  $8 \times 10^3$  dosis infectantes de embrión (EID)) seguida de la valoración de la supervivencia de los sujetos de aproximadamente 14



días a aproximadamente 21 días después de infección con el virus. La inmunidad protectora puede valorarse mediante la apariencia física del sujeto, el comportamiento general (activo), el peso (pérdida inicial de peso seguida de vuelta a un peso aproximado al peso del sujeto antes de la infección con el virus) y supervivencia después de aproximadamente 14 a aproximadamente 21 días después de infección con el virus.

- 5 La valoración de la estimulación de la inmunidad protectora puede hacerse también empleando ensayos que valoran la capacidad de los anticuerpos producidos en respuesta ante las composiciones de la invención (p.ej. una porción de la proteína del virus de origen natural, tal como una porción de proteína de hemaglutinina) para neutralizar la unión de la proteína vírica (p.ej. proteína de hemaglutinina) a una célula hospedadora (véase, por ejemplo, "Current Protocols in Immunology", 19.11.1-19.11.32, Cottey, R., *et al.*, John Wiley & Sons, Inc (2001)). La valoración de la estimulación de inmunidad protectora puede hacerse también empleando ensayos que miden la capacidad de los anticuerpos de inhibir la unión de hemaglutinina (véanse, por ejemplo, Burnett, F.M., *et al.*, *J. Exp. Biol. Med. Sci.* 25: 227-233 (1947); Salk, J.E. *J. Immunol.* 49: 87-98 (1944); "Current Protocols in Immunology", 19.11.1-19.11.32, Cottey, R., *et al.*, John Wiley & Sons, Inc (2001)).

- 15 Se cree que la inhibición de la unión de hemaglutinina es indicativa de la capacidad de los anticuerpos, formados a partir de las composiciones y mediante los métodos de la invención, de neutralizar los sitios de unión de ácido siálico de la hemaglutinina vírica de origen natural ("neutralización de la unión de HA") y, así, prevenir la infección de la célula hospedadora como consecuencia de la estimulación de una respuesta inmunitaria protectora. Se cree que la inhibición o neutralización de la unión de hemaglutinina se correlaciona con la capacidad de una respuesta inmunitaria de proteger frente a una dosis letal de virus.

- 20 La neutralización de la unión de HA puede valorarse mediante ensayos *in vitro* (véanse, por ejemplo, "Current Protocols in Immunology" 19.11.1-19.11.32, Cottey, R., *et al.*, Supl. 42, John Wiley & Sons, Inc. (2001) y "WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance", Webster, R., *et al.*, páginas 28-36, 48-54, 82-92 (2002)). Los ensayos de neutralización vírica ejemplares se basan en la capacidad del suero de unirse específicamente y prevenir la replicación de virus de la gripe en cultivo, tal como en la estirpe celular de riñón canino Madin-Darby (MDCK). Brevemente, se cultivan células en placas de 96 pocillos en presencia de un virus previamente titulado y se observa el efecto citopático del virus replicante al microscopio. Para ensayar el suero, se preparan diluciones en serie del suero y se preincuban con la disolución madre vírica durante 2 horas a 37 °C antes de infectar las células MDCK. Se incuba la mezcla durante 2 horas adicionales, después de lo cual se retira la mezcla de virus/suero y se reemplaza por medio reciente. Se hacen crecer las células durante 4 días. Se puntúan los pocillos como positivos de crecimiento vírico si al menos aproximadamente un 50 % de las células mueren en al menos aproximadamente la mitad de los pocillos para una dilución sérica dada. El recíproco de la dilución máxima de suero que protege al menos aproximadamente a la mitad de las células de la muerte, en al menos aproximadamente la mitad de los pocillos, se considera el título de neutralización.

- 35 Como alternativa, puede efectuarse un ensayo de microneutralización *in vitro* para valorar la neutralización de la unión de HA. Por ejemplo, se diluye suero, se preincuba con un título conocido de virus y se mezcla con células MDCK, como se describe anteriormente. Después de 2 días de incubación, se lavan las células y se fijan con acetona. Se desarrollan las placas como ELISA usando un anticuerpo monoclonal del antígeno nuclear de la gripe NP. Se determina el título de microneutralización como el recíproco de la dilución máxima que proporciona menos de aproximadamente un 50 % de la lectura anti-NP de los pocillos de control de solo virus.

- 40 El ensayo de inhibición de hemaglutinina (HAI) está basado en el antígeno HA sobre la superficie del virus de la gripe, que aglutina eritrocitos (RBC) y previene que los eritrocitos precipiten. Los anticuerpos que se unen específicamente a las regiones de unión a ácido siálico de HA previenen la aglutinación al permitir la precipitación. Se efectúa el ensayo en placas de fondo en V de 96 pocillos con RBC de pollo recientes. Se titula una disolución madre de antígenos víricos de modo que esté presente aproximadamente un exceso de 4 veces respecto a la cantidad mínima necesaria para prevenir la precipitación. El suero de ensayo, que puede ser de varias especies incluyendo ratón, hurón, ave de corral o humano, se calienta a aproximadamente 56 °C para inactivar el complemento. Se efectúan diluciones en serie 2x del suero inactivado y se mezclan con la disolución madre de HA. Después de aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente, se añaden RBC y se incuba la placa durante aproximadamente 30 a aproximadamente 45 minutos. Se puntúan los resultados mediante las observaciones: la aglutinación da como resultado pocillos turbios mientras que la inhibición da como resultado un "botón" de eritrocitos precipitados en el fondo del pocillo. Los controles incluyen RBC sin HA, que forma un botón, y HA y RBC sin suero, que permanece turbio. El título de HAI de una muestra sérica particular es el recíproco de la última dilución que previene la aglutinación (concretamente, forma un botón). Por ejemplo, si una dilución aproximadamente 1: 128 se lee como un botón, pero la dilución 1:256 no, el título de HAI es aproximadamente 128.

- 55 En una realización, la invención es un método de preparación de una proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto, que comprende las etapas de separar una porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural para preparar así una porción de proteína, en el que la porción de proteína incluye al menos una porción de una cabeza globular y al menos una porción de al menos una estructura secundaria que causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria, y en el que la porción de proteína carece de un dominio de fusión con membrana, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. La secuencia de ácido nucleico que codifica la porción de proteína se transforma en una célula procaríótica y se cultiva

la célula procariótica hospedadora para preparar así la proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto.

5 "Una porción de una proteína" o "porción de proteína", como se usa en la presente memoria con referencia a una hemaglutinina vírica de origen natural, hace referencia a cualquier parte de la hemaglutinina vírica de origen natural que es menor que la hemaglutinina vírica de origen natural entera. "Hemaglutinina vírica de origen natural", como se usa en la presente memoria, hace referencia a la hemaglutinina vírica entera, como aparece en la naturaleza.

La porción de proteína puede carecer además de una secuencia señal. La porción de proteína puede incluir además un sitio de unión a ácido siálico.

10 Las porciones de proteína de hemaglutinina vírica de origen natural para uso en las composiciones y métodos de la invención pueden ser una porción de *Orthomyxoviridae* (gripe A, B, C), *Paramyxovirus* (paragripe, virus respiratorio sincitial, virus de la enfermedad de Newcastle, Nipah, sarampión, moquillo canino, virus Sendai), *Reoviridae* (rotavirus), *Parvoviridae* (parvovirus humano, parvovirus porcino), *Orthopoxvirus* (virus de la viruela de los monos, virus de ectromelia), *Flaviviridae* (Nilo occidental, encefalitis japonesa, St. Louis, Murray Valley, Kunjin), *Avipoxvirus* (viruela aviar), virus Nipah (Guillaume V., *et al.*, *J. Virol.*, 80: 7546-54 (2006)); virus del moquillo canino (Singethan K., *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 87: 1635-42 (2006)); virus de la enfermedad de Newcastle, (de Leeuw O.S., *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 86: 1759-69 (2005) y Melanson V.R., *et al.*, *J. Virol.*, 78: 13053-61 (2004); Deng R., *et al.*, *Virology*, 204: 17-26; (1994)), sarampión (Masse N., *et al.*, *J. Virol.*, 78: 9051-63 (2004)), virus Sendai (Tomasi M., *et al.*, *FEBS Lett.*, 11: 56-60 (2003)), paragripe humana (Porotto M., *et al.*, *J. Virol.*, 79: 2383-92 (2005); Tsurudome M., *et al.*, *Virology*, 213: 190-203 (1995); Bousse T., *et al.*, *Virology*, 209: 654-7 (1995); y Takimoto T., *et al.*, *J. Virol.*, 66: 7597-600 (1992)).

Las porciones de hemaglutinina vírica ("porciones de proteína") (p.ej., una hemaglutinina vírica de gripe A, gripe B y gripe C) pueden incluir al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en porciones de proteína a las que se hace referencia en la presente memoria como "HA1-1," "HA1-2" y "HA1-3."

25 "HA1-1," como se usa en la presente memoria, hace referencia a una porción de proteína de una hemaglutinina vírica que incluye al menos un sándwich  $\beta$  que incluye el sitio de unión a sustrato, que incluye al menos aproximadamente dos láminas  $\beta$ , al menos aproximadamente de 2 a 3 hélices  $\alpha$  cortas, al menos una lámina  $\beta$  pequeña y un sándwich  $\beta$  pequeño adicional en la parte inferior de la molécula y al menos aproximadamente 4 enlaces disulfuro. El sándwich  $\beta$  que incluye el sitio de unión a sustrato de HA1-1 incluye al menos aproximadamente 4 hebras  $\beta$  como lámina superior y al menos de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 hebras  $\beta$  como lámina inferior. Al menos aproximadamente una hélice  $\alpha$  de la porción HA1-1 está localizada al lado del sándwich  $\beta$  que incluye el sitio de unión a sustrato y al menos aproximadamente 1 a aproximadamente 2 están localizadas en la parte inferior del sándwich  $\beta$  que incluye el sitio de unión a sustrato. El sándwich  $\beta$  pequeño de HA1-1 puede incluir al menos de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 hebras  $\beta$  en cada lámina  $\beta$ ; o de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 hebras  $\beta$ . Las porciones de proteína HA1-1 ejemplares incluyen las SEQ ID NO: 8, 11, 14, 17, 20, 38, 40, 45, 47, 49, 179, 180, 181 y 182.

40 "HA1-2," como se usa en la presente memoria, hace referencia a una porción de proteína de una hemaglutinina vírica que incluye al menos un sándwich  $\beta$  que incluye el sitio de unión a sustrato, al menos de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 hélices  $\alpha$  cortas, al menos aproximadamente una lámina  $\beta$  pequeña en la parte inferior de la molécula y al menos aproximadamente 2 enlaces disulfuro. Una hebra  $\beta$  en una hemaglutinina vírica puede incluir entre aproximadamente 2 y aproximadamente 15 aminoácidos. Una hebra  $\beta$  pequeña puede incluir aproximadamente 2 aminoácidos, o entre aproximadamente 2 y aproximadamente 3 aminoácidos, o entre aproximadamente 2 y 4 aminoácidos, o entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 aminoácidos. Una lámina  $\beta$  pequeña puede incluir entre aproximadamente 2 y aproximadamente 3 hebras  $\beta$ , o entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4 hebras  $\beta$ . El sándwich  $\beta$  que incluye el sitio de unión a sustrato de HA1-2 puede incluir además al menos aproximadamente 4 hebras  $\beta$  como lámina superior y al menos de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 hebras  $\beta$  como lámina inferior. Al menos aproximadamente una hélice  $\alpha$  de la porción HA1-2 está localizada al lado del sándwich  $\beta$  que incluye el sitio de unión a sustrato, y al menos aproximadamente 1 a aproximadamente 2 están localizadas en la parte inferior del sándwich  $\beta$  que incluye el sitio de unión a sustrato. Las porciones de proteína HA1-2 ejemplares incluyen las SEQ ID NO: 9, 12, 15, 18, 21, 24, 26, 28, 30, 32, 39, 41, 46, 48 y 50.

50 "HA1-3," como se usa en la presente memoria, hace referencia a una porción de proteína de una hemaglutinina vírica que incluye al menos un sándwich  $\beta$  que incluye el sitio de unión a sustrato, al menos aproximadamente 2 hélices  $\alpha$  cortas y al menos un enlace disulfuro. "Sándwich  $\beta$ ," como se usa en la presente memoria, hace referencia a al menos aproximadamente 2 conjuntos de láminas  $\beta$  que forman al menos aproximadamente una capa interactiva. "Sitio de unión a sustrato", como se usa en la presente memoria con referencia al sándwich  $\beta$ , significa cualquier parte de la porción de hemaglutinina vírica de origen natural que tenga la capacidad de interactuar o unirse a una molécula. Por ejemplo, el sándwich  $\beta$  que incluye el sitio de unión a sustrato de la porción puede incluir una porción que se une a ácido siálico. El sándwich  $\beta$  que incluye el sitio de unión a sustrato de HA1-3 puede incluir además al menos aproximadamente 4 hebras  $\beta$  como lámina superior y al menos aproximadamente 3 hebras  $\beta$  como lámina inferior. Al menos aproximadamente una hélice  $\alpha$  de la porción HA1-1 está localizada al lado del sándwich  $\beta$  que incluye el sitio de unión a sustrato y al menos otra hélice  $\alpha$  está localizada en la parte inferior del

sándwich  $\beta$  que incluye el sitio de unión a sustrato. Una hélice  $\alpha$  corta puede incluir menos de aproximadamente 5 giros (2, 3, 4, 5 giros) en una hélice  $\alpha$ . Una hélice  $\alpha$  en una hemaglutinina vírica puede ser de entre 1 y aproximadamente 15 giros, o de entre aproximadamente 2 a 15 giros. Las porciones de proteína HA1-3 ejemplares incluyen las SEQ ID NO: 10, 13, 16, 19, 22, 25, 27, 29, 31 y 33.

5 "Un sitio de unión a ácido siálico", como se usa esa frase en la presente memoria con referencia a la porción de la proteína de hemaglutinina vírica de origen natural, significa una parte de la porción de proteína que tiene la capacidad de interactuar con residuos de ácido siálico. Se hace referencia también en la presente memoria a "un sitio de unión a ácido siálico" como "un dominio de unión a ácido siálico".

10 "Al menos una porción", como se usa en la presente memoria, hace referencia a cualquier parte de un componente (p.ej. una cabeza globular, una estructura secundaria) o molécula (p.ej. una proteína, antígeno, receptor de tipo Toll, un péptido, flagelina, HA, proteína de matriz 2 (M2), ectodominio de matriz 2 (M2e)) o la totalidad del componente o la molécula. Se hace referencia también en la presente memoria a "al menos una porción" como un "fragmento".

15 Se hace referencia con "al menos una porción", como se usa en la presente memoria con referencia a una flagelina (p.ej. fljB/STF2, fliC de *E. coli*, fliC de *S. muenchen*), a cualquier parte de la flagelina (p.ej., motivo C motivo N, dominio 1, 2, 3) o a la totalidad de la flagelina que puede iniciar una ruta de transducción de señal intracelular para un receptor de tipo Toll.

20 Un solo polipéptido puede exhibir varios tipos de estructura secundaria. Sin interacciones estabilizadoras, un polipéptido puede asumir una conformación de ovillo aleatorio. Sin embargo, las estructuras secundarias tales como hélices alfa ( $\alpha$ ) y hebras beta ( $\beta$ ) pueden estabilizar una proteína o una porción de una proteína. La asociación lateral de hebras  $\beta$  forma láminas  $\beta$  (a las que se hace referencia también en la presente memoria como "láminas  $\beta$  plegadas"). Las estructuras secundarias pueden localizarse en las superficies de la porción, proteína o proteína de origen natural (p.ej. hemaglutinina vírica, flagelina, M2e). La estructura terciaria de una proteína es la disposición tridimensional de residuos aminoacídicos. En contraposición con la estructura secundaria, que se estabiliza por ejemplo por enlaces de hidrógeno, hélices  $\alpha$  o hebras  $\beta$ , la estructura terciaria es el resultado de interacciones hidrófobas entre las cadenas laterales no polares de la porción, proteína o hemaglutinina vírica de origen natural. Las interacciones hidrófobas mantienen las hebras de hélices en ovillos aleatorios con una estructura interna compacta. El tamaño y forma de una proteína pueden depender de su secuencia aminoacídica primaria así como del número, tamaño y disposición de las estructuras secundarias.

30 "Una cabeza globular", como se usa esa frase en la presente memoria, hace referencia a una porción de una proteína de hemaglutinina vírica de origen natural que incluye las regiones de unión a receptor o ácido siálico. Se hace referencia también en la presente memoria a "cabeza globular" como un "dominio globular". La cabeza globular de las proteínas de hemaglutinina vírica se ha determinado basándose en cristalografía de rayos X como se describe, por ejemplo, en Wilson I.A., *et al.* Nature 289: 366-373 (1981); Chen, J., *et al.*, Cell 95: 409-417 (1998); Ha Y., *et al.*, The EMBO Journal 21: 865-875 (2002); Russell, R.J., *et al.*, Virology 325: 287-296 (2004) y Cox, N.J., *et al.*, en: "Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections", eds. BWJ Mathy, *et al.*, Vol. 1 (9ª ed.) Nueva York, NY, Oxford Univ. Press, Cap. 32, pág. 634 (1998). La cabeza globular de una hemaglutinina vírica de origen natural es un componente de la subunidad HA1 de, por ejemplo, hemaglutinina vírica de la gripe. Además del dominio de unión a receptor, la cabeza globular puede incluir el subdominio E y el subdominio F como se describen, por ejemplo, en Ha, Y., *et al.* The EMBO Journal 21: 865-875 (2002).

40 La frase "causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria", como se usa en la presente memoria, hace referencia a un mantenimiento de la estructura terciaria de la cabeza globular de la hemaglutinina vírica de origen natural suficiente para estimular una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto.

45 El dominio de fusión con membrana de una hemaglutinina vírica es aquella región de la hemaglutinina vírica (implicada en la unión de hemaglutinina vírica) que se une a una célula hospedadora. Un dominio transmembrana de la hemaglutinina vírica es aquella porción de la hemaglutinina vírica que atraviesa la membrana del virus. Un dominio citoplasmático de una hemaglutinina vírica es aquella porción de la hemaglutinina vírica localizada en la superficie citoplasmática del virus.

50 La porción de la proteína de hemaglutinina vírica de origen natural (a la que se hace referencia también en la presente memoria como "porción de proteína" puede carecer además de una secuencia señal. La porción de cabeza globular empleada en los métodos descritos en la presente memoria puede incluir al menos una porción de al menos una estructura secundaria que incluye al menos una porción de al menos una lámina  $\beta$  plegada, al menos una hélice  $\alpha$  y/o al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en un puente salino, una cremallera de leucina y un dedo de cinc. La porción de cabeza globular puede incluir además al menos aproximadamente 1 enlace disulfuro, al menos aproximadamente 2 enlaces disulfuro, al menos 3 enlaces disulfuro, al menos aproximadamente 4 enlaces disulfuro, al menos aproximadamente 5 enlaces disulfuro y al menos aproximadamente 6 enlaces disulfuro.

El método de preparación de una proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto puede incluir además la etapa de sustituir una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un residuo aminoacídico hidrófobo en la porción de proteína por una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un residuo

- aminoacídico seleccionado del grupo consistente en un residuo aminoacídico hidrófilo, un residuo aminoacídico polar y un residuo aminoacídico neutro. El residuo aminoacídico hidrófobo sustituido puede incluir al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en un residuo de fenilalanina, un residuo de triptófano y un residuo de tirosina. El residuo aminoacídico polar que sustituye al aminoácido hidrófobo puede incluir al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en un residuo de ácido aspártico y un residuo de ácido glutámico.
- 5 La porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural puede ser una porción de una proteína de hemaglutinina vírica de origen natural de la gripe (p.ej., gripe A, B y C). La proteína de hemaglutinina vírica de gripe A puede ser al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en H1, H2, H3, H5, H7 y H9.
- 10 La célula hospedadora empleada en los métodos descritos en la presente memoria puede ser una célula hospedadora procariótica. La célula hospedadora procariótica puede ser al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en una célula hospedadora procariótica *E. coli*, una célula hospedadora procariótica *Pseudomonas*, una célula hospedadora procariótica *Bacillus*, una célula hospedadora procariótica *Salmonella* y una célula hospedadora procariótica *P. fluorescens*.
- 15 El método de preparación de una proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto puede incluir además la etapa de transformar la célula hospedadora procariótica con una secuencia de ácido nucleico chaperona. La secuencia de ácido nucleico chaperona puede ser al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en una chaperona groES-groEL, una chaperona dnaK-dnaJ-grpE, una chaperona groES-groEL-tig y una chaperona tig.
- 20 El método de preparación de una proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto puede incluir además la etapa de fusionar al menos una porción de un agonista de receptor de tipo Toll (TLR) con la proteína. La secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una porción de un agonista de receptor de tipo Toll puede ligarse operativamente con la secuencia de ácido nucleico que codifica la porción de proteína de hemaglutinina vírica. Puede haber un ligador (p.ej. ligador peptídico) entre el agonista de receptor de tipo Toll y la porción de hemaglutinina vírica.
- 25 Los receptores de tipo Toll hacen referencia a una familia de proteínas receptoras que son homólogas de la proteína Toll de *Drosophila melanogaster*. Los receptores de tipo Toll son proteínas receptoras de señalización transmembrana de tipo I caracterizadas por un dominio extracelular repetido rico en leucina y un dominio intracelular homólogo de un receptor de interleucina 1. Los receptores de tipo Toll incluyen TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR 8, TLR9, TLR10, TLR11 y TLR12.
- 30 "Agonista," como se usa en la presente memoria con referencia a un TLR, significa una molécula que activa una ruta de señalización de TLR. Una ruta de señalización de TLR es una ruta de transducción de señal intracelular empleada por un TLR particular que puede activarse por un ligando de TLR o agonista de TLR. Se emplean rutas intracelulares comunes por los TLR e incluyen, por ejemplo, NF- $\kappa$ B, cinasa N-terminal Jun y proteína cinasa activada por mitógeno. El agonista de receptor de tipo Toll puede incluir al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en un agonista de TLR1, un agonista de TLR2 (p.ej. Pam3Cys, Pam2Cys, lipoproteína bacteriana), un agonista de TLR3 (p.ej., ARNbc), un agonista de TLR4 (p.ej., lipopolisacárido bacteriano), un agonista de TLR5 (p.ej. una flagelina), un agonista de TLR6, un agonista de TLR7, un agonista de TLR8, un agonista de TLR9 (p.ej. motivos de ADN no metilados), un agonista de TLR10, un agonista de TLR11 y un agonista de TLR12.
- 35 Los agonistas de receptor de tipo Toll para uso en los métodos y composiciones de la invención pueden ser un componente agonista de receptor de tipo Toll que es al menos una porción de un agonista de receptor de tipo Toll, en el que el componente agonista de receptor de tipo Toll incluye al menos un residuo de cisteína en una posición en que no aparece una cisteína en el agonista de receptor de tipo Toll nativo, activando el componente agonista de receptor de tipo Toll un receptor de tipo Toll.
- 40 Los ligandos de TLR4 (p.ej. agonistas de TLR4) para uso en las composiciones y métodos de la invención pueden incluir al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID NO: 359-406 (véanse los documentos PCT/US 2006/002906/WO 2006/083706, PCT/US 2006/003285/WO 2006/083792, PCT/US 2006/041865y PCT/US 2006/042051). Los ligandos de TLR2 (p.ej., agonistas de TLR2) para uso en las composiciones y métodos de la invención pueden incluir también al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID NO: 455-494 (véanse los documentos PCT/US 2006/002906/WO 2006/083706, PCT/US 2006/003285/WO 2006/083792y PCT/US 2006/041865/WO 2006/042051).
- 45 El ligando de TLR2 (p.ej. agonista de TLR2) puede incluir también al menos una porción de al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en la proteína de modificación de flagelina FlmB de *Caulobacter crescentus*, la proteína del sistema de secreción de tipo III bacteriano, proteína invasiva de *Salmonella*, la proteína de biogénesis fimbrial de tipo 4 (PilX) de *Pseudomonas*, la proteína SciJ de *Salmonella*, la presunta proteína de membrana integral de *Streptomyces*, la proteína de membrana de *Pseudomonas*, la adhesina de *Bordetella pertusis*, la peptidasa B de *Vibrio cholerae*, la proteína sensora de virulencia de *Bordetella*, la presunta proteína de membrana integral de *Neisseria meningitidis*, la fusión de las proteínas de biosíntesis flagelar FliR y FliH de *Clostridium*, la proteína de membrana externa (porina) de *Acinetobacter*, la proteína de biosíntesis flagelar FliH de *Helicobacter*, la proteína
- 55

relacionada con ompA de *Xanthomonas*, la porina omp2a de *Brucella*, la presunta proteína porina/de ensamblaje fimbrial (LHR) de *Salmonella*, la wbdK de *Salmonella*, la glucosiltransferasa implicada en la biosíntesis de LPS y la presunta permeasa de *Salmonella*.

5 El ligando de TLR2 (p.ej., agonista de TLR) puede incluir al menos una porción de al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en lipoproteína/lipopéptidos (una variedad de patógenos), peptidoglicano (bacterias grampositivas), ácido lipoteicoico (bacterias grampositivas), lipoarabinomanano (micobacterias), una modulina soluble en fenol (*Staphylococcus epidermidis*), glucoinositolfosfolípidos (*Trypanosoma cruzi*), glucolípidos (*Treponema maltophilum*), porinas (*Neisseria*), zimosano (hongos) y LPS atípicos (*Leptospira interrogans* y *Porphyromonas gingivalis*).

10 El ligando de TLR2 (p.ej., agonista de TLR2) puede incluir también al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID NOS: 495-497 (véanse los documentos PCT/US 2006/002906/WO 2006/083706, PCT/US 2006/003285/WO 2006/083792, PCT/US 2006/041865 y PCT/US 2006/042051).

KGGVGPVRRSSRLRRTTQPG (SEQ ID NO: 495)

GRRGLCRGCRTRGRIKQLQSAHK (SEQ ID NO: 496)

15 RWGYHLRDRKYKGVRSKGVPR (SEQ ID NO: 497)

El agonista de TLR2 puede incluir al menos una porción de una lipoproteína bacteriana (BLP).

El agonista de TLR2 puede ser una lipoproteína bacteriana tal como Pam2Cys (S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína), Pam3Cys ([palmitoil]-Cys((RS)-2,3-di(palmitoiloxi)propil]cisteína) o lipoproteína OprI de *Pseudomonas aeruginosa* (OprI). Las lipoproteínas OprI ejemplares incluyen la SEQ ID NO: 782, codificada por la SEQ ID NO: 783. Es una lipoproteína bacteriana ejemplar de *E. coli* para uso en la invención descrita en la presente memoria la SEQ ID NO: 784, codificada por la SEQ ID NO: 785. Es una lipoproteína bacteriana que activa una ruta de señalización de TLR2 (un agonista de TLR2) una proteína bacteriana que incluye un ácido palmitoleico (Omueti, K.O., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 280: 36616-36625 (2005)). Por ejemplo, la expresión de las SEQ ID NO: 783 y 785 en sistemas de expresión bacterianos (p.ej., *E. coli*) da como resultado la adición de un resto de ácido palmitoleico a un residuo de cisteína de la proteína resultante (p.ej., SEQ ID NO: 782 y 784), generando así un agonista de TLR2 para uso en las composiciones, proteínas de fusión y polipéptidos de la invención. La producción de lipoproteínas tripalmitoiladas (a las que se hace referencia también como triacil-lipoproteínas) en bacterias ocurre mediante la adición de un grupo diacilglicerol al grupo sulfhidrilo de una cisteína (p.ej., la cisteína 21 de la SEQ ID NO: 784) seguida de la escisión de la secuencia señal y la adición de una tercera cadena de acilo al grupo N-terminal libre de la misma cisteína (p.ej., la cisteína 21 de la SEQ ID NO: 784) (Sankaran, K., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269: 19706 (1994)), generando un péptido tripalmitilado (un agonista de TLR2) como se muestra, por ejemplo, en la Figura 45.

El agonista de receptor de tipo Toll de las composiciones de la invención puede incluir además al menos un residuo de cisteína en el aminoácido terminal del extremo amino y/o el aminoácido terminal del extremo carboxilo del agonista de receptor de tipo Toll. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 359 puede incluir además al menos un residuo de cisteína en un enlace peptídico con el residuo de glicina aminoterminal y/o al menos un residuo de cisteína en un enlace peptídico con el residuo de glicina carboxiterminal; La SEQ ID NO: 360 puede incluir además al menos un residuo de cisteína en un enlace peptídico con el residuo de lisina aminoterminal y/o al menos un residuo de cisteína en un enlace peptídico con el residuo de glicina carboxiterminal; la SEQ ID NO: 361 puede incluir además al menos un residuo de cisteína en un enlace peptídico con el residuo de ácido glutámico aminoterminal y/o al menos un residuo de cisteína en un enlace peptídico con el residuo de prolina carboxiterminal.

Los agonistas de TLR5 para uso en los métodos de la invención pueden incluir al menos una porción de una flagelina. Las flagelinas son patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) que activan el TLR5.

La flagelina en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria puede ser al menos una porción de una flagelina de *S. typhimurium* (número de acceso a Genbank AF045151), al menos una porción de flagelina de *S. typhimurium* seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 498, SEQ ID NO: 812, SEQ ID NO: 816 y SEQ ID NO: 500; al menos una porción de una flagelina de *S. muenchen* (número de acceso a Genbank AB028476) que incluye al menos una porción de SEQ ID NO: 504 y SEQ ID NO: 813; al menos una porción de flagelina de *P. aeruginosa* que incluye al menos una porción de la SEQ ID NO: 815; al menos una porción de flagelina de *Listeria monocytogenes* que incluye al menos una porción de la SEQ ID NO: 820; al menos una porción de una flagelina de *E. coli* que incluye al menos una porción de la SEQ ID NO: 502 y la SEQ ID NO: 814; al menos una porción de flagelina de *Yersinia* y al menos al menos una porción de flagelina de *Campylobacter*.

La flagelina empleada en las composiciones de la invención puede incluir también los polipéptidos de SEQ ID NO: 498, SEQ ID NO: 500, SEQ ID NO: 504 y SEQ ID NO: 502; al menos una porción de la SEQ ID NO: 498, al menos una porción de la SEQ ID NO: 500, al menos una porción de la SEQ ID NO: 504 y al menos una porción de la SEQ ID NO: 502; y un polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 499, la SEQ ID NO: 501, la SEQ ID NO: 505 y la SEQ ID NO: 503; o al menos una porción de un polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 499, la SEQ ID NO: 501, la SEQ ID NO: 505 y la SEQ ID NO: 503.

- La flagelina empleada en las composiciones y el método de la invención puede carecer de al menos una porción de la región de bisagra. Las regiones de bisagra son las regiones hipervariables de una flagelina. Se hace también referencia en la presente memoria a las regiones de bisagra de una flagelina como "dominio o región D3", "dominio o región helicoidal", "dominio o región hipervariable" y "dominio o región variable". "Falta" de una región de bisagra de una flagelina significa que al menos un aminoácido, o al menos un codón de ácido nucleico que codifica al menos un aminoácido que comprende la región de bisagra de una flagelina, está ausente en la flagelina. Los ejemplos de regiones de bisagra incluyen los aminoácidos 176-415 de la SEQ ID NO: 498, que están codificados por los ácidos nucleicos 528-1245 de la SEQ ID NO: 499; los aminoácidos 174-422 de la SEQ ID NO: 502, que están codificados por los ácidos nucleicos 522-1266 de la SEQ ID NO: 503; o los aminoácidos 173-464 de la SEQ ID NO: 504, que están codificados por los ácidos nucleicos 519-1392 de la SEQ ID NO: 505. Por tanto, si los aminoácidos 176-415 estuvieran ausentes de la flagelina de SEQ ID NO: 498, la flagelina carecería de una región de bisagra. Se hace referencia también en la presente memoria a una flagelina que carece de al menos una porción de una región de bisagra como una "versión truncada" de una flagelina.
- "Al menos una porción de una región de bisagra", como se usa en la presente memoria, hace referencia a cualquier parte de la región de bisagra de la flagelina, o a la totalidad de la región de bisagra. Se hace referencia también en la presente memoria a "al menos una porción de una región de bisagra" como "un fragmento de una región de bisagra". Al menos una porción de la región de bisagra de fljB/STF2 puede ser, por ejemplo, los aminoácidos 200-300 de SEQ ID NO: 498. Por tanto, si los aminoácidos 200-300 estuvieran ausentes de la SEQ ID NO: 498, la secuencia aminoacídica resultante de STF2 carecería de al menos una porción de una región de bisagra.
- Como alternativa, al menos una porción de una flagelina de origen natural puede reemplazarse por al menos una porción de una región de bisagra artificial. "De origen natural", con referencia a la secuencia aminoacídica de flagelina, significa la secuencia aminoacídica presente en la flagelina nativa (p.ej. flagelina de *S. typhimurium*, flagelina de *S. muenchin*, flagelina de *E. coli*). La región de bisagra de origen natural es la región de bisagra que está presente en la flagelina nativa. Por ejemplo, los aminoácidos 176-415 de la SEQ ID NO: 498, los aminoácidos 174-422 de la SEQ ID NO: 502 y los aminoácidos 173-464 de la SEQ ID NO: 504, son los aminoácidos correspondientes a la región de bisagra natural de las flagelinas STF2, fljC de *E. coli* y fljC de *S. muenchen*, respectivamente. "Artificial," como se usa en la presente memoria con referencia a una región de bisagra de una flagelina, significa una región de bisagra que se inserta en la flagelina nativa en cualquier región de la flagelina que contenga o contuviera la región de bisagra nativa.
- La región de bisagra de una flagelina se elimina y reemplaza por un antígeno (p.ej., HA1-1, HA1-2, el sitio de escisión madurativa) y se fusiona el constructo resultante con otro antígeno (p.ej., 4xM2e).
- Puede emplearse una región de bisagra artificial en una flagelina que carece de al menos una porción de una región de bisagra, lo que puede facilitar la interacción del extremo carboxilo y amino de la flagelina para unión a TLR5 y, por tanto, la activación de la ruta de transducción de señal innata de TLR5. Una flagelina que carece de al menos una porción de una región de bisagra se designa por el nombre de la flagelina seguido de "Δ." Por ejemplo, una STF2 (p.ej., de SEQ ID NO: 498), que carece de al menos una porción de una región de bisagra se refiere como "STF2Δ" o "fljB/ STF2Δ" (p.ej., de SEQ ID NO: 500).
- La flagelina para uso en los métodos y composiciones de la invención puede ser al menos una porción de una flagelina, en la que el componente de flagelina incluye al menos un residuo de cisteína y activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5; un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en la que al menos una lisina del componente de flagelina se ha sustituido por al menos una arginina, activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5; un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en la que al menos una lisina del componente de flagelina se ha sustituido por al menos un residuo de serina, activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5; un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en la que al menos una lisina del componente de flagelina se ha sustituido por al menos un residuo de histidina, activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5, como se describe en la presente memoria.
- Una proteína de fusión recombinante puede generarse ligando operativamente un agonista de TLR con la porción de proteína (p.ej., HA1-1, HA1-2).
- "Proteína de fusión", como se usa en la presente memoria, hace referencia a una proteína generada a partir de al menos dos componentes similares o distintos (p.ej. una porción de proteína de HA y un agonista de TLR). Las proteínas de fusión pueden generarse recombinantemente o por conjugación química.
- En una realización, las proteínas de fusión de porciones de proteína de HA y agonistas de TLR (p.ej., SEQ ID NO: 89-92, 95, 151-160, 177, 209, 210 y 211) pueden mezclarse o coadministrarse con proteínas de fusión de agonistas de TLR y proteínas M2e (p.ej., SEQ ID NO: 528, 587, 589 y 591) y administrarse a un sujeto para estimular una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria protectora.

Las proteínas de fusión de la invención pueden designarse por los componentes de las proteínas de fusión separados por un "." Por ejemplo, "STF2.HA1-2" hace referencia a una proteína de fusión que comprende una

proteína STF2 y una proteína HA1-2 y "STF2Δ.HA1-2" hace referencia a una proteína de fusión que comprende una proteína STF2 sin la región de bisagra y HA1-2. Las proteínas de fusión ejemplares de la invención incluyen las SEQ ID NO: 89-92, 95, 151-160, 177, 209, 210 y 211.

5 Las proteínas de fusión pueden incluir, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más agonistas de receptor de tipo Toll (p.ej. flagelina) y 2, 3, 4, 5, 6 o más antígenos (p.ej., porciones de proteína tales como HA1-1, HA1-2). Cuando dos o más agonistas de TLR y/o dos o más porciones de proteína comprenden proteínas de fusión de la invención, se hace referencia también a ellos como "multímeros". Por ejemplo, un multímero de HA1-1 puede ser cuatro secuencias de HA1-1, a lo que se hace referencia en esta memoria como 4xHA1-1. Igualmente, "2xHA1-1" es un multímero de dos secuencias de HA1-1. (Véanse, por ejemplo, las SEQ ID NO: 342-346 y 348).

10 Las proteínas de fusión de la invención pueden incluir además un ligador entre al menos un componente de la proteína de fusión (p.ej. agonista de TLR) y al menos el otro componente de la proteína de fusión (p.ej., HA1-1, HA1-2) de la composición, un ligador entre al menos dos componentes similares de la proteína de fusión (p.ej., HA1-1, HA1-2) o cualquier combinación de los mismos. "Ligador", como se usa en la presente memoria con referencia a una proteína de fusión de la invención, hace referencia a un conector entre componentes de la proteína de fusión de manera que los componentes de la proteína de fusión no se unan directamente. Por ejemplo, una parte de la proteína de fusión (p.ej. flagelina) puede ligarse a una parte distinta (p.ej. una porción de proteína, HA1-1, HA1-2, un antígeno) de la proteína de fusión. Igualmente, pueden ligarse al menos dos o más componentes similares o parecidos de la proteína de fusión (p.ej. dos flagelinas pueden incluir además un ligador entre cada flagelina, o dos proteínas HA pueden incluir además un ligador entre cada proteína HA).

20 Adicionalmente, o como alternativa, las proteínas de fusión de la invención pueden incluir una combinación de un ligador entre componentes distintos de la proteína de fusión y componentes similares o parecidos de la proteína de fusión. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender al menos dos agonistas de TLR que incluyen además un ligador entre, por ejemplo, dos o más flagelinas; al menos dos porciones de proteína de HA que incluyen además un ligador entre ellas; un ligador entre un componente de la proteína de fusión (p.ej. flagelina) y otro componente distinto de la proteína de fusión (p.ej. porciones de proteína o HA) o cualquier combinación de los mismos.

25 El ligador puede ser un ligador aminoacídico. El ligador aminoacídico puede incluir residuos aminoacídicos de origen sintético o natural. El ligador aminoacídico empleado en las proteínas de fusión de la invención puede incluir al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en un residuo de lisina, un residuo de ácido glutámico, un residuo de serina y un residuo de arginina. El ligador aminoacídico puede incluir, por ejemplo, las SEQ ID NO: 521, 523, 524 y 526, codificadas por las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 520, 522, 525 y 527, respectivamente.

30 El agonista de receptor de tipo Toll de las proteínas de fusión de la invención puede fusionarse con el extremo carboxilo, el extremo amino o tanto el extremo carboxilo como amino de la porción de proteína de HA (p.ej., HA1-1, HA1-2 u otros agentes, tales como el ectodominio de la proteína de matriz 2, un sitio de escisión madurativa).

35 Las proteínas de fusión pueden generarse fusionando porciones de proteína de HA (u otros antígenos, tales como el sitio de escisión madurativa de HA) con al menos una de las cuatro regiones (regiones 1, 2, 3 y 4) de la flagelina, que se han identificado basándose en la estructura cristalina de la flagelina (PDB: 1 UCU) (véase la Figura 46).

40 La región 1 es TIAL (SEQ ID NO: 823)...-...GLG (95-111 de SEQ ID NO: 841). Los correspondientes residuos del constructo fljB de *Salmonella typhimurium* son TTLD (SEQ ID NO: 824)...-...GTN (196-216 de SEQ ID NO: 841). Esta región es un segmento peptídico extendido en un surco de dos hebras β (GTDQKID (SEQ ID NO: 825) y NGEVTL (SEQ ID NO: 826) de (SEQ ID NO: 841). La sustitución de este péptido por un antígeno (p.ej., sitio de escisión madurativa de HA) puede imitar la conformación del péptido de sitio de escisión madurativa de tipo silvestre en HAO. Los aminoácidos ejemplares que pueden sustituirse incluyen: residuos de flagelina SGLDDAAIKAAT (SEQ ID NO: 827) (201-212 de la SEQ ID NO: 841) sustituidos por los residuos del sitio de escisión madurativa: RGIFGAIAGFIE (SEQ ID NO: 828), que corresponden al subtipo A/H3N2, o RGLFGAIAGFIE (SEQ ID NO: 803), que corresponden a los residuos del sitio de escisión madurativa de los subtipos A/H2N1, A/H1N1, A/H5N1, o por RGFFGAIAGFLE (SEQ ID NO: 805), que corresponden a los residuos del sitio de escisión madurativa de HA de gripe B.

50 La región 2 de la flagelina de *Salmonella* es un pequeño bucle de GTG (238-240 de SEQ ID NO: 841) en 1 estructura UCU (véase la Figura 48). El correspondiente bucle en fljB de *Salmonella* es GADAA (SEQ ID NO: 829) (244-248 de la SEQ ID NO: 841). La inserción de un antígeno (p.ej. porciones de proteína de HA, un péptido del sitio de escisión madurativa) en este bucle o el reemplazo del bucle entero por un antígeno (p.ej. porciones de proteína de HA, un péptido del sitio de escisión madurativa) debería conservar la estructura de bucle extendido del péptido del sitio de escisión madurativa que está asociada a la molécula de HA nativa.

55 La región 3 es un bucle mayor que reside en el lado opuesto del péptido de la región 1 (véase la Figura 48). Este bucle puede sustituirse simultáneamente junto con la región 1, creando una doble copia del antígeno (p.ej. porciones de proteína de HA, un péptido del sitio de escisión madurativa). El bucle empieza en AGGA (SEQ ID NO: 830) y acaba en PATA (SEQ ID NO: 831) (259-274 de la SEQ ID NO: 841). La correspondiente secuencia de fljB de *Salmonella* es AAGA (SEQ ID NO: 832)...-...ATTK (SEQ ID NO: 833) (266-281 de la SEQ ID NO: 841). La secuencia

## ES 2 534 332 T3

AGATKTTMPAGA (SEQ ID NO: 834) (267-278 de la SEQ ID NO: 841) puede reemplazarse por los antígenos (p.ej. porciones de proteína de HA, péptidos de un sitio de escisión madurativa).

5 La región 4 es el bucle (VTGTG (SEQ ID NO: 835)) que conecta una hélice  $\alpha$  corta (TEAKAALTAA (SEQ ID NO: 836)) y una hebra  $\beta$  (ASVVKMSYTDN (SEQ ID NO: 837) en 1 estructura UCU (véase la Figura 48). El correspondiente bucle en fljB de *Salmonella* es un bucle más largo VDATDANGA (SEQ ID NO: 838 (307-315 de la SEQ ID NO: 841). Puede insertarse un antígeno (p.ej., una porción de proteína de HA, un péptido del sitio de escisión madurativa) en esta región o reemplazarla.

10 Pueden insertarse o usarse para reemplazar los péptidos enumerados en las cuatro regiones anteriores una o más copias de antígenos (p.ej. sitio de escisión madurativa). Preferiblemente, los reemplazos estarían en la región 1 y región 3.

Las secuencias ejemplares de péptidos del sitio de escisión madurativa de HA incluyen las SEQ ID NO: 800-804.

Alineamiento de secuencia del modelo de rayos X (1 UCU) y la SEQ ID NO: 841. 75,1 % de identidad en una superposición de 506 residuos; puntuación: 1703,0; frecuencia de hueco: 2,6 %



1UCU 1

AQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTANI

KGL

Sfla 2

AQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTANI

KGL

\*\*\*\*\*

\*\*

1UCU 61

TQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQAEIT

QRLN

Sfla 62

TQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQAEIT

QRLN

\*\*\*\*\*

\*\*

1UCU 121

EIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLDNLNVQQ

KYKV

Sfla 122

EIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLDSLNVQK

AYDV

\*\*\*\*\*

\*\*

1UCU 181 SDTAATVTGYAD--TTI---

ALDNSTFKASATGLGGTDQKIDGDLKFDDTTGKYYAKVTV

Sfla 182

KDTAVTTKAYANNGTTLDVSGLDAAIKAATGGTNGTASVTGGAVKFDADNNK

YFVTIGG

\*\*\* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

1UCU 236 TGGT—  
 KG D G Y Y E V S V D K T N G E V T L A G G A T S P L T G G L P A T A T E D V K N V Q V A N A D L T E A K A  
 Sfla 242 FTGADAAKNGDYEVNV-  
 A T D G T V T L A A G A T K T T M P A G A T T K T E V Q E L K D T P A V V S A D A K N

\* \*

1UCU 294 ALTAAGVTGT----ASVVKMSYTDNNGKTIDGGLAVKVGDDYYSATQNK-  
 D G S I S I N T T K  
 Sfla 301  
 A L I A G G V D A T D A N G A E L V K M S Y T D K N G K T I E G G Y A L K A G D K Y Y A A D Y D E A T G A I  
 K A K T T S

\* \*

1UCU 349  
 Y T A D D G T S K T A L N K L G G A D G K T E V S I G G K T Y A A S K A E G H N F K A Q P D L A E A A A T  
 T T E N P L  
 Sfla 361  
 Y T A A D G T T K T A A N Q L G G V D G K T E V V T I D G K T Y N A S K A A G H D F K A Q P E L A E A A A  
 K T T E N P L

\* \*

1UCU 409  
 Q K I D A A L A Q V D T L R S D L G A V Q N R F N S A I T N L G N T V N N L T S V R S R I E D S D Y A T E V S  
 N M S R A  
 Sfla 421  
 Q K I D A A L A Q V D A L R S D L G A V Q N R F N S A I T N L G N T V N N L S E A R S R I E D S D Y A T E V S  
 N M S R A

\* \*

\* \*

1UCU 469 QILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO: 840)  
 Sfla 481 QILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO: 841)

\* \*

Los métodos de preparación de una proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto pueden incluir además la etapa de ligar operativamente una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora con la secuencia de ácido nucleico que codifica una porción de la hemaglutinina vírica.

- 5 "Portador", como se usa en la presente memoria, hace referencia a una molécula (p.ej., proteína, péptido) que puede potenciar la estimulación de una respuesta inmunitaria protectora. Los portadores pueden estar físicamente unidos (p.ej. ligados por tecnología recombinante, síntesis peptídica, conjugación química o reacción química) a una composición (p.ej. una porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural) o mezclados con la composición.
- 10 Los portadores para uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden incluir, por ejemplo, al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en toxoide del tétanos (TT), toxoide de *Vibrio cholera*, toxoide de la difteria (DT), un mutante reactivo cruzado (CRM) del toxoide de la difteria, enterotoxina de *E. coli*, la subunidad B de enterotoxina termolábil (LTB) de *E. coli*, la proteína de cubierta del virus del mosaico del tabaco (TMV), la proteína de envoltura del virus de la rabia (RV) (glucoproteína), tiroglobulina (Thy), la proteína de choque térmico HSP de 60 kDa, hemocianina de lapa bocallave (KLH), el antígeno de tuberculosis secretado

tempranamente 6 (ESAT-6), exotoxina A, coleragenoide, antígeno nuclear de hepatitis B y el complejo de proteína de membrana externa de *N. meningitidis* (OMPC) (véanse, por ejemplo, Schneerson, R., *et al.*, Prog. Clin. Biol. Res. 47: 77-94 (1980); Schneerson, R., *et al.*, J. Exp. Med. 152: 361-76 (1980); Chu, C., *et al.*, Infect. Immun. 40: 245-56 (1983); Anderson, P., Infect. Immun. 39: 233-238 (1983); Anderson, P., *et al.*, J. Clin. Invest. 76: 52-59 (1985); Fenwick, B.W., *et al.*, 54: 583-586 (1986); Que, J.U., *et al.* Infect. Immun. 56: 2645-9 (1988); Que, J.U., *et al.* Infect. Immun. 56: 2645-9 (1988); (Que, J.U., *et al.* Infect. Immun. 56: 2645-9 (1988); Murray, K., *et al.*, Biol. Chem. 380: 277-283 (1999); Fingerut, E., *et al.*, Vet. Immunol. Immunopathol. 112: 253-263 (2006) y Granoff, D.M., *et al.*, Vaccine 11: supl 1: S46-51 (1993)).

Las proteínas portadoras ejemplares para uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden incluir al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID NO: 788-795:

Las composiciones de la invención pueden incluir además al menos un coadyuvante. Los coadyuvantes contienen agentes que pueden potenciar la respuesta inmunitaria contra sustancias que son poco inmunogénicas por sí mismas (véase, por ejemplo, "Immunology Methods Manual", vol. 2, I. Lefkovits, ed., Academic Press, San Diego, CA, 1997, cap. 13). "Immunology Methods Manual" está disponible como un conjunto de 4 volúmenes (código de producto Z37, 435-0), en CD-ROM, (código de producto Z37, 436-9) o ambos (código de producto Z37,437-7). Los coadyuvantes pueden ser, por ejemplo, mezclas de compuestos naturales o sintéticos que, cuando se administran con composiciones de la invención, tales como proteínas que estimulan una respuesta inmunitaria protectora preparadas mediante los métodos descritos en la presente memoria, potencian además la respuesta inmunitaria ante la proteína. Las composiciones que incluyen además coadyuvantes pueden aumentar además la respuesta inmunitaria protectora estimulada por composiciones de la invención, por ejemplo, estimulando una respuesta celular y/o humoral (concretamente, protección de la enfermedad frente a la producción de anticuerpo). Los coadyuvantes pueden actuar potenciando la captación y localización de proteína, la extensión o prolongación de la liberación de proteína, la activación de macrófagos y la estimulación de linfocitos T y B. Los coadyuvantes para uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden ser sales minerales, emulsiones en aceite, productos micobacterianos, saponinas, productos sintéticos y citocinas. Los coadyuvantes pueden estar físicamente unidos (p.ej., ligados por tecnología recombinante, por síntesis peptídica o reacción química) a una composición descrita en la presente memoria o mezclados con las composiciones descritas en la presente memoria.

En otra realización, la invención es un método de preparación de una proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto, que comprende las etapas de separar una porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural formando así una porción de proteína, en el que la porción de proteína incluye al menos una porción de una cabeza globular y al menos una porción de al menos una estructura secundaria que causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria, y en el que la porción de proteína carece de un dominio de fusión con membrana, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático; transfectar una secuencia de ácido nucleico que codifica la porción de proteína a una célula hospedadora eucariótica, en la que la célula hospedadora eucariótica no es una célula hospedadora eucariótica de *Pichia pastoris* y cultivar la célula hospedadora eucariótica, preparando así la proteína. En una realización, la porción de proteína puede carecer además de una secuencia señal. En otra realización, la porción de proteína puede incluir además un sitio de unión a ácido siálico.

En una realización adicional, la invención es un método de preparación de una proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto, que comprende las etapas de separar una porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural formando así una porción de proteína, en el que la porción de proteína incluye al menos una porción de una cabeza globular y al menos una porción de al menos una estructura secundaria que causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria, y en el que la porción de proteína carece de un dominio de fusión con membrana, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático; transfectar una secuencia de ácido nucleico que codifica la porción de proteína a una célula hospedadora eucariótica, en el que la célula hospedadora eucariótica no es una célula hospedadora eucariótica de insecto y cultivar la célula hospedadora eucariótica para preparar así la proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto.

En una realización adicional, la invención es un método de preparación de una proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto, que comprende las etapas de separar una porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural formando así una porción de proteína, en el que la porción de proteína incluye al menos una porción de una cabeza globular y al menos una porción de al menos una estructura secundaria que causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria, y en el que la porción de proteína carece de un dominio de fusión a membrana, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático; transfectar una secuencia de ácido nucleico que codifica la porción de proteína a una célula hospedadora eucariótica, en el que la célula hospedadora eucariótica no es una célula de insecto transformada establemente y cultivar la célula hospedadora eucariótica para preparar así la proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto.

En otra realización, la invención es un método de preparación de una proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto, que comprende las etapas de separar una porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural preparando así una porción de proteína, en el que la porción de proteína

incluye al menos una porción de una cabeza globular y al menos una porción de al menos una estructura secundaria que causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria, y en el que la porción de proteína carece de un dominio de fusión con membrana, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático; infectar una secuencia de ácido nucleico que codifica la porción de proteína en una célula hospedadora de insecto (p.ej., una célula hospedadora de insecto con baculovirus tal como células Sf9 o High5) y cultivar la célula hospedadora de insecto preparando así la proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto.

Los métodos de preparación de una proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto pueden incluir además la etapa de eliminar al menos un sitio de glucosilación en la secuencia de ácido nucleico que codifica la porción de proteína. El sitio de glucosilación que se elimina puede incluir un sitio de N-glucosilación.

Las células hospedadoras eucarióticas empleadas en los métodos de la invención pueden incluir una célula hospedadora eucariótica de *Saccharomyces*, una célula hospedadora eucariótica de insecto (p.ej., al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en una célula de insecto infectada con *Baculovirus*, tal como células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) o *Trichoplusia ni* (High5) y una célula de insecto de *Drosophila* tal como células Dme12), una célula hospedadora eucariótica fúngica, una célula hospedadora eucariótica parásita (p.ej., una célula hospedadora eucariótica de *Leishmania tarentolae*), células CHO, células de levadura (p.ej. *Pichia*) y una célula hospedadora de *Kluyveromyces lactis*.

Las células hospedadoras eucarióticas adecuadas pueden incluir también células vegetales (p.ej. tomate, cloroplasto, células de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*, patata tal como *Solanum tuberosum*, zanahoria tal como *Daucus carota L.* y tabaco tal como *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana* (Gils, M., et al., *Plant Biotechnol. J.* 3: 613-20 (2005); He, D.M., et al., "Colloids Surf B Biointerfaces", (2006); Huang, Z., et al., *Vaccine* 19: 2163-71 (2001); Khandelwal, A., et al., *Virology*. 308: 207-15 (2003); Marquet-Blouin, E., et al., *Plant Mol. Biol.* 51: 459-69 (2003); Sudarshana, M.R., et al. *Plant Biotechnol. J.* 4: 551-9 (2006); Varsani, A., et al., *Virus Res.*, 120: 91-6 (2006); Kamarajugadda S., et al., *Expert Rev. Vaccines* 5: 839-49 (2006); Koya V, et al., *Infect. Immun.* 73: 8266-74 (2005); Zhang, X., et al., *Plant Biotechnol. J.* 4: 419-32 (2006)).

Las proteínas preparadas mediante los métodos de la invención y las composiciones de la invención pueden purificarse y caracterizarse empleando métodos bien conocidos (p.ej., cromatografía en gel, cromatografía de intercambio catiónico, PAGE-SDS) como se describe en la presente memoria.

Para la producción a gran escala, pueden emplearse técnicas de fermentación como se describen en la presente memoria. Las técnicas de fermentación ejemplares adicionales pueden incluir un ciclo propuesto que puede empezar con un cultivo inoculado en 6 l de medio MRBR, como se describe en la presente memoria, mantenido a aproximadamente 30 °C aproximadamente a pH 7 y controlado por DO a más de aproximadamente un 30 %. Puede iniciarse entonces una alimentación de 6 l al menos aproximadamente 30 minutos después del agotamiento de la glucosa. El medio de alimentación de 6 l propuesto, cuando se combina con 6 l de medio MRBR, puede proporcionar las condiciones necesarias para el crecimiento de *E. coli* basado en la utilización de aproximadamente un 52 % del carbono para crecimiento. La alimentación puede incluir o no IPTG. El lote puede inducirse con IPTG al menos 2 mM, introducido como un bolo poco después de comenzar la alimentación para iniciar la producción. La velocidad de alimentación puede comenzar a aproximadamente 20 ml de alimentación por hora por litro de volumen de biorreactor y aumentar con el tiempo basándose en la capacidad del cultivo de aceptar más glucosa sin acumulación de glucosa. El cultivo puede recolectarse cuando la alimentación se completa. El medio de alimentación de 6 l, aproximadamente a pH 6,0, puede incluir glucosa 180 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O) 4 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 g/l, DL-alanina 40 g/l, ácido cítrico 4 g/l, MgSO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O) 5,5 g/l, trazas metálicas 6 ml, CaCl<sub>2</sub> 2,5 g/l, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1 g/l.

La disgregación y clarificación celular en una producción a gran escala pueden incluir la retirada de Triton X-100 del tampón de resuspensión, la disolución de los productos insolubles mediante la adición de Tris 50 mM, NaCl 25 mM, urea 8 M, aproximadamente a pH 8 al lisado, la adición de PEI (polietilamina) y la posterior retirada mediante centrifugación con uno o más de los tampones para retirar los ácidos nucleicos y/o ayudar a la filtración, la adición de floculantes tales como Aerosil 380, Aerosil 200, Alkoxide Alu C y Celpur y la posterior retirada por centrifugación para ayudar a la filtración. La cromatografía de intercambio catiónico puede incluir el uso de una resina de proceso, añadiendo una etapa de retirada de endotoxina desnaturalizante que contiene urea hasta 8 M y Triton X-100 hasta aproximadamente 2 %, y una elución en gradiente por etapas. El gradiente de elución por etapas puede incluir NaCl de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 mM..

En aún otra realización, la invención es un método de estimulación de la inmunidad protectora en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto de una composición que incluye una proteína preparada mediante un método que comprende las etapas de separar una porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural formando así una porción de proteína, en el que la porción de proteína incluye al menos una porción de una cabeza globular y al menos una porción de al menos una estructura secundaria que causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria, y en el que la porción de proteína carece de un dominio de fusión con membrana, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático; transformar una secuencia de ácido nucleico

que codifica la porción en una célula hospedadora procariótica y cultivar la célula hospedadora procariótica preparando así la proteína que estimula inmunidad protectora en un sujeto.

5 En todavía otra realización, la invención es un método de estimulación de la inmunidad protectora en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye una porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural, en el que la porción de proteína incluye al menos una porción de una cabeza globular y al menos una porción de al menos una estructura secundaria que causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria, y en el que la porción de proteína carece de un dominio de fusión con membrana, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático.

10 En una realización adicional, la invención es un método de preparación de una proteína de hemaglutinina vírica que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto, que comprende las etapas de separar una porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural preparando así una porción de proteína, en el que la porción de proteína incluye al menos una porción de una cabeza globular y al menos una porción de al menos una estructura secundaria que causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria, y en el que la porción de proteína carece de un dominio de fusión con membrana, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático; transfectar una secuencia de ácido nucleico que codifica la porción a una célula hospedadora eucariótica, en el que la célula hospedadora eucariótica no es una célula hospedadora eucariótica de *Pichia pastoris* y cultivar la célula hospedadora eucariótica preparando así la proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto.

20 En aún otra realización, la invención es un método de preparación de una proteína de hemaglutinina vírica que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto, que comprende las etapas de separar una porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural preparando así una porción de proteína, en el que la porción de proteína incluye al menos una porción de una cabeza globular y al menos una porción de al menos una estructura secundaria que causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria, y en el que la porción de proteína carece de un dominio de fusión con membrana, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático; transfectar una secuencia de ácido nucleico que codifica la porción a una célula hospedadora eucariótica, en el que la célula hospedadora eucariótica no es una célula hospedadora eucariótica de *Drosophila melanogaster* y cultivar la célula hospedadora eucariótica preparando así la proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto.

30 En todavía otra realización, la invención es un método de preparación de una proteína hemaglutinina vírica que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto, que comprende las etapas de transformar una célula hospedadora procariótica con una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una hemaglutinina vírica que carece de un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático y cultivar la célula procariótica preparando así la proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto.

35 Es una realización adicional de la invención un método de estimulación de la inmunidad protectora en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye una proteína preparada mediante un método que comprende las etapas de transformar una célula hospedadora procariótica con una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una hemaglutinina vírica que carece de un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático y cultivar la célula hospedadora procariótica preparando así la proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto.

40 En otra realización, la invención es un método de estimulación de la inmunidad protectora en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye una proteína que tiene al menos una hemaglutinina vírica que carece de un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático, en el que la proteína se expresó en una célula procariótica.

45 En todavía otra realización, la invención es una composición que comprende al menos una porción de al menos un patrón molecular asociado a patógeno y una porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural, en la que la porción de proteína de hemaglutinina vírica de origen natural incluye al menos una porción de una cabeza globular y al menos una porción de al menos una estructura secundaria que causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria, y en la que la porción de proteína de hemaglutinina vírica de origen natural carece de un dominio de fusión con membrana, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático.

50 Los patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP), tales como flagelina o lipoproteína bacteriana, hacen referencia a una clase de moléculas (p.ej. proteína, péptido, carbohidrato, lípido, lipopéptido, ácido nucleico) encontradas en microorganismos que, cuando se unen a un receptor de reconocimiento de patrón (PRR), pueden desencadenar una respuesta inmunitaria innata. El PRR puede ser un receptor de tipo Toll (TLR).

55 Los TLR son el tipo mejor caracterizado de receptor de reconocimiento de patrón (PRR) expresado en células presentadora de antígeno (APC). Las APC utilizan TLR para examinar el microentorno y detectar señales de infección patogénica involucrando los ligandos afines con TLR, los PAMP. La interacción de PAMP y TLR desencadena la respuesta inmunitaria innata, la primera línea de defensa contra ataques patogénicos, manifestada como una liberación de citocinas, quimiocinas y otros mediadores inflamatorios, el agrupamiento de células

fagocíticas e importantes mecanismos celulares que conducen a la expresión de moléculas coestimuladoras y un eficaz procesamiento de antígenos y presentación ante linfocitos T. Los TLR controlan tanto las respuestas inmunitarias innata como adaptativa.

5 La unión de PAMP a TLR activa las rutas inmunitarias innatas. Las células diana pueden dar como resultado la exhibición de moléculas coestimuladoras sobre la superficie celular, así como de péptido antigénico en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (véase la Figura 37). Las composiciones, proteínas de fusión o polipéptidos de la invención pueden incluir un PAMP (p.ej. una flagelina) que se une a un TLR (p.ej. TLR5), promoviendo la diferenciación y maduración de la APC, incluyendo la producción y exhibición de señales coestimuladoras (véase la Figura 37). Las composiciones pueden internalizarse por su interacción con el TLR y procesarse por la ruta lisosómica, generando péptidos antigénicos que se exhiben sobre la superficie en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad.

15 Las composiciones, proteínas de fusión y polipéptidos de la invención emplean patrones moleculares asociados a patógeno (agonistas de TLR) que desencadenan eventos celulares que dan como resultado la expresión de moléculas coestimuladoras, la secreción de citocinas y quimiocinas críticas y un eficaz procesamiento y presentación de antígenos ante linfocitos T. Como se discute anteriormente, los TLR reconocen PAMP incluyendo componentes de pared celular bacteriana (p.ej., lipoproteínas y lipopolisacáridos bacterianos), secuencias de ADN bacteriano que contienen residuos CpG no metilados y flagelina bacteriana. Los TLR actúan como iniciadores de la respuesta inmunitaria innata y controladores de la respuesta inmunitaria adaptativa (Medzhitov, R., *et al.*, *Cold Springs Harb. Symp. Quant. Biol.* 64: 429, (1999); Pasare, C., *et al.*, *Semin. Immunol.* 16: 23 (2004); Medzhitov, R., *et al.*, *Nature* 388: 394 (1997); Barton, G.M., *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.* 14: 380 (2002); Bendelac, A., *et al.*, *J. Exp. Med.* 195: F19 (2002)).

25 Como se discute anteriormente, la unión de PAMP a TLR activa las rutas inmunitarias para uso en las composiciones, proteínas de fusión y polipéptidos de la invención, que pueden emplearse en la estimulación del sistema inmunitario en un sujeto. Las composiciones, proteínas de fusión y polipéptidos de la invención pueden desencadenar una respuesta inmunitaria ante un antígeno (p.ej., una proteína vírica tal como de virus de la gripe) y desencadenar rutas de transducción de señal del sistema inmunitario innato y adaptativo del sujeto estimulando así el sistema inmunitario de un sujeto. La estimulación del sistema inmunitario del sujeto puede prevenir la infección por un antígeno o un virus (p.ej., un virus de la gripe) y tratar así el sujeto o prevenir en el sujeto la enfermedad, dolencia y, posiblemente, muerte.

30 En una realización adicional, la invención es una composición que comprende un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en la que el componente de flagelina incluye al menos un residuo de cisteína y activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.

"Componente de flagelina", como se usa en la presente memoria, significa al menos parte o una flagelina entera.

35 "Activa," cuando se hace referencia a un receptor de tipo Toll (TLR), significa que el componente (p.ej. un componente de flagelina o un componente agonista de receptor de tipo Toll) estimula una respuesta asociada a un TLR. Por ejemplo, la flagelina bacteriana activa TLR5 y las respuestas inflamatorias del hospedador (Smith, K.D., *et al.*, *Nature Immunology* 4: 1247-1253 (2003)). El lipopéptido bacteriano activa TLR1; Pam3Cys y Pam2Cys activan TLR2; ARNbc activa TLR3; LPS (proteína de unión a LPS) y LPS (lipopolisacárido) activan TLR4; las imidazoquinolinas (compuestos antivíricos y ARNmc) activan TLR7 y el ADN bacteriano (ADN con CpG) activa TLR9. TLR1 y TLR6 requieren heterodimerización con TLR2 para reconocer ligandos (p.ej., agonistas de TLR, antagonistas de TLR). TLR1/2 se activan por triacil-lipoproteínas (o un lipopéptido tal como Pam3Cys), mientras que TLR6/2 se activan por diacil-lipoproteínas (p.ej., Pam2Cys), aunque puede haber cierto reconocimiento cruzado. Además de los ligandos naturales, las moléculas pequeñas sintéticas incluyendo imidazoquinolinas, con subclases que son específicas de TLR7 o TLR8, pueden activar tanto TLR7 como TLR8. Hay también análogos sintéticos de LPS que activan TLR4, tales como monofosforil-lípido A [MPL].

50 La activación de TLR puede dar como resultado la señalización mediante MyD88 y NF- $\kappa$ B. Existen ciertas evidencias de que los diferentes TLR inducen diferentes resultados inmunitarios. Por ejemplo, Hirschfeld, *et al.*, *Infect. Immun.* 69: 1477-1482 (2001)) y Re, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276: 37692-37699 (2001) demostraron que TLR2 y TLR4 activan diferentes patrones de expresión génica en células dendríticas. Pulendran, *et al.*, *J. Immunol.* 167: 5067-5076 (2001)) demostró que estos patrones de expresión génica divergentes se resumían a nivel de proteína en una respuesta específica de antígeno cuando se usaban lipopolisacáridos que señalizan a través de TLR2 o TLR4 para guiar la respuesta (TLR4 favorecía una respuesta de tipo Th1 con abundante secreción de IFN $\gamma$ , mientras que TLR2 favorecía una respuesta de tipo Th2 con abundante IL-5, IL-10 y IL-13 y menores niveles de IFN $\gamma$ ). Existe redundancia en el resultado de la señalización a través de diferentes TLR.

55 La activación de TLR puede dar como resultado una actividad de células efectoras aumentada que puede detectarse, por ejemplo, midiendo las células CD8<sup>+</sup> secretoras de IFN $\gamma$  (p.ej., actividad linfocítica citotóxica) y respuestas de anticuerpo aumentadas que pueden detectarse, por ejemplo, por ELISA, neutralización vírica y citometría de flujo (Schnare, M., *et al.*, *Nat. Immunol.* 2: 947 (2001); Alexopoulou, L., *et al.*, *Nat. Med.* 8: 878 (2002);

Pasare, C., *et al.*, *Science* 299: 1033 (20031; Napolitani, G., *et al.*, *Nat. Immunol.* 6: 769 (2005) y Applequist, S.E., *et al.*, *J. Immunol.* 175: 3882 (2005)).

5 La composición que comprende un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en la que el componente de flagelina incluye al menos un residuo de cisteína y activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5, puede incluir además al menos una porción de al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en un agonista de receptor de tipo Toll 1, un agonista de receptor de tipo Toll 2 (p.ej., Pam3Cys, Pam2Cys), un agonista de receptor de tipo Toll 3, un agonista de receptor de tipo Toll 4, un agonista de receptor de tipo Toll 6, un agonista de receptor de tipo Toll 7, un agonista de receptor de tipo Toll 8, un agonista de receptor de tipo Toll 9, un agonista de receptor de tipo Toll 10, un agonista de receptor de tipo Toll 11 y un agonista de receptor de tipo Toll 12.

10 El agonista de receptor de tipo Toll 1, agonista de receptor de tipo Toll 2, agonista de receptor de tipo Toll 3, agonista de receptor de tipo Toll 4, agonista de receptor de tipo Toll 6, agonista de receptor de tipo Toll 7, agonista de receptor de tipo Toll 8, agonista de receptor de tipo Toll 9, agonista de receptor de tipo Toll 10, agonista de receptor de tipo Toll 11 y agonista de receptor de tipo Toll 12 empleados en las composiciones, tales como composiciones que comprenden un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en los que el componente de flagelina incluye al menos un residuo de cisteína y activando el componente de flagelina TLR5, pueden incluir además al menos un residuo de cisteína adicional.

15 En una realización, al menos un residuo de cisteína sustituye a al menos un residuo aminoacídico en una secuencia aminoacídica de flagelina de origen natural del componente de flagelina.

20 El residuo de cisteína que sustituye al al menos un residuo aminoacídico en una secuencia aminoacídica de flagelina de origen natural del componente de flagelina puede estar remoto de al menos un aminoácido del sitio de reconocimiento de receptor de tipo Toll 5 del componente de flagelina. "Sitio de reconocimiento de receptor de tipo Toll 5" significa aquella parte del ligando de TLR5 (p.ej., agonista de TLR5) que interacciona con TLR5 para mediar una respuesta celular. Se hace también referencia a "sitio de reconocimiento de receptor de tipo Toll 5" como "sitio de activación de receptor de tipo Toll 5" y "dominio de activación de receptor de tipo Toll 5".

25 Iguualmente, "sitio de reconocimiento de receptor de tipo Toll" significa aquella parte del ligando de receptor de tipo Toll (p.ej., un agonista de receptor de tipo Toll) que interacciona con su TLR respectivo para mediar una respuesta celular. Se hace también referencia a "sitio de reconocimiento de receptor de tipo Toll" como "sitio de activación de receptor de tipo Toll" y "dominio de activación de receptor de tipo Toll".

30 El residuo de cisteína que sustituye al al menos un residuo aminoacídico en una secuencia aminoacídica de flagelina de origen natural del componente de flagelina puede estar también remoto de al menos un aminoácido del componente de flagelina implicado en la unión al receptor de tipo Toll 5.

En otra realización, el componente de flagelina incluye al menos una porción de una secuencia aminoacídica de flagelina de origen natural en combinación con el residuo de cisteína.

35 El residuo de cisteína usado en combinación (al que se hace referencia también en la presente memoria como "cisteína añadida") con al menos una porción de una secuencia aminoacídica de flagelina de origen natural puede ser al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en el aminoácido aminoterminal del componente de flagelina o del componente agonista de receptor de tipo Toll y el aminoácido carboxiterminal del componente de flagelina o del componente agonista de receptor de tipo Toll. El residuo de cisteína usado en combinación con al menos una porción de una secuencia aminoacídica de flagelina de origen natural puede estar remoto de al menos un aminoácido del sitio de reconocimiento de receptor de tipo Toll 5 del componente de flagelina, o remoto de al menos un aminoácido del sitio de reconocimiento de receptor de tipo Toll del componente agonista de receptor de tipo Toll.

40 El residuo de cisteína usado en combinación con al menos una porción de una secuencia aminoacídica de flagelina de origen natural puede estar remoto de al menos un aminoácido del componente de flagelina implicado en la unión al receptor de tipo Toll 5 o remoto de al menos un aminoácido de un componente agonista de receptor de tipo Toll implicado en la unión a receptor de tipo Toll.

En otra realización, el componente de flagelina carece de al menos una porción de una región de bisagra de una secuencia aminoacídica de flagelina de origen natural.

50 La composición que comprende un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en la que el componente de flagelina incluye al menos un residuo de cisteína y activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5, puede incluir además al menos una porción de al menos un antígeno (p.ej., un antígeno de la gripe, tal como un antígeno de la gripe A, B o C).

55 El antígeno puede ser un antígeno esencialmente hidrófobo, tal como un antígeno de sitio de escisión madurativa de HA. El antígeno de sitio de escisión madurativa puede ser al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en las (SEQ ID NO: 530, 532, 533, 534, 535, 600, 601, 602, 603 y NVPEKQTRGIFGAIAGFIE (H3) (SEQ ID NO:

796), NIPSIQSRGLFGAIAGFIE (H1) (SEQ ID NO: 797), PAKLLKERGFFGAIAGFLE (GRIPE B) (SEQ ID NO: 798), RERRRKKRGLFGAIAGFIE (H5) (SEQ ID NO: 799), RGLXGAIAGFIE (SEQ ID NO: 821), RGLXGAIAGFIE (SEQ ID NO: 822).

5 "Esencialmente hidrófobo", como se usa en la presente memoria, significa que el antígeno tiene una solubilidad limitada en una disolución o entorno acuoso. La naturaleza hidrófoba de los péptidos o proteínas puede determinarse y compararse, por ejemplo, mediante la escala de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle (Kyte, J., *et al.*, Mol. Biol. 157: 105-132 (1982), (1982)), que asigna un valor numérico a cada uno de los 20 aminoácidos según la hidrofobia relativa. Un valor positivo indica un aminoácido hidrófobo. Un valor negativo indica un aminoácido hidrófilo. El promedio de estos valores para un péptido o polipéptido individual (calculado añadiendo los valores de hidrofobia individuales para cada aminoácido del polipéptido o proteína y dividiendo el valor total entre el número de aminoácidos en el polipéptido o proteína) proporciona un índice de la hidrofobia global conocido como "promedio general de hidropatía", al que se hace también referencia como "GRAVY." Un valor de GRAVY mayor de 0 indica que la proteína o el péptido es esencialmente hidrófobo. Un valor de GRAVY menor de 0 indica que la proteína o el péptido es esencialmente hidrófilo. Los valores de hidrofobia individuales para los 20 aminoácidos de origen natural, según la escala de Kyte-Doolittle (Kyte, J., *et al.*, Mol. Biol. 157: 105-132 (1982)), son como sigue:

|                 |      |
|-----------------|------|
| Alanina         | 1,8  |
| Arginina        | -4,5 |
| Asparagina      | -3,5 |
| Ácido aspártico | -3,5 |
| Cisteína        | 2,5  |
| Glutamina       | -3,5 |
| Ácido glutámico | -3,5 |
| Glicina         | -0,4 |
| Histidina       | -3,2 |
| Isoleucina      | 4,5  |
| Leucina         | 3,8  |
| Lisina          | -3,9 |
| Metionina       | 1,9  |
| Fenilalanina    | 2,8  |
| Prolina         | -1,6 |
| Serina          | -0,8 |
| Treonina        | -0,7 |
| Triptófano      | -0,9 |
| Tirosina        | -1,3 |
| Valina          | 4,2  |



La hidrofobia de antígenos tales como antígenos de proteína o péptido, para uso en las composiciones y métodos de la invención, puede determinarse calculando la puntuación GRAVY basándose en los valores de hidrofobia de la escala de Kyte-Doolittle anterior. Por ejemplo, se calcularon puntuaciones GRAVY que indican péptidos esencialmente hidrófobos mediante la adición de los valores de hidrofobia (anteriormente) de aminoácidos individuales para los siguientes aminopéptidos de sitio de escisión madurativa:

5

| Sitio de escisión madurativa                                 | GRAVY |
|--|-------|
| NVPEKQTRGIFGAIAGFIE (A/H3N2) (SEQ ID NO: 800)                | 0,053 |
| NVPQIESRGLFGAIAGFIE (A/H2N1) (SEQ ID NO: 801)                | 0,453 |
| NIPSIQSRGLFGAIAGFIE (A/H1N1) (SEQ ID NO: 802)                | 0,611 |
| RGLFGAIAGFIE (región conservada de gripe A) (SEQ ID NO: 803) | 1,067 |
| PAKLLKERGFFGAIAGFLE (gripe B) (SEQ ID NO: 804)               | 0,400 |
| RGFFGAIAGFLE (región conservada de gripe B) (SEQ ID NO: 805) | 0,925 |

Igualmente, se calcularon puntuaciones GRAVY que indican péptidos esencialmente hidrófilos para los siguientes péptidos:

| Secuencia aminoacídica   | GRAVY  |
|--|--------|
| <b>M2e de gripe humana</b> (SEQ ID NO: 806)                            |        |
| SLLTEVETPIRNEWGSRSDSSDP  | -1,129 |
| <b>M2e de gripe de Vietnam</b> (SEQ ID NO: 807)                        |        |
| GSGAG SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSDP   | -0,907 |
| <b>M2e de gripe de Hong Kong</b> (SEQ ID NO: 808)                      |        |
| GSGAGSLLTEVETLTRNGWGRCRCSDSSDP   | -0,507 |
| <b>Péptido 001 de E del virus del Nilo occidental</b> (SEQ ID NO: 809) |        |
| LTSGHLKCRVKMEKLQKGT  | -0,475 |
| <b>Péptido 2E del dengue</b> (SEQ ID NO: 810)                          |        |
| EAEPFPGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKK  | -0,333 |
| <b>Péptido wt de BCRA BL</b> (SEQ ID NO: 811)                          |        |
| SLLTEVETPIRNEWGSRSDSSDP  | -1,129 |

10 Un antígeno puede ser cualquier molécula (p.ej., proteína, péptido, glucoproteína, carbohidrato, lípido, lipopéptido, polisacárido) que pueda reconocerse por los componentes del sistema inmunitario, independientemente de si puede desencadenar la activación del sistema inmunitario. El antígeno puede ser un fragmento o una porción de un antígeno de origen natural o una molécula sintética que imita el antígeno de origen natural o una porción del antígeno de origen natural.

El antígeno puede ser un antígeno vírico. Un "antígeno vírico", como se usa en la presente memoria, hace referencia a cualquier porción de un virus (p.ej., virus de la gripe, flavivirus) que genera una respuesta inmunitaria en un sujeto cuando se emplea en combinación con un agonista de TLR (p.ej., una flagelina, Pam2Cys, Pam3Cys) o en ausencia de un agonista de TLR. El antígeno vírico puede ser una porción o un fragmento de un virus de origen natural o una molécula sintética que imita un virus de origen natural, tal como una proteína recombinante o sintética (p.ej., virus de la gripe, flavivirus), péptido, lípido o carbohidrato, que genera una respuesta inmunitaria en el sujeto. El antígeno de la gripe puede incluir al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en un antígeno de la gripe A, antígeno de la gripe B y antígeno de la gripe C. El antígeno de la gripe puede ser una proteína de membrana integral del virus de la gripe, tal como HA, o una porción de proteína de HA, tal como HA1-1 y HA1-2.

El antígeno puede ser al menos una porción de una proteína de matriz de la gripe 2 (M2), incluyendo al menos una porción del ectodominio de una proteína M2 de la gripe (M2e).

La proteína de matriz 2 (M2 o proteína M2) es una proteína de canal iónico de membrana integral selectiva de protón del virus de la gripe A. M2 se expresa abundantemente en la membrana plasmática de células infectadas con virus, pero generalmente se subexpresa por viriones. Por ejemplo, es una porción de una secuencia de M2 de la gripe A la SEQ ID NO: 508, que está codificada por la SEQ ID NO: 509. La forma nativa de la proteína M2 es un homotetrámero (concretamente, cuatro moléculas de proteína M2 ligadas por disulfuro idénticas). Cada una de las unidades son hélices estabilizadas por dos enlaces disulfuro. M2 se activa por un bajo pH. Cada una de las moléculas de proteína M2 en el homotetrámero consiste en tres dominios: un dominio de 24 aminoácidos externo o N(amino)-terminal (p.ej., SEQ ID NO: 510; al que también se hace referencia como una "secuencia de consenso humana"), que está codificada por la SEQ ID NO: 511; una región transmembrana de 19 aminoácidos hidrófobos y un dominio de 54 aminoácidos interno o C(carboxi)-terminal. La proteína M2 puede variar dependiendo del subtipo vírico de la gripe (p.ej., los subtipos H1 y H5 de la gripe A) y la fuente vírica de la gripe (p.ej., Puerto Rico, Tailandia, Nueva York, Hong Kong) como se muestra, por ejemplo, en las secuencias aminoterminales ejemplares de proteínas M2 (SEQ ID NO: 544-556 y 570-578) y como se describe en el documento PCT/US2005/046662 (WO2006/069262).

La proteína M2 tiene un importante papel en el ciclo vital del virus de la gripe A. Es importante en la etapa de denudación, donde permite la entrada de protones en la partícula vírica que reducen el pH dentro del virus, dando como resultado la disociación de la proteína de matriz vírica M1 de la ribonucleoproteína RNP. Como consecuencia, la cubierta vírica se retira y los contenidos del virus se liberan del endosoma al citoplasma de la célula hospedadora para infección.

La función del canal M2 puede inhibirse por fármacos antivíricos, tales como amantadina y rimantadina, que previenen que el virus infecte la célula hospedadora. Dichos fármacos antivíricos se unen habitualmente a la región transmembrana de la proteína M2 y bloquean estéricamente el canal iónico creado por la proteína M2, lo que previene que los protones entren y denuden el virión.

La proteína M2 para uso en las composiciones y métodos de la invención puede incluir al menos una porción de la SEQ ID NO: 510, codificada por la SEQ ID NO: 511 o al menos una porción de la SEQ ID NO: 544, codificada por la SEQ ID NO: 603. La proteína M2 puede incluir además al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en la SEQ ID NO: 512, la SEQ ID NO: 516, la SEQ ID NO: 531, la SEQ ID NO: 536 (M2e de H5N1 de gripe A, aislamiento 2004 Viet Nam con serina reemplazando a cisteína), la SEQ ID NO: 537 (M2e de H5N1 de gripe A, aislamiento 2004 Viet Nam), la SEQ ID NO: 538 (M2e de H5N1 de gripe A, aislamiento Hong Kong 97 con serina reemplazando a cisteína), la SEQ ID NO: 539 (M2e de H5N1 de gripe A, aislamiento Hong Kong 97), la SEQ ID NO: 540 (M2e de H7N2 de gripe A, aislamiento de pollo/Nueva York 95 con serina reemplazando a cisteína), la SEQ ID NO: 541 (M2e de H7N2 de gripe A, aislamiento de pollo/Nueva York 95), la SEQ ID NO: 542 (M2e de H9N2 de gripe A, aislamiento Hong Kong 99 con serina reemplazando a cisteína) y la SEQ ID NO: 543 (gripe A, aislamiento Hong Kong 99). Ciertos residuos de cisteína, por ejemplo los aminoácidos 16 y 18 de la SEQ ID NO: 537 y los aminoácidos 17 y 19 de las SEQ ID NO: 539, 541 y 543 en la secuencia de origen natural de al menos una porción de proteína M2, se reemplazan por una serina (véanse las SEQ ID NO: 538, 540, 542 y 544, respectivamente).

Las composiciones que comprenden un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en las que el componente de flagelina incluye al menos un residuo de cisteína y activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5 que incluye además un antígeno (p.ej., un péptido de sitio de escisión madurativa, porción de proteína de HA tal como HA1-1 HA1-2), pueden coadministrarse o mezclarse con otro componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en el que el componente de flagelina incluye al menos un residuo de cisteína y activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5 que incluye además un antígeno diferente distinto (p.ej., M2e) o una proteína de fusión de un agonista de TLR y un antígeno (p.ej., STF2.HA1-1, STF2.HA1-2, STF2Δ.HA1-1, STF2Δ.HA1-2, STF2.M2e, STF2.4xM2e, STF2Δ.M2e, STF2Δ.4xM2e).

Las composiciones que comprenden el componente de flagelina que es al menos una porción de flagelina, en el que el componente de flagelina incluye al menos un residuo de cisteína y activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5, pueden incluir un antígeno que se produce mediante modificación química de las cadenas laterales del antígeno (p.ej., antígenos capsulares, antígenos relacionados con patógeno, antígenos de la gripe, antígenos de flavivirus) de manera que se genere un grupo activo que está acoplado (a lo que se hace referencia

también en la presente memoria como conjugación química) con un grupo reactivo compatible creado en las flagelinas sustituidas de la invención (véase a continuación). Se lleva a cabo la derivatización (modificación) del material capsular de modo que se modifique una pequeña minoría de las cadenas laterales (aproximadamente un 5 %) para evitar la destrucción de la mayoría de las estructuras inmunorreactivas en el material capsular.

- 5 El antígeno puede conjugarse químicamente con componentes de flagelina y componentes de agonista de receptor de tipo Toll. La conjugación química (a la que se hace referencia también en la presente memoria como "acoplamiento químico") puede incluir conjugación mediante un grupo reactivo tal como un grupo tiol (p.ej. un residuo de cisteína) o mediante derivatización de un grupo primario (p.ej., aminoterminal) o secundario (p.ej., lisina). Pueden usarse diferentes reticulantes para conjugar químicamente ligandos de TLR (p.ej., agonistas de TLR) con proteínas (p.ej., antígenos, composiciones de la invención, constructos de HA y M2e de la invención) u otras moléculas (p.ej., ácidos nucleicos, polisacáridos). Están comercialmente disponibles agentes reticulantes ejemplares, por ejemplo, en Pierce (Rockland, III). Los métodos para conjugar químicamente el antígeno con el componente de flagelina son bien conocidos e incluyen el uso de reticulantes comercialmente disponibles, tales como los descritos en la presente memoria.
- 10 Por ejemplo, la conjugación de antígenos de péptido o proteína con un componente de flagelina o un componente agonista de receptor de tipo Toll puede ser mediante al menos un residuo de cisteína del componente de flagelina o del componente de receptor de tipo Toll y al menos un residuo de cisteína de una proteína (p.ej., un antígeno de la gripe tal como HA, M2e) empleando técnicas establecidas. La proteína puede derivatizarse con un reticulante homobifuncional específico de sulfhidrilo, se desala entonces la proteína para retirar el reticulante no reaccionado y se añade y conjuga entonces el copartícipe de péptido o proteína mediante al menos un residuo de cisteína. Los reactivos ejemplares para uso en los métodos de conjugación pueden adquirirse comercialmente en Pierce (Rockland, III), por ejemplo, BMB (n° de catálogo: 22331), BMDB (n° de catálogo: 22332), BMH (n° de catálogo: 22330), BMOE (n° de catálogo: 22323), BM[PEO]<sub>3</sub> (n° de catálogo: 22336), BM[PEO]<sub>4</sub> (n° de catálogo: 22337), DPDPB (n° de catálogo: 21702), DTME (n° de catálogo: 22335), HBVS (n° de catálogo: 22334).
- 15 Como alternativa, las proteínas y antígenos que contienen cisteína pueden conjugarse también con residuos de lisina en los componentes de flagelina, flagelina, componentes de agonista de receptor de tipo Toll y agonistas de receptor de tipo Toll de la invención. Se derivatiza una proteína que no contiene residuos de cisteína con una amina heterobifuncional y un reticulante específico de sulfhidrilo. Después de desalar, se añade y conjuga el copartícipe que contiene cisteína. Los reactivos ejemplares para uso en los métodos de conjugación pueden adquirirse comercialmente en Pierce (Rockland, III), por ejemplo, AMAS (n° de catálogo: 22295), BMPA (n° de catálogo 22296), BMPS (n° de catálogo 22298), EMCA (n° de catálogo: 22306), EMCS (n° de catálogo: 22308), GMBS (n° de catálogo: 22309), KMUA (n° de catálogo: 22211), LC-SMCC (n° de catálogo: 22362), LC-SPDP (n° de catálogo: 21651), MBS (n° de catálogo: 22311), SATA (n° de catálogo: 26102), SATP (n° de catálogo: 26100), SBAP (n° de catálogo: 22339), SIA (n° de catálogo: 22349), SIAB (n° de catálogo: 22329), SMCC (n° de catálogo: 22360), SMPB (n° de catálogo: 22416), SMPH (n° de catálogo 22363), SMPT (n° de catálogo 21558), SPDP (n° de catálogo: 21857), sulfo-EMCS (n° de catálogo: 22307), sulfo-GMBS (n° de catálogo: 22324), sulfo-KMUS (n° de catálogo: 21111), sulfo-LC-SPDP (n° de catálogo: 21650), sulfo-MBS (n° de catálogo: 22312), sulfo-SIAB (n° de catálogo: 22327), sulfo-SMCC (n° de catálogo: 22322), sulfo-SMPB (n° de catálogo: 22317) y sulfo-LC-SMPT (n° de catálogo: 21568).
- 20 Adicionalmente, o como alternativa, los antígenos de péptido o proteína pueden conjugarse también con componentes de flagelina o componentes de agonista de receptor de tipo Toll de la invención a través de al menos un residuo de lisina en ambos copartícipes conjugados. Los dos copartícipes conjugados se combinan junto con un reticulante homobifuncional específico de amina. Se separa por purificación entonces el heteroconjugado apropiado de los agregados indeseados y homoconjugados. Los reactivos ejemplares para uso en los métodos de conjugación pueden adquirirse comercialmente en Pierce (Rockland, III), por ejemplo, BSOE (n° de catálogo: 21600), BS<sub>3</sub> (n° de catálogo: 21580), DFDNB (n° de catálogo: 21525), DMA (n° de catálogo: 20663), DMP (n° de catálogo: 21666), DMS (n° de catálogo: 20700), DSG (n° de catálogo: 20593), DSP (n° de catálogo: 22585), DSS (n° de catálogo: 21555), DST (n° de catálogo: 20589), DTBP (n° de catálogo: 20665), DTSSP (n° de catálogo: 21578), EGS (n° de catálogo: 21565), MSA (n° de catálogo: 22605), sulfo-DST (n° de catálogo: 20591), sulfo-EGS (n° de catálogo: 21566) y THPP (n° de catálogo: 22607).

De forma similar, los antígenos de péptido o proteína pueden conjugarse con componentes de flagelina o componentes de agonista de receptor de tipo Toll de la invención a través de al menos un grupo carboxilo (p.ej., ácido glutámico, ácido aspártico o el extremo carboxilo del péptido o proteína) en un copartícipe y aminas en el otro copartícipe. Se mezclan conjuntamente los dos copartícipes de conjugación junto con el reactivo de reticulación heterobifuncional apropiado. Se separa por purificación entonces el heteroconjugado apropiado de los agregados indeseados y homoconjugados. Los reactivos ejemplares para uso en los métodos de conjugación pueden adquirirse en Pierce (Rockland, III), por ejemplo, AEDP (n° de catálogo: 22101), EDC (n° de catálogo: 22980) y TFCS (n° de catálogo: 22299).

Además, los antígenos de carbohidrato pueden conjugarse con proteínas, componentes de flagelina, flagelina, componentes de agonista de receptor de tipo Toll y agonistas de receptor de tipo Toll de la invención a través de al menos un residuo de cisteína en la proteína empleando técnicas bien establecidas. Por ejemplo, se derivatiza

inicialmente la proteína con un reticulante heterobifuncional que contiene al menos un grupo específico de sulfhidrilo y al menos un grupo hidrazida. Se trata entonces el polisacárido u oligosacárido con un agente oxidante tal como meta-peryodato de sodio, generando grupos aldehído terminales. Se añade entonces el carbohidrato oxidado a la proteína derivatizada y ocurre la conjugación con el aldehído a través de la hidrazida en el reticulante. Los reactivos ejemplares para uso en los métodos de conjugación pueden adquirirse en Pierce (Rockland, III), por ejemplo, BMPH (n° de catálogo: 22297), EMCH (n° de catálogo: 22106), KMUH (n° de catálogo: 22111) y PDPH (n° de catálogo: 22301).

Pueden conjugarse lipopéptidos adicionales con antígenos de proteína, componentes de flagelina o componentes de receptor de tipo Toll de la invención a través de cadenas laterales aminoacídicas en la cadena peptídica. Se emplearían estrategias y reactivos similares a como se describen anteriormente para la conjugación de péptido con proteínas.

Los TLR pueden activarse por ácidos nucleicos. Por ejemplo, TLR3 se activa por ARN bicatenario (bc), TLR7 y TLR8 se activan por ARN monocatenario (mc) y TLR9 se activa por secuencias de ADN con CpG. Pueden emplearse varias técnicas diferentes para conjugar componentes de agonista de receptor de tipo Toll de TLR de ácido nucleico con antígenos de proteína. Por ejemplo, para la molécula de ADN no modificada, puede modificarse el grupo 5' fosfato con la carbodiimida hidrosoluble EDC (Pierce; Rockford, IL, n° de catálogo: 22980) seguido de imidazol, formando una fosforilimidazolidina terminal. Puede sustituirse entonces por una amina terminal este grupo reactivo mediante la adición de etilendiamina. El ácido nucleico de amina modificada puede conjugarse entonces con una cisteína en una proteína usando un reticulante heterobifuncional de maleimida (específico de cisteína) y de NHS-éster (específico de lisina), como se describe anteriormente para la conjugación de péptido-proteína.

Como alternativa, o adicionalmente, puede incorporarse un grupo sulfhidrilo al extremo 5' sustituyendo por cistamina la etilendiamina en la segunda etapa. Después de la reducción del enlace disulfuro, puede conjugarse el sulfhidrilo libre con cisteínas en proteínas, componentes de flagelina, flagelina, componentes de agonista de receptor de tipo Toll y agonistas de receptor de tipo Toll empleando un reticulante homobifuncional basado en maleimida, o con lisinas usando un reticulante heterobifuncional, como se describe anteriormente. Como alternativa, o adicionalmente, pueden sintetizarse oligonucleótidos sintéticos con bases modificadas en el extremo 3' o 5'. Estas bases modificadas pueden incluir grupos amina primaria o sulfhidrilo que pueden conjugarse con proteínas usando los métodos descritos anteriormente. El extremo 3' de las moléculas de ARN puede modificarse químicamente para permitir el acoplamiento con proteínas u otras macromoléculas. El diol del residuo de 3'-ribosa puede oxidarse usando meta-peryodato de sodio, produciendo un grupo aldehído. El aldehído puede conjugarse entonces con proteínas usando un reticulante que contiene hidrazida, tal como MPBH (Pierce; Rockland, IL, n° de catálogo: 22305), que modifica covalentemente el grupo carbonilo y se conjuga entonces con tioles libres en proteínas a través de un grupo maleimida. Como alternativa, el grupo 3'-hidroxilo puede derivatizarse directamente con un reticulante que contiene isocianato, tal como PMPI (Pierce; Rockland, IL, n° de catálogo: 28100), que contiene también un grupo maleimida para conjugación con sulfhidrilos de proteína.

Se han identificado ligandos de TLR de molécula pequeña sintéticos (p.ej., agonistas de receptor de tipo Toll, antagonistas de receptor de tipo Toll. Por ejemplo, imiquimod, que activa potentemente TLR7, y resiquimod, un activador tanto de TLR7 como de TLR8. Se han sintetizado análogos de estos compuestos con niveles variables de potencia y especificidad. La capacidad de conjugar un agonista de TLR de molécula pequeña con un antígeno de interés puede depender de la naturaleza química del ligando de TLR. Algunos ligandos de TLR pueden tener grupos activos que pueden explotarse para conjugación química. Por ejemplo, imiquimod, así como su análogo gardiquimod (InvivoGen; San Diego, CA) y el análogo de adenina activador de TLR7 CL087 (InvivoGen, San Diego, CA), tienen grupos amina primaria (-NH<sub>2</sub>), que pueden ser dianas para la derivatización por reticulantes que contienen imidoésteres o ésteres de NHS. En otra estrategia, gardiquimod contiene un grupo hidroxilo expuesto (-OH), que puede derivatizarse por un reticulante que contiene isocianato, tal como PMPI (Pierce; Rockland, IL, n° de catálogo: 28100) para reticulación posterior con grupos sulfhidrilo de proteína.

Además, puede disponerse la síntesis a medida de derivados de ligandos de TLR de molécula pequeña para unir grupos funcionales novedosos a diferentes posiciones en la molécula para facilitar la reticulación. Los derivados a medida pueden incluir también grupos, tales como maleimidias, que pueden usarse entonces para ligamiento directo con antígenos de proteína.

La conjugación química de un antígeno con el componente de flagelina puede dar como resultado una solubilidad acuosa aumentada del antígeno (p.ej., un antígeno esencialmente hidrófobo tal como un antígeno de sitio de escisión madurativa) como componente de la composición.

La composición que comprende un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en la que el componente de flagelina incluye al menos un residuo de cisteína y activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5, puede incluir un residuo de cisteína en la región hipervariable del componente de flagelina.

Al menos un residuo de cisteína sustituye a al menos un aminoácido en una secuencia aminoacídica de flagelina de origen natural del componente de flagelina. El residuo de cisteína puede sustituir a al menos un aminoácido seleccionado del grupo consistente en los aminoácidos 1, 237, 238, 239, 240, 241 y 495 de la SEQ ID NO: 812; al

menos un aminoácido seleccionado del grupo consistente en los aminoácidos 1, 240, 241, 242, 243, 244 y 505 de la SEQ ID NO: 498; al menos un aminoácido seleccionado del grupo consistente en los aminoácidos 1, 237, 238, 239, 240, 241 y 504 de la SEQ ID NO: 504; al menos un aminoácido seleccionado del grupo consistente en los aminoácidos 1, 211, 212, 213, y 393 de la SEQ ID NO: 815; al menos un aminoácido seleccionado del grupo consistente en los aminoácidos 1, 151, 152, 153, 154, y 287 de la SEQ ID NO: 820; al menos un aminoácido seleccionado del grupo consistente en los aminoácidos 1, 238, 239, 240, 241, 242, 243 y 497 de la SEQ ID NO: 502 y al menos un aminoácido seleccionado del grupo consistente en los aminoácidos 1, 237, 238, 239, 240, 241 y 495 de la SEQ ID NO: 812.

El componente de flagelina o componente agonista de receptor de tipo Toll puede incluir al menos una porción de una secuencia aminoacídica de flagelina de origen natural en combinación con el residuo de cisteína.

La composición de la invención en la que el residuo de cisteína sustituye a al menos un aminoácido del componente de flagelina en una secuencia aminoacídica de flagelina de origen natural, o en la que el componente de flagelina incluye al menos una porción de una secuencia aminoacídica de flagelina de origen natural en combinación con el residuo de cisteína, puede activar un receptor de tipo Toll 5. Por ejemplo, puede situarse un residuo de cisteína en el dominio D1/D2 cercano al extremo amino y al extremo carboxilo, remoto del sitio de reconocimiento de TLR5 (véanse, por ejemplo, las Figuras 46 y 47). Como alternativa, o adicionalmente, el residuo de cisteína puede situarse en el punto distal del dominio hipervariable (véanse, por ejemplo, las Figuras 46 y 47) aproximadamente en el aminoácido 237, aproximadamente 238, aproximadamente 239, aproximadamente 240 y aproximadamente 241 de la SEQ ID NO: 812. Es preferible sustituir aminoácidos polares o cargados a sustituir aminoácidos hidrófobos por los residuos de cisteína. Es la menos preferible la sustitución en el sitio de reconocimiento de TLR5.

Se representa la flagelina de *Salmonella typhimurium* STF1 (FliC) en la SEQ ID NO: 812 (nº de acceso: P06179). El sitio de reconocimiento de TLR5 es del aminoácido aproximadamente 79 a aproximadamente 117 y de aproximadamente 408 a aproximadamente 439. Los residuos de cisteína pueden sustituir a o incluirse en combinación con los aminoácidos de aproximadamente 408 a aproximadamente 439 de la SEQ ID NO: 812, los aminoácidos aproximadamente 1 y aproximadamente 495 de la SEQ ID NO: 812, los aminoácidos de aproximadamente 237 a aproximadamente 241 de la SEQ ID NO: 812 y/o los aminoácidos de aproximadamente 79 a aproximadamente 117 y de aproximadamente 408 a aproximadamente 439 de la SEQ ID NO: 812.

Se representa la flagelina de *Salmonella typhimurium* STF2 (FliB) en la SEQ ID NO: 498. El sitio de reconocimiento de TLR5 es de los aminoácidos aproximadamente 80 a aproximadamente 118 y de aproximadamente 420 a aproximadamente 451 de la SEQ ID NO: 498. Los residuos de cisteína pueden sustituir a o incluirse en combinación con los aminoácidos aproximadamente 1 y aproximadamente 505 de la SEQ ID NO: 498, los aminoácidos de aproximadamente 240 a aproximadamente 244 de la SEQ ID NO: 498, los aminoácidos de aproximadamente 79 a aproximadamente 117 y/o de aproximadamente 419 a aproximadamente 450 de la SEQ ID NO: 498.

Se representa la flagelina de *Salmonella muenchen* en la SEQ ID NO: 504 (nº de acceso: P06179). El sitio de reconocimiento de TLR5 es de los aminoácidos aproximadamente 79 a aproximadamente 117 y de aproximadamente 418 a aproximadamente 449 de la SEQ ID NO: 504. Los residuos de cisteína pueden sustituir a o incluirse en combinación con los aminoácidos aproximadamente 1 y aproximadamente 504 de la SEQ ID NO: 504, de aproximadamente 237 a aproximadamente 241 de la SEQ ID NO: 504, de aproximadamente 79 a aproximadamente 117 y/o los aminoácidos de aproximadamente 418 a aproximadamente 449 de la SEQ ID NO: 504.

Se representa la flagelina de *Escherichia coli* en la SEQ ID NO: 502 (nº de acceso: P04949). El sitio de reconocimiento de TLR5 es de los aminoácidos aproximadamente 79 a aproximadamente 117 y de aproximadamente 410 a aproximadamente 441 de la SEQ ID NO: 502. Los residuos de cisteína pueden sustituir a o incluirse en combinación con los aminoácidos aproximadamente 1 y aproximadamente 497 de la SEQ ID NO: 502, de aproximadamente 238 a aproximadamente 243 de la SEQ ID NO: 502, de aproximadamente 79 a aproximadamente 117 y/o los aminoácidos de aproximadamente 410 a aproximadamente 441 de la SEQ ID NO: 502.

Se representa la flagelina de *Pseudomonas aeruginosa* en la SEQ ID NO: 815. El sitio de reconocimiento de TLR5 es de los aminoácidos aproximadamente 79 a aproximadamente 117 y de aproximadamente 308 a aproximadamente 338 de la SEQ ID NO: 815. Los residuos de cisteína pueden sustituir a o incluirse en combinación con los aminoácidos aproximadamente 1 y aproximadamente 393 de la SEQ ID NO: 815, de aproximadamente 211 a aproximadamente 213 de la SEQ ID NO: 815, de aproximadamente 79 a aproximadamente 114 y/o de aproximadamente 308 a aproximadamente 338 de la SEQ ID NO: 815.

Se representa la flagelina de *Listeria monocytogenes* en la SEQ ID NO: 820. El sitio de reconocimiento de TLR5 es de los aminoácidos aproximadamente 78 a aproximadamente 116 y de aproximadamente 200 a aproximadamente 231 de la SEQ ID NO: 820. Los residuos de cisteína pueden sustituir a o incluirse en combinación con los aminoácidos aproximadamente 1 y aproximadamente 287 de la SEQ ID NO: 820, de aproximadamente 151 a aproximadamente 154 de la SEQ ID NO: 820, de aproximadamente 78 a aproximadamente 116 y/o de aproximadamente 200 a aproximadamente 231 de la SEQ ID NO: 820.

Se han descrito los sitios de reconocimiento de TLR5 definidos experimentalmente en STF2 (véase, por ejemplo, Smith, K.D., *et al.*, Nature Immunology 4: 1247-1253 (2003) en los aminoácidos aproximadamente 79 a aproximadamente 117 y de aproximadamente 420 a aproximadamente 451. Además, Smith, K.D., *et al.*, Nature Immunology 4: 1247-1253 (2003), basándose en la homología de secuencia, identificó sitios de reconocimiento de TLR5 en otras flagelinas tales como STF1 en los aminoácidos de aproximadamente 79 a aproximadamente 117, de aproximadamente 408 a aproximadamente 439; *P. aeruginosa* en los aminoácidos de aproximadamente 79 a aproximadamente 117, de aproximadamente 308 a aproximadamente 339; *L. pneumophila* en los aminoácidos de aproximadamente 79 a aproximadamente 117, de aproximadamente 381 a aproximadamente 419; *E. coli* en los aminoácidos de aproximadamente 79 a aproximadamente 117, de aproximadamente 477 a aproximadamente 508; *S. marcesens* en los aminoácidos de aproximadamente 79 a aproximadamente 117, de aproximadamente 265 a aproximadamente 296; *B. subtilis* en los aminoácidos de aproximadamente 77 a aproximadamente 117, de aproximadamente 218 a aproximadamente 249 y *L. monocytogenes* en los aminoácidos de aproximadamente 77 a aproximadamente 115, de aproximadamente 200 a aproximadamente 231.

Se ha determinado la estructura a alta resolución de STF1 (FliC) (SEQ ID NO: 812) y puede ser una base para el análisis del reconocimiento de TLR5 por una flagelina y la localización de las sustituciones/adiciones de cisteína. La flagelina parece "un bumerán", con los extremos amino y carboxilo al final de un brazo (véase, por ejemplo, la Figura 48). El sitio de reconocimiento de TLR5 se localiza aproximadamente en el lado externo del bumerán, justo por debajo de los extremos amino y carboxilo de la flagelina. La región de bisagra, que no es necesaria para el reconocimiento de TLR5, se localiza por encima de la curva. La región de mayor homología de secuencia de flagelinas está en el sitio de reconocimiento de TLR5. La siguiente región de homología de secuencia está en los dominios D1 y D2, que incluyen el sitio de reconocimiento de TLR5 y los extremos amino y carboxilo. Los dominios D1 y D2, con o sin un ligador, están en STF2Δ (SEQ ID NO: 500), que puede activar TLR5. La región de menor homología de secuencia entre flagelinas es la región hipervariable.

Se cree que la capacidad del componente de flagelina o componente de receptor de tipo Toll de activar TLR5 puede lograrse manteniendo los sitios de conjugación (residuos de cisteína que sustituyen a al menos un aminoácido en un componente de flagelina de secuencia aminoacídica de flagelina de origen natural o al menos una porción de una secuencia aminoacídica de flagelina de origen natural en combinación con el residuo de cisteína) remotos del sitio de reconocimiento de TLR5 o TLR. Por ejemplo, para STF1 (SEQ ID NO: 812), para la que está disponible una determinación estructural de alta resolución, esto puede conseguirse en el dominio D1, el dominio D2 o en la región de bisagra. En el dominio D1/D2, los extremos amino y carboxilo pueden estar remotos (a lo que se hace referencia también en la presente memoria como "distales") del sitio de reconocimiento de TLR5, y moverse desde el extremo amino o carboxilo puede llevar el sitio de conjugación más cerca del sitio de reconocimiento y puede interferir con la actividad de TLR5. En la región de bisagra, los aminoácidos de aproximadamente 237 a aproximadamente 241 de la SEQ ID NO: 812 están aproximadamente en la otra punta del "bumerán" y están aproximadamente a la misma distancia del sitio de reconocimiento de TLR5 que los extremos amino y carboxilo. El sitio puede estar también en una localización que mantiene el reconocimiento de TLR5.

Puede tenerse en consideración la identidad aminoacídica para la localización de los sitios de conjugación. Los aminoácidos polares y cargados (p.ej., serina, ácido aspártico, lisina) es más probable que estén expuestos a la superficie y sean susceptibles de unión de un antígeno. Los aminoácidos hidrófobos (p.ej., valina, fenilalanina) es más probable que estén enterrados en interacciones estructurales y deberían evitarse.

Las composiciones que incluyen componentes de flagelina con residuos de cisteína o componentes de agonista de receptor de tipo Toll con residuos de cisteína activan el TLR5 y pueden conjugarse químicamente con antígenos.

Las composiciones y métodos de empleo de las composiciones de la invención pueden incluir además una proteína portadora. La proteína portadora puede ser al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en toxoide del tétanos, toxoide de *Vibrio cholerae*, toxoide de difteria, mutante reactivo cruzado de toxoide de difteria, una subunidad B de una enterotoxina termolábil en *E. coli*, una proteína de cubierta del virus del tabaco, una proteína de envoltura del virus de la rabia, una glucoproteína de envoltura del virus de la rabia, una tiroglobulina, una proteína de choque térmico 60, una hemocianina de lapa bocallave y un antígeno de tuberculosis secretado tempranamente 6.

La composición que comprende un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en la que el componente de flagelina incluye al menos un residuo de cisteína y activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5, puede incluir una lisina del componente de flagelina que sustituye a al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en un residuo de arginina, un residuo de serina y un residuo de histidina.

En una realización adicional, la invención es una composición que comprende un componente agonista de receptor de tipo Toll que es al menos una porción de un agonista de receptor de tipo Toll, en la que el componente agonista de receptor de tipo Toll incluye al menos un residuo de cisteína en una posición en que no aparece un residuo de cisteína en el agonista de receptor de tipo Toll nativo, activando el componente agonista de receptor de tipo Toll un receptor de tipo Toll. "Componente", como se usa en la presente memoria con referencia a un componente agonista de receptor de tipo Toll, significa al menos parte o la totalidad del agonista de receptor de tipo Toll.

En una realización, el residuo de cisteína de la composición que comprende un componente agonista de receptor de tipo Toll que es al menos una porción de un agonista de receptor de tipo Toll, en el que el componente agonista de receptor de tipo Toll incluye al menos un residuo de cisteína en una posición en que no aparece un residuo de cisteína en el agonista de receptor de tipo Toll nativo, activando el componente agonista de receptor de tipo Toll un agonista de receptor de tipo Toll, sustituye a al menos un aminoácido en una secuencia aminoacídica de origen natural de un componente agonista de receptor de tipo Toll. La cisteína puede sustituir a al menos un aminoácido remoto del sitio de reconocimiento de receptor de tipo Toll del componente agonista de receptor de tipo Toll.

En otra realización, el componente agonista de receptor de tipo Toll incluye al menos una porción de una secuencia aminoacídica de agonista de receptor de tipo Toll de origen natural en combinación con un residuo de cisteína. El residuo de cisteína en combinación con el agonista de receptor de tipo Toll de origen natural puede estar remoto del sitio de reconocimiento de receptor de tipo Toll del componente agonista de receptor de tipo Toll.

La composición que comprende un componente agonista de receptor de tipo Toll que es al menos una porción de un agonista de receptor de tipo Toll, en el que el componente agonista de receptor de tipo Toll incluye al menos un residuo de cisteína en una posición en que no aparece un residuo de cisteína en el agonista de receptor de tipo Toll nativo, activando el componente agonista de receptor de tipo Toll un agonista de receptor de tipo Toll, puede incluir además al menos una porción de al menos un antígeno (p.ej., un antígeno de la gripe, tal como un antígeno de proteína de membrana integral de la gripe, HA, HA1-1, HA1-2, M2, M2e).

En todavía otra realización, la invención es una composición que comprende un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en la que al menos una lisina del componente de flagelina se ha sustituido por al menos una arginina, activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.

"Sustituido", como se usa en la presente memoria con referencia a flagelina, componente de flagelina, agonista de receptor de tipo Toll o componente agonista de receptor de tipo Toll, significa que al menos un aminoácido, tal como una lisina del componente de flagelina, se ha modificado a otro residuo aminoacídico, por ejemplo una sustitución conservativa (p.ej., arginina, serina, histidina), formando así un componente de flagelina sustituido o componente agonista de receptor de tipo Toll sustituido. El componente de flagelina sustituido o componente agonista de receptor de tipo Toll sustituido puede prepararse generando constructos recombinantes que codifican flagelina con las sustituciones mediante medios químicos, mediante la generación de proteínas o péptidos de al menos una porción de la flagelina mediante técnicas de síntesis de proteína o cualquier combinación de las mismas.

El residuo de lisina que está sustituido por un aminoácido (p.ej., arginina, serina, histidina) puede ser al menos un residuo de lisina seleccionado del grupo consistente en lisina 19, 41, 58, 135, 160, 177, 179, 203, 215, 221, 228, 232, 241, 251, 279, 292, 308, 317, 326, 338, 348, 357, 362, 369, 378, 384, 391 y 410 de la SEQ ID NO: 812.

La flagelina puede ser una flagelina de *S. typhimurium* que incluye la SEQ ID NO: 816. El residuo de lisina que está sustituido por un aminoácido (p.ej., arginina, serina, histidina) puede ser al menos un residuo de lisina seleccionado del grupo consistente en lisina 20, 42, 59, 136, 161, 177, 182, 189, 209, 227, 234, 249, 271, 281, 288, 299, 319, 325, 328, 337, 341, 355, 357, 369, 381, 390, 396, 403 414 y 422 de la SEQ ID NO: 816.

La flagelina puede ser flic de *E. coli* que incluye la SEQ ID NO: 814. La flagelina puede ser una flagelina de *S. muenchen* que incluye la SEQ ID NO: 813. La flagelina puede ser una flagelina de *P. aeruginosa* que incluye la SEQ ID NO: 815. La flagelina puede ser una flagelina de *Listeria monocytogenes* que incluye la SEQ ID NO: 820.

Las composiciones de la invención pueden incluir una flagelina que tiene lisinas sustituidas en una región adyacente al motivo C de la flagelina, el motivo N de la flagelina, tanto el motivo C como el motivo N de la flagelina, el dominio 1 de la flagelina, el dominio 2 de la flagelina o cualquier combinación de los mismos. El motivo C y el motivo N de la flagelina y el dominio 1 y el dominio 2 de la flagelina pueden estar implicados en la activación de TLR5 por la flagelina (Murthy, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 279: 5667-5675 (2004)).

La conjugación química de una proteína, péptido o polipéptido con otra molécula puede ser mediante derivatización de un grupo secundario tal como una lisina. Ciertos residuos de lisina en la flagelina están cercanos a o en el dominio 1, el motivo C o el motivo N, motivos que pueden ser importantes en la unión de la flagelina a TLR5. Por ejemplo, los residuos de lisina de los aminoácidos 58, 135, 160 y 410 de la SEQ ID NO: 812 pueden estar sustituidos por al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en un residuo de arginina, un residuo de serina y un residuo de histidina. La derivatización de dichos residuos de lisina hasta, por ejemplo, antígenos conjugados químicamente con flagelinas, puede reducir la capacidad o la afinidad de unión de la flagelina a TLR5 y, por tanto, disminuir la respuesta inmunitaria innata mediada por TLR5. La sustitución de al menos un residuo de lisina en una flagelina que puede estar cercana a regiones de la flagelina que son importantes en la mediación de interacciones con TLR5 (p.ej., motivo C, motivo N, dominio 1) por otro aminoácido (p.ej., arginina, serina, histidina) puede conservar o potenciar la unión de flagelina a TLR5. En una realización particular, la sustitución aminoacídica es una sustitución aminoacídica conservativa por al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en arginina, serina e histidina. Se describen en la presente memoria los reactivos comercialmente disponibles ejemplares para conjugación química.

Ciertos residuos de lisina en la flagelina están en el dominio (dominio 1) y pueden ser importantes para la activación de TLR5. Por ejemplo, los residuos de lisina en las posiciones 58, 135, 160 y 410 de la SEQ ID NO: 812 están en el dominio 1. La derivatización de dichos residuos de lisina hasta, por ejemplo, antígenos químicamente conjugados, puede reducir la bioactividad de TLR5 y, por tanto, disminuir una respuesta inmunitaria innata mediada por TLR5.

- 5 Los residuos de lisina que pueden sustituirse pueden incluir residuos de lisina implicados en la activación de TLR5. Los residuos de lisina en el motivo N (aminoácidos 95-108 de la SEQ ID NO: 812) y/o el motivo C (aminoácidos 441-449 de la SEQ ID NO: 812) pueden ser adecuados para sustitución. La sustitución de ciertos residuos de lisina en la flagelina (p.ej., lisina en la posición aminoacídica 19, 41), por ejemplo, por una arginina, serina o histidina, puede mantener la unión de la flagelina a TLR5 y dejar otras lisinas disponibles para conjugación química con otra molécula tal como un antígeno (p.ej. proteína) u otra molécula tal como otra proteína, péptido o polipéptido.

10 La estructura cristalina de rayos X del fragmento F41 de flagelina de *Salmonella typhimurium* muestra la estructura de dominios de la flagelina (Samatey, F.A., *et al.*, Nature 410: 321 (2001)). La proteína flagelina completa contiene 4 dominios, designados como D0, D1, D2 y D3. Se muestran tres de estos dominios en la estructura cristalina porque la estructura se preparó con un fragmento proteolítico de flagelina completa. Las secuencias aminoacídicas de flagelina de *Salmonella typhimurium* para estas regiones, numeradas respecto a la SEQ ID NO: 812, son como sigue:

D0 contiene las regiones A1 a A55 y S451 a R494

D1 contiene las regiones N56 a Q176 y T402 a R450

D2 contiene las regiones K177 a G189 y A284 a A401

- 20 D3 contiene la región Y190 a V283

Los residuos de lisina ejemplares de la SEQ ID NO: 812 adecuados para sustitución, por ejemplo por arginina, histidina o serina, pueden incluir:

D0 contiene 2 residuos de lisina; K19, K41

D1 contiene 4 residuos de lisina; K58, K135, K160 y K410

- 25 D2 contiene 14 residuos de lisina en las posiciones 177, 179, 292, 308, 317, 326, 338, 348, 357, 362, 369, 378, 384, 391

D3 contiene 8 residuos de lisina en las posiciones 203, 215, 221, 228, 232, 241, 251, 279

- 30 Los residuos de lisina ejemplares adecuados para sustitución incluyen las lisinas en las posiciones 58, 135, 160 y 410 de la SEQ ID NO: 812 (Jacchieri, S. G., *et al.*, J. Bacteriol. 185: 4243 (2003); Donnelly, M.A., *et al.*, J. Biol. Chem. 277: 40456 (2002)). Las secuencias se obtuvieron a partir de la base de conocimiento de proteínas Swiss-Prot localizada en línea en <http://us.expasy.org/sprot/>. Los residuos de lisina que pueden modificarse se indican con un \*.

Los residuos de lisina ejemplares de la SEQ ID NO: 816 adecuados para sustitución pueden incluir:

D0- con 2 lisinas en posiciones 20, 42;

- 35 D1- con 5 lisinas en posiciones 59, 136, 161, 414, 422;

D2 con 16 lisinas en posiciones 177, 182, 189, 299, 319, 325, 328, 337, 341, 355, 357, 369, 381, 390, 396, 403 y

D3 con 7 lisinas en posiciones 209, 227, 234, 249, 271, 251, 281, 288.

- 40 En una realización adicional, la invención es una composición que comprende un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en la que al menos una lisina del componente de flagelina se ha sustituido por al menos un residuo de histidina, activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.

En aún otra realización, la invención es un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en el que el componente de flagelina incluye al menos un residuo de cisteína y activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.

- 45 En otra realización, la invención es un método de estimulación de inmunidad protectora en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en el que el componente de flagelina incluye al menos un residuo de cisteína y activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.



En aún otra realización, la invención es un método de estimulación de inmunidad protectora en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en el que al menos una lisina del componente de flagelina se ha sustituido por al menos una arginina, activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.

5 En todavía otra realización, la invención es un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en el que al menos una lisina del componente de flagelina se ha sustituido por al menos un residuo de serina, activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.

10 En otra realización, la invención es un método de estimulación de una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en el que al menos una lisina del componente de flagelina se ha sustituido por al menos un residuo de serina, activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.

15 En una realización adicional, la invención es un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en el que al menos una lisina del componente de flagelina se ha sustituido por al menos un residuo de histidina, activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.

20 En una realización más, la invención es un método de estimulación de inmunidad protectora en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en el que al menos una lisina del componente de flagelina se ha sustituido por al menos un residuo de histidina, activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5.

25 Es otra realización de la invención un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye un componente agonista de receptor de tipo Toll que es al menos una porción de un agonista de receptor de tipo Toll, en el que el componente agonista de receptor de tipo Toll incluye al menos un residuo de cisteína en una posición en que no aparece un residuo de cisteína en el agonista de receptor de tipo Toll nativo, activando el componente agonista de receptor de tipo Toll un agonista de receptor de tipo Toll.

30 Es otra realización de la invención un método de estimulación de inmunidad protectora en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que incluye un componente agonista de receptor de tipo Toll que es al menos una porción de un agonista de receptor de tipo Toll, en el que el componente agonista de receptor de tipo Toll incluye al menos un residuo de cisteína en una posición en que no aparece un residuo de cisteína en el agonista de receptor de tipo Toll nativo, activando el componente agonista de receptor de tipo Toll un agonista de receptor de tipo Toll.

35 En aún otra realización, la invención es una composición que comprende un componente de antígeno que incluye al menos una porción de un sitio de escisión madurativa de hemaglutinina y un componente agonista que incluye un agonista de receptor de tipo Toll (p.ej., al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en un agonista de receptor de tipo Toll 1, un agonista de receptor de tipo Toll 3, un agonista de receptor de tipo Toll 5, un agonista de receptor de tipo Toll 6, un agonista de receptor de tipo Toll 7 y un agonista de receptor de tipo Toll 9), en el que el agonista de receptor de tipo Toll no es un agonista de receptor de tipo Toll 2 (p.ej., el complejo de proteína de membrana externa (OMPC), tal como OMPC de *Neisseria meningitidis*). El sitio de escisión madurativa de hemaglutinina puede incluir al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en un sitio de escisión madurativa de hemaglutinina de gripe A, un sitio de escisión madurativa de hemaglutinina de gripe B y un sitio de escisión madurativa de hemaglutinina de gripe C.

45 En una realización, el componente de antígeno y el componente agonista de las composiciones de la invención pueden ser componentes de una proteína de fusión. En otra realización, el componente de antígeno está químicamente conjugado con el componente agonista. El componente agonista incluye una composición que comprende un componente de flagelina que es al menos una porción de una flagelina, en la que el componente de flagelina incluye al menos un residuo de cisteína y activando el componente de flagelina un receptor de tipo Toll 5. El componente de antígeno incluye además al menos una porción de una proteína de matriz 2, que puede incluir además un segundo componente agonista que incluye al menos una porción de un segundo agonista de receptor de tipo Toll (p.ej., al menos una porción de al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en un agonista de receptor de tipo Toll 2, un agonista de receptor de tipo Toll 3, un agonista de receptor de tipo Toll 4, un agonista de receptor de tipo Toll 5, un agonista de receptor de tipo Toll 6, un agonista de receptor de tipo Toll 7 y un agonista de receptor de tipo Toll 9). La proteína de matriz 2 puede fusionarse con el segundo componente agonista o conjugarse químicamente con un segundo componente agonista.

55 Un "componente de antígeno", como se usa en la presente memoria, hace referencia a una parte o la totalidad de un antígeno.

Un "componente agonista", como se usa en la presente memoria, hace referencia a una parte o la totalidad de un agonista, tal como un agonista de receptor de tipo Toll.

En una realización adicional, la invención es un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que comprende un componente de antígeno que incluye al menos una porción de un sitio de escisión madurativa de hemaglutinina y un componente agonista que incluye un agonista de receptor de tipo Toll, en el que el agonista de receptor de tipo Toll no es un agonista de receptor de tipo Toll 2.

En una realización más, la invención es un método de estimulación de inmunidad protectora en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición que comprende un componente de antígeno que incluye al menos una porción de un sitio de escisión madurativa de hemaglutinina y un componente agonista que incluye un agonista de receptor de tipo Toll, en el que el agonista de receptor de tipo Toll no es un agonista de receptor de tipo Toll 2.

En aún otra realización, la invención es una composición que incluye al menos una porción de un antígeno de HA (p.ej., el sitio de escisión madurativa) que está fusionada (p.ej. recombinantemente) o conjugada químicamente con al menos una porción de una región de bisagra de una flagelina, un componente de flagelina o una flagelina en la que se ha eliminado la región de bisagra; y al menos una porción de una proteína M2e que está fusionada (p.ej. recombinantemente) o conjugada químicamente con una flagelina o un componente de flagelina, por ejemplo, en el extremo amino o carboxilo de la flagelina o componente de flagelina (véase, por ejemplo, la Figura 48).

En una realización adicional, la invención incluye una proteína, péptido o polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 % y al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con las proteínas, polipéptidos y péptidos de la invención.

El porcentaje de identidad de dos secuencias aminoacídicas (o dos secuencias de ácido nucleico) puede determinarse alineando las secuencias con fines de comparación óptima (p.ej., pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia). Se comparan entonces la secuencia aminoacídica o secuencia de ácido nucleico en las correspondientes posiciones y el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (concretamente, % identidad = n° de posiciones idénticas/n° de posiciones x 100). La longitud de la proteína o ácido nucleico que puede alinearse con fines de comparación es de al menos un 30 %, preferiblemente de al menos un 40 %, más preferiblemente de al menos un 60 % y aún más preferiblemente de al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de la longitud de la secuencia de referencia, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de una porción de proteína de HA (p.ej., HA1-1, HA1-2), proteína de fusión, antígeno o polipéptido.

La comparación real de las dos secuencias puede lograrse mediante métodos bien conocidos, por ejemplo, usando un algoritmo matemático. Se describe un ejemplo preferido no limitante de dicho algoritmo matemático en Karlin *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873-5877 (1993), cuyas enseñanzas se incorporan a la presente como referencia en su totalidad). Dicho algoritmo se incorpora a los programas BLASTN y BLASTX (versión 2.2) como se describe en Schaffer *et al.* (*Nucleic Acids Res.*, 29: 2994-3005 (2001), cuyas enseñanzas se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (p.ej., BLASTN; disponible en el sitio de Internet del National Center for Biotechnology Information). En una realización, la base de datos examinada es una base de datos no redundante (NR) y los parámetros para comparación de secuencia pueden fijarse en: sin filtros; valor esperado 10; tamaño de palabra 3; la matriz es BLOSUM62 y los costes de hueco son por existencia 11 y por extensión 1.

Es otro algoritmo matemático empleado para la comparación de secuencias el algoritmo de Myers y Miller, *CABIOS* (1989), cuyas enseñanzas se incorporan a la presente como referencia en su totalidad. Dicho algoritmo se incorpora al programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de software de alineamiento de secuencia GCG (Accelrys, San Diego, California). Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias aminoacídicas, se usan una tabla de probabilidad de mutaciones PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Son conocidos en la materia algoritmos adicionales para el análisis de secuencia e incluyen ADVANCE y ADAM como se describen en Torellis y Robotti (*Comput. Appl. Biosci.*, 10: 3-5 (1994), cuyas enseñanzas se incorporan a la presente como referencia en su totalidad) y FASTA, descrito en Pearson y Lipman (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444-2448 (1988), cuyas enseñanzas se incorporan a la presente como referencia en su totalidad).

El porcentaje de identidad entre dos secuencias aminoacídicas puede lograrse usando el programa GAP del paquete de software GCG (Accelrys, San Diego, California) usando una matriz Blossom 63 o una matriz PAM250, una penalización por creación de hueco de 12, 10, 8, 6 o 4 y una penalización por extensión de hueco de 2, 3 o 4. En aún otra realización, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico puede lograrse usando el programa GAP del paquete de software GCG (Accelrys, San Diego, California), usado una penalización por creación de hueco de 50 y una penalización por extensión de hueco de 3.

La secuencia de ácido nucleico que codifica una porción de proteína de HA, polipéptido o proteínas de fusión de la invención y polipéptidos de la invención puede incluir secuencias de ácido nucleico que hibridan con secuencias de ácido nucleico o complementos de secuencias de ácido nucleico de la invención, por ejemplo las SEQ ID NO: 53-58, 64, 68, 71, 72, 73, 76, 78, 80, 84, 87, 104, 107, 110, 111, 112, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 137, 139, 142, 143, 146, 147, 150, 167, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191 y 192) y secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias aminoacídicas y proteínas de fusión de la invención (p.ej., las SEQ ID NO: 89-92, 95, 151-160, 177, 209, 210 y 211) en condiciones de hibridación selectiva (p.ej., condiciones de hibridación de alto rigor). Como se usan en la presente memoria, los términos "hibrida a bajo rigor", "hibrida a rigor medio", "hibrida a alto rigor" o "hibrida en condiciones de muy alto rigor" describen condiciones para la hibridación y lavado de secuencias de ácido nucleico. Puede encontrarse orientación para efectuar las reacciones de hibridación, que pueden incluir métodos acuosos y no acuosos, en Ausubel, F.M., *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, N.Y. (2001), cuyas enseñanzas se incorporan a la presente memoria en su totalidad.

Para aplicaciones que requieren una alta selectividad, pueden emplearse condiciones de rigor relativamente alto para formar híbridos. En las disoluciones usadas para algunas hibridaciones basadas en membrana, la adición de un disolvente orgánico tal como formamida permite que ocurra la reacción a menor temperatura. Son condiciones de alto rigor, por ejemplo, condiciones de salinidad relativamente baja y/o alta temperatura. El alto rigor se proporciona mediante NaCl de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,10 M a temperaturas de aproximadamente 50 a aproximadamente 70 °C. Las condiciones de alto rigor permiten números limitados de desapareamientos entre las dos secuencias. Para conseguir condiciones menos rigurosas, la concentración salina puede aumentarse y/o la temperatura puede reducirse. Las condiciones de rigor medio se consiguen a una concentración salina de NaCl de aproximadamente 0,1 a 0,25 M y una temperatura de aproximadamente 37 a aproximadamente 55 °C, mientras que las condiciones de bajo rigor se consiguen a una concentración salina de NaCl de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,9 M, y una temperatura en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 55 °C. La selección de componentes y condiciones para la hibridación es bien conocida por los especialistas en la materia y se revisa en Ausubel *et al.* (1997, "Short Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Nueva York N.Y., unidades 2.8-2.11, 3.18-3.19 y 4-64.9).

Un "sujeto", como se usa en la presente memoria, puede ser un mamífero tal como un primate o un roedor (p.ej., rata, ratón). En una realización particular, el sujeto es un ser humano.

Una "cantidad eficaz", cuando se hace referencia a la cantidad de una composición y proteína de fusión de la invención, hace referencia a aquella cantidad o dosis de la composición y proteína de fusión que, cuando se administra al sujeto, es una cantidad suficiente para eficacia terapéutica (p.ej., una cantidad suficiente para estimular una respuesta inmunitaria en el sujeto). Las composiciones y proteínas de fusión de la invención pueden administrarse en una sola dosis o en múltiples dosis.

Los métodos de la presente invención pueden lograrse mediante la administración de las composiciones y proteínas de fusión de la invención por medios entéricos o parenterales. Específicamente, la vía de administración es por ingestión oral (p.ej., en forma de bebida, comprimido o cápsula) o por inyección intramuscular de la composición y proteína de fusión. Están también englobadas otras vías de administración por la presente invención, incluyendo las vías intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea, y la administración nasal. Pueden emplearse también supositorios o parches transdérmicos.

Las composiciones y proteínas de fusión de la invención pueden administrarse *ex vivo* a las células dendríticas autólogas del sujeto. Después de la exposición de las células dendríticas a la composición y proteína de fusión de la invención, pueden administrarse las células dendríticas al sujeto.

Las composiciones y proteínas de fusión de la invención pueden administrarse solas o pueden coadministrarse al paciente. La coadministración pretende incluir la administración simultánea o secuencial de la composición, proteína de fusión o polipéptido de la invención individualmente o en combinación. Cuando la composición y la proteína de fusión se administran individualmente, el modo de administración puede realizarse suficientemente cercano en el tiempo entre sí (por ejemplo, administración de la composición cercana en el tiempo a la administración de la proteína de fusión), de modo que los efectos sobre la estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto sean máximos. Se concibe también que puedan usarse múltiples vías de administración (p.ej., intramuscular, oral, transdérmica) para administrar las composiciones y proteínas de fusión de la invención.

Las composiciones y proteínas de fusión de la invención pueden administrarse solas o como mezclas con excipientes convencionales, por ejemplo, sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas farmacéutica o fisiológicamente aceptables adecuadas para aplicación entérica o parenteral que no reaccionen perjudicialmente con el extracto. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, disoluciones salinas (tales como disolución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas y carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Dichas preparaciones puede esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampone, sustancias colorantes y/o aromáticas y similares que no reaccionen perjudicialmente con las composiciones, proteínas de fusión o polipéptidos de la invención. Las

preparaciones pueden combinarse también, cuando se desee, con otras sustancias activas para reducir la degradación metabólica. Las composiciones y proteínas de fusión de la invención pueden administrarse por administración oral, tal como una bebida, inyección intramuscular o intraperitoneal o suministro intranasal. Las composiciones y proteínas de fusión solas, o combinadas con una mezcla, pueden administrarse en una sola dosis o en más de una durante un periodo de tiempo para conferir el efecto deseado (p.ej., aliviar o prevenir la infección vírica y aliviar los síntomas de infección vírica tal como infección por gripe o flavivirus).

Cuando se necesita o desea la aplicación parenteral, son mezclas particularmente adecuadas para las composiciones y proteínas de fusión las disoluciones inyectables estériles, preferiblemente disoluciones oleosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones o implantes, incluyendo supositorios. En particular, los portadores para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de dextrosa, disolución salina, agua pura, etanol, glicerol, propilenglicol, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, polímeros de bloque de polioxietileno y similares. Las ampollas son dosificaciones unitarias convenientes. Las composiciones, proteínas de fusión o polipéptidos pueden incorporarse a liposomas o administrarse mediante bombas o parches transdérmicos. Las mezclas farmacéuticas adecuadas para uso en la presente invención son bien conocidas por los especialistas en la materia y se describen, por ejemplo, en "Pharmaceutical Sciences" (17ª Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA) y el documento WO 96/05309, cuyas enseñanzas se incorporan a la presente por referencia.

Las composiciones y proteínas de fusión de la invención pueden administrarse a un sujeto sobre un soporte que presente las composiciones, proteínas de fusión y polipéptidos de la invención al sistema inmunitario del sujeto, generando una respuesta inmunitaria en el sujeto. La presentación de las composiciones, proteínas de fusión y polipéptidos de la invención incluiría preferiblemente la exposición de porciones antigénicas de la proteína vírica para generar anticuerpos. Los componentes (p.ej., PAMP y una proteína vírica) de las composiciones, proteínas de fusión y polipéptidos de la invención están en estrecha proximidad física entre sí sobre el soporte. Las composiciones y proteínas de fusión de la invención pueden unirse al soporte mediante unión covalente o no covalente. Preferiblemente, el soporte es biocompatible. "Biocompatible," como se usa en la presente memoria, significa que el soporte no genera una respuesta inmunitaria en el sujeto (p.ej., la producción de anticuerpos). El soporte puede ser un portador de sustrato biodegradable, tal como una perla polimérica o un liposoma. El soporte puede incluir además alúmina u otros coadyuvantes adecuados. El soporte puede ser un virus (p.ej., adenovirus, poxvirus, alfavirus), bacteria (p.ej., *Salmonella*) o un ácido nucleico (p.ej., ADN de plásmido).

La dosificación y frecuencia (dosis única o múltiples) administradas a un sujeto pueden variar dependiendo de una variedad de factores, incluyendo exposición previa a un antígeno o una proteína vírica, duración de la infección vírica, tratamiento previo de la infección vírica y vía de administración de la composición, proteína de fusión o polipéptido; tamaño, edad, sexo, salud, peso corporal, índice de masa corporal y dieta del sujeto; naturaleza y extensión de los síntomas de exposición vírica, infección vírica y el virus particular responsable de la infección (p.ej., un flavivirus o virus de la gripe), o tratamiento o infección de otro antígeno, tal como un antígeno de la gripe, clase de tratamiento concurrente, complicaciones de la exposición vírica, infección o exposición vírica u otros problemas relacionados con la salud. Pueden usarse otros regímenes o agentes terapéuticos junto con los métodos y composiciones, proteínas de fusión o polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, la administración de las composiciones y proteínas de fusión puede estar acompañada de otros productos terapéuticos víricos o del uso de agentes para tratar los síntomas de una afección asociada a o consecuencia de la exposición al antígeno, tal como una infección por flavivirus (p.ej., fiebre alta, entumecimiento, DHF, meningoencefalitis) o infección por gripe, por ejemplo. El ajuste y manipulación de las dosificaciones establecidas (p.ej., frecuencia y duración) están dentro de las capacidades de los especialistas en la materia.

Los virus de la gripe son virus de ARN monocatenario que pertenecen a la familia vírica *Orthomyxoviridae*. Los virus de la gripe se dividen en tres tipos (A, B, C) determinados por las diferencias antigénicas en los antígenos de ribonucleoproteína (RNP) y matriz (M) de los virus. El virus de la gripe A infecta naturalmente seres humanos y varias otras especies de mamífero, incluyendo cerdos y caballos, y una amplia variedad de especies de aves, y causa epidemias y pandemias en la población humana. El virus de la gripe B parece infectar naturalmente solo seres humanos y causa epidemias en seres humanos. El virus de la gripe C se ha aislado de seres humanos y cerdos, pero generalmente no aparece en epidemias y habitualmente se resuelve con una enfermedad leve en seres humanos.

Los viriones de la gripe maduros están recubiertos por una estructura pleomórfica con un intervalo de diámetro de 80 a 120 nm. El genoma de ARN monocatenario está estrechamente asociado a una nucleoproteína helicoidal y está presente en 7 (gripe C) u 8 (gripe A y B) segmentos separados de ribonucleoproteína (RNP), cada uno de los cuales tiene que estar presente para una replicación exitosa del virus. El genoma segmentado está encerrado en una envoltura de lipoproteína externa. La proteína de matriz 1 (MP1 o a la que se hace referencia también en la presente memoria como "M1") recubre el interior de la envoltura de lipoproteína externa y está unida a la RNP.

La hemaglutinina (HA) es una glucoproteína de superficie en un virus (p.ej., un virus de la gripe) que es responsable de la unión a ácido N-acetilneuramínico (NeuNAc; al que se hace referencia también en la presente memoria como "ácido siálico") en células hospedadoras y de la posterior fusión de las membranas vírica y hospedadora. La HA adquirió su nombre en virtud de su capacidad de causar la aglomeración o aglutinación de eritrocitos. La HA de la gripe es un trímero consistente en tres subunidades monoméricas (HAO). La HA efectúa dos funciones críticas

durante el proceso de infección: unión a un receptor de sialiloligosacárido de superficie celular y fusión de virus y membrana de la célula hospedadora. Después de la unión del trímero de HA a la membrana plasmática de una célula hospedadora, la membrana de la célula hospedadora envuelve el virus en un endosoma e intenta digerir los contenidos del endosoma acidificando su interior y transfiriéndolo a un lisosoma en la célula hospedadora. Sin embargo, el entorno ácido del lisosoma desestabiliza la HA, dando como resultado el desplegamiento parcial de HAO, que expone un sitio sensible a proteasa (el sitio de escisión madurativa) que se escinde por una proteasa de hospedador, formando las subunidades HA1 y HA2, que están conectadas por un solo enlace disulfuro (Wiley, D. C., *et al.*, Annu. Rev. Biochem. 56: 365-394 (1987)). La escisión ocurre en un residuo aminocídico específico y genera un extremo amino hidrófobo para la subunidad HA2. Este extremo hidrófobo de HA2 media la fusión entre la envoltura vírica y la membrana endosómica de la célula hospedadora y libera los contenidos del virión en el citoplasma de una célula, un proceso conocido como desnudación. Por tanto, la escisión del polipéptido HA es un requisito para la infectividad.

Se ha determinado la estructura cristalina de varias hemaglutininas víricas (véanse, por ejemplo, Wilson, I.A., *et al.*, Nature 289: 366-373 (1981); Chen, J., *et al.*, Cell 95: 409-417 (1998); Ha, Y., *et al.*, The EMBO Journal 21: 865-875 (2002); Russell, R.J., *et al.*, Virology 325: 287-296 (2004) y Cox, N.J., *et al.*, en: "Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections", eds. B.W.J. Mathy, *et al.*, Vol. 1 (9ª ed.) Nueva York, NY, Oxford Univ. Press, cap. 32, pág. 634 (1998). Las estructuras cristalográficas de rayos X muestran que la HA está plegada en dos componentes estructurales o dominios- una cabeza globular y un tallo fibroso (véase, por ejemplo, la Figura 1). La cabeza globular incluye HA1, incluyendo aquella parte de HA1 que se une a ácido siálico (a la que se hace referencia también como el "sitio o dominio de unión a receptor" o "sitio o dominio de unión a ácido siálico") y láminas  $\beta$  antiparalelas. El tallo fibroso está más próximo a la membrana vírica y consiste en toda HA1 y parte de HA2, incluyendo el sitio de escisión entre HA1 y HA2.

Existen 15 subtipos conocidos de HA de la gripe A (H1-H15) que comparten entre aproximadamente 40 y aproximadamente 60 % de identidad de secuencia ("World Health Organization BULL." World Health Organ., 58: 585-591 (1980)). Se han aislado virus de la gripe que contienen los 15 subtipos de HA de especies de aves (H5, H7 y H9), equinas (H3 y H7), focas (H3, H4 y H7), ballenas (H1 y H13) y cerdos (H1, H3 y H9). Los subtipos de virus de la gripe A se nombran generalmente según los determinantes antigénicos particulares de HA (H, 15 tipos principales) y neuraminidasa (N, aproximadamente 9 tipos principales). Por ejemplo, los subtipos incluyen gripe A(H2N1), A(H3N2), A(H5N1), A(H7N2), A(H9N2), A(H1/H0), A(H3/H0) y A(H5/H0). El pasado siglo, tres subtipos de gripe A dieron como resultado pandemias: H1 en 1918 y 1977; H2 en 1957 y H3 en 1968. En 1997, un virus aviar H5 y en 1999 un virus H9 dieron como resultado brotes de enfermedad respiratoria en Hong Kong. Se han aislado HA de virus de la gripe de tipo B de seres humanos y focas y no se dividen en subtipos.

Un hospedador infectado con la gripe puede generar una respuesta de anticuerpo ante la cabeza globular de HA que protege a ese hospedador de la posterior infección con la misma cepa de virus al bloquear la interacción entre HA y la célula hospedadora, concretamente, neutralizando la infectividad del virus. Debido a la baja fidelidad y alta tasa de replicación del ARN de la gripe, el virus está experimentando constantemente mutaciones menores en el gen de HA que conservan la estructura de cabeza globular y la interacción con la célula hospedadora, pero pueden permitir al virus de progenie escapar de la vigilancia inmunitaria. Se hace referencia a estas mutaciones puntuales como "deriva antigénica". Además, si se infecta un hospedador individual simultáneamente con dos cepas diferentes de la gripe A, puede surgir un nuevo subtipo de virus como resultado del reagrupamiento o del intercambio de segmentos de ARN o genes entre diferentes cepas de virus de la gripe A. Los virus que surgen del reagrupamiento presentan al sistema inmunitario humano una nueva experiencia antigénica que habitualmente da como resultado una alta morbilidad y mortalidad. Este tipo de cambio antigénico drástico es conocido como "desplazamiento antigénico". Puesto que los virus de la gripe de tipo B circulan casi exclusivamente en seres humanos, estos virus no pueden experimentar reagrupamiento con cepas animales y, por tanto, cambian solo por deriva antigénica.

La inmunidad ante HA puede reducir la probabilidad de infección y la gravedad de la enfermedad si aparece infección. La HA es una diana antigénica importante y la eficacia de las vacunas depende de la coincidencia antigénica entre la cepa de vacuna y la cepa en circulación. Puesto que la proteína de hemaglutinina experimenta fácilmente desplazamiento y deriva antigénicos para escapar de la defensa inmunitaria del hospedador, las vacunas tradicionales deben estar basadas en las cepas de gripe en circulación actuales y actualizarse anualmente. Las actualizaciones anuales de las vacunas de la gripe no solo son costosas sino que requieren también cantidades significativas de tiempo de producción e infraestructura de fabricación. Una composición de vacuna basada en las regiones invariables del virus puede proporcionar una protección reactiva cruzada amplia.

En contraposición con la cabeza globular de la HA, los cambios en los residuos aminoacídicos que rodean el sitio de escisión madurativa de HA están limitados debido a restricciones funcionales. Los residuos aminoacídicos que rodean el sitio de escisión madurativa de HA influyen en el reconocimiento, y por lo tanto escindibilidad, del sitio por la proteasa de hospedador. Puesto que el virus no codifica la proteasa, los cambios en los residuos aminoacídicos que rodean el sitio de escisión madurativa están restringidos. Como consecuencia, un péptido de aproximadamente 20 aminoácidos que cubre el sitio de escisión madurativa permanece genéticamente estable entre los virus de la gripe del mismo subtipo de HA (documento WO ' 2004/080403; Bianchi, *et al.* J. Virol. 79: 7380-7388 (2005)) o como péptidos ramificados (Horvath, *et al.* Immunol. Letters 60: 127-136(1998), Nagy, *et al.* Scand. J. Immunol. 40: 281-291 (1994)).

Es un segundo antígeno altamente conservado de la gripe A el ectodominio de la proteína de matriz 2 (M2e). M2 es una proteína de 97 aminoácidos expresada a bajos niveles en viriones maduros y a niveles mucho mayores en células infectadas. La proteína M2 forma un homotetrámero que funciona como canal iónico que es crítico para la replicación del virus, por tanto las mutaciones en M2e no son bien toleradas como mutaciones en HA. El ectodominio de 24 aminoácidos (M2e) está altamente conservado entre múltiples cepas de la gripe A. En mamíferos, la M2e es poco inmunogénica en su forma nativa. Los anticuerpos contra M2e pueden conferir protección pasiva en modelos animales de infección por gripe A (Treanor, J.J., *et al.*, *J. Virol.* 64: 1375 (1990), Liu, W.P., *et al.*, *Immunol. Lett.* 93: 131 (2004)), no neutralizando el virus y previniendo la infectividad, sino matando las células infectadas y perturbando el ciclo vital vírico (Zebedee, S.L., *et al.*, *J. Virol.* 62: 2762 (1998); Jegerlehner, A.N., *et al.*, *J. Immunol.* 172: 5598 (2004)), lo que puede ser mediante actividad de linfocitos NK dependiente de anticuerpo (Jegerlehner, A.N., *et al.*, *J. Immunol.* 172: 5598 (2004)). La composición que incluye proteínas M2e puede limitar la gravedad de la enfermedad por gripe A permitiendo que la respuesta inmunitaria del hospedador desarrolle inmunidad adaptativa ante el antígeno de la gripe neutralizante dominante, HA.

Las estrategias para gestionar la infección y dolencia resultantes de infección por virus de la gripe no han cambiado significativamente en las últimas cuatro décadas. Debido a la naturaleza estacional de la enfermedad de la gripe, los distintos tipos de virus de la gripe (A y B) que amenazan la población humana y la inestabilidad genética de cada tipo, es necesario reformular una vacuna multivalente cada año, basándose en la predicción epidemiológica de cepas que es probable que circulen en la población humana en la temporada de la gripe próxima. La vacuna se produce a partir de disoluciones madre de cepas víricas prototípicas seleccionadas crecidas en huevos de gallina embrionados. Por tanto, la estrategia actual tiene varias limitaciones que incluyen: (a) la dependencia de la predicción incierta de las cepas en circulación; (b) la dependencia de la capacidad de crecimiento de las cepas apropiadas en huevos de gallina; (c) el sistema de producción basado en huevos tiene riesgos de contaminación de producto; (d) el producto producido en huevos no puede usarse en individuos con alergia a los huevos y (e) un riesgo significativo de que la vacuna multivalente típica no confiera protección ante una cepa pandémica de virus ante el que la población humana no tenga inmunidad preexistente.

El componente protector dominante de la vacuna de la gripe actualmente disponible es la hemaglutinina vírica (HA). Una vacuna más eficaz puede incluir no solo HA específica de cepa, sino antígenos protectores cruzados tales como de M2e y sitio de escisión madurativa. Es también preferible un proceso de producción de vacuna que sea más fiable, económico y escalable que el método basado en huevos actual. Las composiciones, proteínas de fusión y polipéptidos de la invención proporcionan composiciones que incluyen HA, M2e y sitio de escisión madurativa de proteínas de la gripe que pueden estimular una respuesta inmunitaria, específicamente una respuesta inmunitaria protectora, ante varios antígenos de la gripe en el sujeto.

Las enseñanzas de todas las patentes, solicitudes publicadas y referencias citadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad.

## EJEMPLIFICACIÓN

### EJEMPLO 1: DISEÑO DE PORCIONES DE UNA HEMAGLUTININA DE GRIPE A DE ORIGEN NATURAL

#### Materiales y Métodos

Diseño de los constructos de cabeza globular HA1-1, 1-2 y 1-3 para A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). La cepa de la gripe A/Puerto Rico/8/34 (PR8) es una cepa de virus de la gripe A adaptada a ratón bien caracterizada. La estructura cristalina publicada de la HA de PR8 madura (SEQ ID NO: 1) (Gamblin *et al.* 2005. *Science* 303: 1838-1842; número de acceso a PDB 1 RU7) se usó en combinación con la base de datos Molecular Modeling para determinar los límites de los tres constructos de cabeza globular de PR8. La lista completa de estructuras cristalinas resueltas para moléculas de hemaglutinina de la gripe A puede encontrarse en el Protein Data Bank (PDB) o en el sitio web de estructuras del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure>).

Se observó la estructura cristalina tridimensional de HA de PR8 usando el programa Cn3D del sitio web del NCBI. La molécula de HA trimérica tiene la forma de un champiñón. Se hace referencia a la cabeza globular como la porción de la molécula de hemaglutinina en la parte superior que se parece a la cabeza de un champiñón, y se hace referencia al tallo de hélice superenrollada como la parte inferior de la molécula que se parece al tallo del champiñón (Figura 1). La cabeza globular contiene el sitio de unión a sustrato que se une a ácido siálico sobre la superficie celular, y por lo tanto es importante para la entrada vírica. Además, la mayoría de epítopos de anticuerpos neutralizantes están localizados cerca y alrededor de este sitio de unión a receptor, haciendo a la cabeza globular una buena diana para vacunas protectoras. La cabeza globular contiene la mayoría del péptido HA1, incluyendo los residuos numerados de E51 a K327 en PR8, por ejemplo.

Se usó la estructura monomérica de la cadena A de PR8, que engloba la cabeza globular, para guiar el diseño de los constructos HA1-1, 1-2 y 1-3 de PR8 (Figura 1). Los constructos de HA se diseñaron con límites de dominios dentro de la cabeza globular, de modo que cuando la molécula se expresa en una célula hospedadora, la proteína codificada puede plegarse o replegarse espontáneamente *in vitro* para imitar la conformación nativa. Un dominio estructural (al que se hace referencia también en la presente memoria como "dominio") en una proteína es un

elemento de estructura global que es autoestabilizante y a menudo se pliega independientemente del resto de la cadena proteica. La mayoría de los dominios puede clasificarse en plegamientos. Muchos dominios no son únicos de las proteínas producidas por un gen o una familia génica, sino que en lugar de ello aparecen en una variedad de proteínas. Los dominios se nombran y distinguen a menudo porque desempeñan un papel importante en la función biológica de la proteína a la que pertenecen, por ejemplo, el dominio de unión a sustrato de la hemaglutinina puede participar en la unión al sustrato. Debido a que los dominios pueden ser autoestabilizantes, pueden intercambiarse los dominios entre una proteína y otra o asociarse con otras proteínas portadoras mediante ingeniería genética, preparando proteínas quiméricas. Un dominio puede estar compuesto por ninguno, uno o muchos motivos estructurales. En los casos del diseño de constructo de hemaglutinina de la gripe, se conservan muchos motivos estructurales. La selección de límites está guiada por las estructuras cristalinas conocidas. En el caso de PR8, los residuos de E51 a K327 (SEQ ID NO: 1) se pliegan en una estructura compacta que se distingue del resto de las moléculas de HA, es por tanto la región en que centrarse para diseñar los constructos de HA.

Diseño de los constructos de cabeza globular HA1-1, 1-2 y 1-3 para A/Viet Nam/1203/2004 (H5N1). La estructura de HA usada como referencia en el diseño de constructos de cabeza globular de Viet Nam/1203/2004 (H5N1) se describe en Stevens *et al.*, 2006, *Science* 312: 404-410 (número MMDB 38730; número de acceso a PDB 2FKO). Como se describe para los constructos de cabeza globular de PR8 anteriores, se usó la estructura cristalina publicada de A/Viet Nam/1203/2004 HA (SEQ ID NO: 2) madura en combinación con la base de datos Molecular Modeling para determinar los límites de dominios de los tres constructos de cabeza globular de Viet Nam. Se aplicaron los mismos criterios estructurales para la conservación de la estructura secundaria y terciaria del dominio estructural al diseño de constructos de Viet Nam. Aunque las diferentes moléculas de aglutinina pueden diferir en la naturaleza o número de los residuos que comprenden la molécula de hemaglutinina, la estructura global es notablemente similar. Por tanto, el diseño de los límites de dominios para los constructos de cabeza globular de Viet Nam requería la situación de los límites en posiciones estructuralmente equivalentes, pero numéricamente diferentes, en la molécula de HA.

Diseño de los constructos de cabeza globular HA1-1, 1-2 y 1-3 para A/Indonesia/5/2005 (H5N1). La estructura cristalina de HA de Indonesia no se ha resuelto. En general, cuando la estructura cristalina de una HA dada no se ha resuelto, puede usarse la estructura disponible con la mayor identidad de secuencia para guiar el diseño de constructo. En el caso de diseño del constructo de cabeza globular de Indonesia, la estructura más cercana disponible es A/Viet Nam/1203/2004 (Stevens *et al.* 2006, *Science* 312: 404-410; número MMDB 38730; número de acceso a PDB 2FKO), que es del mismo subtipo que A/Indonesia/5/2005.

Para diseñar los constructos de cabeza globular para esta HA, se alineó en primer lugar la secuencia primaria de HA de Indonesia (SEQ ID NO: 3) con la molécula de HA de A/Viet Nam/1203/2004 (H5VN; SEQ ID NO: 2) (identidad de secuencia primaria: 96,13 %). Se realizó el alineamiento de secuencia primaria para A/Viet Nam/1203/2004 HA (H5VN; SEQ ID NO: 2) y A/Indonesia/5/2005 (H51N; SEQ ID NO: 3) usando CLUSTALW y se muestra a continuación, en que (\*) asterisco= identidad, (:) dos puntos= sustitución conservativa; (.) punto= sustitución débilmente conservativa y (espacio)= sustitución divergente.

ES 2 534 332 T3

50

H5IN MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILE  
H5VN MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILE

\*\*\*\*\*

100

H5IN KTHNGKLCDLGKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINPEWSYIVEKAN  
H5VN KKHNGKLCDLGKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINPEWSYIVEKAN

\*\*\*\*\*

150

H5IN PTNDLCYPGSFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSA  
H5VN PVNDLCYPGDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSSHEASLGVSSA

\*\*\*\*\*

200

H5IN CPYLGSPSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKSYNNTNOEDLLVLWGIHHPNDA  
H5VN CPYQGKSSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNTNOEDLLVLWGIHHPNDA

\*\*\*\*\*

250

H5IN AEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVPKIATRISKVNGQSGRMEFFWTILK  
H5VN AEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPRIATRISKVNGQSGRMEFFWTILK

\*\*\*\*\*



300

H5IN PNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGA  
H5VN PNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGA

\*\*\*\*\*

350

H5IN INSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSRLVATGLRNSPQRESRRKKRGLFG  
H5VN INSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSRLVATGLRNSPQRERRRRKKRGLFG

\*\*\*\*\*

400

H5IN AIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAIDGVTNKVNS  
H5VN AIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAIDGVTNKVNS

\*\*\*\*\*

450

H5IN IIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMEN  
H5VN IIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMEN

\*\*\*\*\*

500

H5IN ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESIRN  
H5VN ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRN

\*\*\*\*\*

550

H5IN GTYNYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMMA  
H5VN GTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVA

\*\*\*.\*\*\*\*\*

568

H5IN GLSLWMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO:3)  
H5VN GLSLWMCSNGSLQCR---(SEQ ID NO:2)

\*\*\*\*\*

5 Diseño de los constructos de cabeza globular HA1-1, 1-2 y 1-3 para A/Nueva Caledonia/20/1999 (H1N1). La estructura cristalina de HA de Nueva Caledonia no se ha resuelto. Para diseñar los constructos de cabeza globular para esta HA, se alineó en primer lugar la secuencia primaria de HA de Nueva Caledonia (H1 NC; SEQ ID NO: 4) con dos moléculas de HA estrechamente relacionadas del mismo subtipo (homología de secuencia primaria > 85 %) para las que se han resuelto las estructuras, específicamente el virus H1N1 1918 (igual que los virus A/Carolina del Sur/1/18) (SEQ ID NO: 5) y A/Puerto Rico/8/34 (H1PR8; SEQ ID NO: 1) (Gamblin, *et al.*, *Science* 303, 1838-42 (2004). A/Carolina del Sur/1/18: número MMDB 26943, número de acceso a PDB: 1 RUZ y PR8, número MMDB: 26941 y número de acceso a PDB: 1 RU7). Se realizó el alineamiento de secuencia primaria usando CLUSTALW y se muestra a continuación, en que (\*) asterisco= identidad, (:) dos puntos= sustitución conservativa; (.) punto= sustitución débilmente conservativa y (espacio)= sustitución divergente.

ES 2 534 332 T3

50

H1NC MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL  
H1PR8 MKANLLVLLSALAAADADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL  
\*\*\*\*\*...\*:\*\*\*\*\*

100

H1NC EDSHNGKLCCLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETP  
H1PR8 EDSHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETP  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

150

H1NC NPENGTCPYGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTVTGVSA  
H1PR8 NSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTA  
\*\*\*\*\*...\*\*:\*

200

H1NC SCSHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHHPPN  
H1PR8 ACSHEGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLKNSYVNKKGKEVLVLWGIHHPPN  
:\*\*\*\*\*:\* \*\*:\*:\*\*\*\*\*:\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

250

H1NC IGNQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYWTLL  
H1PR8 SKEQQNIYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERPVRDQAGRMNYYWTLL  
:\*:\*:\*\*\*\*\*:\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*:\*\*\*\*\*\*

300

H1NC EPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDKACQTPQG  
H1PR8 KPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLG  
:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

350

H1NC AINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIA  
H1PR8 AINSSLPYQNIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNTPSIQSRGLFGAIA

\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*\*\*

400

H1NC GFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIE  
H1PR8 GFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNTVIE

\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

450

H1NC KMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERT  
H1PR8 KMNIQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERT

\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

500

H1NC LDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGC-----  
H1PR8 LDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTY

\*\*\*\*\*

550

H1NC -----  
H1PR8 DYPKYSEESKLNREKVDGVKLESMGIYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAIS

565

H1NC ----- (SEQ ID NO: 4)  
H1PR8 FWMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO: 1)

5 Diseño de los constructos de cabeza globular HA1-1, 1-2 y 1-3 para A/Wisconsin/67/2005 (H3N2). La estructura cristalina de HA de Wisconsin no se ha resuelto. Para diseñar los constructos de cabeza globular para esta HA, se alineó en primer lugar la secuencia primaria de HA de Wisconsin (H3Wis; SEQ ID NO: 6) con una molécula de HA de referencia estrechamente relacionada del mismo subtipo (identidad de secuencia primaria: 81,16 %) para la que se había resultado la estructura, específicamente gripe A/X31 subtipo H3N2 (H3X31; SEQ ID NO: 7) (número de acceso a PDB: 1VIU). Se alineó la secuencia de HA de Wisconsin con HA de X31 usando CLUSTAL W y se muestra a continuación, en que (\*) asterisco= identidad, (:) dos puntos= sustitución conservativa; (.) punto= sustitución débilmente conservativa y (espacio)= sustitución divergente. Se encontró que cada aminoácido en X31 tiene la correspondiente coincidencia en la secuencia de A/Wisconsin/67/2005. Se usaron entonces los límites de dominios de la estructura de X31 para identificar los límites de dominios de A/Wisconsin/67/2005.

50

H3Wis QKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGG  
H3X31 QDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSSTGK  
\* .\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

100

H3Wis ICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPY  
H3X31 ICNNPHRILDGIDCTLIDALLGDPHCDVFQNETWDLFVERSKAFSNCYPY  
\*\*.:\*\*.:\*\*\*\*.:\*\*\*\*\*.:\*\* \*\*.:\*\*\*\*\*.:\*\*\*\*\*

150

H3Wis DVDPYASLRSLVASSGTLEFNDESFNWTGVTQNGTSSACKRRSNNFFSR  
H3X31 DVDPYASLRSLVASSGTLEFITEGFTWTGVIQNGGSNACKRGP GSGFFSR  
\*\*\*\*\*.\*.\*\*\*\*\* \*\* \*.\* \*\* ..\*\*\*\*

200

H3Wis LNWLTHLKFYKYPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPGTDNDQIFLHAQASG  
H3X31 LNWLTKSGSTYPVLNVTMPNNDNFDKLYIWGIHHPSTNQEQTSLYVQASG  
\*\*\*\*\*: .\*.\*\*\*\*\*.:\*\*\*\*\*.:\*\*\*.\*:..\* \*.:\*\*\*\*

250

H3Wis RITVSTKRSQQTVIPNIGSRPRIRNIPSRISYWTIVKPGDILLINSTGN  
H3X31 RVTVSTRRSQQTIPNIGSRPWVRLSSRISYWTIVKPGDVLVINSNGN  
\*.:\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.:\*\*\*\*\*.:\*.:\*\*\*\*\*.:\*\*\*\*\*.\*

300

H3Wis LIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRI  
H3X31 LIAPRGYFKMRTGKSSIMRSDAPIDTCISECITPNGSIPNDKPFQNVNKI  
\*\*\*\*\*.:\*\*\*\*\*.\*.\*\*\*\*\*.\*.\*\*\*\*\*.\*.\*\*\*\*\*.\*

329

H3Wis TYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTR (SEQ ID NO: 6)  
H3X31 TYGACPKYVKQNTLKLATGMRNVPEKQT- (SEQ ID NO: 7)  
\*\*\*\*\*.:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

5 **RESULTADOS**

Representación de los límites de dominios para constructos de HA de PR8. Se destacan los límites de dominios seleccionados en la secuencia siguiente (SEQ ID NO: 1) como sigue: los límites de HA1-1 se subrayan una vez (S53-R324 de SEQ ID NO: 1); los límites de HA1-2 se subrayan dos veces (K62-S284 de SEQ ID NO: 1); los límites de HA1-3 se subrayan en negra (N101-G276 de SEQ ID NO: 1). Se dan a continuación descripciones detalladas del diseño y dominios límite de cada subunidad.

10

60  
 MKANLLVLLSALAAADADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDSHNGKLCR  
 120  
LKGIAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELRE  
 180  
 QLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHGKSSFYRNLLWLTEKGSYPKLNKNS  
 240  
 YVNKKGKEVLVLWGIHPPNSKEQONLYQNENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERPQVRDOA  
 300  
 GRMNYWTLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLG  
 360  
 AINSSLPYQNIHPVTIGECPKYVRSAKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGM  
 420  
 IDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNTVIEKMNIQFTA  
 480  
 ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSOLKNNAKEIGNGC  
 540  
 FEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPKYSEESKLNREKVDGVKLESMGIYQILAIYSTVASSL  
 565  
 VLLVSLGAISFWMCNGLQCRICI (SEQ ID NO: 1)

5 Constructo HA1-1 de PR/8 (SEQ ID NO: 8). Para este constructo, se conservaron cuatro (4) enlaces disulfuro conservados haciendo el truncamiento aminoterminal antes de la cisteína en posición 59 de la SEQ ID NO: 1 y el truncamiento carboxiterminal después de la cisteína en posición 319 de la SEQ ID NO: 1. Los enlaces disulfuro conservados se enumeran a continuación: C59-C291, C72-C84, C107-C152 y C295-C319 de la SEQ ID NO: 1. Usando la estructura cristalina citada anteriormente y la base de datos Molecular Modeling (MMDB) para identificar la estructura terciaria y secundaria, se situó el truncamiento aminoterminal en la serina en posición 53 de la SEQ ID NO: 1, que es inmediatamente adyacente al giro enrollado formado por los residuos 50-52 de la SEQ ID NO: 1 (LED). El truncamiento eliminó completamente la hebra  $\beta$  precedente formada por los residuos 44-49 de la SEQ ID NO: 1 [THSVNL (SEQ ID NO: 214)]. Se conservaron la hebra que cubre los residuos 53-58 de la SEQ ID NO: 1 [SHNGKL (SEQ ID NO: 215)] y la hebra  $\beta$  completa asociada a los residuos 59-62 de la SEQ ID NO: 1 [CRLK (SEQ ID NO: 216)]. Aunque en la estructura los residuos 53-58 de la SEQ ID NO: 1 [SHNGKL (SEQ ID NO: 215)] se definen como ovillo aleatorio, estos residuos imitan una hebra  $\beta$  y por tanto sirven para estabilizar las láminas  $\beta$  plegadas definidas por los residuos 307-310 de la SEQ ID NO: 1 [PYQN SEQ ID NO: 217] y los residuos 320-323 de la SEQ ID NO: 1 [PKYV, SEQ ID NO: 218]. Se hizo el truncamiento carboxiterminal en la secuencia de ovillo aleatorio que cubre los residuos 324-327 de la SEQ ID NO: 1 [RSAK, SEQ ID NO: 219] en la arginina en posición 324 de la SEQ ID NO: 1, de tal modo que la cola carboxiterminal que interacciona con HA2 se eliminara completamente.

25 Constructo HA1-2 de PR/8 (SEQ ID NO: 9). Para este constructo, se conservaron dos (2) enlaces disulfuro conservados (C72-C84 y C107-C152 de la SEQ ID NO: 1) haciendo el truncamiento aminoterminal antes de la cisteína en posición 72 de la SEQ ID NO: 1 y el truncamiento carboxiterminal después de la cisteína en posición 152 de la SEQ ID NO: 1. Usando la estructura cristalina citada anteriormente y la base de datos MMD para identificar la estructura terciaria y secundaria, se situaron los truncamientos aminoterminal y carboxiterminal en los bucles [KGI, residuos 62-64 de la SEQ ID NO: 1 y NASMHE (SEQ ID NO: 220), residuos 285-290, de la SEQ ID NO: 1] que conectan dos conjuntos distintos de láminas  $\beta$  plegadas. El truncamiento de la molécula en estos bucles conserva la estructura secundaria circundante, que a su vez conserva la estructura terciaria de la cabeza globular.

30 Se hizo el truncamiento aminoterminal en la lisina en posición 62 de la SEQ ID NO: 1, de tal modo que la hebra  $\beta$  que comprende APLQLG (SEQ ID NO: 221) en los residuos 65-70 de la SEQ ID NO: 1 del conjunto de hebras  $\beta$  distal de la membrana permaneciera totalmente intacta, mientras que la hebra  $\beta$  precedente [CRLK, SEQ ID NO:

216, residuos 59-62, de la SEQ ID NO: 1], que es más próxima a la membrana, se eliminara mayoritariamente. Se hizo el truncamiento carboxiterminal en la serina en posición 284 de la SEQ ID NO: 1, de tal modo que la hebra  $\beta$  [GIITS, SEQ ID NO: 222, residuos 280-284 de la SEQ ID NO: 1] del conjunto de hebras  $\beta$  distal permanezca total o mayoritariamente intacta y la hebra  $\beta$  posterior [CNTK, SEQ ID NO: 223, residuos 291-294, de la SEQ ID NO: 1] del conjunto proximal de hebras  $\beta$  se elimine total o mayoritariamente. La conservación del conjunto distal de hebras  $\beta$  era el determinante principal en la selección del límite de dominio para el constructo HA1-2. La lámina  $\beta$  plegada distal, que está compuesta por hebras  $\beta$  de APLQLG (SEQ ID NO: 221) [residuos 65-70 de la SEQ ID NO: 1], SYIVET (SEQ ID NO: 224) [residuos 94-99 de la SEQ ID NO: 1] y GIITS (SEQ ID NO: 222) [residuos 280-284 de la SEQ ID NO: 1], sirve como elemento estructural secundario estabilizante que asegura una estructura de dominio compacto.

Constructo HA1-3 de PR/8 (SEQ ID NO: 10). Para este constructo, se conservó un (1) enlace disulfuro conservado (C107-C152 de la SEQ ID NO: 1) haciendo el truncamiento aminoterminal antes de la cisteína en posición 107 de la SEQ ID NO: 1 y el truncamiento carboxiterminal después de la cisteína en posición 152 de la SEQ ID NO: 1. Usando la estructura cristalina citada anteriormente y la base de datos MMDB para identificar la estructura terciaria y secundaria, se hizo el truncamiento aminoterminal en la asparagina en posición 101 de la SEQ ID NO: 1, de tal modo que se eliminara completamente la hélice  $\alpha$  precedente [NIAGWLLG, SEQ ID NO: 225, residuos 73-80, de la SEQ ID NO: 1 y una hebra  $\beta$  [SYIVET, SEQ ID NO: 224, residuos 94-99 de la SEQ ID NO: 1, mientras que la hebra  $\beta$  posterior [PGDFI, SEQ ID NO: 226, residuos 109-113 de la SEQ ID NO: 1] se conservaba junto con la hebra NSENGICY, SEQ ID NO: 227 [residuos 101-108 de la SEQ ID NO: 1] que incluye la cisteína conservada en posición 107 de la SEQ ID NO: 1.

Se hizo el truncamiento carboxiterminal cerca del final de la hebra  $\beta$  [AFALSRGF, SEQ ID NO: 228, residuos 270-277 de la SEQ ID NO: 1] El último aminoácido de esta hebra, posición 277 de la SEQ ID NO: 1, es una fenilalanina que se eliminó para no exponer este residuo hidrófobo. Se hizo el truncamiento carboxiterminal en la glicina en posición 276 de la SEQ ID NO: 1 que está entre dos estructuras secundarias. El truncamiento en esta posición mantiene la hebra  $\beta$  precedente [AFALSRG, SEQ ID NO: 229, residuos 270-276 de la SEQ ID NO: 1] mayoritariamente intacta y elimina completamente la hebra  $\beta$  posterior [GIITS, SEQ ID NO: 222, residuos 280-284 de la SEQ ID NO: 1].

Representación de los límites de dominios para el constructo de HA de VNO4. Se destacan los límites de dominios seleccionados en la secuencia siguiente (SEQ ID NO: 2) como sigue: los límites de HA1-1 se subrayan una vez (E50-K323 de SEQ ID NO: 2), los límites de HA1-2 se subrayan dos veces (G62-E284 de SEQ ID NO: 2) y los límites de HA1-3 se subrayan en negrita (N103-G276 de SEQ ID NO: 2). Se dan a continuación descripciones detalladas del diseño y dominios límite de cada subunidad.

60  
 MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKKKHNGKLCDL  
 120  
DGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPVNDLCYPGDFNDYEELKHL  
 180  
 LSRINHFEEKIQIIPKSSWSSHEASLGVSSACPYQKGSSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKRSY  
 240  
 NNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPRIATRISKVNGQSG  
 300  
 RMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGA  
 360  
 INSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNRLVLATGLRNSPQRERRRKRGLFGAIGFIEGGW  
 420  
 QGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLE  
 480  
 RRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELG  
 540  
 NGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGIYQILSIYSTVA  
 565  
 SSLALAIMVAGLSLWMCNGLQCR (SEQ ID NO: 2)

5 Constructo HA1-1 de VNO4 (SEQ ID NO: 11). Para este constructo, se conservaron cuatro (4) enlaces disulfuro conservados haciendo el truncamiento aminoterminal antes de la cisteína en posición 58 de la SEQ ID NO: 2 y el truncamiento carboxiterminal después de la cisteína en posición 318 de la SEQ ID NO: 2. Los enlaces disulfuro conservados se enumeran a continuación: C58-C290, C71-C83, C106-C151 y C294-C318 de la SEQ ID NO: 2. Usando la estructura cristalina citada anteriormente y la base de datos Molecular Modeling (MMDB) para identificar la estructura terciaria y secundaria, se situó el truncamiento aminoterminal en el ácido glutámico en posición 50 de la SEQ ID NO: 2, de tal modo que la hebra  $\beta$  precedente [THAQDI, SEQ ID NO: 230, residuos 43-48 de la SEQ ID NO: 2] se elimine totalmente y la hebra posterior [EKKHNG, SEQ ID NO: 231, residuos 50-55 de la SEQ ID NO: 2] y la hebra  $\beta$  [KLCDDL, SEQ ID NO: 232] formada por los residuos 56-61 de la SEQ ID NO: 2 se dejaran totalmente intactas. Estructuralmente, el péptido aleatorio que comprende los residuos 50-55 de la SEQ ID NO: 2 [EKNHG, SEQ ID NO: 231] imita una hebra  $\beta$  que completa la lámina  $\beta$  plegada distal de membrana para mantener la estructura de dominios intacta. Se hizo el truncamiento carboxiterminal en la región de bucle cercana a los residuos 323-326 de la SEQ ID NO: 2 [KSNR, SEQ ID NO: 233] que sigue a la cisteína en posición 318 de la SEQ ID NO: 2. El truncamiento en este bucle conserva la estructura secundaria porque la hebra  $\beta$  precedente formada por los residuos 319-322 de la SEQ ID NO: 2 [PKYV, SEQ ID NO: 234] permanece totalmente intacta y la hebra  $\beta$  posterior [LVLATG, SEQ ID NO: 235, residuos 327-332 de la SEQ ID NO: 2] se elimina completamente.

20 Constructo HA1-2 de VNO4 (SEQ ID NO: 12). Para este constructo, se conservaron dos (2) enlaces disulfuro conservados (C71-C83 y C106-C151 de la SEQ ID NO: 2) haciendo el truncamiento aminoterminal antes de la cisteína en posición 71 de la SEQ ID NO: 2 y el truncamiento carboxiterminal después de la cisteína en posición 151 de la SEQ ID NO: 2. Usando la estructura cristalina citada anteriormente y la base de datos Molecular Modeling (MMDB) para identificar la estructura terciaria y secundaria, se situó el truncamiento aminoterminal en la glicina en posición 62 de la SEQ ID NO: 2, de tal modo que la hebra  $\beta$  posterior que comprende los residuos 64-68 de la SEQ ID NO: 2 [KPLIL, SEQ ID NO: 236] permanece totalmente intacta, mientras que la hebra  $\beta$  precedente [KLCDDL, SEQ ID NO: 232, residuos 56-61 de la SEQ ID NO: 2] se elimina completamente.

30 Para conservar la estructura secundaria, se hizo el truncamiento carboxiterminal en la región de bucle en el ácido glutámico en posición 284 de la SEQ ID NO: 2, de tal modo que la hebra  $\beta$  precedente [TIMKS, SEQ ID NO: 237, residuos 279-283 de la SEQ ID NO: 2] permaneciera total o mayoritariamente intacta y la hebra  $\beta$  posterior [YGNCN, SEQ ID NO: 238, residuos 287-291 de la SEQ ID NO: 2] se eliminara completamente.

Constructo HA1-3 de VNO4 (SEQ ID NO: 13). Para este constructo, se conservó un (1) enlace disulfuro conservado (C106-C151 de la SEQ ID NO: 2) haciendo el truncamiento aminoterminal antes de la cisteína en posición 106 de la SEQ ID NO: 2 y el truncamiento carboxiterminal después de la cisteína en posición 151 de la SEQ ID NO: 2.

5 Usando la estructura cristalina citada anteriormente y la base de datos Molecular Modeling (MMDB) para identificar la estructura terciaria y secundaria, se situó el truncamiento aminoterminal en la asparagina en posición 103 de la SEQ ID NO: 2, de tal modo que la hebra  $\beta$  precedente [SYIVEK, SEQ ID NO: 239, residuos 93-98 de la SEQ ID NO: 2] se eliminara completamente, mientras que la secuencia de hebra  $\beta$  posterior [PGDFN, SEQ ID NO: 240, residuos 108-112 de la SEQ ID NO: 2] permanecía total o mayoritariamente intacta. Para conservar la estructura secundaria, se hizo el truncamiento carboxiterminal en la región de ovillo aleatorio en la glicina en posición 276 de la SEQ ID NO: 2, de tal modo que la hebra  $\beta$  precedente formada por los residuos 102-105 de la SEQ ID NO: 2 [KGDS, SEQ ID NO: 241 permanece total o parcialmente intacta, la hebra  $\beta$  precedente [EYAYKIVK, SEQ ID NO: 242, residuos 267-274 de la SEQ ID NO: 2] se conserva totalmente y la hebra  $\beta$  posterior [TIMKS, SEQ ID NO: 237, residuos 279-283 de la SEQ ID NO: 2] se elimina completamente.

15 Representación de los límites de dominios para constructos de HA de IND05. La descripción del constructo A/Indonesia/5/2005 está basada en el alineamiento de secuencia con referencia a la estructura de A/Viet Nam/1203/2004. Se destacan los límites de dominios seleccionados en la secuencia siguiente (SEQ ID NO: 3) como sigue: los límites de HA1-1 se subrayan una vez (E50-K323 de SEQ ID NO: 3), los límites de HA1-2 se subrayan dos veces (G62-E284 de SEQ ID NO: 3), los límites de HA1-3 se subrayan en negrita (N103-G276 de SEQ ID NO: 3). Se dan a continuación descripciones detalladas del diseño y dominios límite de cada subunidad.

60

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAODILEKTHNGKLCDL

120

DGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELKHL

180

LSRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYLGSPSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKKSY

240

NNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVPKIATRISKVNGQSG

300

RMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKQCQTPMGA

360

20

INSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NRLVLATGLRNSPQRESRRKRGFLGAIAGFIEGGW

420

QGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVTKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNLE

480

RRLENLKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELG

540

NGCFEFYHKCDNECMESIRNGTYNYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVA

600

SSLALAIMMAGLSLWMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO: 3)

25 Constructo HA1-1 de IND05 (SEQ ID NO: 14). Para este constructo, se conservaron cuatro (4) enlaces disulfuro conservados haciendo el truncamiento aminoterminal antes de la cisteína en posición 58 de la SEQ ID NO: 3 y el truncamiento carboxiterminal después de la cisteína en posición 318 de la SEQ ID NO: 3. Los enlaces disulfuro conservados se enumeran a continuación: C58-C291, C71-C83, C106-C151 y C294-C318 de la SEQ ID NO: 3. Usando la estructura cristalina citada anteriormente y la base de datos Molecular Modeling (MMDB) para identificar la estructura terciaria y secundaria, se situó el truncamiento aminoterminal en el ácido glutámico en posición 50 de la SEQ ID NO: 3, de tal modo que la hebra  $\beta$  precedente [THAQDI, SEQ ID NO: 243, residuos 43-48 de la SEQ ID NO:

30



- 3] se eliminara totalmente y la hebra posterior [EKTHNG, SEQ ID NO: 244, residuos 50-55 de la SEQ ID NO: 3] y la hebra  $\beta$  [KLCDLD, SEQ ID NO: 245] formada por los residuos 56-61 de la SEQ ID NO: 3 se dejaran totalmente intactas. Estructuralmente, el péptido aleatorio que comprende los residuos 50-55 de la SEQ ID NO: 3 [EKTHNG, SEQ ID NO: 244] imita una hebra  $\beta$  que completa la lámina  $\beta$  plegada distal de membrana para mantener la estructura de dominios intacta. Se hizo el truncamiento carboxiterminal en la región de bucle cercana a los residuos 323-326 de la SEQ ID NO: 3 [KSNR, SEQ ID NO: 246] que sigue a la cisteína en posición 318 de la SEQ ID NO: 3. El truncamiento en este bucle conserva la estructura secundaria porque la hebra  $\beta$  precedente formada por los residuos 319-322 de la SEQ ID NO: 3 [PKYV, SEQ ID NO: 247] permanece totalmente intacta y la hebra  $\beta$  posterior [LVLATG, SEQ ID NO: 248, residuos 327-332 de la SEQ ID NO: 3] se elimina completamente.
- 10 Constructo HA1-2 de IND05 (SEQ ID NO: 15). Para este constructo, se conservaron dos (2) enlaces disulfuro conservados (C71-C83 y C106-C151 de la SEQ ID NO: 3) haciendo el truncamiento aminoterminal antes de la cisteína en posición 71 de la SEQ ID NO: 3 y el truncamiento carboxiterminal después de la cisteína en posición 151 de la SEQ ID NO: 3. Usando la estructura cristalina citada anteriormente y la base de datos Molecular Modeling (MMDB) para identificar la estructura terciaria y secundaria, se situó el truncamiento aminoterminal en la glicina en posición 62 de la SEQ ID NO: 3, de tal modo que la hebra  $\beta$  posterior que comprende los residuos 64-68 de la SEQ ID NO: 3 [KPLIL, SEQ ID NO: 249] permaneciera totalmente intacta, mientras que la hebra  $\beta$  precedente [KLCDLD, SEQ ID NO: 245, residuos 56-61 de la SEQ ID NO: 3] se eliminaba completamente. Para conservar la estructura secundaria, se hizo el truncamiento carboxiterminal en la región de bucle en el ácido glutámico en posición 284 de la SEQ ID NO: 3 en la secuencia [ELE, residuos 284-286 de la SEQ ID NO: 3], de tal modo que la hebra  $\beta$  precedente [AIMKS, SEQ ID NO: 250, residuos 279-283 de la SEQ ID NO: 3] permaneciera total o mayoritariamente intacta y la hebra  $\beta$  posterior [YGNCN, SEQ ID NO: 251, residuos 287-291 de la SEQ ID NO: 3] se eliminara completamente.
- 15 Constructo HA1-3 de IND05 (SEQ ID NO: 16). Para este constructo, se conservó un (1) enlace disulfuro conservado (C106-C151 de la SEQ ID NO: 3) haciendo el truncamiento aminoterminal antes de la cisteína en posición 106 de la SEQ ID NO: 3 y el truncamiento carboxiterminal después de la cisteína en posición 151 de la SEQ ID NO: 3. Usando la estructura cristalina citada anteriormente y la base de datos Molecular Modeling (MMDB) para identificar la estructura terciaria y secundaria, se situó el truncamiento aminoterminal en la asparagina en posición 103 de la SEQ ID NO: 3, de tal modo que la hebra  $\beta$  precedente [SYIVEK, SEQ ID NO: 252, residuos 93-98 de la SEQ ID NO: 3] se eliminara completamente, mientras que la secuencia de hebra  $\beta$  [PGSFN, SEQ ID NO: 253, residuos 108-112 de la SEQ ID NO: 3] permanecía total o mayoritariamente intacta. Para conservar la estructura secundaria, se hizo el truncamiento carboxiterminal en la región de ovillo aleatorio en la glicina encontrada en posición 276 de la SEQ ID NO: 3, de tal modo que la hebra  $\beta$  precedente [EYAYIVK, SEQ ID NO: 254, residuos 267-274 de la SEQ ID NO: 3] se conservara totalmente y la hebra  $\beta$  posterior [AIMKS, SEQ ID NO: 250, residuos 279-283 de la SEQ ID NO: 3] se eliminara completamente.
- 20 Representación de los límites de dominios para constructos de HA de Nueva Caledonia. La descripción del constructo de A/Nueva Caledonia/20/199 está basada en el alineamiento de secuencia con referencia a la estructura de A/Puerto Rico/8/34. Se destacan los dominios límite seleccionados en la secuencia siguiente (SEQ ID NO: 4) como sigue: los límites de HA1-1 se subrayan una vez (S53-R324 de SEQ ID NO: 4), los límites de HA1-2 se subrayan dos veces (K62-S284 de SEQ ID NO: 4), los límites de HA1-3 se subrayan en negrita (N101-G276 de SEQ ID NO: 4). Se dan a continuación descripciones detalladas del diseño y dominios límite de cada subunidad.

60

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDSHNGKLCL

120

LKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETPNPENGTCYPGYFADYEELRE

180

QLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHVTGVSASCSHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKS

240

YVNNKEKEVLVLWGVHHPNIGNQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQE

300

GRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFFALSRGFGSGIITSSNAPMDECDACQTPQG

360

AINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSACL~~RMVTGLRN~~PSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGM

420

VDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRM

480

ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSOLKNNAKEIGNGC

540

FEFYHKCNNECMESVKNNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSL

565

VLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO: 4)

5 Diseño del constructo HA1-1 de Nueva Caledonia (SEQ ID NO: 17). Para este constructo, se conservaron cuatro (4) enlaces disulfuro conservados haciendo el truncamiento aminoterminal antes de la cisteína en posición 59 de la SEQ ID NO: 4 y el truncamiento carboxiterminal después de la cisteína en posición 319 de la SEQ ID NO: 4. Los enlaces disulfuro conservados se enumeran a continuación: C59-C291 C72-C84, C107-C152 y C295-C319 de la SEQ ID NO: 4. Usando las estructuras cristalinas de referencia y la MMDB para comprobar las estructuras secundarias, se hizo el truncamiento aminoterminal en la serina en posición 53 de la SEQ ID NO: 4, de tal modo que la hebra  $\beta$  precedente [THVNLLLED, SEQ ID NO: 255, residuos 44-52 de la SEQ ID NO: 4] se eliminara totalmente y las hebras  $\beta$  posteriores SHNGKL, SEQ ID NO: 256 [residuos 53-58 de la SEQ ID NO: 4] y APLQLG, SEQ ID NO: 257 [residuos 65-70 de la SEQ ID NO: 4] se dejaran totalmente intactas. El truncamiento aminoterminal en la secuencia de ovillo aleatorio [SHNGKL, SEQ ID NO: 256, residuos 53-58 de la SEQ ID NO: 4] dejó la estructura secundaria mayoritariamente intacta debido a que imita una hebra  $\beta$  que deja la lámina  $\beta$  plegada intacta. Se hizo el truncamiento carboxiterminal en la arginina en posición 324 de la SEQ ID NO: 4 en la secuencia de ovillo aleatorio [RSAK, SEQ ID NO: 258, residuos 324-327 de la SEQ ID NO: 4] que sigue a la cisteína en posición 319 de la SEQ ID NO: 4. El truncamiento en este ovillo aleatorio conserva la estructura secundaria dejando la hebra  $\beta$  precedente [PKYV, SEQ ID NO: 259, residuos 320-323 de la SEQ ID NO: 4] totalmente intacta mientras que la hebra  $\beta$  posterior [LRMVTG, SEQ ID NO: 260, residuos 328-333 de la SEQ ID NO: 4] se elimina completamente.

20 Diseño del constructo HA1-2 de Nueva Caledonia (SEQ ID NO: 18). Para este constructo, se conservaron dos (2) enlaces disulfuro conservados (C72-C84 y C107-C152 de la SEQ ID NO: 4) haciendo el truncamiento aminoterminal antes de la cisteína en posición 72 de la SEQ ID NO: 4 y el truncamiento carboxiterminal después de la cisteína en posición 152 de la SEQ ID NO: 4. Usando las estructuras cristalinas de referencia y la MMDB para comprobar las estructuras secundarias, se hizo el truncamiento aminoterminal en la lisina en posición 62 de la SEQ ID NO: 4, de tal modo que la secuencia de ovillo aleatorio que comprende [SHNGKLCLLKG, SEQ ID NO: 261, residuos 53-64 de la SEQ ID NO: 4] se retirara parcial o mayoritariamente, la hebra  $\beta$  precedente [THSVNLLLED, SEQ ID NO: 255, residuos 44-52 de la SEQ ID NO: 4] se eliminara completamente y la hebra  $\beta$  posterior [APLQLG, SEQ ID NO: 257, residuos 65-70 de la SEQ ID NO: 4] permaneciera totalmente intacta. Se hizo el truncamiento carboxiterminal en la serina en posición 284 de la SEQ ID NO: 4, de tal modo que la hebra  $\beta$  precedente [SGIITS, SEQ ID NO: 262, residuos 279-284 de la SEQ ID NO: 4] permaneciera totalmente intacta y el ovillo aleatorio posterior [NAPMDECD, SEQ ID NO: 263, residuos 285-293 de la SEQ ID NO: 4] se eliminara total o mayoritariamente.

30 Diseño del constructo HA1-3 de Nueva Caledonia (SEQ ID NO: 19). Para este constructo, se conservó un (1) enlace disulfuro conservado (C107-C152 de la SEQ ID NO: 4) haciendo el truncamiento aminoterminal antes de la cisteína en posición 107 de la SEQ ID NO: 4 y el truncamiento carboxiterminal después de C152 de la SEQ ID NO: 4.

Usando las estructuras cristalinas de referencia y la MMDB para comprobar las estructuras secundarias, se hizo el truncamiento aminoterminal en la asparagina en posición 101 de la SEQ ID NO: 4, de tal modo que la hebra  $\beta$  precedente [SYIVET, SEQ ID NO: 264, residuos 94-99 de la SEQ ID NO: 4] se eliminara completamente y la hebra  $\beta$  posterior [PGYFA, SEQ ID NO: 265, residuos 109-113 de la SEQ ID NO: 4] permaneciera totalmente intacta. Para conservar la estructura secundaria, se hizo el truncamiento carboxiterminal en la glicina en posición 276 de la SEQ ID NO: 4, de tal modo que la secuencia de la hebra  $\beta$  precedente [YAFALSRGF, SEQ ID NO: 266, residuos 269-277 de la SEQ ID NO: 4] permaneciera mayoritariamente intacta, mientras que la secuencia de la hebra  $\beta$  posterior [SGIITS, SEQ ID NO: 262, residuos 279-284 de la SEQ ID NO: 4] se eliminaba.

672005 Representación de los límites de dominio para constructos de HA de A/Wisconsin/67/2005. La descripción del constructo de A/Wisconsin/67/2005 está basada en el alineamiento de secuencia con referencia a la estructura de A/X31. Se destacan los límites de dominio seleccionados en la secuencia siguiente (SEQ ID NO: 6) como sigue: los límites de HA1-1 se subrayan una vez (Q44-K310 de SEQ ID NO: 6) los límites de HA1-2 se subrayan dos veces (S54-D271 de SEQ ID NO: 6) y los límites de HA1-3 se subrayan en negrita (S95-G263 de SEQ ID NO: 6). Se dan a continuación descripciones detalladas del diseño y dominios límite de cada subunidad.

60

QKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTTINDQIEVTNATELVQSSSTGGICDSPHQILD

120

GENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEF

180

NDESFNWTGVTQNGTSSACKRRSNNSSFFSRLNWLTHLKFYKYPALNVTMPNNEKFDKLYIW

240

GVHHPGTDNDQIFLHAQASGRITVSTKRSQQTVIPNIGSRPRIRNIPSRISYWTIVKPG

300

DILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRI

329

15 TYGACPRYVKONTLKLATGMRNVPEKQTR (SEQ ID NO: 6)

Diseño del constructo HA1-1 de A/Wisconsin/67/2005 (SEQ ID NO: 20). Para este constructo, se conservaron cuatro (4) enlaces disulfuro conservados haciendo el truncamiento aminoterminal antes de la cisteína en posición 52 de la SEQ ID NO: 6 y el truncamiento carboxiterminal después de la cisteína en posición 305 de la SEQ ID NO: 6. Los enlaces disulfuro conservados se enumeran a continuación: C52-C277, C64-C76, C97-C139 y C281-C305 de la SEQ ID NO: 6. Usando las estructuras cristalinas de referencia y la MMDB para comprobar las estructuras secundarias, se hizo el truncamiento aminoterminal en la glutamina en posición 44 de la SEQ ID NO: 6, justo después del giro estrecho formado por los residuos 42 y 43 de la SEQ ID NO: 6 [LV], de tal modo que la hebra  $\beta$  precedente [TNATE, SEQ ID NO: 267, residuos 37-41 de la SEQ ID NO: 6] se eliminara totalmente, mientras que la hebra  $\beta$  corta entera formada por los residuos QSS [44-46 de la SEQ ID NO: 6] se conservaba. Se hizo el truncamiento carboxiterminal en la secuencia de ovillo aleatorio [PRYVK, SEQ ID NO: 268, residuos 306-310 de la SEQ ID NO: 6] que sigue a la cisteína en posición 305 de la SEQ ID NO: 6, de tal modo que la cola carboxiterminal que interacciona con HA2 se eliminara completamente. Aunque la secuencia carboxiterminal [PRYVK, SEQ ID NO: 268, residuos 306-310 de la SEQ ID NO: 6] se define como un ovillo aleatorio, estructuralmente sirve como una hebra  $\beta$  adicional y estabiliza además las láminas  $\beta$  plegadas definidas por los residuos 44-46 de la SEQ ID NO: 6 [QSS] y los residuos 293-297 de la SEQ ID NO: 6 [PFQNV, SEQ ID NO: 269]. Este conjunto de  $\beta$  plegadas engloba el extremo amino y el extremo carboxilo en un elemento de estructura secundaria estable para asegurar una estructura de dominio compacta.

Diseño del constructo HA1-2 de A/Wisconsin/67/2005 (SEQ ID NO: 21). Para este constructo, se conservaron dos (2) enlaces disulfuro conservados (C64-C76 y C97-C139 de la SEQ ID NO: 6) haciendo el truncamiento aminoterminal antes de la cisteína en posición 64 de la SEQ ID NO: 6 y el truncamiento carboxiterminal después de la cisteína en posición 139 de la SEQ ID NO: 6. Usando las estructuras cristalinas de referencia y la MMDB para comprobar estructuras secundarias, se hizo el truncamiento aminoterminal en los bucles que conectan dos conjuntos distintos de láminas  $\beta$  plegadas. Se hizo el truncamiento aminoterminal en la serina en posición 54 de la SEQ ID NO: 6, de tal modo que la hebra  $\beta$  que comprende los residuos 57-62 de la SEQ ID NO: 6 [QILDGE, SEQ ID NO: 270] del conjunto de hebras  $\beta$  distal de la membrana permaneciera totalmente intacta, mientras que la hebra  $\beta$  proximal de membrana [GGICD, SEQ ID NO: 271, residuos 49-53 de la SEQ ID NO: 6] se eliminaba completamente. Se hizo el truncamiento carboxiterminal en el ácido aspártico en posición 271 de la SEQ ID NO: 6. El truncamiento en esta

posición conservó la estructura secundaria de tal modo que la cadena  $\beta$  distal de membrana [SSIMRS, SEQ ID NO: 272, residuos 265-270 de la SEQ ID NO: 6] permaneciera intacta, mientras que la hebra  $\beta$  proximal a membrana [APIGK, SEQ ID NO: 273, residuos 272-276 de la SEQ ID NO: 6] se eliminaba. Las láminas  $\beta$  plegadas distales de membrana que comprenden las hebras  $\beta$  QILDGE (SEQ ID NO: 270, [residuos 57-62 de la SEQ ID NO: 6], LFVER (SEQ ID NO: 274) [residuos 86-90 de la SEQ ID NO: 6] y SSIMRS, (SEQ ID NO: 272), [residuos 265-270 de la SEQ ID NO: 6], sirven como elemento estructural secundario estabilizante que asegura una estructura de dominio compacto.

Diseño del constructo HA1-3 de A/Wisconsin/67/2005 (SEQ ID NO: 22). Para este constructo, se conservó un (1) enlace disulfuro conservado (C97-C139 de la SEQ ID NO: 6) haciendo el truncamiento aminoterminal antes de la cisteína en posición 97 de la SEQ ID NO: 6 y el truncamiento carboxiterminal después de la cisteína en posición 139 de la SEQ ID NO: 6- Usando la estructura cristalina de referencia y la MMDB para comprobar las estructuras secundarias, se hizo el truncamiento aminoterminal en la serina en posición 95 de la SEQ ID NO: 6, de tal modo que la hélice  $\alpha$  precedente [TLIDALLG, SEQ ID NO: 275, residuos 65-72 de la SEQ ID NO: 6] se eliminara completamente, mientras que la serina en posición 95 de la SEQ ID NO: 6 y la asparagina en posición 96 de la SEQ ID NO: 6 se conservaban junto con la cisteína conservada en posición 97 de la SEQ ID NO: 6. Se hizo el truncamiento carboxiterminal en la secuencia de ovillo aleatorio aproximadamente en la glicina en posición 263 de la SEQ ID NO: 6, de tal modo que la secuencia de ovillo aleatorio que contiene los residuos 261-263 de la SEQ ID NO: 6 [RSG] se mantuviera total o parcialmente intacta, mientras que la hebra  $\beta$  precedente [RGYFKI, SEQ ID NO: 276, residuos 255-260 de la SEQ ID NO: 6] se conservaba totalmente y la hebra  $\beta$  posterior [SSIMRS, SEQ ID NO: 272, residuos 265-270 de la SEQ ID NO: 6] se eliminaba completamente.

## DISCUSIÓN

Partes del dominio de cabeza globular de la proteína hemaglutinina (HA) del virus de la gripe pueden generar anticuerpos neutralizantes (Brand y Skehel, 1972; Eckert, 1973; Jackson *et al.*, 1979; Russ *et al.*, 1981) y la estructura globular discreta de este dominio se pensó que constituía un fragmento de proteína que podría expresarse en bacterias y replegarse, o expresarse y secretarse por un hospedador eucariótico, evitando así los problemas de expresión y purificación que se han encontrado produciendo proteína HA completa.

El constructo de HA mayor (al que se hace referencia también en la presente memoria como "fragmento de HA") fusionado con STF2, HA1-1 (SEQ ID NO: 8, 11, 14, 17, 20) engloba la mayoría o probablemente toda la región globular del dominio de cabeza HA1 de origen natural (tipo silvestre). Se libera un fragmento de origen natural de HA1 muy similar al constructo HA1-1 del virus con una proteólisis limitada (Bizeband *et al.*, 1995). Por tanto, el análisis estructural y los datos experimentales sugieren que el constructo HA-1 debería plegarse eficazmente, producido en bacterias o eucariotas, y mantener una estructura de tipo nativo estable. De forma similar, se espera que todo el HAO, la porción externa de la molécula de HA fuera de la membrana vírica (SEQ ID NO: 23) consistente en HA1 y HA2, pero excluyendo el péptido señal (17 aa), péptido interno en la membrana vírica (12 aa) y dominio transmembrana (24 aa), debería alcanzar su conformación nativa cuando se expresa en un hospedador eucariótico o puede replegarse en un estado nativo *in vitro* cuando se expresa en bacterias. Los dos fragmentos de HA menores (HA1-2 (SEQ ID NO: 9, 12, 15, 18, 21) y HA1-3 (SEQ ID NO: 10, 13, 16, 19, 22)) truncan la región del dominio de cabeza distal del sitio de unión a receptor de manera que puede desestabilizar el fragmento de proteína resultante (HA1-3) o exponer las cadenas laterales de unos pocos residuos hidrófobos grandes (HA1-2). Por esta razón, se introdujeron mutaciones experimentales en los constructos HA1-2 y HA1-3, designadas como HA1-2*mut* (SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32) y HA1-3*mut* (SEQ ID NO: 25, 27, 29, 31, 33). Las sustituciones hechas en el constructo HA1-3*mut* (SEQ ID NO: 25, 27, 29, 31, 33) introducen residuos cargados de forma opuesta en las hebras opuestas que se dejan expuestas por los truncamientos de HA1-3. "HA *mut*," como se usa en la presente memoria, significa que un aminoácido en la HA nativa o de origen natural se ha sustituido por un aminoácido que no aparece en la HA nativa o de origen natural. Los residuos sustituidos pueden formar un puente salino y estabilizar una estructura que de otro modo puede plegarse mal, o nada en absoluto. Por ejemplo, en PR8, se reemplazó G105 por glutamato y se sustituyó Y115 por lisina (SEQ ID NO: 25). El glutamato cargado negativamente interactuaba con el residuo de lisina cargado positivamente de modo que el péptido N-terminal 1-8 de SEQ ID NO: 25 [NSENEICY, SEQ ID NO: 277] se estabilizaba por interacción carga-carga con la lisina 15 localizada en el extremo N de la hélice corta 15-22 de SEQ ID NO: 25 [KEELREQL, SEQ ID NO: 278] en el centro de la molécula. Para el constructo HA1-2, los truncamientos pueden conducir a la exposición de cadenas laterales hidrófobas, lo que no se esperaría que afectara a la expresión de la proteína. Sin embargo, los residuos expuestos pueden conducir a la agregación de la proteína expresada o a la inestabilidad de la proteína expresada. Para evitar la agregación y potenciar la estabilidad de la molécula expresada, se sustituyeron los pocos residuos hidrófobos grandes que se expusieron por aminoácidos más neutros, generando HA1-2*mut* (SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32). Estas sustituciones pueden dar como resultado una proteína que es más susceptible de un proceso de fabricación robusto y/o estabilidad a largo plazo.

## EJEMPLO 2: DISEÑO DE PORCIONES DE UNA HEMAGLUTININA DE GRIPE B DE ORIGEN NATURAL

### Materiales y Métodos

Diseño de los constructos de cabeza globular HA1-1, 1-2 y 1-3 para B/Lee/40. Las consideraciones estructurales de una vacuna de HA de gripe B son similares a las de la gripe A, concretamente el límite de dominios de la cabeza

- globular de HA debe identificarse de modo que la proteína de fusión flagelina-HA pueda plegarse correctamente o replegarse correctamente para exponer los epítomos antigénicos apropiados. Al contrario que la gripe A, no están disponibles estructuras cristalográficas de rayos X bien definidas para HA de la gripe B, por tanto es más difícil definir sin ambigüedades el límite de dominios de la cabeza globular. Por lo tanto, el modelo de HA de gripe B debe predecirse basándose en modelos bioinformáticos y estructurales (Tung *et al.* 2004. *J. Gen. Vir.* 85, 3249-3259). Estos investigadores usaron un enfoque "basado en el conocimiento" que depende de un alto grado de homología de secuencia entre la estructura conocida del banco de datos de proteínas y la estructura desconocida diana. En general, este enfoque se beneficia más de una identidad de secuencia de al menos un 35 % entre las proteínas conocida y diana.
- En el caso de la gripe B, los modelos más cercanos proceden de A/cerdo/Hong Kong/9/98 (SEQ ID NO: 34) (24 % de identidad, código de acceso a PDB 1 JSD) y A/Aichi/2/68 (SEQ ID NO: 35) (21 % de identidad, código de acceso a PDB 1 HGF). Aunque las identidades de secuencia entre el modelo diana HA de B/Lee/40 (SEQ ID NO: 36) y los modelos de molde conocidos son sustancialmente menores que el mínimo deseado del 35 %, la estrecha similitud de las funciones y plegamientos terciarios de las proteínas HA de la gripe A, a pesar de su divergencia de secuencia (H1, H3, H5 y H9 comparten solo un 18 % de identidad de secuencia), sugiere una predicción posiblemente exitosa de la estructura de HA de gripe B usando el modelo de HA de gripe A. Además, la proteína HEF de la gripe C (fusión de hemaglutinina-esterasa) se pliega de forma similar a la estructura de HA de gripe A a pesar de una identidad de secuencia aún menor que cualquiera de la comparación A/B.
- Puesto que es conocida la estructura cristalina de HEF de la gripe C (número de acceso a PDB 1 FLC, número de acceso a MMDDB 12663), Tung *et al.* incluyeron el conocimiento de la similitud de estructura entre las proteínas HEF de C y HA de gripe A conocida para predecir la estructura de HA de gripe B. Tung *et al.* alinearon en primer lugar la secuencia de HEF de C/Johannesburg/1/66 (SEQ ID NO: 37) con una secuencia de cada uno de los 15 subtipos de HA de virus de la gripe A (<http://flu.lanl.gov>) usando CLUSTALW (Thompson *et al.* 1994. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680) y recopilaron un perfil basado en el alineamiento de estructura informada.
- Se capturaron y asignaron los rasgos estructurales secundarios conservados, así como las variaciones entre los tipos y subtipos por año y especie de hospedador. Alinearon entonces además el perfil de A/C aumentado con un alineamiento de secuencias de HA de gripe B, incluyendo B/Lee/40. Se usaron las técnicas de modelización de homología de Tung (1999) para construir el modelo de B/Lee/40.
- Brevemente, hicieron coincidir en primer lugar las estructuras de cadena principal de la diana con las del molde en las regiones alineadas. Las inserciones en la diana respecto al molde se trataron como bucles con estructura final conocida. El alargamiento de la estructura predicha acomodó las inserciones en el molde respecto a la diana. Se modelizaron las estructuras de cadena principal de los bucles usando un método de muestreo de bucle Monte Carlo eficaz (Tung, 1997; Ryu *et al.*, 1998). Una vez se modelizó la estructura de cadena principal, se unieron los átomos de cadena secundaria. Como la cabeza de la molécula de HA es compacta, está disponible un espacio limitado para situar los átomos de cadena secundaria. Por ello, en el análisis, se inicializaron los ángulos de torsión de cadena lateral para que fueran iguales o cercanos a los de la estructura de molde. Esta consideración es particularmente útil para evitar choques entre cadenas laterales en la estructura modelizada. Finalmente, se sometieron los modelos con todos los átomos a una tanda corta de minimización de energía (1000 ciclos) usando AMBER (Weiner *et al.*, 1986) para aliviar la interacción estérica desfavorable y para optimizar la estereoquímica. Se comprobó la calidad del modelo diana por PROCHECK (Wilson *et al.* 1998. *J. Mol. Biol.* 276, 417-436) y se comprobó la funcionalidad por acoplamiento de sustrato para ensayar si el sitio de unión a sustrato modelo puede acomodar el análogo de receptor natural sialil-lactosa como se ha observado en la estructura cristalina de HA de A/Aichi/2/68 (Weis *et al.* 1988. *Nature* 333, 426-431). El modelo de B/Lee/40 simulado parece razonable en una gráfica de Ramachandran (Wilson *et al.* 1998, *J. Mol. Biol.* 276, 417-436) y no muestra choque estérico cuando se acopla la molécula de sialil-2,3-lactosa en el sitio de unión a sustrato del modelo de B/Lee/40, indicando una estereoquímica correcta. Por lo tanto, se usó el modelo de B/Lee/40 para guiar el diseño de vacunas de subunidades de HA de la gripe B.

## Resultados y discusión

- Representación de los límites de dominio para constructos de HA de B/Lee/40. Se destacan los límites de dominio seleccionados en la secuencia siguiente como sigue: los límites de HA1-1 se subrayan una vez (T48-K340 de SEQ ID NO: 36) y los límites de HA1-2 se subrayan dos veces (K60-G299 de la SEQ ID: 36). Se dan a continuación descripciones detalladas del diseño y dominios límite de cada subunidad.

60

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVGIPLTTTTPTKSHFANLK

120

GTQTRGKLCPCNCFNCTDLDVALGRPKCMGNTPSAKVSILHEVKPATSGCFPIMHDKIR

180

QLPNLLRGYENIRLSTSNVINTETAPGGPYKVGTS~~G~~SCPNVANGNGFFNTMAWVIPKDNN

240

KTAINPVTVEVPYICSEGEDQITVWGFHSDDKTQMERLYGDSNPQKFTSSANGVTTHYVS

300

QIGGFNPQTEDEGLKQSGRIVVDYMVQKPGKGTGIVYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKGS

360

LPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPAKLLKE

420

RGFFGAIAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNYLSELE

480

VKNLQRLSGAMNELHDEILELDEKVDDLADTSSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALE

540

RKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGDFSLPTFDSL NITAASLND

584

DGLDNHTILLYSTAASSLAVTLMIAIFIVYMVSRDNVSCSICL (SEQ. ID NO: 36)

Las coordenadas del modelo de B/Lee/40 simulado están disponibles en el Protein Data Bank con el código de acceso 1 TX1. Se convirtió el archivo pdb en el formato de MMDB (Molecular Modeling Data Base) usando

- 5 Se observó entonces el modelo de la estructura de 1TX1 por Cn3D y se guardó la estructura en formato de MMDB. Basándose en el mismo principio usado para diseñar los constructos HA1-1 y HA1-2 de gripe A, se detallaron los límites de dominio de HA-1 y HA 1-2 de B/Lee/40 examinando la estructura del modelo. HA1-1 de B/Lee/40 (SEQ ID NO: 38) incluye la parte superior globular de epítopos concentrados, la lámina  $\beta$  distal de membrana y un sándwich  $\beta$  adicional localizado por debajo de la lámina  $\beta$  distal de membrana. El extremo amino de HA1-1 empieza en el residuo 48 y acaba en el residuo 340 (TTTPTK (SEQ ID NO: 279)...CPIWVK (SEQ ID NO: 280)) de la SEQ ID NO: 36). El HA1-2 de B/Lee/40 (SEQ ID NO: 39) se diseñó retirando el sándwich  $\beta$  de HA1-1. HA1-2 empieza en el residuo 60 y acaba en el residuo 299 (KGTQTR (SEQ ID NO: 281)...SKVIKG (SEQ ID NO: 282)) de la SEQ ID NO: 36. Para confirmar la selección de límites, se emplearon también otros métodos independientes. El primer método usado fue el alineamiento de secuencia primaria. Se alineó la secuencia de A/Aichi/2/68 (SEQ ID NO: 35) con la secuencia de B/Lee/40 (SEQ ID NO: 36). Se alinearon los límites de HA1-1 (SEQ ID NO: 40) (residuos 60-326 QSSSTG (SEQ ID NO: 283)...CPKYVK (SEQ ID NO: 284)) y HA1-2 (SEQ ID NO: 41) (residuos 72-287; HRILDG (SEQ ID NO: 285)...SIMRSD (SEQ ID NO: 286)) de A/Aichi/2/68 estrechamente con aquellos de B/Lee/40, apoyando las selecciones de límites usando el modelo simulado. Se hizo un ajuste de residuos para evitar exponer los residuos hidrófobos en cualquier extremo del constructo. Por tanto, la predicción de estructura tridimensional coincide muy bien con el alineamiento de secuencia primaria.
- 10
- 15
- 20

- El segundo método usado fue la predicción de estructura secundaria. El límite de dominios se localiza habitualmente en el bucle o región de giro sin invadir mucho los elementos estructurales secundarios tales como hélice  $\alpha$  y lámina  $\beta$ , especialmente el centro del paquete de hélice  $\alpha$  o lámina  $\beta$ . Se usó este criterio para comprobar doblemente si la selección de límites hecha a partir de la estructura tridimensional simulada está de acuerdo con la predicción de estructura secundaria independiente. Se usó el programa PHD (<http://ca.expasy.org/tools> → Herramientas de proteómica y análisis de secuencia → Herramientas de estructura secundaria y terciaria → PredictProtein) para efectuar la predicción de estructura secundaria. Aparte de dos de los residuos carboxiterminales de HA1-2 que se superponen con una hélice  $\alpha$  corta (5 aminoácidos), todos los demás residuos límite caen dentro de las regiones de bucle, indicando una selección de límites razonable. Los resultados de PHD se enumeran a continuación, en que AA es la secuencia aminoacídica; OBS\_sec es la estructura secundaria observada: H = hélice, E = lámina extendida, blanco = otros (bucle); PROF\_sec: estructura secundaria predicha por PROF: H = hélice, E = (lámina) extendida, blanco = otros (bucle), PROF = predicción por red de perfiles PROF de Heidelberg; Rel\_sec: índice de fiabilidad para la predicción de PROFsec (0 = baja a 9 = alta).
- 25
- 30

- Para la presentación breve, se marcaron las predicciones fuertes con '\*'; SUB\_sec: subconjunto de predicciones de PROFsec para todos los residuos con una exactitud media esperada > 82 %. NOTA: para este subconjunto se usan los siguientes símbolos: L: es bucle (para el que usa el ' ' anterior) .: significa que no se hace predicción para este residuo, ya que la fiabilidad es: Rel < 5; O\_3\_acc: accesibilidad relativa a disolvente observada (acc) en 3 estados: b = 0-9 %, i = 9-36 %, e = 36-100 %; P\_3\_acc: accesibilidad relativa a disolvente predicha por PROF (acc) en 3 estados: b = 0-9 %, i = 9-36 %, e = 36-100 %; Rel\_acc: índice de fiabilidad para la predicción de PROFacc (0 = baja a 9 = alta).
- 35
- 40

## ES 2 534 332 T3

Para la presentación breve, se marcaron las predicciones fuertes con "\*\*"; SUB\_acc: subconjunto de predicciones de PROFacc para todos los residuos con una correlación media esperada > 0,69 (tablas en el encabezado).

NOTA: para este subconjunto se usan los siguientes símbolos:

I: es intermedio (para el que se usa el " " anterior)

5 .: significa que no se hace predicción para este residuo, ya que la fiabilidad es < 4.

.....1.....2.....3.....4.....5

AA MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTT

OBS sec

PROF sec EEEEEEEEE EEEEEEE EEEEE EEEEEEEEE

Rel sec 90456542111257762677454037753444441276147765653203

SUB sec L..EEE.....LLLL.EEE.E...LLL.....LL..EEEEEE....

O 3 acc bbb

P 3 acc ee bbbbbbbbeeb bbbbbbb eeee b bb eebeeb b bbe

Rel acc 33169997521111032778921201222233322135234021321012

SUB acc ...bbbbbb.....bbbb.....e..b.....

.....6.....7.....8.....9.....10

AA PTKSHFANLKGTOGRKLCPCFNCTDLVALGRPKCMGNTPSAKVSILH

OBS sec

PROF sec EEEE EEEEE EEEE

Rel sec 67752200245344675222033211232342043234337875203787

SUB sec LLLL.....L...LLL.....LLL...EEE

O 3 acc bbb

P 3 acc eee bbe eeeeeee eb bbbbbbbb b b ee eeeeb bbb

Rel acc 23201011020002300210201031223343310100210221541265

SUB acc .....b.....eb..bb

.....11.1.....12.1.....13.1.....14.1.....15.1

ES 2 534 332 T3

AA EVKPATSGCFPIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTSNVINTETAPGGPY  
OBS sec  
PROF sec EE HHHHHHHHHH EEEE EE  
Rel sec 50566441224778858887664221002304663021003444556531  
SUB sec E.LLL.....LLLLHHHHHHH.....EE.....LLLL..

O 3 acc bbb  
P 3 acc b eeee bbbb e b ebbabee eeb eeeee  
Rel acc 12210110221001337264350314531332301200011120132011  
SUB acc .....e.bi.b...be.....

.....16.1,.....17.1,.....18.1,.....19.1,.....20.1

AA KVGTSGSCPNAVANGNGFFNTMAWVIPKDNKTAIPVTVEVPYICSEGED  
OBS sec  
PROF sec HHHHHHHHHH EEEEE  
Rel sec 24431001255662036787888752378864236641012244157874  
SUB sec .....LLLL...HHHHHHHHH..LLLL..LL.....LLLL.

O 3 acc bbb  
P 3 acc bbbabee ee bbbbbbb bbeeeee ee ebeb b b eee  
Rel acc 11111012110301026314921522122321112112322203203212  
SUB acc .....b..bb..b.....

.....21.1,.....22.1,.....23.1,.....24.1,.....25.1

AA QITVWGFHSDDKTQMERLYGDSNPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTE  
OBS sec  
PROF sec EEEEEEE HHHHHH EEEEE EEEEEEE  
Rel sec 47897532588742544320368853775200122343201275331035  
SUB sec .EEEE..LLLL..H.....LLLL.EEE.....LL.....L

O 3 acc bbb



ES 2 534 332 T3

P 3 acc bbbbbbbbbb eeee b eeeeeeb b b e e e ebee b e  
Rel acc 19696993033223122210203213224011122211311001202001  
SUB acc .bbbbbb.....b.....

.....26.1,.....27.1,.....28.1,.....29.1,.....30.1

AA DEGLKOSGRIVVDYMOVQKPGKTGTIVYQORGILLPQKVWCASGRSKVIKGS

OBS sec

PROF sec EEEEEEEEE EEEEE EEE EEEEE EEEE

Rel sec 56754320377888983577247886434023022235520330245401

SUB sec LLLL.....EEEEEEE.LLL..EEEE.....EE.....E...

O 3 acc bbb

P 3 acc eee bbbbbbb bbbb ee b b bbbbbbb bb b eeb bbe e

Rel acc 17211105270744553301222473010244520230221020211103

SUB acc .e.....b.b.bibbb.....ib.....bbb.....

.....31.1,.....32.1,.....33.1,.....34.1,.....35.1

AA LPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTK

OBS sec

PROF sec HHH HHHHH HHHHH

Rel sec 32233333000113432246764334340342334133220003551573

SUB sec .....LLL.....HH.LL.

O 3 acc bbb

P 3 acc e e e bb ee b bbbebbe be bb bbbbb

Rel acc 10010011112110110111101210102102111021712452461321

SUB acc .....b..bb.bb....

.....36.1,.....37.1,.....38.1,.....39.1,.....40.1

AA YRPPAKLLKERGFPGAIAAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLK

OBS sec

ES 2 534 332 T3

PROF sec EEEEHHHH EEEEE H  
Rel sec 56853211324203110113404531100120021023564325530623  
SUB sec LLLL.....L.....LL...EE..L..

O 3 acc bbb  
P 3 acc b eee be bbbbbbbbbbbbb bbbbbbbbbbbbb bbbbbbb e  
Rel acc 00011411202355999999623520456353043010011315264032  
SUB acc .....e.....bbbbbbbbb..b..bbb.b..b.....b.bb...

.....41.1,.....42.1,.....43.1,.....44.1,.....45.1

AA STQEAINKITKNLNYLSELEVKNLQRLSGAMNELHDEILELDEKVDDLRA  
OBS sec

HH

PROF sec HHH  
Rel sec 47888989873212477733101234446677898888878756210111  
SUB sec :HHHHHHHHH.....HHH.....HHHHHHHHHHHHHHHH.....

O 3 acc bbb  
P 3 acc bbbbeebbbe b bbee beebbeb ebbembe beeb eebee  
Rel acc 28049825725342322312063124534063444467553254223101  
SUB acc .b.ebb.eb.e.b.....e...eb.e.b.ebbeibee..ee.....

.....46.1,.....47.1,.....48.1,.....49.1,.....50.1

AA DTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFE  
OBS sec

PROF sec HHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH EEE  
Rel sec 0364547777753464114550578879888887664424540663252  
SUB sec ..H.H.HHHHHHH..L....LL.HHHHHHHHHHHHHHH.....H..LL..E.

O 3 acc bbb  
P 3 acc bbbb bb bbbbb eebb e e b eb e b e b e bee eebbbb

ES 2 534 332 T3

Rel acc 04450592968651122001021323439443944173428232012340  
SUB acc .bbb.bb.bbbbbb.....i.bie.bie.b.e.b.....b.

.....51.1,.....52.1,.....53.1,.....54.1,.....55.1

TKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGDFSLPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTILL (SEQ

AA ID NO: 36)

OBS sec

PROF sec EEEE HHHHHHHH HHHH EEEEEEEEE EEEEE

Rel sec 22003402344311355466523223103101002476217776303665

SUB sec .....LL.LLL.....EE..LLLL...EEE

O 3 acc bbb

P 3 acc b beb e bbbbb bbbb ee eebbe beb bbeb eeeeeeb bbb

Rel acc 42120312620271012211330320211224131235303222133868

SUB acc b.....b..b.....e.....b.....bbb

.....56.1,.....57.1,.....58.1. (SEQ ID NO: 36)

AA YYSTAASSLAVTLMIAIFIVYMVSRDNVSCSICL

OBS sec

PROF sec EEEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH EEEEEEE

Rel sec 4310021478888888776321006740346860

SUB sec .....HHHHHHHHHH.....LL....EEE.

O 3 acc bbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbb

P 3 acc bbbbbbbbbbbbbbbbbbbbee eb b bbb

Rel acc 6362366679999996998517101010152400

SUB acc b.b..bbbbbbbbbbbbbb.b.....b.b..

La tercera herramienta que se usa es el análisis de hidrofobia. En general, el núcleo estructural de una proteína tiende a ser un agrupamiento hidrófobo flanqueado por tramos de residuos hidrófilos. Por lo tanto, los límites predichos no deberían localizarse en el centro del núcleo hidrófobo, sino que deberían residir en las regiones hidrófilas flanqueantes. Se representó gráficamente la hidrofobia de la secuencia de B/Lee/40 HA (SEQ ID NO: 36) usando ProtScale (<http://ca.expasy.org/tools> → Análisis de estructura primaria → ProtScale). El análisis de hidrofobia de la secuencia de B/Lee/40 confirmó que los límites seleccionados estaban en las regiones hidrófilas de la proteína (Figura 2). Se enumeran en la siguiente tabla las fuerzas hidrófobas usadas en la gráfica:

5

10

LONGITUD DE SECUENCIA: 584

|  |
|--|
| Usando la escala de <b>Hphob. / Kyte &amp; Doolittle</b> , los valores individuales para los 20 aminoácidos son: |
| Ala: 1,800 Arg: -4,500 Asn: -3,500 Asp: -3,500 Cys: 2,500  |
| Glu: -3,500 Gly: -0,400 His: -3,200 Ile: 4,500 Leu: 3,800 Lys: -3,900  |
| Met: 1,900 Phe: 2,800 Pro: -1,600 Ser: -0,008 Thr: -0,700 Trp:   |
| Tyr: -1,300 Val: 4,200 Asx: -3,500 Glx: -3,500 Xaa: -0,490   |

5 Para identificar los límites de dominio de HA1-1 y HA1-2 de otras moléculas de la gripe B, tales como B/Malasia/2506/2004 (SEQ ID NO: 42), B/Ohio/1/2005 (SEQ ID NO: 43), linaje B/Victoria/2/87 (SEQ ID NO: 787) y B/Shanghái/361/2002 (SEQ ID NO: 44) y linaje B/Yamagata/16/88 (SEQ ID NO: 213), se alineó cada secuencia de HA con la secuencia de HA de B/Lee/40 HA (SEQ ID NO: 36). Los resultados indican que las proteínas HA de la gripe B están mucho más conservadas en comparación con las proteínas HA de la gripe A, especialmente en el dominio de secuencias límite. Por tanto, se usaron los límites identificados en B/Lee/40 para dirigir las selecciones de límite de otras cepas de la gripe B. Se resumen a continuación los límites de dominios resultantes para cada cepa.

- 10 B/Malasia/2506/2004: HA1-1 44-337 (SEQ ID NO: 45) (TTTPTK (SEQ ID NO: 287)-CPIWVK (SEQ ID NO: 288)) HA1-2 56-296 (SEQ ID NO: 46) (KGTETR (SEQ ID NO: 289)-SKVIKG (SEQ ID NO: 290)).
- B/Ohio/1/2005: HA1-1 33-326 (SEQ ID NO: 47) (TTTPTK (SEQ ID NO: 291)-CPIWVK (SEQ ID NO: 292)) HA1-2 45-285 (SEQ ID NO: 48) (KGTKTR (SEQ ID NO: 293)-SKVIKG (SEQ ID NO: 294))
- 15 B/Shanghái/361/2002: HA1-1 33-325 (SEQ ID NO: 49) (TTTPIK (SEQ ID NO: 295)-CPIWVK (SEQ ID NO: 296)) HA1-2 45-284 (SEQ ID NO: 50) (KGTRTR (SEQ ID NO: 297)-SKVIKG (SEQ ID NO: 298))

50

```

BMal  ----IVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTT
BChi  -----DRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTT
BLee  MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTT
BSha  -----DRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTT

```

\*\*\*\*\*

ES 2 534 332 T3

100

BMal PTKSHFANLKGTETRGKLCPCLNCTDL DVALGRPKCTGNIPSARVSILH  
BOhi PTKSHFANLKGTKTRGKLCPCLNCTDL DVALGRPKCTGNIPSAEVSILH  
BLee PTKSHFANLKGQTQTRGKLCPCNCFNCTDL DVALGRPKCMGNTPSAKVSILH  
BSha PIKSHFANLKGTRTRGKLCPCDCLNCTDL DVALGRPMCVGTTPSAKASILH

\* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \*

150

BMal EVRPVTS GCFPIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGSY  
BOhi EVRPVTS GCFPIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINA EKAPGGPY  
BLee EVKPATSGCFPIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTSNVINTETAPGGPY  
BSha EVRPVTS GCFPIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTQNVIDAEKALGGPY

\* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \*

200

BMal KIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDNNKTATNSLTIEVPYICTEGE  
BOhi KIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDNNKTATNSLTIEVPYICTEGE  
BLee KVGTS GSCPNAVANGNGFFNTMAWVIPK-DNNKTAINPVTVEVPYICSEGE  
BSha RLGTS GSCP NATSKSGFFATMAWAVPK-DNNKNATNPLTVEVPYICTEGE

:: \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \*

250

BMal DQITVWGFHSDNEAQMALYGDSPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQT  
BOhi DQITVWGFHSDSETQMAKLYGDSPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQT  
BLee DQITVWGFHSDDKTQMERLYGDSNPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQT  
BSha DQITVWGFHSDDKTQMKNLYGDSNPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFDPQT

\* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \*

300

BMal EDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG  
BOhi EDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG  
BLee EDEGLKQSGRIVVDYMVQKPGKTGTIVYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG  
BSha EDGGLPQSGRIVVDYMVQKPGKTGTIVYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG

\* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \*

350

BMal SLPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIVVK TPLKLANGT  
BOhi SLPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIVVK TPLKLANGT

BLee SLPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGT

BSha SLPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGHCPIWVKTPLKLANGT

\*\*\*\*\*

400

BMal KYRPPAKLLKER-----

(SEQ ID NO: 42)

BOhi KYRPPAKLLKERGF-----

(SEQ ID NO: 43)

BLee KYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADL

(SEQ ID NO: 36)

BSha KYRP-----

(SEQ ID NO: 44)

\*\*\*\*

5 Diseño del constructo HA1-1 de B/Lee/40 (SEQ ID NO: 38). Para este constructo, se conservaron cinco (5) enlaces disulfuro conservados previstos al hacer el truncamiento aminoterminal antes de la cisteína en la posición 69 y el truncamiento carboxiterminal después de la cisteína en posición 335 de la SEQ ID NO: 36. Los apareamientos de disulfuro probables son como sigue: C69 y C72, C75 y C87, C109 y C158, C195 y C289, C309 y C335 de la SEQ ID NO: 36. Usando las estructuras simuladas y la MMDB para comprobar las estructuras secundarias, se hizo el truncamiento aminoterminal en la treonina en posición 48, justo después de la vuelta de hebra  $\beta$  introducida por la prolina 46 seguida de leucina 47 de la SEQ ID NO: 36, de tal modo que la hebra  $\beta$  precedente [TGVI, SEQ ID NO: 299, residuos 42-45 de la SEQ ID NO: 36] se eliminara totalmente, mientras que la hebra  $\beta$  corta entera formada por los residuos TTTP (SEQ ID NO: 300) [residuos 48-51 de la SEQ ID NO: 36] se conservaba. Se hizo el truncamiento carboxiterminal al final de la hebra  $\beta$  PIWV (SEQ ID NO: 301) [residuos 336-340 de la SEQ ID NO: 36] después de la cisteína en posición 335, de tal modo que la cola carboxiterminal que interacciona con HA2 se eliminara completamente. Seis hebras  $\beta$  incluyendo la hebra  $\beta$  C-terminal forman un sándwich  $\beta$  estable definido por las hebras  $\beta$  PIWV (SEQ ID NO: 301) [residuos 336-340 de la SEQ ID NO: 36], PYYTG (SEQ ID NO: 302) [residuos 322 a 326 de la SEQ ID NO: 36] y TTTP (SEQ ID NO: 300) [residuos 48-51 de la SEQ ID NO: 36] (lámina  $\beta$  plegada inferior) y las hebras  $\beta$  DCLHE (SEQ ID NO: 303) [residuos 308-312 de la SEQ ID NO: 38], YGGLN (SEQ ID NO: 304) [residuos 314-318 de la SEQ ID NO: 36] y KAIGN (SEQ ID NO: 305) [residuos 330-334 de la SEQ ID NO: 36] (lámina  $\beta$  plegada superior). Este conjunto de láminas  $\beta$  plegadas incluye tanto el extremo amino como el extremo carboxilo en un elemento de estructura secundaria estable. Dichos truncamientos se hicieron por creer que daban como resultado una estructura de dominio compacto.

25 Diseño del constructo HA1-2 de B/Lee/40 (SEQ ID NO: 39). Para este constructo, se conservaron cuatro (4) enlaces disulfuro conservados previstos al hacer el truncamiento aminoterminal antes de la cisteína en la posición 69 y el truncamiento carboxiterminal después de la cisteína en posición 289 de la SEQ ID NO: 36. Usando la estructura simulada y la MMDB para comprobar estructuras secundarias, se hizo el truncamiento aminoterminal en los bucles que conectan dos conjuntos distintos de láminas  $\beta$  plegadas. Se hizo el truncamiento aminoterminal en la lisina en posición 60, de tal modo que la hebra  $\beta$  que comprende los residuos 62-66 de la SEQ ID NO: 36 [TQTRG, SEQ ID NO: 306] del conjunto de hebras  $\beta$  distal de membrana permaneciera totalmente intacta, mientras que la hebra  $\beta$  proximal de membrana [TTTP, SEQ ID NO: 300, residuos 48-51 de la SEQ ID NO: 36] que forma parte de HA1-1 se eliminaba completamente. Se hizo el truncamiento carboxiterminal en la serina 300 de la SEQ ID NO: 36. El truncamiento en esta posición conservó la estructura secundaria de tal modo que la cadena  $\beta$  distal de membrana [KVIKG, SEQ ID NO: 307, residuos 295-299 de la SEQ ID NO: 36] permanecía intacta, mientras que la hebra  $\beta$  proximal a membrana [DCLHE, SEQ ID NO: 308, residuos 308-312 de la SEQ ID NO: 36] se eliminaba. Las láminas  $\beta$  plegadas distales de membrana que comprenden las hebras  $\beta$  TQTRG (SEQ ID NO: 306) [residuos 62-66 de la SEQ ID NO: 36], SILHEV (SEQ ID NO: 309) [residuos 97-102 de la SEQ ID NO: 36] y KVIKG (SEQ ID NO: 307) [residuos 295-299 de la SEQ ID NO: 36] sirven como elemento estructural secundario estabilizante que se cree que concluye con una estructura de dominio compacto.

B/Malasia/2506/2004, B/Ohio/1/2005 y B/Shanghái/361/2002 siguen la misma estructura de referencia que se describe anteriormente.

**EJEMPLO 3: CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE FLAGELINA-HEMAGLUTININA RECOMBINANTES EN *E. coli*****Materiales y Métodos**

5 Clonación de subunidades de HA de gripe A. Se clonaron subunidades de la cabeza globular de HA de varias cepas de la gripe A y se expresaron solas o como fusiones con flagelina. Se expresaron también en fusión con el dominio de cabeza globular de HA dos proteínas ampliamente usadas como proteínas portadoras en vacunas conjugadas CRM-197 es una toxina de difteria mutada (DTx) de *Corynebacterium diphtheriae* y LTB es la subunidad B de toxina termolábil de *E. coli*.

Se generaron estos constructos con una a cuatro diferentes metodologías:

10 **Método nº 1:** En este protocolo, se optimizaron los codones de un gen de fusión que comprende flagelina (STF2) (SEQ ID NO: 212) y la subunidad HA para expresión en *E. coli* y se obtuvo de un vendedor comercial (DNA2.0 Inc., Menlo Park, CA) mediante síntesis química. Se extirpó el gen con las enzimas *NdeI* y *BlnI*, se purificó en gel el fragmento de inserto, se ligó con pET24a (Novagen, San Diego, CA) que se había digerido con *NdeI* y *BlnI* y se trató con fosfatasa alcalina bacteriana (BAP).

15 **Método nº 2:** Para una clonación sencilla de los genes fusionados con flagelina, se generó un plásmido modular que contiene un único sitio *BlnI* en el extremo 3' del gen de flagelina (STF2) (SEQ ID NO: 212). Esto se realizó introduciendo una mutación silenciosa en los nucleótidos 5'-GTGCTGAGCCTGTTACGT- 3' (SEQ ID NO: 310) [nt 1501 a 1518 de la SEQ ID NO: 212] de STF2, creando un sitio *BlnI* único en el módulo de plásmido, pET24/STF2.blp (SEQ ID NO: 51). Se optimizaron los codones de genes sintéticos para cada antígeno diana para expresión en *E. coli* y se obtuvieron de un vendedor comercial (DNA2.0 Inc., Menlo Park, CA). Se extirparon los genes sintéticos con la enzima *BlnI* y se ligaron por extremos compatibles con pET24/STF2.blp, que se había tratado con *BlnI* y BAP.

20

**Método nº 3:** Usando cebadores de codificación e inversos (Keck Foundation BRLK, Universidad de Yale, Nuevo Haven, CT; Midland Certified Reagent Company, Midland, TX) como se indica para cada constructo, se efectuó la amplificación por PCR usando los moldes de ADN mostrados en cada tabla. Se sometió el producto de PCR a digestión con *BlnI*, se purificó en gel y se ligó con el vector pET24/STF2.blp (SEQ ID NO: 51) previamente preparado por digestión con *BlnI* y tratamiento con BAP.

25

**Método nº 4:** Se generó un módulo de plásmido, pET24/STF2.SG (SEQ ID NO: 52), introduciendo un ligador heptamérico flexible, Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser (S-G-S-G-S-G-S (SEQ ID NO: 311)) en el extremo 3' del gen de STF2. Se creó un sitio *BamHI* único en el ligador para facilitar la clonación de fragmentos de la subunidad de HA en fusión con flagelina. Se obtuvieron genes sintéticos con codones optimizados para expresión en *E. coli* de un vendedor comercial (DNA2.0 Inc., Menlo Park, CA), se extirparon de los plásmidos originales con las endonucleasas de restricción *BamHI* y *BlnI* y se ligaron por extremos compatibles con el módulo pET24/STF2, que se había digerido previamente con *BamHI* y tratado con BAP.

30

En cada caso, se usaron los plásmidos construidos para transformar células TOP10 de *E. coli* competentes y se identificaron los presuntos recombinantes por cribado de PCR y análisis de cartografía de restricción. Se verificó la integridad de los constructos por secuenciación de ADN y se usaron para transformar el hospedador de expresión, BLR3 (DE3) (Novagen, San Diego, CA; nº de cat. 69053). Se seleccionaron los transformantes en placas que contenían kanamicina (50 µg/ml), tetraciclina (5 µg/ml) y glucosa (al 0,5 %). Se recogieron las colonias y se inocularon en 2 ml de medio LB suplementado con kanamicina 25 µg/ml, tetraciclina 12,5 µg/ml y 0,5 % de glucosa y se hicieron crecer durante una noche. Se usaron alícuotas de estos cultivos para inocular cultivos recientes en la misma formulación de medio, que se cultivaron hasta que alcanzaron una  $DO_{600} = 0,6$ , en cuyo momento se indujo la expresión de proteína mediante la adición de IPTG 1 mM y cultivo durante 3 horas a 37 °C. Se recolectaron las células y se analizó la expresión de proteína.

35

40

PAGE-SDS y transferencia Western: Se determinaron la expresión e identidad de proteína mediante electroforesis en gel y análisis de inmunotransferencia. Se recolectaron las células mediante centrifugación y se lisaron en tampón Laemmli. Se diluyó una alícuota de 10 µl de cada lisado en tampón de muestra de PAGE-SDS con o sin DTT 10 mM como reductor. Se hirvieron las muestras durante 5 minutos, se cargaron en gel de poliacrilamida con SDS al 10 % y se sometieron a electroforesis (PAGE-SDS). Se tiñó el gel con Coomassie R-250 (Bio-Rad; Hercules, CA) para visualizar las bandas de proteína. Para transferencia Western, se sometieron a electroforesis 0,5 µl/carril de lisado celular, se electrotransferieron a una membrana de PVDF y se bloquearon con leche en polvo al 5 % (p/v).

45

50

Se sondeó entonces la membrana con anticuerpo anti-flagelina (Inotek; Beverly, MA) o suero de ratón inmune convaleciente de gripe A PR/8/38. Se generó suero inmune de PR/8/34 en ratones BALB/c (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) que recibieron una dosis de exposición subletal determinada experimentalmente de  $8 \times 10^1$  dosis infectantes de embrión (EID) de virus de la gripe PR/8/34. Se dejaron entonces convalecer los animales durante > 21 días después de la infección, en cuyo momento se aisló y clarificó el suero inmune. Después de sondear con anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (Pierce; Rockland, IL), se visualizaron las bandas de proteína con un sustrato cromogénico de fosfatasa alcalina (Promega, Madison, WI). Se seleccionaron clones

55

bacterianos que procuraron bandas de proteína del peso molecular correcto y reactivas con los anticuerpos apropiados para producción de proteína para uso en ensayos biológicos.

5 Se prepararon los constructos derivados de HA de la cepa A/Puerto Rico/8/34 (PR8) (SEQ ID NO: 1) y enumerados en la Tabla 1 mediante la ruta génica sintética descrita en el método n° 1 y el método n° 4. De forma similar, se muestran los constructos derivados de la cepa A/Viet Nam/1203/2004 (SEQ ID NO: 2) en la Tabla 2, se describen los constructos derivados de HA de la cepa A/Indonesia/2005 (IND) (SEQ ID NO: 3) en la Tabla 3 y se describen aquellos de la cepa A/Nueva Caledonia/12/99 (NC) (SEQ ID NO: 4) en las Tablas 4. "IND", como se usa en la presente memoria, hace referencia a "Indonesia". Cuando sea apropiado, los cebadores de ADN y moldes de ADN usados en la reacción de amplificación por PCR se enumeran en la misma tabla.

10 Tabla 1: Constructos de HA de PR8 para expresión en *E. coli*

| SEQ ID NO: | Constructo      | MÉTODO |
|------------|-----------------|--------|
| 53         | STF2.HA1-1      | n° 4   |
| 54         | STF2.HA1-1.his  | n° 4   |
| 55         | STF2.HA1-2      | n° 1   |
| 56         | STF2: HA 1-2mut | n° 1   |
| 57         | STF2.HA1-3      | n° 1   |
| 58         | STF2.HA1-3mut   | n° 1   |
| 59         | HA1-1           | n° 1   |
| 60         | HA1-1.his       | n° 1   |
| 61         | HA1-2.his       | n° 1   |
| 62         | CRM.HA1-2       | n° 1   |
| 63         | LTB.HA1-2       | n° 1   |

Tabla 2: Constructos de HA de VN para expresión en *E. coli*

| SEQ NO: | ID | Constructo    | MÉTODO | Cebador de cod. de SEQ ID NO: | Cebador inv. de SEQ ID NO: | Molde de ADN de SEQ ID NO: |
|---------|----|---------------|--------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 64      |    | STF2.HA1-1    | n° 3   | 65                            | 66                         | 67                         |
| 68      |    | STF2.HA1-2    | n° 3   | 69                            | 70                         | 67                         |
| 71      |    | STF2.HA1-2mut | n° 2   | N/A                           | N/A                        | 72                         |

Tabla 3: Constructos de HA de IND para expresión en *E. coli*

| SEQ NO: | ID | Constructo | MÉTODO | Cebador de cod. de SEQ ID NO: | Cebador inv. de SEQ ID NO: | Molde de ADN de SEQ ID NO: |
|---------|----|------------|--------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 73      |    | STF2.HA1-1 | n° 3   | 74                            | 66                         | 75                         |



| SEQ NO: | ID | Constructo    | MÉTODO | Cebador de cod. de SEQ ID NO: | Cebador inv. de SEQ ID NO: | Molde de ADN de SEQ ID NO: |
|---------|----|---------------|--------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 76      |    | STF2.HA1-2    | n° 3   | 69                            | 77                         | 75                         |
| 78      |    | STF2.HA1-2mut | n° 2   | N/A                           | N/A                        | 79                         |

Tabla 4: Constructos de HA de NC para expresión en *E. coli*

| SEQ NO: | ID | Constructo    | MÉTODO | Cebador de cod. de SEQ ID NO: | Cebador inv. de SEQ ID NO: | Molde de ADN de SEQ ID NO: |
|---------|----|---------------|--------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 80      |    | STF2.HA1-1    | n° 3   | 81                            | 82                         | 83                         |
| 84      |    | STF2.HA1-2    | n° 3   | 85                            | 86                         | 83                         |
| 87      |    | STF2.HA1-2mut | n° 2   | N/A                           | N/A                        | 88                         |

## Resultados

5 Los portadores proteicos tienen una aplicación extendida en vacunas humanas. El material reactivo cruzado (CRM<sub>197</sub>) de toxina de difteria se considera que es ventajoso como molécula portadora en la formulación de varias vacunas conjugadas. Los portadores ejemplares incluyen enterotoxina termolábil (LT) de *E. coli* y su subunidad B (LTB), toxoide del tétanos (TT) y toxina del cólera (CT). Usando CRM<sub>197</sub> y LTB como representantes de este grupo de proteínas portadoras, se han generado constructos en que la cabeza globular de HA de la cepa A/Puerto Rico/8/34 (PR8) (SEQ ID NO: 1) se fusiona con el extremo 3' del gen de CRM<sub>197</sub> o del gen de LTB como se describe en el método n° 1, generando los constructos CRM.HA1-2 (SEQ ID NO: 62) y LTB.HA1-2 (SEQ ID NO: 63). Se verificaron los constructos por secuenciación de ARN y se usaron para transformar el hospedador de expresión, BLR3 (DE3) (Novagen, San Diego, CA; n° de cat. 69053).

15 Se seleccionaron los transformantes en placas que contenían kanamicina (50 µg/ml), tetraciclina (5 µg/ml) y glucosa (al 0,5 %). Se recogieron varias colonias de un cultivo de una noche, que se usaron para inocular un medio LB reciente suplementado con kanamicina 25 µg/ml, tetraciclina 12,5 µg/ml y 0,5 % de glucosa. A una DO<sub>600</sub>= 0,6, se indujo la expresión de proteína con IPTG 1 mM durante 3 h a 37 °C. Se recolectaron las células y se analizó una alícuota del lisado en PAGE-SDS al 10 % por tinción con azul de Coomassie y por inmunotinción, usando sueros de convaleciente de PR/8/34. En el caso del constructo CRM.HA1-2, se recogieron varios clones y se analizó la expresión por PAGE-SDS.

20 Como se ensayó por tinción con azul de Coomassie del gel de PAGE-SDS, todos los clones exhibían una banda que migraba con un PM aparente de 84 kDa y que corresponde al PM predicho. La ausencia de esta banda en el cultivo de control (sin IPTG) indica que se induce específicamente por IPTG. Esta observación se confirmó además cuando se fraccionaron los extractos celulares de dos clones n° 5 y n° 6 en presencia o ausencia de un agente reductor (DTT 5 mM). Aunque la proteína recombinante cuyos enlaces disulfuro se han perturbado por el tratamiento con DTT no se reconoce por los anticuerpos afines, la proteína recombinante nativa sí. De forma similar, un clon que expresa el constructo LTB.HA1-2 exhibe una banda correspondiente al peso molecular predicho de proteína de 39,8 kDa cuando se induce con IPTG. Se confirma la identidad de la proteína de fusión LTB-HA1-2 mediante análisis de transferencia Western usando suero de ratón convaleciente. Esta banda disminuye su intensidad cuando estaba presente un reductor (β-mercaptoetanol). Esta última observación sugiere que se empleó lo más probablemente una cantidad insuficiente de reductor en el experimento. Tomados en conjunto, los datos presentados en la presente memoria apoyan el concepto de que la cabeza globular de HA puede fusionarse exitosamente con proteínas portadoras generando proteínas conformacionalmente sensibles.

## CLONACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE FLAGELINA-HEMAGLUTININA RECOMBINANTES EN *E. coli*

35 Clonación de subunidades de HA de gripe B. Se clonaron subunidades de la cabeza globular de HA de varias cepas de la gripe B y se expresaron como fusiones con flagelina. Estos constructos se generaron mediante una PCR en dos etapas.

Se optimizaron los codones de la subunidad de HA para expresión en *E. coli* y se obtuvieron de un vendedor comercial (DNA2.0 Inc., Menlo Park, CA) mediante síntesis química. Se amplificaron por PCR los HA1-1 o HA1-2 usando ADN sintetizado como molde. Se derivó la secuencia de flagelina (STF2) (SEQ ID NO: 212) del plásmido pET24a-STF2.HA1-2. Se amplificó por PCR el fragmento de ADN de STF2 y el extremo C-terminal del producto de PCR tiene una superposición de 28-30 pb con la secuencia N-terminal de la subunidad de HA de fusión.

Se fusionaron las subunidades de STF2 y HA conjuntamente mediante una segunda PCR. Usando los cebadores de codificación e inversos respectivos (Integrated DNA Technologies, Inc, Coralville, IA 52241) enumerados a continuación, se amplificó el ADN de la proteína de fusión a partir de los moldes de ADN también mostrados a continuación. Se sometió posteriormente el producto de PCR a digestión con *Xba*I, purificación en gel y ligamiento con pET24a-STF2.HA1-2 que se había digerido anteriormente con *Xba*I y *Sna*BI.

Se enumeran a continuación los constructos y, cuando sea apropiado, se enumeran también los cebadores de ADN y moldes de ADN usados en la reacción de amplificación por PCR.

Constructos de STF2.HA de gripe B para expresión en *E coli*

| SEQ NO: | ID | Constructo            | Cebador de cod. de SEQ ID NO: | Cebador inv. de SEQ ID NO: | Molde de ADN de SEQ ID NO: |
|---------|----|-----------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 184     |    | STF2.HA1-1.his        | 193, 195                      | 194, 196                   | 55, 183                    |
| 186     |    | STF2.HA1-2.his        | 193, 198                      | 197, 199                   | 55, 185                    |
| 188     |    | STF2.HA1-2.his        | 193, 201                      | 200, 202                   | 55, 187                    |
| 190     |    | STF2.HA1-2.his (Lee)  | 193, 204                      | 203, 205                   | 55, 189                    |
| 192     |    | STF2.HA1-2.his (Ohio) | 193, 207                      | 206, 208                   | 55, 191.                   |

En cada caso, se usaron los plásmidos construidos para transformar células DH5 $\alpha$  de *E. coli* competentes y se identificaron los presuntos recombinantes por cribado de PCR y análisis de cartografía de restricción. Se verificó la integridad de los constructos por secuenciación de ADN y se usó para transformar el hospedador de expresión, BLR3 (DE3) (Novagen, San Diego, CA; n° de cat.69053). Se seleccionaron los transformantes en placas LB (peptona Veggie, EMD Bioscience, La Jolla, CA; n° de cat.71280; extracto de levadura Veggie, EMD Bioscience, n° de cat. 71279) que contienen kanamicina (35  $\mu$ g/ml). Se recogieron las colonias y se inocularon en 2 ml de medio LB (Veggie) suplementado con kanamicina 35  $\mu$ g/ml y se hicieron crecer durante una noche. Se usaron alícuotas de estos cultivos para inocular cultivos recientes en la misma formulación de medio, que se cultivaron hasta alcanzar una DO<sub>600</sub>= 0,6. Se indujo la expresión de proteína mediante la adición de IPTG 1 mM. Se recolectaron las células después de 2 horas de cultivo a 37 °C y se analizó la expresión de proteína.

PAGE-SDS y transferencia Western: Se determinaron la expresión e identidad de proteína mediante electroforesis en gel y análisis de inmunotransferencia. Se recolectaron las células mediante centrifugación y se lisaron en tampón de Tris/NaCl (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, pH 8,0). Se diluyeron dos alícuotas de cada lisado en tampón de muestra de PAGE-SDS y se hirvieron durante 5 minutos. Se redujo una alícuota de muestra con DTT (concentración final 200 mM, EMD Bioscience, La Jolla, CA 92039; n° de cat. 233155). Se cargaron las muestras (1,5  $\mu$ l/carril de lisado celular) en un gel de poliacrilamida con SDS al 4-12 % y se sometieron a electroforesis (PAGE-SDS). Se tiñó el gel con Coomassie R-250 (Bio-Rad; Hercules, CA) para visualizar las bandas de proteína.

Para transferencia Western, se sometió a electroforesis el gel duplicado, se electrotransfirió a una membrana de PVDF y se bloqueó con leche en polvo al 5 % (p/v). Se sondeó entonces la membrana con anticuerpo anti-flagelina (6H11, Inotek, Beverly, MA; lote n° 1030B5) o antisuero de hurón creado contra B/Malasia (2506/2004, CDC n° 2005741987). Después de sondear con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (1:10.000) (el anticuerpo de cabra anti-ratón es de Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, PA. El anticuerpo de cabra anti-hurón es de Bethyl Laboratories; Montgomery, TX.), se visualizaron las bandas de proteína después de la adición de TMB, un sustrato cromogénico de HRP (Pierce; Rockland, IL; n° de cat.34018). El peso molecular aproximado de STF2.HA1-1 (MAL) es de 84 kDa y el peso molecular aproximado de STF2.HA1-2 (MAL y SH) es de ~78 kDa. Se cargaron dos microgramos de proteína de fusión STF2.4xM2e como control positivo para el anticuerpo anti-flagelina y control negativo para los sueros anti-HA. Se incluyó lisado vírico (B/Malasia/2506/04, CDC n° 2005756250) en el experimento como control positivo para sueros anti-HA y control negativo para el anticuerpo anti-flagelina. La tinción con azul de Coomassie del gel mostró una baja inducción de la

proteína STF2.HA1-1 (MAL), pero bandas mucho más marcadas para las proteínas STF2.HA1-2(MAL) y STF2.HA1-2(SH). El análisis de transferencia Western usando anticuerpos monoclonales anti-flagelina (1:4.000) exhibió una banda positiva marcada aproximadamente a 84 kDa para carriles cargados con STF2.HA1-1 (MAL), y de aproximadamente 75 kDa en carriles cargados con STF2.HA1-2(MAL) o STF2.HA1-2(SH). El patrón de inducción de cada proteína de fusión en la transferencia Western es muy similar al resultado del gel teñido con azul de Commassie. El nivel de proteína no reducida y reducida reconocido por la flagelina era comparable. El control positivo para anti-flagelina (STF2.4xM2e) mostró una sola banda marcada, y el control negativo no exhibió señal.

El análisis de transferencia Western que usa antisueros policlonales anti-HA (1:1.000) exhibía un patrón similar a la transferencia con anti-flagelina, excepto porque la proteína STF2.HA1-2 reducida tenía una señal disminuida en comparación con la de la muestra no reducida, indicando que una porción sustancial de los anticuerpos policlonales anti-HA en el antisuero reconocen los epítomos conformacionales formados por la correcta formación de enlace disulfuro, mientras que una pequeña proporción de los anticuerpos en los antisueros reconocen epítomos lineales que no están basados en la formación de enlace disulfuro. Se observó algo similar usando un ensayo de ELISA de captura. Merece la pena observar que el antisuero contra B/Malasia/2506/2004 (linaje Victoria) reconoce también a B/Shanghái/361/2002, que pertenece al linaje Yamagata. Este resultado indica que estos dos linajes no solo comparten una similitud de secuencia primaria sustancial, sino que comparten también estructura terciaria.

Los resultados de transferencia Western y ELISA confirman la expresión de las proteínas de fusión HA1-1 y HA1-2 de gripe B funcionales en *E. coli*.

#### EJEMPLO 4: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE FLAGELINA-HEMAGLUTININA RECOMBINANTES

##### Materiales y Métodos

Crecimiento bacteriano y lisis celular: Se expresaron los constructos de HA en la cepa hospedadora BLR (DE3) de *E. coli*. Se cultivaron y recolectaron células de *E. coli* portadoras de un plásmido que codifica STF2.HA1-1.his(PR8) (SEQ ID NO: 54) como se describe anteriormente. Se recuperaron cepas individuales de disoluciones madre en glicerol y se hicieron crecer en matraces compartidos hasta un volumen final de 12 l. Se hicieron crecer las células en medio LB que contenía kanamicina 50 µg/ml, tetraciclina 12,5 µg/ml/0,5 % de dextrosa hasta DO<sub>600</sub> = 0,6 y se indujeron con IPTG 1 mM durante 3 h a 37 °C. Se recolectaron las células por centrifugación (7000 rpm x 7 minutos en una centrífuga Sorvall RC5C) y se resuspendieron en 1X PBS, 1 % de glicerol, ADNasa 1 µg/ml, PMSF 1 mM, cóctel de inhibidor de proteasa y lisozima 1 mg/ml. Se lisaron entonces las células por dos pasadas a través de un microfluidizador a 103,4 MPa. Se centrifugó el lisado a 45.0000 g durante 1 hora en una ultracentrífuga Beckman Optima L (Beckman Coulter; Fullerton, CA) para separar las fracciones soluble e insoluble.

Purificación y replegamiento de proteína STF2.HA1-1.his(PR8) (SEQ ID NO: 89) de *E. coli*: Después de la lisis y centrifugación, se resuspendió la fracción insoluble (sedimento) en 100 ml de 1X TBS, pH 8,0 + β-mercaptoetanol 1 mM y se añadió urea sólida a una concentración final de 6,2 M. Después de resuspensión con un homogeneizador de bola de vidrio Dounce, se centrifugó la mezcla como se describe anteriormente. Se cargó el sobrenadante resultante sobre una columna de Sepharose quelante (GE/Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) cargada con NiSO<sub>4</sub> y equilibrada con tampón A [Tris 20 mM, pH 8,0/urea 8 M/NaCl 0,5 M].

Después de lavar con 1 l de tampón B [tampón A + 1 % de TX-100 (p/v)], se eluyó la columna con un gradiente lineal de 5 volúmenes de columna desde 100 % de tampón A hasta 100 % de tampón C [tampón A + imidazol 0,5 M]. Se agruparon las fracciones de pico, se concentraron 3,5 veces en un concentrador centrífugo Amicon 15 (Millipore; Billerica, MA) y se dializaron frente a 3 x 2 l de urea 8 M/Tris 20 mM, pH 8,0/EDTA 2 mM. Después de la diálisis, se replegó STF2.HA1-1.his(PR8) (SEQ ID NO: 89) mediante dilución rápida hasta una concentración final de proteína 0,1 mg/ml en tampón de replegamiento [Tris 0,1 M, pH 8,0/NaCl 0,1 M/1 % de glicerol (p/v)/glutacion reducido 5 mM/glutacion oxidado 1 mM y se incubó durante una noche a temperatura ambiente.

Se capturó entonces la proteína replegada en una columna HiTrap de 5 ml de Sepharose quelante (GE/Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) cargada con NiSO<sub>4</sub> y equilibrada con tampón D [Tris 20 mM, pH 8,0/NaCl 0,5 M/glutacion reducido 1 mM/glutacion oxidado 0,2 mM] y se eluyó con 100 % de tampón E [tampón D + imidazol 0,5 M]. Se agruparon las fracciones de elución de pico, se concentraron usando un concentrador centrífugo Amicon 15 (Millipore; Billerica, MA) y se fraccionaron en una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 (GE/Amersham; Piscataway, NJ) equilibrada con 1X TBS, pH 8,0 + 0,5 % (p/v) de desoxicolato de sodio. Se agruparon las fracciones de pico S200, se dializaron frente a 3 x 2 l de 1X TBS, pH 8,0 (sin desoxicolato), se pusieron en viales y se almacenaron a -80 °C.

Purificación de STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) y STF2.HA1-2mut(PR8) (SEQ ID NO: 91): Se cultivaron y recolectaron células de *E. coli* portadoras de un plásmido que codifica STF2.HA1-2.his(PR8) (SEQ ID NO: 55) como se describe anteriormente. Después de la lisis y centrifugación, se resuspendió la fracción insoluble (sedimento) que contenía STF2.HA1-2(PR8) y se homogeneizó en Tris 50 mM, pH 8,0 + 0,5 % (p/v) de Triton X-100 usando un homogeneizador Dounce. Se centrifugó entonces el homogeneizado (19.000 rpm x 10 min). Se volvió a homogeneizar la fracción de sedimento resultante en Tris 50 mM, pH 8,0 + 0,5 % (p/v) de Triton X-100 + NaCl 1,0 M

y se centrifugó. Se disolvió entonces la fracción de cuerpo de inclusión (sedimento) en tampón A [acetato de sodio 50 mM, pH 4,0 + urea 8,0 M] y se centrifugó (19.000 rpm x 10 min) para retirar los desechos insolubles.

5 Se fraccionó el sobrenadante resultante en una columna Source S (GE/Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) equilibrada con tampón A y se eluyó con un gradiente lineal de 5 volúmenes de columna de tampón B (acetato de sodio 50 mM, pH 4,0, NaCl 1,0 M). Se replegó entonces la proteína mediante dilución rápida en tampón C (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0). Se fraccionó entonces la proteína replegada en una columna HP de Sepharose Q (GE/Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) equilibrada con tampón C y se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 60 % de tampón D (tampón C + NaCl 1 M). Se fraccionó entonces el eluido de Q HP en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) Superdex 200 (GE/Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) equilibrada con 1 X disolución salina tamponada con Tris, pH 8,0, para separar la proteína monomérica de la agregada. Se agruparon entonces las fracciones monoméricas, se tomaron alícuotas y se almacenaron a -80 °C.

15 Purificación de STF2.HA1-3(PR8) (SEQ ID NO: 92): Se cultivaron y recolectaron células de *E. coli* portadoras de un plásmido que codifica STF2.HA1-3 (PR8) (SEQ ID NO: 57) como se describe anteriormente. Después de la lisis y centrifugación, se ajustó la fracción soluble (sobrenadante) que contiene STF2.HA1-3(PR8) a urea 6,2 M, DTT 100 mM y se incubó a temperatura ambiente durante una noche, reduciendo completamente y desnaturizando la proteína. Se diluyó entonces la proteína 5 veces en tampón A (ácido cítrico 50 mM, pH 3,5, urea 8 M, β-mercaptoetanol 1 mM, EDTA 1 mM) y se cargó sobre una columna FF de Sepharose SP (GE/Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) equilibrada con tampón A. Para retirar la endotoxina, se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de tampón B (tampón A + 1 % (p/v) de Triton X-100) seguido de 10 volúmenes de columna de tampón C (ácido cítrico 50 mM, pH 3,5, β-mercaptoetanol 1 mM, EDTA 1 mM, 70 % (v/v) de isopropanol).

20 Se eluyó entonces la proteína unida en un gradiente lineal de 5 volúmenes de columna de tampón A:tampón D (tampón A + NaCl 1 M). Se dializó entonces la proteína eluida con tampón E (Tris 20 mM, pH 8,5, urea 8 M, β-mercaptoetanol 1 M, EDTA 1 mM) y se pasó a través de una columna Source Q (GE/Amersham Biosciences; Piscataway, NJ). Se recogió la proteína STF2.HA1-3(PR8) (SEQ ID NO: 92) en la fracción de circulación. Se concentró la proteína usando concentradores centrifugos Amicon (Millipore; Billerica, MA) y se dializó frente a tampón F (Tris 20 mM, pH 8,0, urea 8 M, EDTA 1 mM) para retirar el reductor. Se replegó entonces el polipéptido desnaturizado mediante dilución rápida hasta una concentración final de 0,1 mg/ml en tampón de replegamiento (Tris 0,1 M, pH 8,0/NaCl 0,1 M/1 % (p/v) de glicerol, glutatión reducido 5 mM, glutatión oxidado 1 mM) y se incubó durante una noche a temperatura ambiente. Se fraccionó entonces la proteína replegada en una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 equilibrada con 1X disolución salina tamponada con Tris (TBS), pH 8,0, más 0,25 % (p/v) de desoxicolato de sodio para separar la STF2.HA1-3(PR8) monomérica de la proteína agregada. Se agruparon las fracciones de pico monoméricas, se dializaron frente a 1X TBS, pH 8,0 para retirar el desoxicolato, se tomaron alícuotas y se almacenaron a -80 °C.

25 Purificación de STF2.HA1-2His(PR8) (SEQ ID NO: 93): Se cultivaron y recolectaron células de *E. coli* portadoras de un plásmido que codifica STF2.HA1-2.his(PR8) (SEQ ID NO: 61) como se describe anteriormente. Después de la lisis celular, se homogeneizó la fracción insoluble y se lavó una vez con tampón A (Tris 50 mM, pH 8,0), seguido de lavado secuencial con tampón A + 0,5 % (p/v) de Triton X-100 y tampón A + 0,5 % (p/v) de Triton X-100 + NaCl 1 M. Se lavó entonces el material insoluble dos veces más con tampón A solo. Se disolvieron entonces los cuerpos de inclusión lavados con tampón B (1 X PBS, pH 7,4, urea 8 M), se aplicaron a una columna de Ni-NTA (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) cargada con NiSO<sub>4</sub> y se eluyeron con un gradiente lineal de tampón C (Tris 50 mM, pH 8,0, urea 8 M, NaCl 0,3 M, imidazol 0,5 M). Para reducir la endotoxina, se dializó la proteína eluida durante una noche frente a 1X PBS, pH 7,4, urea 8 M y se volvió a aplicar a la columna de Ni-NTA.

30 Se lavó entonces la columna con tampón D (Tris 10 mM, pH 8,8, urea 8 M, 60 % (v/v) de isopropanol) y se eluyó como se describe anteriormente. Se replegó entonces la proteína purificada por Ni-NTA por dilución 1:10 (v/v) con tampón de replegamiento (Tris 50 mM, pH 8,8). Se concentró entonces la proteína HA1-2 His(PR8) (SEQ ID NO: 93) replegada usando una unidad de ultrafiltración Amicon (Millipore; Billerica, MA) y se aplicó a una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 (GE/Amersham; Piscataway, NJ) equilibrada con 1X TBS, pH 8,0. Se combinaron las fracciones de pico monoméricas, se tomaron alícuotas y se almacenaron a -80 °C.

35 PAGE-SDS y análisis de transferencia Western: Se determinó la identidad de proteína de todos los constructos de HA y se estimó la pureza por PAGE-SDS. Se diluyó una alícuota de 5 µg de cada muestra en tampón de muestra de PAGE-SDS con o sin DTT 100 mM como reductor. Se hirvieron las muestras durante 5 minutos y se cargaron en gel de poliacrilamida con SDS al 10 % (LifeGels; French's Forrest, Nueva Gales del Sur, AUS) y se sometieron a electroforesis. Se tiñó el gel con Coomassie R-250 (Bio-Rad; Hercules, CA) para visualizar las bandas de proteína. Para transferencia Western, se sometieron a electroforesis 0,5 µg/carril de proteína total como se describe anteriormente, se electrotransfirieron entonces los geles a una membrana de PVDF y se bloquearon con leche en polvo al 5 % (p/v) antes de sondear con anticuerpo anti-flagelina (Inotek; Beverly, MA) o suero inmune de convaleciente de gripe A PR/8/34 (descrito a continuación en ELISA de antigenicidad de proteína). Después de sondear con anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (Pierce; Rockland, IL), se visualizaron bandas de proteína con un sustrato cromogénico de fosfatasa alcalina (Promega; Madison, WI).

Ensayo de proteína: Se determinó la concentración de proteína total para todas las proteínas usando el ensayo de Micro BCA (ácido bicinónico) (Pierce; Rockford IL) en formato de microplaca, usando seroalbúmina bovina como patrón, según las instrucciones del fabricante.

5 Ensayo de endotoxina: Se determinaron los niveles de endotoxina para todas las proteínas usando el kit de ensayo LAL cromogénico cuantitativo QCL-1000 (Cambrex; E. Rutherford, NJ), siguiendo las instrucciones del fabricante para el método de microplaca.

10 Ensayo de bioactividad de TLR5: Las células HEK293 expresan constitutivamente TLR5 y secretan varios factores solubles, incluyendo IL-8, en respuesta a la señalización de TLR5. Se sembraron las células en microplacas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo), se añadieron las siguientes proteínas de ensayo y se incubaron durante una noche: STF2.HA1-1His(PR8) (SEQ ID NO: 89), STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90), STF2.HA1-2(PR8)*mut* (SEQ ID NO: 91), STF2.HA1-3(PR8) (SEQ ID NO: 92), HA1-2His(PR8) (SEQ ID NO: 93), STF2.HA1-2(Mal) (SEQ ID NO: 211) sobrenadante, STF2: HA1-2 (Mal) (SEQ ID NO: 211) replegada, STF2.HA1-2(SH) (SEQ ID NO: 211) sobrenadante, STF2.HA1-2(SH) (SEQ ID NO: 211) replegada, STF2.HA1-1 (Mal) (SEQ ID NO: 209) sobrenadante y STF2.HA1-1 (Mal) (SEQ ID NO: 209). El día siguiente, se recolectó el medio acondicionado, se transfirió a una microplaca de 96 pocillos limpia y se congeló a -20 °C. Después de descongelar, se ensayó en el medio acondicionado la presencia de IL-8 en un ELISA de sándwich usando un par de anticuerpos coincidentes anti-IL-8 humana (Pierce, Rockland, IL; n° M801E y n° M802B) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la densidad óptica usando un espectrofotómetro de microplaca (FARCyte, GE/Amersham; Piscataway, NJ).

20 ELISA de antigenicidad de proteína: Para determinar si la proteínas de fusión recombinantes exhibían epítopos de HA plegados correctamente, se evaluó la antigenicidad de las proteínas de fusión de HA individuales por ELISA. Se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos durante una noche a 4 °C con diluciones en serie en PBS (100 µl/pocillo) de cada proteína diana partiendo de 5 µg/ml. Se bloquearon las placas con 200 µl/pocillo de tampón de diluyente de ensayo (ADB; BD Pharmingen) durante 1 hora a temperatura ambiente, y se lavaron entonces 3 veces con PBS-T. Se añadió entonces una dosis fija de anticuerpo primario a cada pocillo.

25 Para ensayar la reactividad de HA, se añadieron 100 µl/pocillo de una dilución 1:10.000 de suero no inmune o inmune de convaleciente de PR/8/34 en ADB. Se generó suero inmune de PR/8/34 en ratones BALB/c (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) que recibieron una dosis de exposición subletal determinada experimentalmente de  $8 \times 10^1$  dosis infectantes de embrión (EID) de virus de la gripe PR/8/34. Se dejaron entonces convalecer los animales durante > 21 días después de la infección, en cuyo momento se aisló y clarificó el suero inmune. Para ELISA de flagelina o marcaje de 6 x histidina, se añadió anticuerpo monoclonal contra 6x His (Invitrogen; Carlsbad, CA) o flagelina (Inotek; Beverly, MA) a 1 µg/ml en ADB (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas durante 1 h a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C. Se lavaron entonces las placas tres veces con PBS-T. Se añadieron anticuerpos de IgG de cabra anti-ratón marcados con HRP (Jackson Immunochemical; West Grove, PA) diluidos en ADB (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron las placas tres veces con PBS-T. Después de añadir sustrato TMB Ultra (Pierce; Rockford, IL) y monitorizar el desarrollo de color, se midió la A<sub>450</sub> en un espectrofotómetro de microplaca (FARCyte, GE/Amersham; Piscataway, NJ).

## Resultados y discusión

40 Rendimiento y pureza de proteína: Se muestran en la Tabla 6 los resultados de la purificación de proteínas de fusión de HA y STF2.HA recombinantes producidas en *E. coli*. Las cuatro proteínas se produjeron con alto rendimiento, con una pureza estimada superior al 90 % y la endotoxina muy por debajo del nivel aceptable estándar de 0,1 UE/µg. Las tres proteínas de fusión de STF2 tenían también una bioactividad de TLR5 *in vitro* muy alta, mientras que la proteína HA 1-2His<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 93), como se esperaba, no tenía actividad de TLR5.

Tabla 6

| proteína                   | SEQ NO: | ID | rendimiento (mg) | pureza (%) | est. endotoxina (UE/µg) | actividad de TLR5 (CE <sub>50</sub> , ng/ml) |
|----------------------------|---------|----|------------------|------------|-------------------------|--|
| STF2.HA1-1.his(PR8)        | 89      |    | 6,4              | >90        | 0,04                    | 0,2  |
| STF2.HA1-2(PR8)            | 90      |    | 6,0              | >98        | 0,02                    | 0,15   |
| STF2.HA1-2(PR8) <i>mut</i> | 91      |    | 12               | >95        | 0,01                    | 1,2  |
| STF2.HA1-3(PR8)            | 92      |    | 2,1              | >90        | 0,016                   | 1,2  |

| proteína      | SEQ NO: | ID | rendimiento (mg) | pureza (%) | est. | endotoxina (UE/ $\mu$ g) | actividad de TLR5 (CE <sub>50</sub> , ng/ml) |
|---------------|---------|----|------------------|------------|------|--------------------------|--|
| HA1-2His(PR8) | 93      |    | 10               | >95        |      | 0,03                     | nd   |

5 **Antigenicidad de proteínas de HA de gripe A producidas en *E. coli*:** Se analizaron las cuatro proteínas recombinantes por transferencia Western con anticuerpo contra STF2 (flagelina) (Inotek; Beverly, MA) y antiseros inmunes recogidos de ratones convalecientes de PR/8/34. Las tres proteínas de fusión de STF2 parecían reaccionar comparablemente a un anticuerpo anti-flagelina. STF2.HA1-1His(PR8) (SEQ ID NO: 89), STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) y HA1-2His(PR8) (SEQ ID NO: 93) reaccionaban también con suero de convaleciente anti-PR/8/34. Esta reactividad se observó solo en muestras de proteína no reducidas, la adición de DTT al tampón de muestra disminuyó en gran medida la señal. Este descubrimiento sugiere que la mayoría de los anticuerpos anti-HA en el suero de convaleciente son conformacionalmente dependientes y que es necesaria una unión disulfuro apropiada en HA para la reactividad por transferencia Western. En contraposición con estos resultados, STF2.HA1-3(PR8) (SEQ ID NO: 92) no reaccionaba eficazmente con el suero de convaleciente y que se produjera una pequeña señal no se afectaba por el reductor. Este descubrimiento sugería que la proteína STF2.HA1-3 puede no ser capaz de plegarse apropiadamente y/o presentar epítopos de HA nativos.

#### ELISA de captura para proteínas de cabeza globular de la gripe B

15 Se evaluó la antigenicidad de proteínas de fusión de HA individuales usando ELISA de captura. Se usó un anticuerpo monoclonal anti-flagelina sobre la fase sólida para capturar estas proteínas. Se usaron antiseros de hurón creados por infección con B/Malasia/2506/2004 natural para detectar la proteínas de fusión de HA capturadas. Los resultados de este ensayo determinarán si las proteínas de fusión recombinantes exhibían epítopos de HA correctamente plegados. Debido a la considerable homología de secuencia entre las diferentes moléculas de cabeza globular de HA de la gripe B, un 84,6 %, se esperaba que estos antiseros reaccionaran tanto con los constructos de cabeza globular de Malasia como de Shanghai.

#### Preparación de muestras

25 Se sedimentaron por centrifugación células de *E. coli* que expresan las proteínas recombinantes STF2.HA1-2(Malasia (SEQ ID NO: 210)), STF2.HA1-2 (Shanghai (SEQ ID NO: 211)) y STF2.HA1-1 (Malasia (SEQ ID NO: 209)) y se resuspendieron en tampón Tris (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, pH 8). Se lisaron las células por sonicación. Se centrifugó el lisado celular para separar las proteínas solubles de las proteínas insolubles. Se resuspendió el sedimento de proteína insoluble en tampón Tris con urea 6 M y se sometieron las proteínas a un replegamiento rápido diluyendo rápidamente la disolución 1:10 en tampón Tris. Las concentraciones de proteína tanto de las proteínas solubles como de muestras sedimentadas que contienen proteínas replegadas se estimaron por UV<sub>280</sub> (espectrofotómetro DU 800). Se evaluaron por ELISA sobrenadantes que contienen proteínas STF2.HA1-1(Mal) (SEQ ID NO: 209); STF2.HA1-2(Mal) (SEQ ID NO: 210), STF2.HA1-2(SH, Shanghai) (SEQ ID NO: 211) y sedimentos solubilizados que contienen STF2.HA1-1(Mal), STF2.HA1-2(Mal) y STF2.HA1-2(SH) replegadas por reactividad con antiseros de hurón creados por infección natural contra B/Malasia/2506/2004. Se usaron muestras de sobrenadante de *E. coli* y muestras replegadas solubilizadas que contienen proteína STF2.4xM2e (SEQ ID NO: 35 94) como controles negativos.

#### Método ELISA

40 Se recubrió la placa ELISA (Maxisorp, Nunc, Dinamarca) con el anticuerpo monoclonal específico de flagelina 6H11 (Inotek, Beverly, MA) a 0,5 ug/ml y se incubó durante una noche a 2-5 °C. Se aspiró la disolución que contiene anticuerpo y se bloquearon los pocillos con 300 ul/pocillo de Super Block + Tween-20 durante 2 horas a 25 °C. Se lavó la placa una vez con 1xPBS y se secó con papel secante. Se efectuaron diluciones en serie 3x de las diferentes disoluciones de proteína en una placa de dilución partiendo de una concentración de 5 ug/ml. Se transfirieron 100 ul desde la placa de dilución a la placa ELISA.

45 Se incubó la placa durante 1 h a 25 °C. Se retiró la proteína no unida lavando la placa 3 veces con PBS + 0,05 % de Tween-20. Se diluyó antisuero de hurón creado contra B/Malasia/2506/2004 (CDC, AL, Georgia) a 1: 100 y se añadieron 100 ul a cada pocillo. Se incubó entonces la placa durante 1 h a 25 °C. Después de esta etapa de incubación, se lavaron las placas 6 veces con PBS que contiene 0,05 % de Tween-20. Se diluyó IgG de cabra anti-hurón conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP, Bethyl Labs Inc., IL) 1:10.000 y se añadieron 100 ul a cada pocillo. Se incubó la placa durante 30 min. Después de esta etapa de incubación, se lavó la placa 6 veces con PBS+0,05 % de Tween-20. Se añadieron a cada pocillo 100 ul de TMB Ultra que contiene el sustrato de HRP 50 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Pierce, Rockford, IL). Después de la adición de este sustrato, se monitorizó el desarrollo de color y se detuvo la reacción con la adición de 100 ul/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. Se midió la A<sub>450</sub> en un lector de microplacas (SpectraMax 190, Molecular devices, Sunnyvale, CA).

**Antigenicidad de proteínas de HA de gripe B producidas en *E. coli***

Los datos de ELISA (Figura 3) indicaban que los antisueros reconocían epítomos que eran sensibles al reductor. El tratamiento de proteínas con agentes reductores, que alteran la conformación de las proteínas mediante la perturbación de los enlaces disulfuro, disminuía la reactividad de los antisueros con las proteínas. La reactividad del lisado total no reducido de STF2.HA1-2(Mal), lisado total no reducido de STF2.HA1-2(SH) y lisado total no reducido de STF2.HA1-1 (Mal), cuando se mantienen en la configuración plegada apropiada, era muy buena e indica que la conformación de la proteínas de fusión de HA individuales era comparable con la de la cabeza globular en la proteína HA nativa. Aunque el antisuero contiene anticuerpos conformacionalmente sensibles y la reactividad depende de una unión disulfuro correcta, contiene también anticuerpos que no son sensibles a la unión disulfuro como se demuestra por la actividad residual que se observó tanto en condiciones reducida como no reducida.

**Bioactividad de TLR5 de proteínas STF2.HA (gripe B)**

Las proteínas de fusión recombinantes mostraron una potencia que coincidía con los resultados del ELISA de captura, indicando que las muestras replegadas pueden ser más activas que el lisado en su forma nativa (Figuras 4 y 5). Las muestras en la forma no tratada nativa mostraban una actividad que era 2 veces menor que las muestras replegadas. Estas proteínas estaban mal plegadas en la forma nativa y, por lo tanto, requieren una etapa de replegamiento para reinstaurar la bioactividad de TLR5. Esta actividad era consistente con la actividad de HA en el ELISA de captura.

**EJEMPLO 5: INMUNOGENICIDAD DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE FLAGELINA-HEMAGLUTININA RECOMBINANTES QUE REPRESENTAN LA CEPA VÍRICA A/PUERTO RICO/8/34 EN *E. coli*****20 Materiales y Métodos**

Estudios animales: Se usaron ratones BALB/c hembra (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) a la edad de 6-8 semanas. Se dividieron los ratones en grupos de 10 y recibieron inmunizaciones subcutáneas (s.c.) inguinales los días 0 y 14 como sigue:

- 1) PBS (disolución salina tamponada con fosfato).
- 25 2) 3 µg de STF2.4xM2e (SEQ ID NO: 94) en disolución salina (histidina 10 mM, Tris 10 mM, NaCl 75 mM, 5 % (vol/vol) de sacarosa, 0,02 % (p/v) de polisorbato-80, EDTA 0,1 mM, 0,5 % (v/v) de etanol, pH 7,2)
- 3) 30 µg de STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) en PBS
- 4) 3,0 µg de STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) en PBS
- 5) 0,3 µg de STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) en PBS
- 30 6) 0,03 µg de STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) en PBS

Un grupo adicional de 5 ratones recibió una exposición subletal determinada experimentalmente con  $8 \times 10^1$  dosis infectantes de embrión (EID) de PR/8/34 y se dejaron convalecer durante > 21 días. Se usaron entonces estos animales como controles positivos inmunes convalecientes durante los estudios de exposición (véase a continuación). Se extrajo sangre a los ratones los días 10 (primario) y 21 (refuerzo), se clarificaron los sueros mediante coagulación y centrifugación y se almacenaron a -20 °C.

Determinación del anticuerpo sérico: Se determinaron los niveles de IgG específica de HA mediante ELISA. Se recubrieron durante una noche placas ELISA de 96 pocillos (Costar (n° de cat. 9018) Corning, NY) a 4 °C con 100 µl/pocillo de proteína HA<sub>0</sub>His (producida en *Drosophila*) (SEQ ID NO: 176) en PBS (5 µg/ml). Se bloquearon las placas con 200 µl/pocillo de tampón de diluyente de ensayo (ADB; BD Pharmingen, (n° de cat.: 555213) (San Diego, CA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas 3 veces con PBS + 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBS-T). Se añadieron diluciones de los sueros en ADB (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas durante una noche a 4 °C. Se lavaron las placas tres veces con PBS-T. Se añadieron anticuerpos de IgG de cabra anti-ratón marcados con HRP (Jackson Immunochemical, West Grove, PA (n° de cat: 115-035-146)) diluidos en ADB (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron las placas tres veces con PBS-T. Después de añadir sustrato TMB Ultra (Pierce (n° de cat. 34028), Rockford, IL)) y monitorizar el desarrollo de color, se midió la A<sub>450</sub> en un espectrofotómetro de microplacas Tecan Farcyte (Durham, NC).

ELISA de células MDCK enteras: Se hicieron crecer células MDCK (ATCC (n° de cat. CCL-34) Manassas, VA) en placas de cultivo de 96 pocillos (BD (n° de cat. 353075), Corning, NY) en medio DMEM completo que contiene 10 % de FCS a 37 °C durante 1 a 2 días o hasta que las células estuvieran cercanas a la confluencia. Se incubaron entonces los pocillos con  $1 \times 10^5$  EID de virus PR/8/34 (50 µl) en medio DMEM sin FCS o medio solo (para controles no infectados).

Después de una incubación de 60 minutos a 37 °C, se añadieron 200 µl de medio completo a cada pocillo y se incubaron las placas durante una noche a 37 °C. El día siguiente, se lavaron las placas con PBS y se fijaron con

formalina al 10 % a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se lavaron los pocillos tres veces con PBS/0,1 % de BSA y se bloquearon con 200 µl/pocillo de ADB (BD Pharmingen, nº de cat. 555213, San Diego, CA) durante 1 hora a TA o durante una noche a 4 °C. Se añadieron diluciones en serie de sueros de ensayo a los pocillos y se incubaron durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos y se incubaron con IgG de cabra anti-ratón conjugada con HRP (Jackson Immunochemical, nº de cat. 115-035-146 (West Grove, PA) durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de sustrato TMB Ultra (Pierce (nº de cat. 34028), Rockford, IL) durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con la adición de 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N y se leyó la DO<sub>450</sub> usando un espectrofotómetro de microplaca (FARCyte, Amersham, Durham, NC).

## Resultados y discusión

10 Inducción de la respuesta de IgG específica de HA después de inmunización con STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90). Se examinó la inmunogenicidad de STF2.HA1-2 inmunizando ratones BALB/c (10/grupo) por vía subcutánea el día 0 y 14 con un intervalo de dosis de STF2.HA1-2 (30, 3,0, 0,3 o 0,03 µg). Se inmunizaron los grupos de control de ratones con PBS (control negativo), 3 µg de STF2.4xM2e (SEQ ID NO: 94) (control negativo para inmunogenicidad de HA, control positivo para el estudio de eficacia por exposición letal) o una exposición subletal con 8x10<sup>1</sup> EID del aislamiento de gripe PR/8/34 para generar animales convalecientes inmunes. Se examinaron las respuestas de IgG específicas de HA 7 días después del refuerzo (día 21) por ELISA. Los resultados demuestran que la inmunización con 30, 3 o 0,3 µg de STF2.HA1-2(PR8) inducía respuestas de IgG consistentes y significativas específicas de HA0sHis (SEQ ID NO: 176) de manera dependiente de la dosis (Figura 6).

20 Los sueros de ratones BALB/c inmunizados con STF2.HA1-2 (SEQ ID NO: 90) reaccionan con células MDCK infectadas con virus de la gripe. Los resultados de ELISA directa anteriores demostraban que los sueros inmunes de animales inmunizados con STF2.HA1-2 reconocen HA0His expresada en *Drosophila* recombinante (SEQ ID NO: 176) correspondiente a la secuencia de HA de PR/8/34. Para demostrar que los anticuerpos anti-HA reconocen HA vírica nativa, se examinó en los mismos sueros la capacidad de reaccionar con células MDCK infectadas con PR/8/34. Los resultados mostrados en la Figura 7 demuestran que los sueros de ratones inmunizados con 30, 3,0 o 0,30 µg de STF2.HA1-2 se unían específicamente a células MDCK infectadas con PR/8/34, indicando que los anticuerpos anti-HA desencadenados por inmunización con STF2.HA1-2 reconocen HA en su conformación nativa.

30 Colectivamente, estos resultados demuestran que los ratones inmunizados con STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) en PBS, sin coadyuvante ni portador convencionales, creaban respuestas anti-HA vigorosas que reconocían HA recombinante expresada en *Drosophila* y HA vírica nativa expresada sobre la superficie de células MDCK infectadas con PR/8/34 *in vitro*.

## EJEMPLO 6: EFICACIA DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE FLAGELINA-HEMAGLUTININA RECOMBINANTES QUE REPRESENTAN LA CEPA VÍRICA A/PUERTO RICO/8/34

### Materiales y Métodos

35 Exposición de ratones a virus de la gripe. Para valorar la eficacia, se expusieron ratones inmunizados como se describe en el ejemplo 5 el día 28 a la administración intranasal de una DL<sub>90</sub> (dosis letal para el 90 % de ratones) (8x10<sup>3</sup> EID) de aislamiento de gripe A PR/8/34. Se monitorizaron en los animales diariamente durante 21 días después de la exposición supervivencia, pérdida de peso y presentación clínica. Se calculó el % de pérdida de peso basándose en la media de ((peso diario (g) /peso inicial (g) el día 28) x 100) de cada animal individual por grupo. Se asignaron las puntuaciones clínicas como sigue: 4 pts = sano, 3 pts = aseo reducido, 2 pts = actividad física reducida y 1, pt = moribundo. Los resultados experimentales de las puntuaciones clínicas y pérdida de peso reflejan los resultados basados en los animales supervivientes el día evaluado).

### Titulación vírica y determinación de la TCID<sub>50</sub>.

45 Preparación celular: Se cultivaron células MDCK (ATCC (nº de cat. C-34), Manassas, VA) en placas de cultivo de 100x20 mm (BD (nº de cat. 353003) Corning, NY) hasta el 90-95 % de confluencia y se desalojó la monocapa por incubación con tripsina-EDTA a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub> durante 20 minutos. Se inactivó la tripsina mediante la adición de un medio de cultivo celular DMEM suplementado con 10 % de FBS y se rascó la monocapa celular con una espátula estéril para completar el desprendimiento de las células. Se recolectó la suspensión celular y se lavó dos veces con DMEM + 10 % de FBS. Se resuspendieron las células en DMEM + 10 % de FBS y se contaron. Se ajustó la concentración celular a 4 x 10<sup>5</sup> células/ml y se añadieron 100 µl a cada pocillo de una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos (BD (nº de cat. 353075), Corning NY). Se incubaron las placas a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub> hasta que la confluencia alcanzó un 90-95 %.

55 Titulación vírica: Se diluyó virus de la gripe (cepa A/Puerto Rico/8/34 [PR/8]) a 1x10<sup>8</sup> EID en DMEM exento de rojo fenol + 0,1 % de BSA (fracción V (Rockland (nº de cat. BSA-50) Gilbertsville, PA), y se prepararon diluciones en serie 5x en placas de 96 pocillos usando el mismo medio. Se lavaron las monocapas de células MDCK en placas de 96 pocillos, preparadas como se describe en la presente memoria, aspirando el medio de cultivo, reemplazándolo por 200 µl/pocillo de 1 x PBS y aspirando el PBS. Se añadieron las diluciones en serie 5x de virus de la gripe preparadas anteriormente a las monocapas lavadas a un volumen de 100 µl/pocillo. Se trató una fila de pocillos con medio solo como control. Se incubaron las células durante 2 horas a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub> para permitir el



desprendimiento y entrada víricos. Se lavaron los pocillos por aspiración, aclarando con 200 µl/pocillo de PBS y aspiración del PBS. Todos los pocillos recibieron 100 µl/pocillo de DMEM exento de rojo fenol + 0,1 % de BSA y se incubaron las placas durante 48 horas a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub>.

5 Determinación de la viabilidad celular: Después de la incubación con virus como se describe anteriormente, se aspiró el medio de los pocillos y se reemplazó por medio reciente que contiene 40 µg/ml de rojo neutro (Sigma Aldrich (nº de cat. N2889) St. Louis, MO). Para determinar la lisis máxima, se añadieron 2 µl de solución de lisis (9 % de Triton X-100 en agua, peso/volumen) a pocillos por triplicado que se incubaron solo con medio. Después de 1 hora de incubación, se fijaron las células mediante la adición de 100 µl/pocillo de formaldehído al 1 %/CaCl<sub>2</sub> al 1 % durante 5 minutos a temperatura ambiente; se efectuó esta etapa de fijación dos veces en sucesión. Se aspiró la disolución de fijación y se liberó el rojo neutro mediante la adición de 100 µl/pocillo de medio de extracción (50 % de etanol/1 % de ácido acético).

15 Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 20 minutos, con agitación durante los 2 minutos finales. Se determinó la cantidad de tinte liberado midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm usando un espectrofotómetro de microplaca. Se midió la muerte celular (y por ello la infectividad vírica) como una disminución de la cantidad de tinte liberada en comparación con el control de medio. Al final de la incubación, se efectuó el ensayo de rojo neutro como se describe en la presente memoria. Se calculó el porcentaje de lisis de cada dilución sérica como:

$$\% \text{ de reducción} = 100 \times ((\text{muestra-virus})/(\text{med-virus}))$$

20 en la que muestra, max y med hacen referencia a los valores de absorbancia en pocillos que representan muestras experimentales, solo virus y solo medio, respectivamente. Se definió el título neutralizante de cada muestra como la dilución que daba como resultado un 50 % de reducción de la infectividad vírica.

25 Ensayo de neutralización de gripe A/PR/8/34. Se adaptó este ensayo con modificaciones del "WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance", pág. 86-88 (WHO/CDS/CSR/NCS2002.5). Se adapta el ensayo de rojo neutro de un protocolo público del Cell Lab del Gettysburg College (<http://www3.gettysburg.edu/~sorense/CelllabO4/neutralred.htm>).

30 Específicamente, se sembraron células MDCK (ATCC, nº de cat. (CCL\_34), Manassas, VA) en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos (BD (cat. 353075), Corning, NY) como se describe anteriormente. Se termoinactivaron los reactivos de ensayo (sueros experimental y de control) incubando durante 30 minutos en un baño de agua calentado a 56 °C. Se titularon en serie los sueros en placas de 96 pocillos, con diluciones 3x en DMEM exento de rojo fenol + 0,1 % de BSA. Se añadió un volumen igual de virus PR/8/34 diluido a 5x10<sup>6</sup> EID/ml en el mismo medio a cada dilución sérica para conseguir una concentración vírica final de 2,5x10<sup>6</sup> EID/ml (la TCID<sub>50</sub> predeterminada para la disolución madre actual de virus). Se incluyeron pocillos que contienen solo medio y solo virus como controles negativo y positivo, respectivamente. Se incubaron las placas durante 30 minutos a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub>.

35 Se lavaron las monocapas celulares preparadas como se describe anteriormente (Preparación celular) una vez con 200 µl/pocillo 1 x PBS, y entonces con 100 µl/pocillo de mezclas de suero:virus y reactivos de control preparados como se describe anteriormente, y se incubaron durante 2 horas a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, se lavaron las monocapas celulares una vez con PBS, se añadieron 100 µl/pocillo de DMEM exento de rojo fenol + 0,1 % de BSA a cada pocillo y se incubaron a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Al final de la incubación, se efectuó el ensayo de rojo neutro como se describe anteriormente (Determinación de la viabilidad celular). Se calculó el porcentaje de lisis de cada dilución sérica como se describe anteriormente: Se definió el título neutralizante de cada muestra como la dilución que da como resultado un 50 % de reducción de la infectividad vírica.

## Resultados y discusión

45 La inmunización con STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) proporciona protección frente a una exposición letal a gripe A: Los resultados del Ejemplo 5 demostraron que la inmunización de ratones con STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) generaba una respuesta de anticuerpo que reconocía HA nativa. Para evaluar la eficacia, se expusieron los mismos ratones el día 28 a una DL<sub>90</sub> (8x10<sup>3</sup> EID) de virus PR/8/34 administrada por vía intranasal. Se monitorizaron en los ratones diariamente durante 19 días después de la exposición supervivencia, pérdida de peso y presentación clínica. Como se muestra en las Figuras 8A, 8B y 8C, los ratones inmunizados con PBS mostraron signos de infección (pérdida de peso y puntuaciones clínicas menores) tan pronto como tres días después de la exposición, y todos los ratones murieron para el día 21 después de la exposición. En contraposición, los ratones inmunizados con 30, 3,0 o 0,3 µg de STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) demostraron una protección notablemente potenciada. Estos animales demostraron poca o ninguna pérdida de peso, puntuaciones clínicas significativamente mayores y un 100 % de supervivencia, que era similar a los animales de control convalecientes inmunes, durante el periodo de 21 días. Estos resultados demuestran que STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) expresada en *E. coli* induce respuestas inmunitarias específicas de HA que protegen exitosamente a ratones BALB/c de una exposición letal a virus de la gripe A virulento *in vivo*.

Para evaluar la eficacia de la respuesta de anticuerpo *in vitro*, se desarrolló un ensayo de neutralización vírica basado en células para ensayar la capacidad de los sueros inmunes de neutralizar la infectividad vírica. En este

estudio, se examinó la actividad inhibidora vírica de suero de animales inmunizados con STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) y STF2.HA1-1 (PR8) (SEQ ID NO: 151). Se preincubaron diluciones en serie de sueros no inmune e inmune con PR/8 y se incubaron con células MDCK. Se lavaron los pocillos para retirar el virus libre y se incubaron las placas antes de teñir con rojo neutro para detectar células vivas. Los resultados indican que los sueros inmunes de animales inmunizados con STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) demostraron una dosis inhibidora del 50% en cultivo de tejido (TCID) de  $> 1:40$  (Figura 9).

#### **EJEMPLO 7: INMUNOGENICIDAD DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE FLAGELINA-HEMAGLUTININA RECOMBINANTES QUE REPRESENTAN LA CEPA VÍRICA AVIET NAM/1203/2004**

##### **Materiales y Métodos**

Estudios animales: Se usaron ratones BALB/c hembra (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) a la edad de 6-8 semanas. Se dividieron los ratones en grupos de 10 y recibieron inmunizaciones s.c. inguinales los días 0 y 14 como sigue:

- 1) PBS (disolución salina tamponada con fosfato).
- 2) 3,0  $\mu\text{g}$  de STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) en PBS
- 3) 3,0  $\mu\text{g}$  de STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95) en PBS
- 4) 0,3  $\mu\text{g}$  de STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95) en PBS

Se extrajo sangre a los ratones el día 21, se clarificaron los sueros por coagulación y centrifugación y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Determinación del anticuerpo sérico: Se determinaron los niveles de IgG específica de HA y STF2 mediante ELISA. Se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos (Costar (n° de cat. 9018), Corning, NY) durante una noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  con 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de proteína HA purificada de Viet Nam/1203/2004 (BEI Resources (n° de cat. NR-660), Manassas, VA) o flagelina recombinante (STF2) (SEQ ID NO: 96) en PBS (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Se bloquearon las placas con 200  $\mu\text{l}$ /pocillo de tampón de diluyente de ensayo (ADB; BD Pharmingen (n° de cat. 555213) San Diego, CA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas 3 veces con tampón PBS que contiene 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBS-T). Se añadieron diluciones de los sueros en ADB (100  $\mu\text{l}$ /pocillo) y se incubaron las placas durante una noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se lavaron las placas tres veces con PBS-T. Se añadieron anticuerpos de IgG de cabra anti-ratón marcados con HRP (Jackson Immunochemical (n° de cat. 115-035-146), West Grove, PA) diluidos en ADB (100  $\mu\text{l}$ /pocillo) y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron las placas tres veces con PBS-T. Después de añadir sustrato TMB Ultra (Pierce (n° de cat. 34028), Rockford, IL)) y monitorizar el desarrollo de color, se midió la  $A_{450}$  en un espectrofotómetro de microplacas Tecan Farcyte (Durham, NC).

##### **Resultados y discusión**

Se examinó la inmunogenicidad de STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95) en ratones BALB/c. Se inmunizaron los animales por vía s.c. los días 0 y 14 con 3  $\mu\text{g}$  de STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90), o 3 o 0,3  $\mu\text{g}$  de STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95). El día 21, se extrajo sangre a los animales y se examinaron las respuestas de IgG séricas ante HA purificada de A/Viet Nam/1203/2004 (obtenido de BEI Resources n° de cat. NR-660) y flagelina recombinante (STF2; (SEQ ID NO: 96)) por ELISA (Figuras 10A y 10B). Los resultados demuestran que el suero de ratones inmunizados con STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95) exhibe reactividad específica de antígeno con proteína H5 purificada de gripe A/Viet Nam/1203/2004.

#### **EJEMPLO 8: CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE FLAGELINA-HEMAGLUTININA RECOMBINANTES PRODUCIDAS EN BACULOVIRUS**

Clonación: Se llevó a cabo la expresión de las proteínas de fusión de HA y STF2.HA usando el sistema de expresión de *Baculovirus* Bac-to-Bac (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las directrices del fabricante (Figura 11). Se clonaron ADNc que codifican las proteínas de fusión HA y STF2.HA en el plásmido donante pFastBac, que se usó entonces para transformar células DH10Bac que contienen el báculo y ADN auxiliar. Se identificaron entonces los clones de báculo recombinante generados mediante recombinación homóloga en DH10Bac mediante cribado azul-blanco en placas de X-gal. Se dan los detalles del procedimiento de clonación en los siguientes párrafos.

Generación de módulos de vector: El vector pFastBac™ 1 es compatible con el sistema de expresión de *Baculovirus* Bac-to-Bac® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este vector tiene un promotor fuerte de polihedrina (PH) de AcMNPV para un alto nivel de expresión de proteína y un gran sitio de clonación múltiple para clonación simplificada. pFastBac™ 1 es un vector sin fusión (concretamente, no están presentes marcapos de fusión en el vector).

Para asegurar la expresión apropiada de proteína recombinante, el inserto debe contener un codón iniciador ATG para el inicio de la traducción y un codón finalizador para la terminación de la traducción. Para facilitar la clonación de flagelina en fusión con varios truncamientos del gen HA, se genomanipularon dos módulos de plásmido: pFB-STF2Bip.wt (SEQ ID NO: 97) y pFB-STF2Bip.ng (SEQ ID NO: 98). En el último, se anularon los presuntos sitios de

glucosilación en el gen de flagelina (STF2) sustituyendo Gln (Q) a Asn (N). Se determinaron los sitios potenciales de glucosilación usando la secuencia de consenso para N-glucosilación N-X-S/T: residuo de N seguido de cualquier residuo y S o T en la tercera posición.

5 En ciertas localizaciones, en los residuos 40, 122, 215, 237, 414, 478 y 497 del gen de STF2 (SEQ ID NO: 212), se incorporó el residuo N como una sustitución de Q. Los constructos que albergan estas mutaciones, y en que las proteínas no es probable que se estén modificadas por azúcares, se designan con mutantes no glucosilados (ng). De forma similar, se introdujeron mutaciones de glucosilación en el gen de HAOs en las posiciones 11, 23, 268, 286 y 480 (SEQ ID NO: 23). Ambos constructos de vector (pFB-STF2Blp.wt y pFB-STF2Blp.ng) albergan una mutación silenciosa en los nucleótidos 5'-GTGCTGAGCCTGTTACGT-3' (SEQ ID NO: 310) (nt 1501 a 1518) de STF2 (SEQ ID NO: 212), creando un único *BlnI* en el módulo de plásmido. Cada módulo contiene la secuencia de melitina de abeja melífera (HBM) (SEQ ID NO: 99) fusionada con el extremo amino de STF2, proporcionando una señal para secreción. Se optimizaron en ambos plásmidos los codones para expresión en *Baculovirus* (Midland Certified Reagent Co., Inc, Midland, TX; DNA2.0 Inc, Menlo Park, CA). Se extirparon los genes sintéticos con *Bam*HI o *Bg*II y *Sph*I y se clonaron en el vector pFastBac™1 mediante ligamiento de extremos compatibles, generando los módulos pFB-STF2Blp.wt y pFB-STF2Blp.ng.

Constructos de fusión de flagelina-HA: Se expresaron subunidades de cabeza globular de HA de los virus de la gripe A/Puerto Rico/8/34, A/Viet Nam/1203/2004, A/Indonesia/2005 y A/Nueva Caledonia/12/99 solos o fusionados genéticamente con flagelina (STF2) (SEQ ID NO: 178) y se expresaron en *Baculovirus*. Esto se logró mediante uno de tres métodos.

20 **Método nº 1:** Para generar reactivos para ELISA, se clonaron subunidades HA1-1 de cepas PR8, VN, IND y NC (Tablas 7 y 8) en pFASTBac™1, generando pFB.HA1-1 que alberga un marcaje de hexa-his. Esto se consiguió empleando PCR con un conjunto de cebadores como se indica en las Tablas siguientes y con un gen de HAOs sintético de codones optimizados (HA excluyendo la secuencia señal y el dominio extracelular) como molde de ADN (DNA2.0 Inc., Menlo Park, CA). Se digirieron los fragmentos de PCR con *Bg*II y *Sph*I y se insertaron en pFastBac™1, que se había tratado anteriormente con las enzimas *Bg*II y *Sph*I, seguido de tratamiento con BAP. Para generar una fusión de flagelina-subunidad de HA, se digirió el producto de PCR con *Bln*I y se ligó mediante extremos compatibles con pFB-STF2Blp.wt.

30 **Método nº 2:** En este protocolo, se sintetizaron químicamente genes de subunidad de HA de codones optimizados que representan tanto las formas wt como no glucosilada (DNA2.0 Inc., Menlo Park, CA). Se extirparon los genes con enzimas *Bln*I y *Sph*I y el fragmento se purificó en gel y se ligó con pFB-STF2Blp.wt o la versión no glucosilada, pFB-STF2Blp.ng, previamente digerida con *Bln*I y *Sph*I y tratada con BAP. En cada caso, se usó mezcla de ligamiento para transformar células TOP10 y se cribaron los transformantes por PCR y secuenciación de ADN, para confirmar la presencia y orientación correcta de los insertos. Se usaron los constructos para transformar *E. coli* MAX Efficiency® DH10Bac™ competente (Invitrogen, Carlsbad, CA), generando un báculo recombinante. Se cribaron en las colonias de bacterias los báculos positivos por selección de azul/blanco en placas que contienen kanamicina 50 µg/ml, gentamicina 7 µg/ml, tetraciclina 10 µg/ml, IPTG 40 µg/ml y Bluo-Gal (40 µg/ml). Se preparó el ADN de báculo recombinante y se usó para transfectar la estirpe celular de insecto de elección (células Sf9 o Sf21), generando un *Baculovirus* recombinante. Se amplificó entonces la disolución madre de baculovirus, se tituló y se usó para infectar células de insecto High Five para expresar proteína recombinante.

40 Tabla 7: Constructos de HA de PR8 para expresión en *Baculovirus*

| SEQ ID NO: | Constructo (marcaje de His) | MÉTODO | Cebador de cod. de SEQ ID NO: | Cebador inv. de SEQ ID NO: | Molde de ADN de SEQ ID NO: |
|------------|-----------------------------|--------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 100        | STF2.HAOs                   | nº 1   | 101                           | 102                        | 103                        |
| 104        | STF2.HA1-1                  | nº 1   | 105                           | 106                        | 103                        |
| 107        | STF2.HA1-2                  | nº 1   | 108                           | 109                        | 103                        |
| 110        | STF2.HA1-2mut               | nº 2   | N/A                           | N/A                        | 111                        |
| 112        | STF2.HA1-3                  | nº 1   | 113                           | 114                        | 103                        |
| 115        | STF2.HA1-3mut               | nº 2   | N/A                           | N/A                        | 116                        |
| 117        | ngSTF2.HAOs                 | nº 2   | N/A                           | N/A                        | 118                        |

| SEQ ID NO:      | Construido (marcaje de His) | MÉTODO | Cebador de cod. de SEQ ID NO: | Cebador inv. de SEQ ID NO: | Molde de ADN de SEQ ID NO: |
|-----------------|-----------------------------|--------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 119             | ngSTF2.HA1-1                | n° 2   | N/A                           | N/A                        | 120                        |
| 12 <sup>1</sup> | ngSTF2. HA 1-2              | n° 2   | N/A                           | N/A                        | 122                        |
| 123             | ngSTF2.HA1-2mut             | n° 2   | N/A                           | N/A                        | 124                        |
| 125             | ngSTF2.HA1-3                | n° 2   | N/A                           | N/A                        | 126                        |
| 127             | ngSTF2.HA1-3mut             | n° 2   | N/A                           | N/A                        | 128                        |
| 129             | wtSTF2.HA1-1 ng             | n° 2   | N/A                           | N/A                        | 130                        |
| 131             | ngSTF2.HA1-1 wt             | n° 2   | N/A                           | N/A                        | 132                        |
| 133             | HA1-1                       | n° 1   | 134                           | 135                        | 136                        |
| 137             | HA1-1 (sin marcador)        | n° 1   | 134                           | 138                        | 136                        |

Tabla 8: Constructos de HA de NC, VN y NC para expresión en *Baculovirus*

| SEQ ID NO: | Construido (marcaje de His) | MÉTODO | Cebador de cod. de SEQ ID NO: | Cebador inv. de SEQ ID NO: | Molde de ADN de SEQ ID NO: |
|------------|-----------------------------|--------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 139        | HA1-1(NC)                   | n° 1   | 140                           | 141                        | 142                        |
| 143        | HA1-1(VN)                   | n° 1   | 144                           | 145                        | 146                        |
| 147        | HA1-1(IND)                  | n° 1   | 148                           | 149                        | 150                        |

5 Expresión de proteína: Se cultivaron células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf9) en medio celular de insecto de Grace (Invitrogen; Carlsbad, CA). Se purificaron los bácmidos recombinantes a partir de clones de DH10Bac y se transfectoron en células Sf9 usando celfectina (Invitrogen; Carlsbad, CA), generando disoluciones madre de *Baculovirus* de paso 1 (P1), que se titularon entonces mediante ensayo de placa tradicional según las directrices del fabricante. Se efectuaron infecciones posteriores de células Sf9 usando disoluciones madre víricas P1 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1, produciendo un mayor volumen de disoluciones madre víricas P2 con títulos víricos aumentados. Se aumentaron de escala los cultivos que expresan la siguientes proteínas para purificación de proteína: ngSTF2.HA(PR8)1-2mutHis (SEQ ID NO: 156), ngSTF2.HA(PR8)1-1His (SEQ ID NO: 152), STF2.HA(PR8)1-1His (SEQ ID NO: 151), STF2.HA(PR8)1-2His (SEQ ID NO: 153), STF2.HA1-2mutHis (SEQ ID NO: 155), HA(PR8)1-1His (SEQ ID NO: 179) HA(VN)1-1His (SEQ ID NO: 180), HA(IND)1-1His (SEQ ID NO: 181) y HA(NC)1-1His (SEQ ID NO: 182). Se efectuó la expresión de proteína infectando matraces de 2 x 1 l de células de insecto High-5 con virus P2 a una MOI de 2 y cultivando durante 24 h a 28 °C con agitación lenta. Se recolectó el medio acondicionado mediante centrifugación, se clarificó pasando a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó a 4 °C.

20 Purificación de proteína: Se añadió NiSO<sub>4</sub> a cada sobrenadante clarificado a una concentración final de 0,5 mM y se ajustó el pH a 8,0. Se capturó entonces la proteína marcada con His<sub>6</sub> sobre una columna de Sepharose quelante (GE/Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) cargada con NiSO<sub>4</sub> y equilibrada con tampón A [Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 0,5 M). Después de lavar con tampón A, se eluyó la proteína unida con tampón B (tampón A + imidazol 0,5 M). Se combinaron las fracciones de pico, se dializaron durante una noche frente a tampón A y se aplicaron a una columna de níquel-NTA (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). Se eluyó la columna con un gradiente de 5 volúmenes de columna de 100 % de tampón A a 100 % de tampón B. Se agruparon las fracciones de pico y se dializaron frente a 1X TBS, pH 8,0.

25 PAGE-SDS y análisis de transferencia Western: Se determinó la identidad de proteína y se estimó la pureza por PAGE-SDS. Se diluyó una alícuota de 5 µg de cada muestra en tampón de muestra de PAGE-SDS con o sin DTT

- 100 mM como reductor. Se hirvieron las muestras durante 5 minutos, se cargaron en gel de poliacrilamida con SDS al 10 % (LifeGels; French's Forrest, Nueva Gales del Sur, AUS) y se sometieron a electroforesis. Se tiñó el gel con Coomassie R-250 (Bio-Rad; Hercules, CA) para visualizar las bandas de proteína. Para transferencia Western, se sometieron a electroforesis 0,5 µg/carril de proteína total como se describe anteriormente, se electrotransfirieron entonces los geles a una membrana de PVDF y se bloquearon con leche en polvo al 5 % (p/v) antes de sondear con anticuerpo anti-flagelina (Inotek; Beverly, MA), anticuerpo anti-His<sub>6</sub> (Invitrogen; Carlsbad, CA) o suero inmune de convaleciente de gripe A PR/8/34 (descrito a continuación en ELISA de antigenicidad de proteína). Después de sondear con anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (Pierce; Rockford, IL), se visualizaron bandas de proteína con un sustrato cromogénico de fosfatasa alcalina (Promega; Madison, WI).
- 5
- 10 **Ensayo de proteína:** Se determinó la concentración de proteína total usando el ensayo de Micro BCA (ácido bicinconínico) (Pierce; Rockford IL) en formato de microplaca, usando seroalbúmina bovina como patrón, según las instrucciones del fabricante.
- Ensayo de endotoxina:** Se determinaron los niveles de endotoxina usando el kit de ensayo LAL cromogénico cuantitativo QCL-1000 (Cambrex; E. Rutherford, NJ), siguiendo las instrucciones del fabricante para el método de microplaca.
- 15
- Ensayo de bioactividad de TLR5:** Las células HEK293 expresan constitutivamente TLR5 y secretan varios factores solubles, incluyendo IL-8, en respuesta a la señalización de TLR5. Se sembraron las células en microplacas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo), se añadieron las siguientes proteínas de ensayo y se incubaron durante una noche: ngSTF2.HA(PR8)1-2mutHis (SEQ ID NO: 156), ngSTF2.HA(PR8)1-1His (SEQ ID NO: 152), STF2.HA(PR8)1-1His (SEQ ID NO: 151), STF2.HA(PR8)1-2His (SEQ ID NO: 153) y STF2.HA1-2(PR8)mutHis (SEQ ID NO: 155). El día siguiente, se recolectó el medio acondicionado, se transfirió a una microplaca de 96 pocillos limpia y se congeló a -20 °C. Después de descongelar, se ensayó en el medio acondicionado la presencia de IL-8 en un ELISA de sándwich usando un par de anticuerpos coincidentes anti-IL-8 humana (Pierce; Rockford, IL, n° M801E y n° M802B) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 20
- 25 **ELISA de antigenicidad de proteína:** Se evaluaron los siguientes constructos purificados a partir de cultivo de *Baculovirus* mediante ELISA para determinar si las proteínas exhibían epítomos plegados correctamente de HA: ngSTF2.HA(PR8)1-2mutHis (SEQ ID NO: 156), ngSTF2.HA(PR8)1-1His (SEQ ID NO: 152), STF2.HA(PR8)1-1His (SEQ ID NO: 151), STF2.HA(PR8)1-2His (SEQ ID NO: 153), STF2.HA1-2mutHis (SEQ ID NO: 155) y STF2.HA(PR8)1-1His (SEQ ID NO: 179). Se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos durante una noche a 4 °C con diluciones en serie en PBS (100 µl/pocillo) de cada proteína diana partiendo de 5 µg/ml. Se bloquearon las placas con 200 µl/pocillo de tampón de diluyente de ensayo (ADB; BD Pharmingen) durante 1 hora a temperatura ambiente, y se lavaron entonces 3 veces con PBS-T. Se añadió entonces una dosis fija de anticuerpo primario a cada pocillo. Para ensayar la reactividad de HA, se añadieron 100 µl/pocillo de una dilución 1:10.000 de suero no inmune o inmune de convaleciente de PR/8/34 en ADB. Se generó suero inmune de PR/8/34 en ratones BALB/c (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) que recibieron una dosis de exposición subletal determinada experimentalmente de 8x10<sup>1</sup> dosis infectantes de embrión (EID) de virus de la gripe PR/8/34. Se dejaron entonces convalecer los animales durante > 21 días después de la infección, en cuyo momento se aisló y clarificó el suero inmune.
- 30
- 35
- 40 Para ELISA de flagelina o marcaje de 6 x histidina, se añadió anticuerpo monoclonal contra 6x His (Invitrogen; Carlsbad, CA) o flagelina (Inotek; Beverly, MA) a 1 µg/ml en ADB (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas durante 1 h a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C. Se lavaron entonces las placas tres veces con PBS-T. Se añadieron anticuerpos de IgG de cabra anti-ratón marcados con HRP (Jackson Immunochemical; West Grove, PA) diluidos en (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron las placas tres veces con PBS-T. Después de añadir sustrato TMB Ultra (Pierce; Rockford, IL) y monitorizar el desarrollo de color, se midió la A<sub>450</sub> en un espectrofotómetro de microplaca (FARCyte, GE/Amersham; Piscataway, NJ).
- 45

## Resultados y discusión

- Expresión y purificación de proteínas HA recombinantes:** Se resumen en la Tabla 9 los resultados de la expresión en *Baculovirus* de proteínas de fusión STF2.HA recombinantes. Todas las proteínas se expresaban con rendimiento de moderado a alto. La pureza después de cromatografía de quelato metálico era generalmente buena y los niveles de endotoxina estaban bastante por debajo del límite aceptable de 0,1 UE/µg. Todas las proteínas de fusión de STF2 demostraron una potente actividad de TLR5 *in vitro*.
- 50

Tabla 9

| proteína            | SEQ ID NO: | rendimiento (mg) | pureza (%) | est. | endotoxina (UE/µg) | actividad de TLR (CE <sub>50</sub> , ng/ml) |
|---------------------|------------|------------------|------------|------|--------------------|---|
| STF2.HA1-1.his(PR8) | 151        | 12               | >80        |      | 0,01               | 3   |

| proteína                | SEQ ID NO: | rendimiento (mg) | pureza est. (%) | endotoxina (UE/μg) | actividad de TLR (CE <sub>50</sub> , ng/ml) |
|-------------------------|------------|------------------|-----------------|--------------------|---|
| ngSTF2.HA1-1.His(PR8)   | 152        | 24               | >90             | < 0,01             | 30  |
| STF2.HA1-2His(PR8)      | 153        | 13,2             | >90             | < 0,01             | 9   |
| STF2.HA1-2mutHis(PR8)   | 155        | 25               | >95             | < 0,01             | 900   |
| ngSTF2.HA1-2mutHis(PR8) | 156        | 6                | >90             | 0,01               | 9   |

Se genomanipularon proteínas STF2.HA para expresión en *Baculovirus* con y sin sitios de glucosilación N-ligados para determinar el efecto de esta modificación postraducciona sobre la expresión, plegamiento y actividad biológica. ngSTF2.HA1-2.mutHis(PR8) (SEQ ID NO: 156), que no está glucosilada, parece expresarse a menor nivel en sobrenadantes de *Baculovirus* que la proteína glucosilada correspondiente, sugiriendo que la glucosilación puede influir en el plegamiento o secreción de esta proteína. in embargo, las versiones glucosilada y no glucosilada de esta proteína parecen reaccionar igualmente con antisuero de convaleciente de ratones infectados con gripe PR8 cuando se analizan por transferencia Western. Además, ngSTF2.HA1-1His(PR8) (SEQ ID NO: 152) se expresaba a mayores niveles que su contrapartida glucosilada, indicando que cualquier efecto de la glucosilación sobre la expresión de estas proteínas no puede generalizarse fácilmente.

Además de las proteínas expresadas y purificadas a gran escala, se analizó en los sobrenadantes de P1 de *Baculovirus* a pequeña escala de STF2.HA1-3His(PR8) (SEQ ID NO: 157) y STF2.HA1-3mutHis(PR8) (SEQ ID NO: 158) la reactividad de anticuerpo de HA. Como se observa con la proteína STF2.HA1-3(PR8) (SEQ ID NO: 92) expresada en *E. coli* (véase el ejemplo nº 4), estas proteínas mostraron muy poca reactividad con suero de ratón convaleciente de PR8 en transferencias Western de medio acondicionado. Este resultado confirma además que las proteínas STF2.HA1-3, expresadas en un hospedador procariontico o eucariótico, son incapaces de plegarse apropiadamente y exhibir epítopos nativos.

**Antigenicidad:** Se analizaron por ELISA varias proteínas STF2.HA producidas en *Baculovirus* y *E. coli*. Todas las proteínas de fusión de STF2 reaccionaban igualmente bien con anticuerpo anti-flagelina (Inotek; Beverly, MA), demostrando una igual carga de proteína en el ensayo. Se examinó entonces el plegamiento y la exhibición de epítopos de anticuerpo apropiados en proteínas de fusión STF2.HA midiendo la reactividad de cada proteína con antisueros de ratones que se habían recuperado de infección por gripe PR/8/34. La reactividad con suero de ratón convaleciente de PR/8/34 era equivalente para STF2.HA1-1 His(PR8) (SEQ ID NO: 151), ngSTF2.HA1-1His(PR8) (SEQ ID NO: 152) y ngSTF2HA1-2mutHis(PR8) (SEQ ID NO: 156) expresadas en *Baculovirus* y STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) expresada en *E. coli* (véase el ejemplo nº 4). Por tanto, el reconocimiento de anticuerpo sérico del dominio de cabeza de HA puede centrarse en una región englobada por el constructo HA1-2. Además, el repliegamiento *in vitro* de STF2.HA1-2 (SEQ ID NO: 90) producida en *E. coli* da como resultado una proteína con reactividad inmunitaria equivalente (y por lo tanto conformación plegada similar) a una proteína procesada y secretada por una célula eucariótica (*Baculovirus*). Además, el reconocimiento por anticuerpo sérico del dominio de cabeza de HA parece no ser dependiente de la glucosilación y, al menos para PR/8/34 HA, puede no estar afectado negativamente por la glucosilación. Las HA (hemaglutininas) de diferentes cepas de la gripe tienen patrones variables de glucosilación N-ligada. (La glucosilación puede afectar negativamente el reconocimiento inmunitario de otras HA). El reconocimiento por anticuerpo sérico de HA puede no estar afectado por la N-glucosilación. Es posible que la glucosilación pueda influir de otro modo en la eficacia, tal como la semivida de una vacuna.

### **EJEMPLO 9: INMUNOGENICIDAD Y EFICACIA DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE FLAGELINA-HEMAGLUTININA RECOMBINANTES PRODUCIDAS EN *BACULOVIRUS***

#### **Material y métodos**

**Estudios animales:** Se usaron ratones BALB/c hembra (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) a la edad de 6-8 semanas. Se dividieron los ratones en grupos de 10 y recibieron inmunizaciones subcutáneas inguinales los días 0 y 14 como sigue:

- 1) PBS (disolución salina tamponada con fosfato).
- 2) 3 μg de STF2.HA1-2(PR8) de *E. coli* (SEQ ID NO: 90) en PBS
- 3) 3 μg de STF2.HA1-1(PR8) de *Baculovirus* (SEQ ID NO: 151) en PBS

- 4) 3 µg de ngSTF2.HA1-1 (PR8) de *Baculovirus* (SEQ ID NO: 152) en PBS
- 5) 0,3 µg de ngSTF2.HA1-1 (PR8) de *Baculovirus* (SEQ ID NO: 152) en PBS
- 6) 3 µg de STF2.HA1-1(PR8) de *E. coli* (SEQ ID NO: 89) en PBS
- 7) 0,3 µg de STF2.HA1-1(PR8) de *E. coli* (SEQ ID NO: 89) en PBS

5 Se extrajo sangre a los ratones los días 10 (primario) y 21 (refuerzo), se clarificaron los sueros mediante coagulación y centrifugación y se almacenaron a -20 °C. Se expusieron los animales inmunizados el día 28 a una DL<sub>90</sub> (8x10<sup>3</sup> EID) de virus A PR/8/34 administrado por vía intranasal (véase el ejemplo 6). Se monitorizaron en los ratones diariamente durante 21 días después de la exposición supervivencia, pérdida de peso y presentación clínica.

10 Determinación del anticuerpo sérico: Se determinaron los niveles de IgG específica de HA mediante ELISA. Se recubrieron durante una noche placas ELISA de 96 pocillos (Costar (nº de cat. 9018) Corning, NY) a 4 °C con 100 µl/pocillo de proteína HAOSHis producida en *Drosophila* (SEQ ID NO: 176) en PBS (5 µg/ml). Se bloquearon las placas con 200 µl/pocillo de tampón de diluyente de ensayo (ADB; BD Pharmingen (nº de cat. 555213) San Diego, CA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas 3 veces con PBS que contiene 0,05 % de Tween -20 (PBS-T). Se añadieron diluciones de los sueros en ADB (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas durante una  
 15 noche a 4 °C. Se lavaron las placas tres veces con PBS-T. Se añadieron anticuerpos de IgG de cabra anti-ratón marcados con HRP (Jackson Immunochemical (nº de cat. 115-035-146), West Grove, PA) diluidos en ADB (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron las placas tres veces con PBS-T. Después de añadir sustrato TMB Ultra (Pierce (nº de cat. 34028), Rockford, PA) y monitorizar el desarrollo de color, se midió la A<sub>450</sub> en un espectrofotómetro de microplacas Tecan Farcyte (Durham, NC).

20 **Resultados y discusión**

Inmunogenicidad y eficacia de STF2.HA1-1 (PR8) expresada en *E. coli* y *Baculovirus*: Se inmunizaron ratones BALB/c por vía s.c. con 3,0 o 0,3 µg de las proteínas de fusión recombinantes indicadas los días 0 y 14. El día 21, se extrajo sangre a los ratones y se examinaron los títulos de IgG específicos de HA por ELISA frente a HAOSHis (SEQ ID NO 176) expresada en *Drosophila*. Las Figuras 12A, 12B muestran que las proteínas inducían niveles variables  
 25 de IgG específica de HA, induciendo ngSTF2.HA1-1 (PR8) (SEQ ID NO: 152) la respuesta más fuerte, similar a la observada en animales inmunizados con STF2.HA1-2(PR8) expresada en *E. coli* (SEQ ID NO: 90). De forma interesante, los animales inmunizados con STF2.HA1-1(PR8) que contiene secuencias de glucosilación intactas expresada en *Baculovirus* (SEQ ID NO: 151) desencadenaban de pocas a ninguna respuesta de anticuerpo de HA o flagelina detectable, en notable contraste con lo observado en animales inmunizados de forma similar con  
 30 STF2.HA1-1(PR8), donde se habían retirado las secuencias de glucosilación de consenso (SEQ ID NO: 152).

Se expusieron los ratones inmunizados el día 28 a una DL<sub>90</sub> (8x10<sup>3</sup> EID) de virus A PR/8/34 administrado por vía intranasal. Se monitorizaron en los ratones diariamente durante 21 días después de la exposición supervivencia, pérdida de peso y presentación clínica. Como se muestra en la Figuras 13A, 13B, 13C, los ratones inmunizados con  
 35 PBS mostraron signos de infección (pérdida de peso y puntuaciones clínicas menores) tan pronto como 3 días después de la exposición y murieron para el día 21, mientras que los ratones inmunizados con 3,0 µg de proteína de fusión recombinante STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90) demostraron una protección potenciada con pocos a ningún signo clínico observable de infección ni pérdida de peso. Aunque los animales inmunizados con proteínas de fusión STF2.HA1-1 demostraron una eficacia significativamente mayor que los animales inmunizados con PBS solo, estos animales demostraron una menor eficacia en términos de supervivencia, puntuaciones clínicas y pérdida de  
 40 peso global, en comparación con animales que reciben STF2.HA1-2(PR8) (SEQ ID NO: 90). Estos resultados demuestran que las subunidades de HA ligadas a STF2 en *Baculovirus* son inmunogénicas y eficaces, y sugieren que la STF2.HA1-1 (SEQ ID NO: 89) expresada en *E. coli* o *Baculovirus* es menos inmunogénica y eficaz que la STF2.HA1-2 expresada en *E. coli* (SEQ ID NO: 90) o *Baculovirus*.

**EJEMPLO 10: PURIFICACIÓN DE STF2.HA1-2(IND) (SEQ ID NO:159)**

45 **Materiales y Métodos**

Depósito celular: Se adaptaron células *E. coli* genomanipuladas para expresar STF2.HA1-2(IND) (SEQ ID NO: 159) a cultivo en medio MRSF registrado, se depositaron como disoluciones madre en glicerol en alícuotas de 1 ml y se almacenaron a -70 °C.

|                    |     |
|--------------------|-----|
| medio MRSF, pH 7,0 |     |
| Composición        | g/l |
| Glucosa            | 10  |

ES 2 534 332 T3

| medio MRSF, pH 7,0                                   |         |
|--|---------|
| Composición  | g/l     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 7,8     |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 2,33    |
| Ácido cítrico  | 1,0     |
| MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)                | 1,0     |
| CaCl <sub>2</sub>                                    | 0,04    |
| Oligometales   | 1 ml    |
| HCl de tiamina                                       | 0,01    |
| Kanamicina   | 0,0075  |
|  |         |
| Disolución de oligometales 1000x                     |         |
| Componente   | g/l     |
| EDTA de disodio                                      | 5       |
| FeSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)                | 10      |
| ZnSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)                | 2       |
| MnSO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O)                 | 2       |
| CoCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O)                | 0,2     |
| CuSO <sub>4</sub> (5H <sub>2</sub> O)                | 0,1     |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (2H <sub>2</sub> O) | 0,2     |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 0,1     |
| H <sub>2</sub> O                                     | 1000 ml |

5 Aumento de escala celular: Se recuperaron dos viales (2 ml, depositados en medio MRSF) de células *E. coli* genomanipuladas para expresar STF2.HA1-2 (IND) (SEQ ID NO: 159) de -70 °C y se inocularon en 500 ml de medio MRSF. Se propagaron las células mediante incubación a 37 °C durante 11,5 horas, en cuyo momento la DO<sub>600</sub> era de 3,2. El aumento de escala celular proporcionó biomasa para inocular el biorreactor de producción usado en la fermentación.

10 Fermentación: Se usó una alícuota de 250 ml de células a escala aumentada para inocular un biorreactor de volumen de trabajo de 12 l que contiene 10 l de medio MRBR registrado. Se incubó el cultivo con agitación constante manteniendo el pH a 7,0±0,1, la temperatura a 30±0,1 °C y el oxígeno disuelto (DO) a no menos del 30 %, y se hizo funcionar en modo por lotes hasta que se agotó la glucosa. El agotamiento de glucosa se indica por una



## ES 2 534 332 T3

súbita reducción de la demanda de O<sub>2</sub> y se confirma mediante la medida de la concentración de glucosa con un glucómetro YSI 2700 Select. La DO<sub>600</sub> para el cultivo en ese momento era de 20,1 UA.

5 30 minutos después del agotamiento de glucosa, se bombeó el medio de alimentación registrado al biorreactor a una velocidad controlada hasta añadir 2 l de alimentación. La incubación continuó durante 5,5 horas en condiciones de limitación de glucosa. A una DO<sub>600</sub> de 34 UA, se indujo la expresión de proteína en el cultivo mediante la adición de IPTG a una concentración final de 2 mM e incubación con agitación constante durante 2 horas. A la conclusión del periodo de inducción, se recolectaron las células mediante centrifugación en una centrifuga Avanti JP-20 XP durante 20 minutos a 10.000 g. La DO<sub>600</sub> final para el cultivo era de 58 UA y la concentración de proteína total, determinada por BCA, era de 6,73 mg/ml. Se recuperaron 1,16 kg de pasta celular de una recolección de 10,8 l y se congelaron a -20 °C. El tiempo de proceso total del biorreactor fue de 17 horas. Se confirmó la producción de STF2.HA1-2(IND) (SEQ ID NO: 159) mediante PAGE-SDS.

|   |  |
|---|--|
| medio MRBR, pH 7,0                              |  |
| Composición                                     | g/l  |
| Glucosa   | 20   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 2,2  |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 4,5  |
| Ácido cítrico                                   | 1,0  |
| MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)           | 1,0  |
| CaCl <sub>2</sub>                               | 0,04                                       |
| Oligometales                                    | 1 ml                                       |
| HCl de tiamina                                  | 0,01                                       |
| Antiespumante                                   | 0,05                                       |
| Kanamicina                                      | 0.0075                                     |
|   |  |
| medio de alimentación, pH 6,0                   | adiciones a medio MRBR (volumen final 2 l) |
| Composición                                     | g/l  |
| Glucosa   | 160  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 5,6  |
| DL-Alanina                                      | 50,0                                       |
| Ácido cítrico                                   | 3,0  |
| MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)           | 1,0 (añadido como solución de 78 g/l)      |
| CaCl <sub>2</sub>                               | 2,5 (añadido como solución de 80 g/l)      |

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| medio de alimentación, pH 6,0       | adiciones a medio MRBR (volumen final 2 l) |
| Composición                         | g/l  |
| Oligometales                        | 24 ml                                      |
| FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O | 0,75                                       |

5 Disgregación y clarificación celular: Se descongeló la pasta celular y se resuspendió en una suspensión al 15 % de Tris 50 mM, NaCl 25 mM, pH 8. Se homogeneizó la suspensión densa en un homogeneizador APV1000 tres veces a 82,7 MPa. Se ajustó el lisado a pH 4,0 mediante la adición de ácido acético y se centrifugó para separar el material soluble del insoluble. La STF2.HA1-2(IND) (SEQ ID NO: 159), junto con la mayoría de las demás proteínas, se reparte en la fracción insoluble. Se desechó el material soluble y se disolvió el material insoluble (sedimento) en dos veces el volumen de lisado inicial de acetato 50 mM, 1 % de TritonX-100, urea 8 M, pH 4. Después de mezclar en el homogeneizador a 0 kPa, se centrifugó la muestra y se recogió el sobrenadante, se filtró y se almacenó a 4 °C. Se confirmó la presencia de STF2.HA1-2(IND) (SEQ ID NO: 159) en las fases apropiadas (precipitado o sobrenadante) mediante PAGE-SDS.

10 Cromatografía de intercambio catiónico (CEX): Se aplicó el material clarificado a una columna Poros 50HS de 50 ml. Esta etapa se diseñó para reducir la concentración de endotoxina, reducir la concentración de ácido nucleico y aumentar la pureza de STF2.HA1-2 (IND) (SEQ ID NO: 159) del eluido en comparación con la carga. Después de cargar, se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de acetato 50 mM, 1 % de Triton X-100, urea 8 M, pH 4, seguido de 10 volúmenes de columna de acetato 50 mM, urea 8 M, pH 4. Se eluyó la proteína en un gradiente de 0-100 % de NaCl 1 M. La proteína diana eluyó a aproximadamente NaCl 300 mM. Se agrupó el pico principal (eluido) y se almacenó a 4 °C. Se confirmó la presencia de STF2.HA1-2(IND) (SEQ ID NO: 159) en la elución mediante PAGE-SDS. Se determinó la purificación de STF2.HA1-2(IND) (SEQ ID NO: 159) en esta etapa comparando el número e intensidad de bandas de proteína en el material de carga con las de la elución.

15 Retirada de endotoxina en cromatografía de intercambio catiónico (CEX): Se retira la endotoxina al eluir STF2.HA1-2 (IND) (SEQ ID NO: 159) con lavado de acetato 50 mM, 1 % de Triton X-100, urea 8 M, pH 4 y con condiciones de elución apropiadas. Se ensayó esto usando STF2.HA1-2 (VN) (SEQ ID NO: 95). Comparando dos tandas de intercambio catiónico separadas (resina Toso SP650M) con y sin lavado de acetato 50 mM, 1 % de Triton X-100, urea 8 M, pH 4 (lavado de RE frente a sin lavado de RE), la concentración de endotoxina en la elución de lavado de RE a NaCl 150 mM muestra una concentración de endotoxina significativamente menor que la elución con NaCl 250 mM de la misma tanda, o en cualquiera de las eluciones sin el lavado de acetato 50 mM, 1 % de Triton X-100, urea 8 M, pH 4.

| Tanda            | Elución (mM de NaCl) | [Endotoxina] (UE/ml)  | [Endotoxina] (UE/mg)  | [Proteína] por BCA (g/l) | UV 280/260 |
|------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|------------|
| Carga            | N/A                  | 4,4 x 10 <sup>5</sup> | 1,8 x 10 <sup>6</sup> | 2,39                     | -          |
| Sin lavado de RE | 100                  | 7,9 x 10 <sup>5</sup> | 4,2 x 10 <sup>6</sup> | 1,44                     | 1,05       |
|                  | 250                  | 8,0 x 10 <sup>5</sup> | 4,1 x 10 <sup>6</sup> | 1,12                     | 2,76       |
| Lavado de RE     | 150                  | 5,112                 | 2,888                 | 1,77                     | 0,982      |
|                  | 250                  | 24,440                | N/A                   | N/A                      | 0,545      |

20 Replegamiento: Se dializó el eluido de CEX frente a tampón Tris 50 mM, urea 8 M, pH 8 y se replegó mediante dilución rápida con 10 volúmenes de Tris 50 mM, pH 8.

25 Cromatografía de intercambio aniónico (AEX): Se aplicó la proteína replegada a una columna Q de GE Source de 25 ml. Esta etapa se diseñó para separar la STF2.HA1-2 (IND) (SEQ ID NO: 159) apropiadamente plegada de agregados y proteínas de célula hospedadora y para reducir la concentración de endotoxina del eluido en comparación con la carga. Después de cargar, se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de Tris 50 mM, NaCl 25 mM, pH 8. Se eluyó la proteína en un gradiente de 0-100 % de NaCl 1 M. Eluía un pico enriquecido en STF2.HA1-2(IND) (SEQ ID NO: 159) apropiadamente plegada con baja endotoxina (1,7 UE/ml) a aproximadamente

NaCl 150 mM. Un segundo pico que eluye a aproximadamente NaCl 170 a 270 mM contiene otras proteínas, incluyendo agregados de STF2.HA1-2 (IND) (SEQ ID NO: 159). Se agruparon las fracciones del primer pico y se almacenaron a 4 °C. Se mantuvieron las fracciones del primer pico para procesamiento adicional. Se confirmó la presencia de STF2.HA1-2(IND) (SEQ ID NO: 159) en la primera y segunda eluciones mediante PAGE-SDS. Se determinó la purificación de STF2.HA1-2(IND) (SEQ ID NO: 159) en esta etapa comparando el número e intensidad de bandas de proteína en el material de carga con las de la elución.

Cromatografía de exclusión por tamaño preparativa (SEC): Se procesó el eluido de AEX en una columna SEC de 320 ml en fracciones de 2 x 5 ml frente a TBS. Esta etapa se diseña para separar la STF2.HA1-2 (IND) (SEQ ID NO: 159) correctamente plegada de otras proteínas. Cada tanda daba como resultado la elución de un solo pico principal, que se recogía, se agrupaba y se filtraba a través de un filtro de 0,22 µm. Se almacenó el producto a -70 °C.

Se confirmó la presencia de STF2.HA1-2(IND) (SEQ ID NO: 159) en la elución mediante PAGE-SDS. Se determinó la purificación de STF2.HA1-2(IND) (SEQ ID NO: 159) en esta etapa comparando el número e intensidad de bandas de proteína en el material de carga con las de la elución. El perfil de material final en PAGE-SDS es una sola banda marcada.

### Resultados y discusión

Caracterización final de proteína: Se expresó la proteína STF2.HA1-2(IND) (SEQ ID NO: 159) recombinante en *E. coli* y se purificó hasta homogeneidad. Se formuló el producto final en 1 x TBS (Tris 27,7 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, pH 7,4; preparado a partir de disolución madre 10x, n° de catálogo de Teknova T9530) y se almacenó a -70 °C en alícuotas de 1,0 ml. El rendimiento final era de 15,75 ml (45 ml a una concentración de 0,35 mg/ml), con un nivel de endotoxina de 1,1 UE/mg de proteína determinado por el método LAL. La proteína retenía la actividad biológica de TLR5, medida en un ensayo basado en células de liberación de citocina.

PAGE-SDS: Se determinó la identidad de proteína y se estimó la pureza por PAGE-SDS. Se diluyó una muestra de alícuota en tampón de muestra de PAGE-SDS y diluyente. Se hirvieron las muestras durante 5 minutos, se cargaron en gel de poliacrilamida con SDS al 4 a 12% (Invitrogen NuPage) y se sometieron a electroforesis. Se tiñó el gel con Coomassie R-250 para visualizar las bandas de proteína. Se indicaron los resultados positivos de STF2.HA1-2(IND) (SEQ ID NO: 159) por una banda a aproximadamente 75 kDa en comparación con patrones BioRad Precision Plus procesados en el mismo gel. Se estima la pureza comparando visualmente la intensidad de la banda de STF2.HA1-2 (IND) (SEQ ID NO: 159) con todas las demás bandas.

Ensayo de bioactividad de TLR5: Las células HEK293 expresan constitutivamente TLR5 y secretan varios factores solubles, incluyendo IL-8, en respuesta a la señalización de TLR5. Se sembraron las células en microplacas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo), se añadieron las proteínas de ensayo y se incubaron durante una noche: El día siguiente, se recolectó el medio acondicionado, se transfirió a una microplaca de 96 pocillos limpia y se congeló a -20 °C. Después de descongelar, se ensayó en el medio acondicionado la presencia de IL-8 en un ELISA de sándwich usando un par de anticuerpos anti-IL-8 humanos coincidentes (Pierce, n° M801E y n° M802B) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la densidad óptica usando un espectrofotómetro de microplaca (FARCyte, Amersham).

Ensayo de endotoxina: Se determinaron los niveles de endotoxina usando el kit de ensayo de LAL cromogénico cuantitativo QCL-1000 (Cambrex), siguiendo las instrucciones del fabricante para el método de microplaca.

Ensayo de proteína: Se determinó la concentración de proteína total usando el ensayo de micro BCA (ácido bicinconínico) (Pierce) en formato de microplaca, usando seroalbúmina bovina como patrón, según las instrucciones del fabricante.

Ensayo de UV280/260: Este ensayo es una medida de la concentración de ácido nucleico en una muestra en comparación con la concentración de proteína. El máximo de absorbancia aparece a aproximadamente 260 nm para ácidos nucleicos, mientras que el máximo de absorbancia para proteínas aparece a aproximadamente 280 nm. Una alta relación entre la absorbancia a 280 nm frente a la absorbancia a 260 nm indica una muestra enriquecida en proteína frente a ácidos nucleicos.

## EJEMPLO 11: CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE FLAGELINA-HEMAGLUTININA RECOMBINANTES PRODUCIDAS EN *DROSOPHILA*

### Materiales y Métodos

Clonación y expresión de HA en *Drosophila*: Se aisló ARN de la cepa de gripe A A/Puerto Rico/8/34 usando el kit MinElute Virus Spin de QIAamp (Qiagen, n° de cat. 57704) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se transcribió de forma inversa el ARN de HA usando el sistema SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen; n° de cat. 18080-051) o el sistema SuperScript III One-Step RT-PCR con Platinum-Taq High Fidelity (Invitrogen; n° de cat. 12574-030) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se clonó el ADNc usando el vector de clonación de TOPO PCR II Zero Blunt (Invitrogen). Se subclonó entonces el fragmento HA0s (gen HA sin secuencia

señal y dominio transmembrana) en pMT/STF2Δ tanto en el extremo C como el extremo NH2 del módulo usando una estrategia basada en PCR para generar los constructos STF2Δ.HAOs (PR8) (SEQ ID NO: 160) y HAOs(PR8).STF2Δ (SEQ ID NO: 167) respectivamente. Se clonó también el gen de HA en el vector pMT/Bip/V5-his sin STF2Δ, generando el constructo HAOs.his (SEQ ID NO: 170). La Tabla 10 enumera los constructos y cebadores usados en su construcción.

5

Tabla 10: Constructos de HA de PR8 para expresión en *Drosophila*

| SEQ NO: | ID | Constructo    | Cebador de cod. de SEQ ID NO: | Cebador inv. de SEQ ID NO: | Molde de ADN de SEQ ID NO: |
|---------|----|---------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 160     |    | STF2Δ.HAOsHis | 161                           | 162                        | 163                        |
| 164     |    | STY2Δ.HAOs    | 165                           | 166                        | 163                        |
| 167     |    | HAOs.STF2Δ    | 168                           | 169                        | 163                        |
| 170     |    | HAOsHis       | 171                           | 172                        | 163                        |
| 173     |    | HAOs          | 174                           | 175                        | 163                        |

Expresión de proteína recombinante de células Dmel-2 de *Drosophila*: Se cotransfectaron los plásmidos HAOs.His (SEQ ID NO: 170) y STF2Δ.HAOs (SEQ ID NO: 164) con el plásmido pCoBlast en células Dmel-2 de *Drosophila*, generando células estables Dmel-2 HAOsHis(PR8) y Dmel-2 STF2Δ.HAOs(PR8). Se propagaron las células Dmel-2 estables de cultivos adherente a agitados en medio de selección [medio Sfm de *Drosophila* (Invitrogen; Carlsbad, CA) + blasticidina 25 µg/ml] y se propagaron entonces hasta una escala de producción de 12 l.

10

Se indujo la expresión de proteína recombinante mediante la adición de CuSO<sub>4</sub> a una concentración final de 0,5 mM. Después de incubación durante 72 horas, se retiraron las células del medio acondicionado mediante centrifugación. Se clarificó entonces el medio acondicionado pasando a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó a 4 °C.

15

Purificación de HAOsHis(PR8) (SEQ ID NO: 176): Se aplicó medio acondicionado a una columna de Sepharose quelante (GE/Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) cargada con NiSO<sub>4</sub> y equilibrada con tampón A [Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 0,5 M] y se eluyó con un gradiente lineal de tampón B [tampón A + imidazol 0,5 M]. Se purificó además la proteína mediante fraccionamiento en una columna Superdex 200 SEC (GE/Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) equilibrada con 1X disolución salina tamponada con Tris (TBS), pH 8,0. Se agruparon entonces las fracciones de HAOs.His<sub>6</sub>(PR8), se tomaron alícuotas y se almacenaron a -80 °C

20

PAGE-SDS y análisis de transferencia Western: Se determinó la identidad de proteína y se estimó la pureza por PAGE-SDS. Se diluyó una alícuota de 5 µg de cada muestra en tampón de muestra de PAGE-SDS con o sin DTT 100 mM como reductor. Se hirvieron las muestras durante 5 minutos, se cargaron en gel de poliacrilamida con SDS al 10 % (LifeGels; French's Forrest, Nueva Gales del Sur, AUS) y se sometieron a electroforesis. Se tiñó el gel con Coomassie R-250 (Bio-Rad; Hercules, CA) para visualizar las bandas de proteína. Para transferencia Western, se sometieron a electroforesis 0,5 µg/carril de proteína total como se describe anteriormente, se electrotransfirieron entonces los geles a una membrana de PVDF y se bloquearon con leche en polvo al 5 % (p/v) antes de sondear con anticuerpo anti-flagelina (Inotek; Beverly, MA), anticuerpo anti-His<sub>6</sub> (Invitrogen; Carlsbad, CA) o suero inmune de convaliente de gripe A PR/8/34 (descrito a continuación en ELISA de antigenicidad de proteína). Después de sondear con anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (Pierce; Rockford, IL), se visualizaron bandas de proteína con un sustrato cromogénico de fosfatasa alcalina (Promega; Madison, WI).

25

30

Ensayo de proteína: Se determinó la concentración de proteína total usando el ensayo de Micro BCA (ácido bicinonínico) (Pierce; Rockford IL) en formato de microplaca, usando seroalbúmina bovina como patrón, según las instrucciones del fabricante.

35

Ensayo de endotoxina: Se determinaron los niveles de endotoxina usando el kit de ensayo de LAL cromogénico cuantitativo QCL-1000 (Cambrex; E. Rutherford, NJ), siguiendo las instrucciones del fabricante para el método de microplaca.

Ensayo de bioactividad de TLR5: Las células HEK293 expresan constitutivamente TLR5 y secretan varios factores solubles, incluyendo IL-8, en respuesta a la señalización de TLR5. Se sembraron las células en microplacas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo) y se añadió medio acondicionado de *Drosophila* recombinante que contiene HAOsHis(PR8) (SEQ ID NO: 176) o STF2Δ.HAOs(PR8) (SEQ ID NO: 177). El día siguiente, se recolectó el medio acondicionado, se transfirió a una microplaca de 96 pocillos limpia y se congeló a -20 °C. Después de descongelar,

40

se ensayó en el medio acondicionado la presencia de IL-8 en un ELISA de sándwich usando un par de anticuerpos coincidentes anti-IL-8 humana (Pierce; Rockford, IL, n° M801E y n° M802B) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la densidad óptica usando un espectrofotómetro de microplaca (FARCyte, GE/Amersham; Piscataway, NJ).

- 5 ELISA de antigenicidad de proteína: Se ensayó la HAOs.His<sub>6</sub>(PR8) purificada (SEQ ID NO: 176) mediante ELISA para determinar si la proteína recombinante exhibía epítomos correctamente plegados de HA. Se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos durante una noche a 4 °C con diluciones en serie en PBS (100 µl/pocillo) de proteína HAOs.His<sub>6</sub>(PR8) (SEQ ID NO: 176) partiendo de 5 µg/ml. Se bloquearon las placas con 200 µl/pocillo de tampón de diluyente de ensayo (ADB; BD Pharmingen) durante 1 hora a temperatura ambiente, y se lavaron entonces 3 veces con PBS-T. Se añadió entonces una dosis fija de anticuerpo primario a cada pocillo. Para ensayar la reactividad de HA, se añadieron 100 µl/pocillo de una dilución 1:10.000 de suero no inmune o inmune de convaleciente de PR/8/34 en ADB. Se generó suero inmune de PR/8/34 en ratones BALB/c (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) que recibieron una dosis de exposición subletal determinada experimentalmente de  $8 \times 10^1$  dosis infectantes de embrión (EID) de virus de la gripe PR/8/34.
- 10
- 15 Se dejaron entonces convalecer los animales durante > 21 días después de la infección, en cuyo momento se aisló y clarificó el suero inmune. Para ELISA de marcaje de 6 x histidina, se añadió anticuerpo monoclonal contra 6x His (Invitrogen; Carlsbad, CA) o flagelina (Inotek; Beverly, MA) a 1 µg/ml en ADB (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas durante 1 h a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C. Se lavaron entonces las placas tres veces con PBS-T. Se añadieron anticuerpos de IgG de cabra anti-ratón marcados con HRP (Jackson Immunochemical; West Grove, PA) diluidos en (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron las placas tres veces con PBS-T. Después de añadir sustrato TMB Ultra (Pierce; Rockford, IL) y monitorizar el desarrollo de color, se midió la A<sub>450</sub> en un espectrofotómetro de microplaca (FARCyte, GE/Amersham; Piscataway, NJ).
- 20

### Resultados y discusión

- 25 Caracterización de proteínas HAOs expresadas en *Drosophila*: El análisis de transferencia Western de medio acondicionado con anticuerpo anti-His<sub>6</sub> (Invitrogen; Carlsbad, CA) confirmó la expresión de HAOsHis<sub>6</sub>(PR8) (SEQ ID NO: 176) y el de transferencia Western con anticuerpo anti-flagelina (Inotek; Beverly, MA) confirmó la expresión de STF2Δ.HAOs(PR8) (SEQ ID NO: 177) por células Dmel-2 de *Drosophila* transfectadas con el correspondiente plásmido de expresión. Se reconocieron ambas proteínas por transferencia Western en forma no reducida con suero inmune de ratón convaleciente de PR/8/34, mientras que la reducción de las proteínas con DTT anuló el reconocimiento. Este resultado indica una unión disulfuro correcta de las dos proteínas secretadas. El medio acondicionado con STF2Δ.HAOs(PR8) (SEQ ID NO: 177) mostró una actividad de TLR5 *in vitro* significativa, mientras que el medio con HAOsHis<sub>6</sub>(PR8) (SEQ ID NO: 176) no, como se esperaba. Finalmente, la proteína HAOs.His<sub>6</sub>(PR8) purificada (SEQ ID NO: 176) mostró una reactividad significativa con suero inmune de convaleciente de gripe A PR8/34 mediante ELISA. Estos resultados indican que ambas proteínas HAOs se segregan de células Dmel-2 de *Drosophila* en forma apropiadamente plegada.
- 30
- 35

### EJEMPLO 12: INMUNOGENICIDAD Y EFICACIA DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE FLAGELINA-HEMAGLUTININA RECOMBINANTES QUE REPRESENTAN LA CEPA VÍRICA A/VIET NAM/1203/04

#### Materiales y Métodos

- 40 Estudios animales: Se usaron ratones BALB/c hembra de una edad de 6-8 semanas. Se dividieron los ratones en grupos de 15 y recibieron inmunizaciones subcutáneas (s.c.) los días 0 y 14 como sigue:
- TBS (disolución salina tamponada con fosfato)
  - Sin inmunización
  - 10 µg de STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95) en TBS
  - 45 • 3,0 µg de STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95) en PBS
  - 1 µg de STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95) en TBS

Se extrajo sangre a los ratones el día 21, se clarificaron los sueros por coagulación y centrifugación y se almacenaron a -20 °C.

- 50 Determinación del anticuerpo sérico: Se determinaron los niveles de IgG específica de HA mediante ELISA. Se recubrieron placas ELISA de 96 pocillos (Costar (n° de cat. 9018) Corning, NY) durante una noche a 4 °C con 100 µl/pocillo de proteína HA recombinante de A/Vietnam/1203/04 producida en *Baculovirus* (número de catálogo BEIR NR-660) en PBS (1 µg/ml). Se bloquearon las placas con 300 µl/pocillo de tampón de diluyente de ensayo (ADB; BD Pharmingen, (n° de cat.: 555213) (San Diego, CA) durante 2 horas a 25 °C. Se lavaron las placas 3 veces con PBS + 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBS-T). Se añadieron diluciones de los sueros en ADB (100 µl/pocillo) y se incubaron las

placas durante 1,5 horas a 25 °C. Se lavaron las placas tres veces con PBS-T. Se añadieron anticuerpos de IgG de cabra anti-ratón marcados con HRP (Jackson Immunochemical, West Grove, PA (nº de cat.: 115-035-146)) diluidos en ADB (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas a 25 °C durante 30 minutos. Se lavaron las placas tres veces con PBS-T. Después de añadir sustrato TMB Ultra (Pierce (nº de cat. 34028), Rockford, IL)) y monitorizar el desarrollo de color, se midió la A<sub>450</sub> en un espectrofotómetro de microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Exposición de ratones a virus de la gripe. Para valorar la eficacia, se expusieron ratones el día 28 a la administración intranasal de 10 DL<sub>90</sub> (10x dosis letal para el 90 % de ratones) (6x10<sup>3</sup> EID) de gripe A PR/1203/04. Se monitorizaron en los animales diariamente durante 21 días después de la exposición supervivencia y presentación clínica.

Preparación de disoluciones madre de H5N1 de gripe: Se obtuvo gripe A/Vietnam/1203/04 (H5N1) de los Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, GA). Se prepararon disoluciones madre de los virus en huevos de pollo embrionados de 10 días, y se almacenaron alícuotas de 0,5 ml a -80 °C hasta su uso.

Determinación de títulos víricos: Se determinó la TCID<sub>50</sub> (dosis infectante de cultivo de tejido del 50 %) utilizando células MDCK sembradas en los pocillos de una placa de 96 pocillos y crecidas hasta confluencia. Se inoculó una serie de diluciones log<sub>10</sub> de los virus en la placa por cuadruplicado. Se incubó entonces la placa durante 48-72 horas. Se determinó la TCID<sub>50</sub> identificando la dilución a la que los pocillos por cuadruplicado eran ½ positivos y ½ negativos para crecimiento vírico. Se determinó la EID<sub>50</sub> inoculando diluciones log<sub>10</sub> de la disolución madre en 2-4 huevos por dilución. Se incubaron los huevos durante 40-48 horas y se recolectó 1 ml de fluido alantoico de cada huevo. Se calculó la EID<sub>50</sub> como la dilución a la que ½ de los huevos eran negativos y ½ de los huevos eran positivos de virus infeccioso.

## Resultados y discusión

### Inducción de la respuesta de IgG específica de HA después de inmunización con STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95):

Se examinó la inmunogenicidad de STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95) inmunizando ratones BALB/c (15/grupo) por vía subcutánea el día 0 y 14 con un intervalo de dosis de 10, 3 y 1 µg de proteína. Se inmunizaron los grupos de control negativos de ratones con TBS o no se inmunizaron. Se examinaron las respuestas de IgG específicas de HA 7 días después del refuerzo (día 21) por ELISA. Los resultados demuestran que la inmunización con 10, 3 o 1 µg de STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95) inducía respuestas de IgG específicas de HA consistentes y significativas de manera dependiente de la dosis (Figuras 14-16).

### La inmunización con STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95) proporciona protección frente a una exposición letal a gripe A:

Los análisis serológicos descritos anteriormente demostraron que la inmunización de ratones con STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95) generaba una respuesta de anticuerpo que reconocía HA nativa. Para evaluar la eficacia, se expusieron los mismos ratones el día 28 a 10 DL<sub>90</sub> (6x10<sup>3</sup> EID) de virus A/Viet Nam/1203/04 administrado por vía intranasal. Se monitorizaron en los ratones diariamente durante 21 días después de la exposición supervivencia y presentación clínica. Como se muestra en la Figura 17, los ratones inmunizados con TBS o no inmunizados mostraron signos de infección (pérdida de peso y puntuaciones clínicas menores) tan pronto como cinco días después de la exposición, y todos los ratones murieron para el día 9 después de la exposición. Para los ratones inmunizados con STF2.HA1-2(VN), existe una clara relación entre la dosis recibida y la eficacia. Los ratones inmunizados con 10 µg de STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95) demostraron una protección notablemente potenciada. Los ratones inmunizados con 3 o 1 µg de STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95) demostraron un impacto de modesto a despreciable sobre la eficacia, respectivamente. Los parámetros clínicos estaban relacionados de forma similar con la dosis y los animales que recibieron la dosis máxima de STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95) exhibieron los signos más leves de enfermedad. Estos resultados demuestran que STF2.HA1-2(VN) (SEQ ID NO: 95) expresada en *E. coli* induce respuestas inmunitarias específicas de HA que protegen exitosamente a ratones BALB/c de una exposición letal a virus de la gripe A virulento *in vivo*.

## EJEMPLO 13. PROTEÍNAS DE FLAGELINA CON RESIDUOS DE CISTEÍNA GENOMANIPULADOS PARA CONJUGACIÓN QUÍMICA

Se ha reseñado la estructura cristalina de la flagelina bacteriana de *S. typhimurium*, flagelina de tipo 2 (STF2, SEQ ID NO: 312) (Yonekura, K., *et al.*, *Nature* 424: 643-650 (2003)). Se ha reseñado un modelo atómico completo del filamento flagelar bacteriano por criomicroscopía electrónica, y el estudio de estructura-función más detallado de la activación de TLR5 estaba basado en esta estructura (Smith, K.D., *et al.*, *Nature Immunology* 4: 1247-1253 (2003)). El receptor de tipo Toll 5 (TLR5) reconoce un sitio conservado en la flagelina necesario para la formación del protofilamento y la motilidad bacteriana (*Nature Immunology* 4(12): 1247-1253). El análisis mutacional demostró que la actividad de TLR5 de la flagelina reside en dos regiones en los dominios N y C-terminales, tramos de 39 y 31 aminoácidos, respectivamente (Smith, *et al.*). Estas regiones se destacan en gris en la Figura 18. La mutagénesis por barrido de alanina de estas regiones identificó una serie de mutaciones que reducían la activación de TLR5, pero ninguna mutación individual anulaba completamente la actividad, sugiriendo que existe un grado de flexibilidad o redundancia en el sitio de unión a TLR5. Esto tiene sentido desde la perspectiva evolutiva, de otro modo las bacterias podrían evolucionar fácilmente para evadir la detección por TLR5. La delección de la región de bisagra hipervariable y la retención de los dominios N- y C-terminales conservados da como resultado una proteína (STF2Δ)

que retiene la actividad de TLR5 completa, demostrando que los dominios N- y C-terminales (juntos) son necesarios y suficientes para la activación de TLR5.

Los residuos de lisina son sustratos convenientes para la conjugación química de diversas estructuras químicas con un portador proteico tal como flagelina. De los 30 residuos de lisina de STF2 (SEQ ID NO: 312), solo uno se encuentra dentro del sitio de activación de TLR5 definido experimentalmente, y esta lisina particular no está conservada entre todas las flagelinas bacterianas (Smith, *et al.*, *Nature Immunology* 4: 1247-1253 (2003)). De las 29 lisinas restantes, 24 están localizadas en la región de bisagra hipervariable de la flagelina, dejando por tanto solo 5 residuos de lisina en STF2Δ (SEQ ID NO: 313). La estructura en las Figuras 19 y 20 muestra que la mayoría de lisinas están espacialmente distales del dominio de activación de TLR5, por tanto parecería que las lisinas puedan conjugarse aleatoriamente con antígenos de péptido o carbohidrato con una probabilidad razonable de no interferir con la actividad de TLR5 de la proteína STF2Δ (SEQ ID NO: 313) conjugada resultante. 5 lisinas parecen bordear el sitio de activación de TLR5 bastante estrechamente; estos residuos serían los primeros que se consideraría mutar si la conjugación de antígeno con lisina afecta a la actividad de TLR5.

Pueden genomanipularse posibles sitios adicionales para conjugación (tales como cisteínas o lisinas adicionales) en flagelina completa (STF2 (SEQ ID NO: 312)) o STF2Δ (SEQ ID NO: 313) disponiendo dichos residuos en la región hipervariable o en la cola de los dominios N- y C-terminales conservados distales del sitio de unión a TLR5. Existen también métodos químicos para conjugación con otros aminoácidos. Estos incluyen carboxiaminoácidos (ácido glutámico, ácido aspártico) y los aminoácidos carboxiterminales arginina, histidina, triptófano, tirosina y serina. Puede utilizarse cualquiera de estas estrategias para conjugar estructuras antigénicas con la flagelina sin interferir con el sitio de activación de TLR5.

Algunos tipos de antígenos que incluyen polisacáridos no son susceptibles de tecnología de ADN de fusión recombinante ni de química de péptidos sintéticos, y por tanto no pueden ligarse genética o sintéticamente a un ligando de un receptor de tipo Toll (TLR). Además, es posible que la fusión genética o sintética de un péptido con un ligando de TLR pueda inhibir el plegamiento apropiado del ligando de TLR. Puede ser útil la conjugación química del antígeno con el ligando de TLR, que se pliega y purifica. La conjugación química de los antígenos de péptido permite también la situación del antígeno en sitios específicos del ligando de TLR, limitando por tanto la interferencia con la unión a receptor del ligando de TLR o maximizando la exposición a receptores de antígeno. La conjugación de muchos antígenos de péptido con un ligando de TLR puede maximizar también la inmunogenicidad, aumentando la heterogeneidad conformacional con la que se presenta el antígeno al sistema inmunitario. Para proporcionar un sitio para la conjugación química de dichos antígenos con flagelina, se genomanipuló un residuo de cisteína en diferentes sitios del gen que codifica STF2Δ (flagelina con la región de bisagra hipervariable eliminada; SEQ ID NO: 313 y SEQ ID NO: 314).

## Materiales y Métodos

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Se usó el kit Platinum<sup>®</sup> PCR SuperMix High Fidelity (número de catálogo 12532-016, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) para todas las amplificaciones por PCR, usando el siguiente protocolo basado en las instrucciones del fabricante.

1. Se añadieron los siguientes componentes en cualquier orden a cada tubo de reacción:

- a. 45 µl de Platinum<sup>®</sup> PCR SuperMix High Fidelity (tampón de reacción de PCR)
- b. Disolución cebadora (concentración final 10 pmol de cada cebador)
- c. Disolución de ADN de molde (10 ng de ADN de plásmido)

2. Se rellenó el volumen de reacción hasta 50 µl con agua

3.- Se taparon los tubos y se cargaron en un termociclador

4. Se incubaron los tubos a 94 °C durante 30 a 120 segundos para desnaturalizar completamente el molde y activar la enzima

5. Se efectuó la siguiente amplificación por PCR durante 25-35 ciclos:

- a. Desnaturalizar a 94 °C durante 15-30 segundos
- b. Asociar a 50-55 °C durante 15-30 segundos
- c. Extender a 68-72 °C durante 1 minuto por kb de tamaño de producto de PCR
- d. Si es necesario, enfriar a 4 °C y mantener hasta estar listo para el siguiente proceso

Construcción del gen de STF2Δ (SEQ ID NO: 314): La flagelina completa de *Salmonella typhimurium* fljB (STF2, SEQ ID NO: 312) está codificada por un gen de 1,5 kb (SEQ ID NO: 315). Para generar STF2Δ (SEQ ID NO: 314),

se eliminó la secuencia correspondiente a la región de bisagra hipervariable (aminoácidos 170 a 415 de la SEQ ID NO: 312) y se reemplazó por un ligador flexible corto (GAPVDPASPW (SEQ ID NO: 336)) diseñado para facilitar las interacciones de las secuencias terminales NH<sub>2</sub> y COOH de STF2 (SEQ ID NO: 315) necesarias para la señalización de TLR5 (Smith, K. D., *et al.*, (2004). El receptor de tipo Toll 5 reconoce un sitio conservado en la flagelina necesario para la formación del protofilamento y la motilidad bacteriana (Smith *et al.*, Nature Immunology 4: 1247-53 (2003)).

Para generar el plásmido STF2Δ, se usó una PCR en dos etapas (Figura 21). En la primera reacción, se mezcló un plásmido que codifica STF2.OVA (una fusión de STF2 completa con ovoalbúmina completa, SEQ ID NO: 316) con los cebadores STF28BGF-1 (SEQ ID NO: 317) y STF28MCR-1 (SEQ ID NO: 318) en tampón de reacción de PCR, y se amplificó la mezcla en una reacción de PCR como se describe anteriormente. En una reacción paralela, se mezcló el plásmido molde STF2.OVA con los cebadores STF28.MCF-2 (SEQ ID NO: 319) y STF28ECR-2 (SEQ ID NO: 320) en tampón de reacción de PCR, y se amplificó la mezcla en una reacción de PCR como se describe anteriormente.

Las reacciones de amplificación por PCR generaron fragmentos de ~500 pb y 270 pb, respectivamente. Se combinaron estos productos de PCR con los cebadores STF28BGF-1 (SEQ ID NO: 317) y STF28ECR-2 (SEQ ID NO: 320) en tampón de reacción de PCR, y se amplificó la mezcla en una reacción de PCR como se describe anteriormente. Se digirió el producto de ADN amplificado de esta reacción (770 pb) con las enzimas de restricción *Bgl*II y *Eco*RI durante 2 horas a 37 °C y se ligó en pMTBIP/V5-His B (Invitrogen, Carlsbad, CA) que se había digerido anteriormente con *Bgl*II y *Eco*RI y tratado con fosfatasa intestinal de ternero (CIP). Se usó una alícuota de la mezcla de ligamiento para transformar células TOP10 de *E. coli*. Se usó el constructo pMT/STF2Δ resultante para generar los constructos STF2Δ de cisteína modificada.

Construcción de genes de STF2Δ genomanipulados para expresar un solo residuo de cisteína: Para introducir residuos de cisteína en posiciones definidas en el polipéptido STF2, se usó pMT/STF2Δ como molde en PCR con pares cebadores como se define a continuación.

Para construir el plásmido STF2Δ.3'Cys (SEQ ID NO: 325), se mezcló el plásmido pMT/STF2Δ con los cebadores 3'Forward1 (SEQ ID NO: 321) y 3'Reverse1 (SEQ ID NO: 322) en tampón de reacción de PCR, y se amplificó la mezcla en una reacción de PCR como se describe anteriormente.

Para construir el plásmido 5'Cys.STF2Δ (SEQ ID NO: 326), se mezcló el plásmido pMT/STF2Δ con los cebadores 5'Forward2 (SEQ ID NO: 323) y 5'Reverse2 (SEQ ID NO: 324) en tampón de reacción de PCR, y se amplificó la mezcla en una reacción de PCR como se describe anteriormente.

Para los constructos STF2Δ.3'Cys (SEQ ID NO: 325) y 5'Cys.STF2Δ (SEQ ID NO: 326), se digirieron los productos de PCR generados con las enzimas de restricción *Nde*1 y *Blp*1 y se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Se ligaron los fragmentos purificados mediante extremos compatibles con ADN del plásmido pET24a (Novagen, Madison, WI) que se había digerido anteriormente con las enzimas de restricción *Nde*1 y *Blp*1 y tratado con CIP. Los constructos resultantes se designan pET/STF2Δ.3'Cys y pET/5'Cys.STF2Δ, respectivamente.

Para construir el plásmido STF2Δ.HingeCys (SEQ ID NO: 331), se empleó una PCR en dos etapas similar a la descrita en la Figura 18. Se generó un fragmento mezclando pMT/STF2Δ con los cebadores apareados HingeForward1 (SEQ ID NO: 327) y HingeReverse3 (SEQ ID NO: 328) en tampón de reacción de PCR, y se amplificó la mezcla en una reacción de PCR como se describe anteriormente. Se generó otro fragmento mezclando pMT/STF2Δ con los cebadores apareados HingeForward2 (SEQ ID NO: 329) y HingeReverse4 (SEQ ID NO: 330) en tampón de reacción de PCR, y se amplificó la mezcla en una reacción de PCR como se describe anteriormente. Se combinaron alícuotas de cada una de estas reacciones de PCR y se mezclaron con cebadores HingeForward1 (SEQ ID NO: 327) y HingeReverse4 (SEQ ID NO: 330) en tampón de reacción de PCR, y se amplificó la mezcla en una reacción de PCR como se describe anteriormente. Se purificó el producto de PCR final por electroforesis en gel de agarosa, se digirió con *Nde*1 y *Blp*1 y se ligó el fragmento purificado en el vector pET24a como se describe anteriormente. El constructo resultante se designa pET/STF2Δ.HingeCys.

Expresión de proteína: Se transformaron los plásmidos pET/STF2Δ.3'Cys, pET/5'Cys.STF2Δ y pET/STF2Δ.HingeCys en células BLR(DE3) de *E. coli* competentes como sigue. Se añadieron a tubos de polipropileno de tapón a presión de 1,5 ml preenfriados con hielo una alícuota de 20 μl de células BLR (DE3) y 1 μl de ADN de plásmido (1 μg/μl), y se incubó la mezcla durante 30 minutos. Se calentaron los tubos durante exactamente 30 segundos en un baño de agua a 42 °C sin agitación y se dispusieron entonces en hielo durante 2 minutos adicionales. Se añadieron a cada tubo de células sometidas a choque térmico 250 μl de medio SOC a temperatura ambiente.

Se recuperaron las células a 37 °C (agitación a 250 rpm) durante 60 minutos antes de sembrar sobre medio selectivo que contiene kanamicina. Se sembraron diversas alícuotas (50-100 μl) de la mezcla de transformación y se incubaron las placas a 37 °C durante 15 a 18 horas. Se recogieron las colonias y se inocularon en 2 ml de caldo Luria Bertani (LB) suplementado con kanamicina 25 μg/ml y tetraciclina 12,5 μg/ml y se cultivaron durante una noche. Se inocularon cultivos de LB recientes por dilución de una alícuota de los cultivos de una noche 1:100 y se



cultivaron a 37 °C sin agitación. Cuando la DO<sub>600</sub> del cultivo alcanzó de 0,6 a 1,0, se indujo la expresión de proteína mediante la adición de tio-β-D-galactósido de isopropilo (IPTG) a una concentración final de 1 mM. Varias horas después de la inducción, se recolectaron las células para análisis de la expresión de proteína por PAGE-SDS. Se prepararon disoluciones madre en glicerol a partir de cultivos crecidos en LB suplementado con 0,5 % de glucosa, kanamicina 25 µg/ml y tetraciclina 12,5 µg/ml y se congelaron a -80 °C después de la adición de glicerol (7 % final).

Purificación de proteína: Se expresaron y purificaron las proteínas STF2Δ.3'Cys (SEQ ID NO: 332) y STF2Δ.HingeCys (SEQ ID NO: 333) como sigue. Se inocularon disoluciones madre en glicerol de células BLR(DE3) de *E. coli* que albergan los plásmidos deseados en matraces de agitación de 10 l que contienen LB, y se incubaron a 37° C con agitación constante. Cuando los cultivos alcanzaron la densidad óptica A<sub>600</sub>= 0,8, se indujo la expresión de proteína mediante la adición de IPTG 1 mM y se incubaron los cultivos a 37 °C con agitación constante durante 4 horas antes de recolectar. Se recogieron las células de 10 l de cultivo mediante centrifugación a baja velocidad a 5.000 rpm (rotor SLA3000) durante 10 minutos y se suspendieron en Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, DTT 1 mM (100 ml/10 l).

Se disgregaron las células pasando la suspensión celular dos veces a través de un microfluidizador a 124,1 MPa. Se separó el material insoluble de las proteínas solubles mediante centrifugación a 10.000 rpm (rotor SS34) durante 15 minutos. En las condiciones de cultivo descritas, todas las proteínas STF2Δ se fraccionaron con el material insoluble y formaron cuerpos de inclusión estables que se recogieron como un sedimento sólido después de la centrifugación. Se lavaron los cuerpos de inclusión dos veces con Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 0,1 M y 0,5 % de Triton X-100, seguido de dos lavados con el mismo tampón sin detergente. Se efectuó cada lavado usando un homogeneizador Dounce y se recogieron los cuerpos de inclusión limpiados (IB) mediante centrifugación a 10.000 rpm (rotor SS34) durante 15 minutos. Se lavaron los IB purificados una última vez con Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y se almacenaron como un sedimento celular a -80°C hasta que fueran necesarios.

Se descongeló el material de IB y se solubilizó en urea 8 M a pH 4,0. Esta etapa solubilizaba selectivamente la proteína diana, dejando una cantidad significativa de desechos y proteínas contaminantes en forma de un precipitado sólido, que se retiró por centrifugación. Debido a la única cisteína presente en estas proteínas, todos los procedimientos de purificación posteriores se llevaron a cabo usando tampones que contenían DTT 1 mM como agente reductor. Se capturó la proteína solubilizada usando SP fast flow Sepharose (30 ml, XK16) y se eluyó selectivamente con urea 8 M en acetato de sodio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na) 25 mM, pH 4,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM y NaCl 0,2 M. Para eliminar la precipitación después de esta etapa, se ajustó el pH de la elución de SP de 4,0 a 8,0 mediante diálisis frente a Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM antes del replegamiento de proteína. Se replegó el material dializado mediante dilución directa (10 veces) en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, DTT 1 mM y EDTA 1 mM, de tal modo que la concentración de proteína final fuera menor de 0,1 mg/ml. Se cargó el agrupamiento de SP replegado directamente en Sepharose Q de alta resolución (30 ml, XK16) y se eluyó la proteína unida con un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna de NaCl 0 a 0,5 M en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM. Esta etapa de cromatografía procuró un solo pico que eluyó a una conductividad de aproximadamente 15 ms/cm. Se agrupó el material eluido y se almacenó a -80 °C.

Caracterización de proteína: Se caracterizaron las proteínas mediante pureza, identidad, contenido de endotoxinas y actividad biológica usando los siguientes ensayos.

PAGE-SDS: Se diluyeron las proteínas (típicamente a 5 µg) en tampón de muestra de PAGE-SDS (1 % de SDS, Tris-HCl 30 mM, pH 6,8, 4 % de glicerol, azul de bromofenol 0,1 mg/ml) con y sin β-mercaptoetanol 5 mM. Se hirvieron las muestras durante 5 minutos y se cargaron en gel de poliacrilamida con SDS al 4 -20%. Después de la electroforesis, se tiñeron los geles con azul de Coomassie para visualizar las bandas de proteína.

Ensayo de endotoxina: Se midieron los niveles de endotoxina usando el kit de ensayo del LAL cromogénico cuantitativo QCL-1000 (BioWhittaker n° 50-648U), siguiendo las instrucciones del fabricante para el método de microplaca.

Ensayo de proteína: Se determinaron las concentraciones de proteínas mediante el kit MicroBCA Protein Assay Reagent en un formato de 96 pocillos que usa BSA como patrón (Pierce Biotechnology), siguiendo las instrucciones del fabricante.

ELISA de flagelina: Se examinaron la integridad y concentración de proteína mediante ELISA con anticuerpos específicos de flagelina. Se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos durante una noche a 4 °C con diluciones en serie en PBS de cada proteína diana partiendo de 5 µg/ml. Se bloquearon las placas con 200 µl/pocillo de tampón de diluyente de ensayo (ADB; BD Pharmingen) durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron entonces 3 veces con disolución salina tamponada con fosfato que contiene Tween-20 (PBS-T, NaPO<sub>4</sub> 12 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, 0,05 % de Tween 20). Se añadió anticuerpo policlonal de conejo anti-flagelina diluido en ADB (100 µl/pocillo, 1:5000) a todos los pocillos, se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C y se lavaron entonces tres veces con PBS-T. Se añadió anticuerpo de IgG de cabra anti-conejo marcado con HRP (Jackson Immunochemical) diluido en ADB (100 µl/pocillo, 1:5000) y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron las placas tres veces con PBS-T. Después de añadir sustrato TMB Ultra (Pierce) y monitorizar el desarrollo de color, se midió la A<sub>450</sub> en un espectrofotómetro de microplacas Tecan Farcyte.

5 Ensayo de bioactividad de TLR5: Las células HEK293 (ATCC, nº de cat. CRL-1573, Manassas, VA) expresan constitutivamente TLR5 y secretan varios factores solubles, incluyendo IL-8, en respuesta a la señalización de TLR5. Se sembraron las células en microplacas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo) y se añadieron las proteínas de ensayo recombinantes: El día siguiente, se recolectó el medio acondicionado, se transfirió a una microplaca de 96 pocillos limpia y se congeló a -20 °C. Después de descongelar, se ensayó en el medio acondicionado la presencia de IL-8 en un ELISA de sándwich usando un par de anticuerpos coincidentes anti-IL-8 humana (Pierce; Rockford, IL, nº M801E y nº M802B) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la densidad óptica usando un espectrofotómetro de microplaca..

### Resultados y discusión

10 Rendimiento y pureza de proteína: Se muestran a continuación el rendimiento final y niveles de endotoxina de cada proteína.

| Proteína       | SEQ ID NO: | Rendimiento (mg) | Endotoxina (UE/µg) |
|----------------|------------|------------------|--------------------|
| STF2Δ.3'Cys    | 332        | 75,0             | 0,01               |
| STF2Δ.HingeCys | 333        | 117,0            | 0,004              |

15 Integridad de flagelina: Genomanipular una sola cisteína en STF2Δ no disminuye su reconocimiento por anticuerpos específicos de flagelina, como se muestra en la Figura 22.

20 Ensayo de actividad agonista de TLR5 en IL-8 de HEK293: Genomanipular una sola cisteína en STF2Δ no disminuye la actividad agonista de TLR de la proteína, como se muestra en la Figura 23. Las células expuestas a STF2Δ.3'Cys (SEQ ID NO: 332) o STF2Δ.HingeCys (SEQ ID NO: 333) secretaban niveles de IL-8 comparables a los inducidos por exposición a flagelina completa (STF2, SEQ ID NO: 312) o STF2Δ sin residuos de cisteína (SEQ ID NO: 313).

25 La fusión de flagelina completa (STF2, SEQ ID NO: 312) o flagelina con delección de la región de bisagra (STF2Δ, SEQ ID NO: 313) con un antígeno de proteína tal como la proteína de envoltura del virus del Nilo occidental o hemaglutinina de gripe A aumenta significativamente la inmunogenicidad del antígeno fusionado. Este enfoque es útil para los antígenos de proteína o péptido que pueden codificarse en un constructo de fusión genética que expresa tanto flagelina como el antígeno de interés en una sola proteína, pero no puede aplicarse a antígenos no de proteína o no de péptido, tales como antígenos de polisacárido. Puesto que muchas bacterias y células tumorales expresan estructuras de polisacáridos específicas que son antigénicas pero poco inmunogénicas, es importante concebir métodos escalables para aumentar la inmunogenicidad y eficacia protectora de dichas estructuras. La conjugación química con un ligando de TLR, tal como flagelina, es una estrategia potencial.

30 Existen varios métodos de ligamiento químico, pero uno de los más sencillos es acoplar un antígeno con un grupo tiol libre tal como en un solo residuo de cisteína no apareado. Puesto que la flagelina no contiene de forma nativa cisteínas, se genomanipularon residuos de cisteína en la flagelina en una de tres posiciones: el extremo amino de la flagelina (5'Cys.STF2Δ, SEQ ID NO: 326 y la SEQ ID NO: 334), el extremo carboxilo de la flagelina (STF2Δ.3'Cys, SEQ ID NO: 325 y la SEQ ID NO: 332) y la región de bisagra eliminada de la flagelina (STF2Δ.HingeCys, SEQ ID NO: 331 y SEQ ID NO: 333).

35 Todos los constructos se produjeron en el vector de expresión pET24a para expresión en *E. coli*. Cuando se purifican de células de *E. coli*, las proteínas STF2Δ.HingeCys (SEQ ID NO: 333) y STF2Δ.3'Cys (SEQ ID NO: 332) retienen todas las propiedades antigénicas y biológicas de TLR5 de la proteína STF2Δ no modificada, confirmando por tanto que la introducción de un solo residuo de cisteína no influye negativamente sobre la expresión, purificación, repliegamiento o actividad biológica de STF2Δ.

### CONJUGACIÓN DEL PÉPTIDO DE SITIO DE ESCISIÓN MADURATIVA DE HEMAGLUTININA DE GRIPE CON STF2Δ.hingeCYS

Se conjugó químicamente un péptido que representa el sitio de escisión madurativa de hemaglutinina de gripe con una proteína flagelina modificada, STF2Δ.HingeCys (SEQ ID NO: 333).

### 45 Materiales y Métodos

Producción de la proteína STF2Δ.HingeCys: Se expresó proteína STF2Δ.HingeCys (SEQ ID NO: 333) y se purificó como se describe en el ejemplo anterior.

Síntesis de péptidos H1C1. La secuencia NH<sub>2</sub>-NIPSIQSRGLFFAIAGFIE-COOH (SEQ ID NO: 337) representa el sitio de escisión madurativa de hemaglutinina de gripe A/H1N1 (Bianchi, E., *et al.* (2005). "Universal influenza B vaccine based on the maturational cleavage site of the hemagglutinin precursor" (Bianchi, *et al.*, *J. Virol.* 79:7380-7388 (2005)). Se diseñaron dos péptidos con una cisteína extra o una lisina extra en el extremo N para facilitar el ligamiento químico con proteínas portadoras, dando como resultado las siguientes secuencias peptídicas:

CysH1C1 (SEQ ID NO: 338) NH<sub>2</sub>-CNIPSIQSRGLFFAIAGFIE-COOH (SEQ ID NO: 338)

LysH1C1 (SEQ ID NO: 339) NH<sub>2</sub>-KNIPSIQSRGLFFAIAGFIE-COOH (SEQ ID NO: 339)

Se sintetizaron los péptidos por Anaspec, Inc., (San José, CA) utilizando la química de Fmoc estándar, después de lo cual se escindieron de la matriz con ácido trifluoroacético (TFA), se purificaron por HPLC en fase inversa y se liofilizaron.

Conjugación del péptido CysH1C1 con STF2Δ.HingeCys: Se dializó proteína STF2Δ.HingeCys (SEQ ID NO: 333) a una concentración de 4,9 mg/ml durante una noche en tampón A [1x disolución salina tamponada con fosfato (PBS), EDTA 5 mM, pH 7,2]. Se disolvió BM(PEO)<sub>2</sub> (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), un reticulante de maleimida homobifuncional, en DMSO (dimetilsulfóxido) y se añadió a una concentración final de 2,3 mM. Después de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, se retiró el reticulante libre de la proteína usando una columna de desalado Superdex 25 HiTrap de 5 ml. Se disolvió el péptido CysH1C1 (SEQ ID NO: 338) en DMSO y se añadió a la proteína STF2Δ.HingeCys derivada de maleimida a una concentración final de 0,32 mM. Después de incubar durante 3 horas a temperatura ambiente, se detuvo la reacción por adición de DTT (ditiotreitolo) a una concentración final de 40 mM. Se separaron la proteína y el conjugado de proteína-péptido del péptido libre mediante fraccionamiento en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) Superdex 200 10/300 (GE/Amersham; Piscataway, NJ) equilibrada con disolución salina tamponada con 1X Tris (TBS), pH 8,0.

Caracterización de proteína: Se caracterizaron las proteínas por pureza, identidad, contenido de endotoxinas y actividad biológica como se describe en el ejemplo anterior.

## Resultados y discusión

Caracterización del conjugado peptídico STF2Δ.HingeCys:CysH1C1: Se ensayó la conjugación del péptido CysH1C1 (SEQ ID NO: 338) con STF2Δ.HingeCys (SEQ ID NO: 333) mediante PAGE-SDS con tinción con Coomassie. La conjugación peptídica con la proteína dio como resultado una banda doble en que la banda de migración más rápida correspondía a la proteína no conjugada y la banda de migración más lenta correspondía al conjugado de proteína-péptido.

Se observó un precipitado turbio en la mezcla de conjugación debido a la baja solubilidad del péptido. Para establecer si el conjugado de proteína-péptido precipitaba, se centrifugó la mezcla (16.000xg durante 15 minutos) y se analizaron las fracciones de sedimento y sobrenadante resultantes por PAGE-SDS. La mayoría de la proteína conjugada con péptido permanece en el sobrenadante, indicando que sigue siendo soluble.

Se efectuó la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) del conjugado STF2Δ.HingeCys:CysH1C1 para separar la proteína conjugada del reticulante y péptido no conjugado restantes. Eluyó un solo pico principal en el intervalo incluido de la columna al volumen esperado para STF2Δ monomérica, mientras que eluyó muy poco material en el volumen vacío (Figura 24), indicando que la mayoría de la proteína fraccionada es monomérica.

Se confirmó la naturaleza monomérica del conjugado STF2Δ.HingeCys:CysH1C1 por análisis de PAGE-SDS de las fracciones S200 (Figura 25). El conjugado de proteína-péptido coeluye con la proteína no conjugada a la misma relación que en la muestra de carga, indicando que la especie conjugada es un monómero.

Se encontró que la bioactividad de la mezcla conjugada STF2Δ.HingeCys:CysH1C1 era equivalente a la de la proteína STF2Δ.HingeCys no conjugada, indicando que la unión del reticulante BM(PEO)<sub>2</sub> y la reacción de conjugación del péptido no inhiben la actividad estimulante de TLR5 (Figura 8).

## CONJUGACIÓN DE UN LIPOPÉPTIDO QUE CONTIENE PAM<sub>3</sub>CYS CON UN ANTÍGENO DE HEMAGLUTININA DE LA GRIPE

Varios tipos de receptores de tipo Toll (TLR) se activan potencialmente por lípidos o conjugados lipídicos. Estos incluyen TLR2/1 (diacil-lipoproteínas y proteínas ligadas a GPI), TLR2/6 (triacil-lipoproteínas y proteínas ligadas a GPI) y TLR4 (lipopolisacáridos). La utilidad de vacunas compuestas por antígenos ligados a dichos lípidos es obvia: los lípidos son activadores fuertes de rutas inmunitarias innatas y sin embargo son poco inmunogénicos por sí mismos. Sin embargo, la producción de dichos conjugados es muy compleja. La biosíntesis de lipoproteínas recombinantes en bacterias está limitada por la baja productividad y extrema dificultad de purificar la fusión de proteína-lipopéptido resultante. La síntesis química de antígenos de lipopéptido es más directa, pero está limitada a los antígenos de péptido. Aquí se demuestra la conjugación química de un lipopéptido Pam<sub>3</sub>Cys, un agonista de TLR2/6, con HA1-1His<sub>6</sub> de gripe en un proceso que supera las dificultades inherentes tanto a la biosíntesis como a la síntesis química completa de antígenos lipídicos.

## Materiales y Métodos

Se preparó la producción de HA1-1His<sub>6</sub>(PR8)Bv (SEQ ID NO: 179) HA1-1His<sub>6</sub> (PR8)Bv como se describe en la presente memoria.

5 Síntesis de Pam<sub>3</sub>CS(K)<sub>4</sub>GC (SEQ ID NO: 335). Se efectuó la síntesis a medida de lipopéptido por Anaspec, Inc. (San José, CA) usando la química de Fmoc en fase sólida estándar, después de lo cual se escindió el lipopéptido de la matriz con ácido trifluoroacético (TFA), se purificó por HPLC en fase inversa y se liofilizó.

10 Conjugación de Pam<sub>3</sub>CS(K)<sub>4</sub>GC (SEQ ID NO:335) con HA1-1 His<sub>6</sub>(PR8)Bv (SEQ ID NO: 179). Se dializó HA1-1His<sub>6</sub>(PR8)Bv (SEQ ID NO: 179) con tampón A (1x PBS + EDTA 5 mM, pH 7,2). Se disolvió sulfo-SMCC (Pierce; Rockland, IL), un reticulante de maleimida/éster de NHS heterobifuncional, en DMSO y se añadió a una concentración final de 0,432 mM. Después de incubar durante 30 min a temperatura ambiente, se desaló la proteína en tampón A usando una columna de desalado G-25 HiTrap (GE/Amersham; Piscataway, NJ). Se añadió Triton X-114 (TX-114) (Sigma; St Louis, MO) a una concentración final del 1 % (p/v). Se disolvió Pam<sub>3</sub>CS(K)<sub>4</sub>GC a 20 mg/ml en DMSO y se añadió a una concentración final de 0,6 mg/ml. Después de incubar a temperatura ambiente durante 3 horas, se dispuso el tubo de reacción en un baño a 37 °C durante 10 minutos, causando la formación de gotitas de TX-114. Se centrifugó entonces la muestra a 16.000xg durante 10 minutos para separar el detergente y las fases acuosas. Después de drenar la fase acuosa, se resuspendió la fase de detergente al volumen de reacción original con tampón A. Se analizaron entonces las muestras total, de detergente y acuosa por PAGE-SDS.

15 Caracterización de proteína: Se caracterizaron los conjugados de proteínas-lipopéptido por PAGE-SDS. Se diluyeron las muestras (típicamente 5 µg) en tampón de muestra de PAGE-SDS (Tris 0,1 M, pH 8,0/4 % de SDS/25 % de glicerol/DTT 0,1 M). Se hirieron las muestras durante 5 minutos y se cargaron en gel de poliacrilamida con SDS al 10 %. Después de la electroforesis, se tiñeron los geles con azul de Coomassie para visualizar las bandas de proteína.

## Resultados y discusión

25 La HA1-1His<sub>6</sub>(PR8)Bv (SEQ ID NO: 179) de entrada se procesa como una banda doble en PAGE-SDS. Esto se ha observado para todas las proteínas HA1-1 Hiss preparadas en *Baculovirus* hasta la fecha y es probablemente debido a diferencias en la glucosilación. La HA1-1His<sub>6</sub>(PR8)Bv (SEQ ID NO: 179), que se ha derivatizado con sulfo-SMCC pero no conjugado con lipopéptido, permanece en la fase acuosa durante la separación de TX-114, el comportamiento esperado para una proteína globular soluble. La HA1-1His<sub>6</sub>(PR8)Bv (SEQ ID NO: 179) conjugada con Pam<sub>3</sub>Cys muestra 3 o 4 bandas de mayor peso molecular que la proteína de entrada derivatizada, consistentemente con la modificación covalente por el lipopéptido. En la separación de fases de TX-114, la especie con mayor pm se segrega principalmente en la fase de detergente, mientras que la especie menor (correspondiente a la proteína no modificada) permanece en la fase acuosa. Este comportamiento es consistente con la segregación comúnmente observada de lipoproteínas en gotitas de detergente y confirma que la HA1-1 His<sub>6</sub>(PR8)Bv (SEQ ID NO: 179) se ha modificado covalentemente con el lipopéptido Pam<sub>3</sub>CS(K)<sub>4</sub>GC (SEQ ID NO: 335). Las bandas de mayor peso molecular de aproximadamente 60, 120 y 180 kDa, que se observan en la proteína derivatizada con SMCC pero no en la de entrada, son multímeros de HA1-1 covalentes formados por el reticulante. Esta multimerización se evitaría, y el rendimiento de HA1-1 lipídada una vez mejoraría, manipulando una sola cisteína en HA1-1 y usando un reticulante específico de cisteína en lugar de específico de lisina. Dicha estrategia daría también un mejor control sobre el sitio de unión del lipopéptido en HA1-1, dando un producto más homogéneo y posiblemente mejorando la inmunogenicidad.

## EJEMPLO 14: CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE STF2.4xH1C1, UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN QUE COMPRENDE FLAGELINA (AGONISTA DE TLR5) Y EL SITIO DE ESCISIÓN MADURATIVA DE HEMAGLUTININA DE GRIPE A

### Materiales y Métodos

45 Diseño de constructo: Para facilitar la clonación de genes diana en fusión con flagelina, se generó un plásmido modular que contiene un único sitio *B*/pl en el extremo 3' de gen de flagelina (STF2.blp, SEQ ID NO: 340). Este módulo se preparó introduciendo una mutación silenciosa (5'-GTGCTGAGCCTGTTACGT-3') en los nucleótidos 1501 a 1518 de STF2, creando un sitio *B*/pl único en el módulo de plásmido pET24/STF2.blp (SEQ ID NO: 340). Se optimizaron los codones de genes sintéticos que codifican 1, 2, 3 y 4 copias del fragmento de sitio de escisión madurativo (H1C1) de gripe A subtipo H1 (NIPSIQSRGLFGAIGFIE; SEQ ID NO: 341) para expresión en *E. coli* y se obtuvieron de un vendedor comercial (DNA2.0 Inc., Menlo Park, CA). Se extirparon los genes sintéticos con enzima *B*/pl y se ligaron por extremos compatibles con pET24/STF2.blp, que se había tratado con *B*/pl y fosfatasa alcalina bacteriana (BAP). Estos constructos se designaron como STF2.1xH1C1, STF2.2xH1C1, STF2.3xH1C1 y STF2.4xH1C1 respectivamente (SEQ ID NO: 342; SEQ ID NO: 343; SEQ ID NO: 344; SEQ ID NO: 345).

55 De forma similar, un gen de fusión construido para contener la secuencia H1C1, y flanqueado por un par de cisteínas para facilitar la formación de bucle de los concatémeros, se designó como STF2.4xH1 C2 (SEQ ID NO: 346). Se empleó un enfoque similar para generar un constructo que alberga cuatro copias en serie del fragmento de escisión de gripe A subtipo H5 (RERRRKRGLFGAIGFIE; SEQ ID NO: 347) designado como constructo STF2.4xH5C1 (SEQ ID NO: 348). Los fragmentos de escisión de consenso que representan los subtipos H3

(NVPEKQTRGIFGAIAGFIE; SEQ ID NO: 349), H2 (NVPQIESRGLFGAIAGFIE; SEQ ID NO: 350) y cepa B, B/HA (PAKLLKERGGFFGAIAGFLE; SEQ ID NO: 351), están por tanto abiertos a este enfoque experimental como se plantea anteriormente. En cada caso, se usaron los plásmidos construidos para transformar células TOP10 de *E. coli* competentes y se identificaron los presuntos recombinantes por cribado de PCR y análisis de cartografía de restricción.

Se verificó la integridad de los constructos por secuenciación de ADN y se usaron para transformar el hospedador de expresión, BLR3 (DE3) (Novagen, San Diego, CA; n° de cat. 69053). Se seleccionaron los transformantes en placas que contenían kanamicina (50 µg/ml), tetraciclina (5 µg/ml) y glucosa (al 0,5 %). Se recogieron las colonias y se inocularon en 2 ml de medio LB suplementado con kanamicina 25 µg/ml, tetraciclina 12,5 µg/ml y 0,5 % de glucosa y se hicieron crecer durante una noche. Se usaron alícuotas de estos cultivos para inocular cultivos recientes en la misma formulación de medio, que se cultivaron hasta que alcanzaron una  $DO_{600} = 0,6$ , en cuyo momento se indujo la expresión de proteína mediante la adición de IPTG 1 mM y cultivo durante 3 horas a 37 °C. Se recolectaron las células y se analizó la expresión de proteína.

**PAGE-SDS y transferencia Western:** Se determinaron la expresión e identidad de proteína mediante electroforesis en gel y análisis de inmunotransferencia. Se recolectaron las células mediante centrifugación y se lisaron en tampón Laemmli. Se diluyó una alícuota de 10 µl de cada lisado en tampón de muestra de PAGE-SDS con o sin DTT 100 mM como reductor. Se hirieron las muestras durante 5 minutos, se cargaron en gel de poliacrilamida con SDS al 10 % y se sometieron a electroforesis (PAGE-SDS). Se tiñó el gel con Coomassie R-250 (Bio-Rad; Hercules, CA) para visualizar las bandas de proteína. Para transferencia Western, se sometieron a electroforesis 0,5 µl/carril de lisado celular, se electrotransfirieron a una membrana de PVDF y se bloquearon con leche en polvo al 5 % (p/v). Se sondeó entonces la membrana con anticuerpo anti-flagelina 6H11 (Inotek; Beverly, MA). Después de sondear con anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (Pierce; Rockland, IL), se visualizaron bandas de proteína con un sustrato cromogénico de fosfatasa alcalina (Promega, Madison, WI). Se seleccionaron clones bacterianos que procuraban bandas de proteína del peso molecular correcto y reactivas con los anticuerpos apropiados para producción de proteína para uso en ensayos biológicos.

## Resultados y discusión

**Clonación y expresión de constructos de sitio de escisión:** El fragmento de sitio de escisión madurativa del precursor de hemaglutinina está bien conservado por los subtipos de cepas A y B de la gripe, y por lo tanto podría ser una diana para el desarrollo de una vacuna universal eficaz contra la mayoría de cepas de la gripe en circulación. Se generó una serie de plásmidos que codifican una fusión del ligando de TLR5 con el fragmento de escisión y se expresaron en la cepa BLR (DE3) de *E. coli*. Como se ensayó por tinción con azul de Coomassie del gel de PAGE-SDS, y se confirmó mediante ensayos de inmunotransferencia, las cepas de *E. coli* que albergan los constructos STF2.1xH1C1, STF2.2xH1C1, STF2.3xH1C1 y STF2.4xH1C1 exhibían bandas que corresponden a los pesos moleculares predichos de 55, 58, 60 y 62 kDa respectivamente. De forma similar, las cepas BLR(DE3) que expresan los constructos STF2.4xH1C2 y STF2.4xH5C1 exhiben proteínas de fusión recombinantes que migran con el peso molecular aparente de 62 kDa y 66kDa, respectivamente. Estos datos indican que la fusión de flagelina y fragmento de escisión de HA se expresa abundantemente en *E. coli*.

## EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE STF2.4xH1C1, UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN QUE COMPRENDE FLAGELINA (AGONISTA DE TLR5) Y EL SITIO DE ESCISIÓN MADURATIVA DE HEMAGLUTININA DE GRIPE A

### Materiales y Métodos

**Crecimiento de células bacterianas y lisis celular:** El constructo STF2.4xH1C1 (SEQ ID NO: 345) se expresó en la cepa hospedadora BLR (DE3) de *E. coli*. Se recuperó la cepa de una disolución madre en glicerol y se hizo crecer en matraces agitados hasta un volumen final de 12 l. Se hicieron crecer las células en medio LB que contenía kanamicina 50 µg/ml, tetraciclina 12,5 µg/ml y 0,5 % de dextrosa hasta  $DO_{600} = 0,6$  y se indujeron con IPTG 1 mM durante 3 h a 37 °C. Se recolectaron las células por centrifugación (7000 rpm x 7 minutos en una centrifuga Sorvall RC5C) y se resuspendieron en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, ADNasa 1 1 µg/ml, PMSF 1 mM, cóctel de inhibidor de proteasa y lisozima 1 mg/ml. Se lisaron entonces las células por dos pasadas a través de un microfluidizador (Microfluidics; Newton, MA) a 103,4 MPa. Se centrifugó el lisado a 45.000 g durante 1 hora en una ultracentrífuga Beckman Optima L (Beckman Coulter; Fullerton, CA) para separar las fracciones soluble e insoluble.

**Purificación de STF2.4xH1C1 (SEQ ID NO: 345):** Después de la centrifugación, se recogió la fracción sobrenadante y se pasó a través de una columna Fast Flow de Sepharose Q (GE/Amersham Biosciences; Piscataway, NJ). Se suplementó la fracción de circulación de esta etapa con Triton X-100 (Sigma; St. Louis, MO) a una concentración final del 1 % (p/v) y se pasó a través de la misma columna de Sepharose Q. Se recogió la fracción de circulación de nuevo y se suplementó con urea a una concentración final 8 M y ácido cítrico a una concentración final 20 mM. Después de ajustar el pH a 3,5 con HCl concentrado, se pasó la disolución por una columna Source S (GE/Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) equilibrada con ácido cítrico 20 mM, pH 3,5.

Se lavó entonces la columna con 10 volúmenes de columna de tampón de equilibrado suplementado con 1 % (p/v) de Triton X-100 para retirar la endotoxina. Se eluyó entonces la proteína con un gradiente lineal de 5 volúmenes de

columna de NaCl 0 a 1 M en tampón de equilibrado. Se replegó entonces la STF2.4xH1C1 mediante dilución rápida a una concentración final de 0,1 mg/ml de proteína en tampón de replegamiento [Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, NaCl 0,1 M, 1 % (p/v) de glicerol]. Se concentró la proteína replegada usando ultrafiltración a presión de celda agitada (Millipore; Billerica, MA) y se fraccionó en una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 (GE/Amersham Biosciences; Piscataway, NJ).

**PAGE-SDS y análisis de transferencia Western:** Se determinó la identidad de proteína y se estimó la pureza por PAGE-SDS. Se diluyó una alícuota de 5 µg de cada muestra en tampón de muestra de PAGE-SDS con o sin DTT 100 mM como reductor. Se hirvieron las muestras durante 5 minutos, se cargaron en gel de poliacrilamida con SDS al 10 % (LifeGels; French's Forrest, Nueva Gales del Sur, AUS) y se sometieron a electroforesis. Se tiñó el gel con Coomassie R-250 (Bio-Rad; Hercules, CA) para visualizar las bandas de proteína. Para transferencia Western, se sometieron a electroforesis 0,5 µg/carril de proteína total como se describe anteriormente, se electrotransfirieron entonces a una membrana de PVDF y se bloquearon con leche en polvo al 5 % (p/v) antes de sondear con anticuerpo anti-flagelina (Inotek; Beverly, MA) o suero de ratones inmunizados con un péptido H1C1 lipidado sintético. Después de sondear con anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (Pierce; Rockland, IL), se visualizaron bandas de proteína con un sustrato cromogénico de fosfatasa alcalina (Promega; Madison, WI).

**Ensayo de proteína:** Se determinó la concentración de proteína total para todas las proteínas usando el ensayo de Micro BCA (ácido bicinonínico) (Pierce; Rockford IL) en formato de microplaca, usando seroalbúmina bovina como patrón, según las instrucciones del fabricante.

**Ensayo de endotoxina:** Se determinaron los niveles de endotoxina para todas las proteínas usando el kit de ensayo LAL cromogénico cuantitativo QCL-1000 (Cambrex; E. Rutherford, NJ), siguiendo las instrucciones del fabricante para el método de microplaca.

**Ensayo de bioactividad de TLR5:** Las células HEK293 expresan constitutivamente TLR5 y secretan varios factores solubles, incluyendo IL-8, en respuesta a la señalización de TLR5. Se sembraron las células en microplacas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo) y se añadió la proteína de ensayo STF2.4xH1C1. El día siguiente, se recolectó el medio acondicionado, se transfirió a una microplaca de 96 pocillos limpia y se congeló a -20 °C. Después de descongelar, se ensayó en el medio acondicionado la presencia de IL-8 en un ELISA de sándwich usando un par de anticuerpos coincidentes anti-IL-8 humana (Pierce, Rockland, IL; n° M801E y n° M802B) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la densidad óptica usando un espectrofotómetro de microplaca (FARCyte, GE/Amersham; Piscataway, NJ).

## Resultados y discusión

Se encontró que la proteína STF2.4xH1C1 (SEQ ID NO: 345) purificada y replegada agregaba sustancialmente como la mayoría de la proteína fraccionada en el volumen vacío de la columna Superdex S200 (Figura 26). La proteína tenía también una baja actividad de TLR5 *in vitro*, con un valor de CE<sub>50</sub> aproximadamente dos órdenes de magnitud mayor que la proteína de fusión de flagelina estándar STF2.0VA. La proteína purificada reaccionaba con suero de ratones inmunizados con un péptido H1C1 lipidado sintético.

## EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE STF2.1xH1C1, UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN QUE COMPRENDE FLAGELINA (AGONISTA DE TLR5) Y EL SITIO DE ESCISIÓN MADURATIVA DE HEMAGLUTININA DE GRIPE A

### Materiales y Métodos

**Crecimiento de células bacterianas y lisis celular:** El constructo STF2.1xH1C1 (SEQ ID NO: 355) se expresó en la cepa hospedadora BLR (DE3) de *E. coli*. Se recuperó la cepa de una disolución madre en glicerol y se hizo crecer en matraces agitados hasta un volumen final de 12 l. Se hicieron crecer las células en medio LB que contenía kanamicina 50 µg/ml, tetraciclina 12,5 µg/ml/0,5 % de dextrosa hasta DO<sub>600</sub> = 0,6 y se indujeron con IPTG 1 mM durante 3 horas a 37 °C. Se recolectaron las células por centrifugación (7000 rpm x 7 minutos en una centrifuga Sorvall RC5C) y se resuspendieron en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, ADNasa 1 µg/ml, PMSF 1 mM, cóctel de inhibidor de proteasa y lisozima 1 mg/ml. Se lisaron entonces las células por dos pasadas a través de un microfluidizador (Microfluidics; Newton, MA) a 103,4 MPa. Se centrifugó el lisado a 45.0000 g durante 1 hora en una ultracentrífuga Beckman Optima L (Beckman Coulter; Fullerton, CA) para separar las fracciones soluble e insoluble.

**Purificación de STF2.1xH1C1 (SEQ ID NO: 342):** Después de la centrifugación, se recogió la fracción sobrenadante y se pasó a través de una columna Fast Flow de Sepharose Q (GE/Amersham Biosciences; Piscataway, NJ). Se suplementó la fracción de circulación de esta etapa con Triton X-100 (Sigma; St. Louis, MO) a una concentración final del 1 % (p/v) y se pasó a través de la misma columna de Sepharose Q. Se recogió la fracción de circulación de nuevo y se suplementó con urea a una concentración final 8 M y ácido cítrico a una concentración final 20 mM. Después de ajustar el pH a 3,5 con HCl concentrado, se pasó la disolución por una columna Source S (GE/Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) equilibrada con ácido cítrico 20 mM, pH 3,5.

Se lavó entonces la columna con 10 volúmenes de columna de tampón de equilibrado suplementado con 1 % (p/v) de Triton X-100 para retirar la endotoxina. Se eluyó entonces la proteína con un gradiente lineal de 5 volúmenes de columna de NaCl 0 a 1 M en tampón de equilibrado. Se replegó la STF2.1xH1C1 mediante dilución rápida a una

concentración final de 0,1 mg/ml de proteína en tampón de replegamiento [Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0/NaCl 0,1 M, 1 % (p/v) de glicerol]. Se concentró la proteína replegada usando ultrafiltración a presión de celda agitada (Millipore; Billerica, MA) y se fraccionó en una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 (GE/Amersham Biosciences; Piscataway, NJ).

- 5 **PAGE-SDS y análisis de transferencia Western:** Se determinó la identidad de proteína y se estimó la pureza por PAGE-SDS. Se diluyó una alícuota de 5 µg de cada muestra en tampón de muestra de PAGE-SDS con o sin DTT 100 mM como reductor. Se hirvieron las muestras durante 5 minutos, se cargaron en gel de poliacrilamida con SDS al 10 % (LifeGels; French's Forrest, Nueva Gales del Sur, AUS) y se sometieron a electroforesis. Se tiñó el gel con Coomassie R-250 (Bio-Rad; Hercules, CA) para visualizar las bandas de proteína. Para transferencia Western, se sometieron a electroforesis 0,5 µg/carril de proteína total como se describe anteriormente, se electrotransfirieron entonces los geles a una membrana de PVDF y se bloquearon con leche en polvo al 5 % (p/v) antes de sondear con anticuerpo anti-flagelina (Inotek; Beverly, MA) o suero de ratones inmunizados con un péptido Pam3Cys.H1C1 (SEQ ID NO: 358). Después de sondear con anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (Pierce; Rockland, IL), se visualizaron bandas de proteína con un sustrato cromogénico de fosfatasa alcalina (Promega; Madison, WI).

## 15 **Resultados y discusión**

- Se encontró que la proteína STF2.1xH1C1 (SEQ ID NO: 342) era monomérica a juzgar por el perfil de elución en una columna de filtración en gel Superdex 200. La mayoría de la proteína se encontró en el volumen incluido con el pico principal que eluye aproximadamente a 14 ml. Esto corresponde muy estrechamente al perfil de elución conocido de flagelina monomérica purificada en esta columna. No se observó casi proteína eluyendo en el volumen vacío, que se sabe que es de aproximadamente 7 ml para esta columna, demostrando que no están virtualmente presentes agregados.

## **INMUNOGENICIDAD Y EFICACIA DE PAM3CYS.H1C1, UN PÉPTIDO DE FUSIÓN QUE COMPRENDE PAM3CYS (AGONISTA DE TLR2) Y EL PÉPTIDO DE SITIO DE ESCISIÓN MADURATIVA DE HEMAGLUTININA DE GRIPE A**

### **Materiales y Métodos**

- 25 **Diseño y síntesis de péptido:** El Pam3 (tripalmitilo) es el ligando natural de receptor de tipo Toll 2 (TLR2), y se expresa de forma nativa como el motivo de lipidación de lipoproteína bacteriana (BLP, SEQ ID NO: 357). Pam3 puede prepararse mediante síntesis química y conjugarse con macromoléculas tales como proteínas o acoplarse con el extremo N de péptidos sintéticos usando la química de síntesis peptídica estándar. Esta estrategia implica habitualmente la síntesis de un péptido de interés concluida con el acoplamiento de cisteína modificada con Pam3 (Pam3Cys) con el extremo amino, procurando el lipopéptido de interés. Se usó este enfoque para sintetizar un péptido de fragmento de escisión de HA lipidado, Pam3Cys.H1C1 (Pam3Cys-SLWSEENIPSIQSRGLFGAIAGFIEE, SEQ ID NO: 358).

- 30 **Ratones e inmunización:** Se usaron ratones BALB/c hembra (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) a la edad de 6-8 semanas. Se dividieron los ratones en grupos de 10 y recibieron inmunizaciones subcutáneas (s.c.) inguinales los días 0 y 14 como sigue:

8) PBS (disolución salina tamponada con fosfato).

9) 20 µg de péptido nativo H1C1 (SEQ ID NO: 358) en tampón salino (histidina 10 mM, Tris 10 mM, NaCl 75 mM, 5 % (vol/vol) de sacarosa, 0,02 % (p/v) de polisorbato-80, EDTA 0,1 mM, 0,5 % (v/v) de etanol, pH 7,2)

10) 20 µg de péptido Pam3Cys.H1C1 (SEQ ID NO: 358) en tampón salino

- 40 Un grupo adicional de 5 ratones recibió una exposición subletal determinada experimentalmente con  $8 \times 10^1$  dosis infectantes de embrión (EID) de PR/8/34 y se dejaron convalecer durante > 21 días. Se usaron entonces estos animales como controles positivos inmunes convalecientes durante los estudios de exposición. Se extrajo sangre a los ratones los días 10 (primario) y 21 (refuerzo), se clarificaron los sueros mediante coagulación y centrifugación y se almacenaron a -20 °C.

- 45 **Determinación del anticuerpo sérico:** Se determinaron los niveles de IgG específica de H1C1 mediante ELISA. Se recubrieron durante una noche placas ELISA de 96 pocillos (Costar (nº de cat. 9018) Corning, NY) a 4 °C con 100 µl/pocillo de péptido H1C1 (SEQ ID NO: 358) en PBS (5 µg/ml). Se bloquearon las placas con 200 µl/pocillo de tampón de diluyente de ensayo (ADB; BD Pharmingen, (nº de cat: 555213) (San Diego, CA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas 3 veces con PBS + 0,05 % (v/v) de Tween 20 (PBS-T). Se añadieron diluciones de los sueros en ADB (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas durante una noche a 4 °C. Se lavaron las placas tres veces con PBS-T. Se añadieron anticuerpos de IgG de cabra anti-ratón marcados con HRP (Jackson Immunochemical, West Grove, PA (nº de cat.: 115-035-146)) diluidos en ADB (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron las placas tres veces con PBS-T. Después de añadir sustrato TMB Ultra (Pierce (nº de cat. 34028), Rockford, IL)) y monitorizar el desarrollo de color, se midió la  $A_{450}$  en un espectrofotómetro de microplacas Tecan Farcyte (Durham, NC).

Exposición de ratones a virus de la gripe. Para valorar la eficacia, se expusieron ratones inmunizados como se describe anteriormente el día 28 a la administración intranasal de una DL<sub>90</sub> (dosis letal para el 90 % de ratones) (8x10<sup>3</sup> EID) de aislamiento de gripe A PR/8/34. Se monitorizaron en los animales diariamente durante 21 días después de la exposición supervivencia, pérdida de peso y presentación clínica. Se calculó el % de pérdida de peso basándose en la media de ((peso diario (g) / peso inicial (g) el día 28) x 100) de cada animal individual por grupo. Se asignaron las puntuaciones clínicas como sigue: 4 pts = sano, 3 pts = aseo reducido, 2 pts = actividad física reducida y 1, pt = moribundo. (Los resultados experimentales de las puntuaciones clínicas y pérdida de peso reflejan los resultados basados en los animales supervivientes el día evaluado).

### Resultados y discusión

10 Inducción de respuestas de anticuerpo específico de H1C1 después de inmunización con Pam3Cys.H1C1: Se inmunizaron los ratones con péptido H1C1 nativo (SEQ ID NO: 358) y el mismo péptido modificado por la adición de un residuo Pam3Cys aminoterminal, para ensayar la hipótesis de que el ligamiento con un ligando de TLR2 aumentaría su inmunogenicidad. Se determinó la inmunogenicidad midiendo los niveles de anticuerpos de H1C1 nativo (SEQ ID NO: 358) en los sueros de ratones inmunizados. Los resultados muestran claramente que los  
15 ratones inmunizados con el péptido modificado con Pam3Cys generaban mayores títulos de anticuerpo ante la secuencia de esqueleto peptídico inmunizante que los ratones inmunizados con el péptido nativo (SEQ ID NO: 358) (Figura 27).

Protección frente a exposición letal a virus de la gripe después de inmunización con Pam3Cys.H1C1. Los resultados de la Figura 27 demostraron que la inmunización de ratones con Pam3Cys.H1C1 generaba una respuesta de anticuerpo que reconocía el péptido H1C1 nativo. Para evaluar la eficacia, se expusieron los mismos ratones el día 28 a una DL<sub>90</sub> (8x10<sup>3</sup> EID) de virus PR/8/34 administrada por vía intranasal. Se monitorizaron en los ratones diariamente durante 21 días después de la exposición supervivencia, pérdida de peso y presentación clínica. Como se muestra en la Figura 28, los ratones inmunizados con PBS murieron entre 6 y 10 días después de la exposición, mientras que los ratones convalecientes sobrevivieron más allá del periodo de observación de 21 días. Los ratones  
25 inmunizados con H1C1 nativo (SEQ ID NO: 358) empezaron a morir el día 6 después de la infección a una tasa similar a los ratones de control con PBS, aunque 2 de los 10 ratones sobrevivieron más allá del periodo de observación de 21 días. En contraposición, y de forma similar a los ratones convalecientes, todos los ratones inmunizados con Pam3Cys.H1C1 sobrevivieron más allá del periodo de observación de 21 días. Por tanto, aunque el H1C1 solo no es un potente inmunógeno (Figura 27) ni protector (Figura 28), la misma secuencia acoplada con un  
30 ligando de TLR2 es tanto inmunogénica como protectora.

### EJEMPLO 15: PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE FLAGELINA-M2e

M2e está conservada entre múltiples subtipos de gripe A (a los que se hace referencia también en la presente memoria como "cepas"). M2e es al menos una porción de la proteína M2, en particular, un extremo amino de 24 aminoácidos (al que se hace referencia también en la presente memoria como un "ectodominio") de la proteína M2.  
35 El ectodominio de M2 es una secuencia de aminoácidos relativamente pequeña (24 aminoácidos) en comparación con HA (aproximadamente 566 aminoácidos) y NA (aproximadamente 469 aminoácidos). La secuencia de M2e de aislamientos de gripe A aviar ejemplares difiere de la de los aislamientos humanos, pero está altamente conservada entre los aislamientos aviares (véanse, por ejemplo, las SEQ ID NO: 544-556, 570 y 573-578). Se generaron 4 copias en serie de M2e fusionadas con el extremo carboxilo de una flagelina STF2 (completa o STF2 con delección de la región de bisagra). Se hace también referencia en la presente memoria a STF2 sin la región de bisagra como "STF2Δ."  
40

### Construcción de proteína de fusión

Se construyó la fusión carboxiterminal de la secuencia de 4xM2e sintética (4 secuencias de 24 aminoácidos consecutivos) con STF2 como sigue. Se adquirió el vector pET24A en Novagen, San Diego, CA. La estrategia empleaba el kit Seamless Cloning (número de catálogo 214400) de Stratagene (La Jolla, CA www.stratagene.com) efectuado por DNA 2.0 Inc. (Menlo Park, CA). El gen que codifica la proteína de fusión estaba en pDrive 4xM2e G00448 y se usó como molde de PCR para la preparación de inserto para la construcción del constructo de expresión de fusión C-terminal con STF2. Se usó el constructo sintético de 4xM2e pDrive 4xM2e G00448 como molde de PCR como se resume en el kit Seamless Cloning (número de catálogo 214400) de Stratagene (La Jolla, CA). El producto esperado de esta amplificación incluye 318 pb y los sitios de enzima de restricción incorporados a los oligonucleótidos usados para amplificar este inserto. El procedimiento fue como sigue:  
50

#### Condiciones de PCR

- 1 µl -20 ng de pDrive 4xM2e G00448
- 5 µl de 10x tampón de polimerasa Pfu clonada
- 55 1 µl de mezcla de dNTP 40 mM
- 1 µl -10 pmol del cebador de codificación 4xM2eforbs1



## ES 2 534 332 T3

1 µl -10 pmol del cebador inverso 4xM2erevwsto

40 µl de H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>

Inmediatamente antes de empezar la termociclación, se añadieron a 1 µl de ADN polimerasa *Pfu Turbo* lo siguiente.

secuencia cebadora 4xM2eforbs1:

5 5'-CGCTCTTCAMTGAGCTTGCTGACTGAGGTTGAGACCCCGATTTC (SEQ ID NO: 566)

secuencia cebadora 4xM2erevwsto:

5'-CGCTCTTCACGCTTATTATCTAGACGGGTCTGAGCTATCGTTAGAGCGAG (SEQ ID NO: 567)

Se cicló esta reacción como sigue en un termociclador Thermo Hybaid PxE (Waltham, MA).

Ciclo inicial

| Temperatura | Duración  |
|-------------|-----------|
| 95 °C       | 3 minutos |
| 65 °C       | 1 minuto  |
| 72 °C       | 1 minuto  |

10

Posteriores 9 ciclos

| Temperatura | Duración    |
|-------------|-------------|
| 95 °C       | 45 segundos |
| 65 °C       | 35 segundos |
| 72 °C       | 1 minuto    |

En este punto, se añadió a cada reacción lo siguiente.

5 µl de 10x tampón de polimerasa *Pfu* clonada

15 1 µl de mezcla de 5-metil-dNTP

44 µl de H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>

Posteriormente, se repitió la siguiente termociclación 5 veces.

| Temperatura | Duración    |
|-------------|-------------|
| 95 °C       | 45 segundos |
| 65 °C       | 35 segundos |
| 72 °C       | 1 minuto    |

20

Se llevó el producto de 100 µl a un volumen de 300 µl mediante la adición de tampón TE. Se extrajo el producto resultante una vez con fenol-cloroformo (Invitrogen Carlsbad, número de catálogo CA 15593-031) y se extrajo una vez con cloroformo. Se precipitó entonces con etanol el producto de amplificación mediante la adición de 30 µl de tampón de acetato de sodio a pH 5,2 y 750 µl de etanol al 100 %. Se lavó el sedimento de ADN dos veces con 300 µl de etanol al 70 %, se dejó secar al aire durante 10 minutos y se resuspendió entonces en 50 µl de tampón TE.

## ES 2 534 332 T3

### Amplificación del vector STF2 en pET24.

- Se usó el constructo pET24a/STF2.M2e anteriormente construido como molde para PCR como se plantea en el kit Seamless Cloning (número de catálogo 214400) de Stratagene (La Jolla, CA). El producto esperado de esta amplificación incluye el total del plásmido pET24 más las secuencias de STF2, pero no incluye la única copia de M2e que existe en este constructo. El procedimiento fue como sigue:

#### Condiciones de PCR

- 1 µl -40 ng de STF2.M2E pET22-2
- 5 µl de 10x tampón de polimerasa Pfu clonada
- 1 µl de mezcla de dNTP 40 mM
- 10 1 µl -10 pmol del cebador 4xMECpET24
- 1 µl -10 pmol del cebador 4xM2eC-STF2
- 40 µl de H<sub>2</sub>O
- Inmediatamente antes de empezar la termociclación, se añadió lo siguiente:
- 1 µl de ADN polimerasa *Pfu Turbo*
- 15 secuencia cebadora 4xMECpET24:  
5'-GCTCTTCAGCGGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGG (SEQ ID NO: 568)
- secuencia cebadora 4xM2eC-STF2:  
5'-CGCTCTTCACAGACGTAACAGAGACAGCACGTTCTGCGG (SEQ ID NO: 569)
- Se cicló esta reacción como sigue en un termociclador Thermo Hybaid PxE (Waltham, MA).
- 20 Ciclo inicial

| Temperatura | Duración   |
|-------------|------------|
| 95 °C       | 3 minutos  |
| 65 °C       | 1 minuto   |
| 72 °C       | 18 minutos |

Posteriores 9 ciclos

| Temperatura | Duración    |
|-------------|-------------|
| 95 °C       | 45 segundos |
| 65 °C       | 35 segundos |
| 72 °C       | 18 minutos  |

En este punto, se añadió a cada reacción lo siguiente.

- 5 µl de 10x tampón de polimerasa Pfu clonada
- 25 1 µl de mezcla de 5-metil-dNTP
- 44 µl de H<sub>2</sub>O
- Posteriormente, se repitió la siguiente termociclación 5 veces.

## ES 2 534 332 T3

| Temperatura | Duración    |
|-------------|-------------|
| 95 °C       | 45 segundos |
| 65 °C       | 35 segundos |
| 72 °C       | 18 minutos  |

5 Se llevó el producto de 100 µl a un volumen de 300 µl mediante la adición de tampón TE. Se extrajo el producto resultante una vez con fenol-cloroformo (Invitrogen Carlsbad, número de catálogo CA 15593-031) y se extrajo una vez con cloroformo. Se precipitó entonces con etanol el producto de amplificación mediante la adición de 30 µl de tampón de acetato de sodio a pH 5,2 y 750 µl de etanol al 100 %. Se lavó el sedimento de ADN dos veces con 300 µl de etanol al 70 %, se dejó secar al aire durante 10 minutos y se resuspendió entonces en 50 µl de tampón TE.

### Digestión y ligamiento de vector y amplificaciones de inserto

Se establecieron las digestiones *Eam* 1 104 I separadamente para vector e inserto como sigue:

30 µl de producto amplificado después de precipitación con etanol

10 5 µl de tampón 10x Universal (suministrado con el kit Seamless Cloning)

4 µl de enzima de restricción *Eam* 1 104 I (suministrada con el kit Seamless Cloning)

11 µl de H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>

15 Se mezclaron la digestiones suavemente, se incubaron a 37 °C durante 1 hora y se prepararon las reacciones de ligamiento de vector y productos de inserto como se efectúan anteriormente como sigue (reactivos suministrados con el kit Seamless Cloning):

Ingredientes añadidos en el orden enumerado:

9 µl de H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>

5 µl de inserto amplificado 4xM2e digerido con *Eam* 1 104 I

5 µl de vector amplificado STF2.M2E pET22-2 digerido con *Eam* 1 104 I

20 2 µl de 10x tampón ligasa

2 µl de ATP<sub>r</sub> 10 mM

1 µl de ADN ligasa T4 (diluida desde la disolución madre 1: 16)

1 µl de enzima de restricción *Eam* 1 104 I

25 Se mezclaron las reacciones de ligamiento suavemente y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Se almacenaron entonces los ligamientos en hielo hasta transformar en células XL-10 competentes (número de catálogo de Stratagene 200314) después en el mismo día.

### Transformación del ligamiento en células XL-10 competentes

Se enfriaron tubos Eppendorf durante 10 minutos mientras las células XL-10 competentes (número de catálogo de Stratagene 200314) se descongelaban en hielo.

30 Se tomaron alícuotas de 50 µl de células competentes del tubo de disolución madre por ligamiento.

2 µl de disolución madre de β-mercaptoetanol que se proporciona con las células XL-10.

35 Se incubó esta mezcla durante 10 minutos sobre hielo agitando suavemente cada 2 minutos. Se añadió la reacción de ligamiento Seamless cloning (4 µl), se removió suavemente y se incubó entonces en hielo durante 30 minutos. Se calentaron por choque térmico los tubos durante 35 segundos a 42 °C en un baño de agua. Se incubaron los tubos en hielo durante al menos 2 minutos. Se añadió medio SOC (400 µl) a las células y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con agitación.

Se usan dos placas de agar LB con kanamicina (50 µg/ml) para sembrar 200 µl y 10 µl de las células transformadas y se dejan crecer durante una noche.

Cribado de clones resistentes a kanamicina

Se hicieron crecer candidatos recombinantes para minipreparaciones en caldo Luria que contiene kanamicina (25 ug/ml) y se extrajeron usando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen Valencia, CA, número de catálogo 27106). Se cribaron los clones candidatos por enzimas de restricción (New England Biolabs Beverly, MA), se hicieron crecer los clones positivos en 100 ml de caldo Luria que contiene kanamicina (25 ug/ml) y se extrajeron usando el kit Qiagen HiSpeed Plasmid Midi (número de catálogo 12643). Se remitieron estos clones a GENEWIZ (North Brunswick, NJ) para secuenciación.

Producción y purificación de la proteína de fusión STF2.4xM2e

Se recuperó STF2.4xM2e en el hospedador BLR(DE3)pLysS de *E. coli* (Novagen, San Diego, CA, n° de catálogo 69053) de la disolución madre en glicerol y se aumentó de escala a 5 l. Se hicieron crecer las células en medio LB que contenía kanamicina 15 µg/ml y tetraciclina 12,5 µg/ml hasta  $DO_{600} = 0,4$  y se indujeron con IPTG 1 mM durante 3 h a 37 °C. Se recolectaron las células por centrifugación (7000 rpm x 7 minutos en una centrifuga Sorvall RC5C) y se resuspendieron en 2X PBS, 1 % de glicerol, ADNasa, PMSF 1 mM, cóctel de inhibidor de proteasa y lisozima 1 mg/ml. Se pasó la suspensión a través de un microfluidizador para lisar las células. Se centrifugó el lisado (45.000 g durante 1 hora en una ultracentrífuga Beckman Optima L) para separar la fracción soluble de los cuerpos de inclusión. Se detectó la proteína por PAGE-SDS en las fracciones soluble e insoluble.

Se aplicó la fracción soluble a resina Sepharose Q en presencia de alta salinidad mediante un método por lotes para reducir ADN, endotoxina y otros contaminantes. Se cargó la circulación que contiene la proteína de interés en una columna de 30 ml de Sepharose Q (Amersham Biosciences). Se eluyó la proteína unida usando un gradiente lineal de tampón A a B (tampón A: Tris-Cl 100 mM, pH 8,0. Tampón B: Tris-Cl 100 mM, NaCl 1 M, pH 8,0). Se purificó además la proteína eluida usando una columna de 45 ml Source Q que proporcionó una mayor resolución, necesaria para resolver las proteínas contaminantes. Se eluyó la proteína unida con un gradiente lineal de tampón A a B (tampón A: Tris-Cl 100 mM, pH 8,0. Tampón B: Tris-Cl 100 mM, NaCl 1 M, pH 8,0).

Se completó la purificación final de la proteína usando cromatografía por filtración en gel Superdex-200. Se desarrolló la columna con Tris 100 mM, NaCl 150 mM y 1% de glicerol más 1 % de desoxicolato de sodio para retirar el LPS. Se llevó a cabo el intercambio de tampón usando diálisis de una noche frente a tampón que contiene Tris 50 mM, NaCl 100 mM y 1 % de glicerol para retirar el desoxicolato de sodio. Se determinó la concentración de proteína mediante el kit MicroBCA Protein Assay Reagent (Pierce Biotechnology). Las preparaciones purificadas de STF2.4xM2e procuraron una sola banda visible con tinción de Coomassie que migraba con un peso molecular aparente de aproximadamente 64 kDa en geles de poliacrilamida con 12 % de SDS.

**EJEMPLO 16: EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE CONSTRUCTOS DE PROTEÍNA DE FUSIÓN DE FLAGELINA (STF2 Y STF2Δ) QUE CODIFICAN SECUENCIAS DEL ECTODOMINIO M2 DE GRIPE A**

Se representan las secuencias de consenso de M2e de varias cepas de la gripe A de origen humano y aviar en las SEQ ID NO: 544-556, 570 y 573-578. Para facilitar la clonación de la secuencia de M2e, se generaron dos módulos de vector, pMT/STF2 y pMT/STF2Δ, que contiene cada uno un sitio de clonación múltiple (MCS) (véanse las Figuras 17A y 17B). Para generar pMT/STF2, se fusionó el gen de 1,5 kb que codifica la flagelina completa de *Salmonella typhimurium* fljB de tipo 2, o STF2, con la señal de secreción de proteína de unión a Ig (BIP) del vector pMTBIP/V5-His (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) para expresión en *Drosophila*. La secuencia de BiP se incluye en el extremo 5' del constructo como una señal de secreción para expresión en *Drosophila*. Se clonó un gen de 4xM2e sintetizado químicamente que representa la secuencia de consenso de H1, H2 y H3, de SEQ ID NO: 544, en el MCS de pMT/STF2, creando pMT/STF2.4xM2e(H1).

Se emplea predictivamente una estrategia similar para clonar dos secuencias de M2e asociadas a H5, SLLTEVETPTRNEWECRCSDDSDP (SEQ ID NO: 553) (A/Viet Nam/1203/2004) y SLLTEVELTRNGWGCRCSDSDP (SEQ ID NO: 552) (A/Hong Kong/156/97). Se clonan predictivamente genes sintetizados químicamente con optimización de codón que contienen cuatro copias repetidas en serie de la secuencia de M2e asociada a H5 indicada en pMT/STF2, generando STF2.4xM2e(H5VN) y STF2.4xM2e(H5HK), respectivamente. Para generar un constructo que contenga múltiples formas de M2e, se insertan predictivamente la secuencia o secuencias de 4xM2e heterólogas en cualquiera de los constructos primarios.

"Secuencias heterólogas", como se usa en la presente memoria, significa secuencias de diferentes especies. Por ejemplo, la secuencia H1 es una secuencia humana y la secuencia H5 es una secuencia aviar. Por tanto, las secuencias H1 y H5 son secuencias heterólogas (p.ej.,

SLLTEVETPTRNEWESRSDSDPLESLLTEVETPTRNEWESRSDSDPESLLTEVETPT

RNEWESRSDSDPGSSLLTEVETPTRNEWESRSDSDP (SEQ ID NO: 597),

codificadas por

tctctgctgactgaagtagaaactccaacgcgtaatgaatgggaatcccgttctagcgactcctctgatcctctcgagt  
 ccctgctgacggaggtgaaaccccgaccgcaacgagtgaggaaagccgttctccgattcctctgatccggagagc  
 agcctgctgaccgaggtagaaccccgaccgtaatgagtgaggaaatctcgctcctctgattcttctgaccgggatcc  
 tctctgctgaccgaagtggagactccgactcgcaacgaatgggagagccgttcttctgactcctctgaccgc (SEQ  
 ID NO: 598).

5 Los constructos primarios comprenden al menos un patrón molecular asociado a patógeno (p.ej., STF2, STF2Δ) y al menos una porción de al menos una proteína de membrana integral (p.ej. M2e, tal como las SEQ ID NO: 510 y 544). Si hay más de una membrana integral en un constructo primario, las proteínas de membrana integrales son de la misma especie.

Un constructo heterólogo incluye al menos dos proteínas de membrana integrales tales como H1 (humana) y H5 (aviar), por ejemplo en las SEQ ID NO: 583 y 584.

10 Para generar pMT/STF2Δ, se eliminó la región hipervariable que cubre los aminoácidos 170 a 415 del gen de flagelina completa de SEQ ID NO: 499) y se reemplazó por un ligador flexible corto (10 aminoácidos) (GAPVDPASPW, SEQ ID NO: 594) diseñado para facilitar las interacciones de las secuencias amino- y carboxiterminales necesarias para la señalización de TLR5. La proteína expresada a partir de este constructo retiene una potente actividad de TLR5 expresada sola o en fusión con antígeno de ensayo. Por tanto, se genera predictivamente una segunda serie de constructos de M2e basándose en pMT/STF2Δ. Se transfectan predictivamente células Dmel-2 de *Drosophila* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), crecidas a temperatura ambiente en medio de Schneider suplementado con 10 % de FBS y antibióticos, con los constructos descritos anteriormente usando el reactivo celfectina (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. 24 horas después de la transfección, se inducen predictivamente las células con CuSO<sub>4</sub> 0,5 mM en medio que carece de FBS y se incuban durante 48 horas adicionales. Se recolecta predictivamente el medio acondicionado (CM) de cultivos inducidos y se criba la expresión de proteína por análisis de PAGE-SDS y transferencia Western usando anticuerpos específicos anti-flagelina y anti-M2e. Se efectúan predictivamente la identidad, bioactividad de TLR de la proteína de fusión, antigenicidad valorada por ELISA y estudios de inmunogenicidad en ratón *in vivo*.

#### EJEMPLO 17: CONSTRUCCIÓN Y EXPRESIÓN DE CONSTRUCTOS DE FLAGELINA-HEMAGLUTININA (HA)

25 Se aisló el gen que codifica HA de ADN genómico de la cepa PR8 del propio laboratorio, un derivado atenuado de A/Puerto Rico/8/34 (SEQ ID NO: 565, que codifica la SEQ ID NO: 564). Se fusionó el gen con el módulo STF2Δ que se había construido anteriormente en pPICZΔ, generando STF2Δ.HAPR8 (SEQ ID NO: 560, que codifica la SEQ ID NO: 559) (véase la Figura 39). Se ensayaron en la proteína recombinante purificada la inmunogenicidad y eficacia en ratones BALB/c. Se sintetizó a medida el gen que codifica H5N1 de la cepa A/Vietnam/1203/04 y se fusionó con el módulo STF2Δ, generando STF2Δ.HAH5 (SEQ ID NO: 558, que codifica la SEQ ID NO: 557). Se transformaron ambos constructos de HA humana y aviar en las cepas GS115 y X-33 de *Pichia pastoris* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Se cribó en los clones seleccionados la expresión por fraccionamiento en gel de PAGE-SDS y tinción con azul de Coomassie y análisis de transferencia Western usando anticuerpos anti-HA y anti-flagelina.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de preparación de una proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora ante el virus de la gripe en un sujeto, que comprende:
- 5 a) separar una porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural, en la que:  
la porción de proteína incluye al menos una porción de una cabeza globular y al menos una porción de al menos una estructura secundaria que tiene al menos una lámina  $\beta$  en la parte inferior de la cabeza globular, que causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria, y carece de un dominio de fusión con membrana, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático;
- 10 b) transformar una secuencia de ácido nucleico que codifica la porción de proteína en una célula hospedadora procariótica;
- c) cultivar la célula hospedadora para preparar así la proteína que estimula una respuesta inmunitaria protectora en un sujeto, y
- 15 d) fusionar al menos una porción de una flagelina con la porción de proteína de la hemaglutinina vírica de origen natural o ligar operativamente una secuencia de ácido nucleico que codifica la flagelina con una secuencia de ácido nucleico que codifica la porción de proteína de la hemaglutinina vírica de origen natural, en la que la flagelina activa el receptor de tipo Toll 5 (TLR5).
2. El método de la reivindicación 1, en el que la porción de proteína carece además de una secuencia señal.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la porción de proteína incluye además:
- 20 a) al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en un puente salino, una cremallera de leucina, un dedo de cinc o al menos una hélice  $\alpha$ ; o
- b) al menos un enlace disulfuro; o
- c) al menos dos enlaces disulfuro; o
- d) al menos cuatro enlaces disulfuro; o
- e) al menos cinco enlaces disulfuro; o
- 25 f) al menos seis enlaces disulfuro.
4. El método de la reivindicación 1, que incluye además la etapa de sustituir por una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un residuo aminoacídico seleccionado del grupo consistente en un residuo aminoacídico hidrófilo, un residuo aminoacídico polar y un residuo aminoacídico neutro una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un residuo aminoacídico hidrófobo en la porción de proteína.
- 30 5. El método de la reivindicación 4, en el que el residuo aminoacídico hidrófobo incluye al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en un residuo de fenilalanina, un residuo de triptófano y un residuo de tirosina. o el residuo aminoacídico polar incluye al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en un residuo de ácido aspártico y un residuo de ácido glutámico.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la hemaglutinina vírica incluye:
- 35 a) una proteína hemaglutinina vírica de la gripe; o
- b) una proteína hemaglutinina vírica de la gripe A; o
- c) una proteína hemaglutinina vírica de la gripe A, en la que la gripe A es al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en H1, H2, H3, H5, H7 y H9 de gripe A; o
- d) una proteína hemaglutinina vírica de la gripe B; o
- 40 e) una proteína hemaglutinina vírica de la gripe C.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la célula hospedadora procariótica
- a) es una célula hospedadora procariótica de *E. coli*; o
- b) es una célula hospedadora procariótica de *Pseudomonas*; o
- c) es una célula hospedadora procariótica de *Bacillus*; o

- d) es una célula hospedadora procariótica de *Salmonella*.
8. El método de la reivindicación 1, que incluye además la etapa de insertar un ligador aminoacídico entre la flagelina y la porción de proteína de la hemaglutinina vírica de origen natural.
9. El método de la reivindicación 1, en el que la flagelina
- 5 i) carece de al menos una porción de una región de bisagra; o
- ii) incluye al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en flagelina de *Salmonella typhimurium*, flagelina de *E. coli*, flagelina de *S. muenchen*, flagelina de *Yersinia*, flagelina de *Campylobacter*, flagelina de *P. aeruginosa* y flagelina de *L. monocytogenes*; o
- iii) incluye al menos un residuo de cisteína.
- 10 10. El método de la reivindicación 1, que incluye además la etapa de:
- a) ligar operativamente una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora con la secuencia de ácido nucleico que codifica la porción de proteína de la hemaglutinina vírica de origen natural; o
- 15 b) ligar operativamente una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora con la secuencia de ácido nucleico que codifica la porción de proteína de la hemaglutinina vírica de origen natural; y la proteína portadora es al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en toxoide del tétanos, toxoide de *Vibrio cholerae*, toxoide de difteria, mutante reactivo cruzado de toxoide de difteria, una subunidad B de una enterotoxina termolábil de *E. coli*, una proteína de cubierta del virus de mosaico del tabaco, una proteína de envoltura del virus de la rabia, una glucoproteína de envoltura del virus de la rabia, una tiroglobulina, una proteína de choque térmico 60, una hemocianina de lapa bocallave y un antígeno de tuberculosis secretado tempranamente 6; o
- 20 c) eliminar al menos un sitio de glucosilación de la secuencia de ácido nucleico que codifica la porción de proteína de la hemaglutinina vírica de origen natural, y en cuyo caso opcionalmente el sitio de glucosilación incluye un sitio de N-glucosilación.
- 25 11. El método de la reivindicación 1, en el que la hemaglutinina vírica de origen natural incluye la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7.
12. El método de la reivindicación 1, en el que la porción de proteína incluye la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 48 o la SEQ ID NO: 50.
- 30 13. El método de la reivindicación 1, en el que la porción de proteína de la hemaglutinina vírica de origen natural no está glucosilada.
14. El método de la reivindicación 1, en el que la porción de proteína de la hemaglutinina vírica de origen natural incluye una porción HA1-1 de la hemaglutinina vírica de gripe de origen natural o una porción HA1-2 de la hemaglutinina vírica de gripe de origen natural.
- 35 15. Una composición para estimular una respuesta inmunitaria protectora ante virus de la gripe, que comprende una fusión de una flagelina o al menos una porción de la flagelina, en la que la flagelina activa el receptor de tipo Toll 5 (TLR5), y una porción de proteína de una hemaglutinina vírica de origen natural, en la que:
- 40 a) la porción de proteína de la hemaglutinina vírica de origen natural incluye al menos una porción de una cabeza globular y al menos una porción de al menos una estructura secundaria que tiene al menos una lámina  $\beta$  en la parte inferior de la cabeza globular, que causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria, y carece de un dominio de fusión con membrana, un dominio transmembrana, un dominio citoplasmático; o
- 45 b) la porción de proteína de hemaglutinina vírica de origen natural no está glucosilada e incluye al menos una porción de una cabeza globular y al menos una porción de al menos una estructura secundaria que tiene al menos una lámina  $\beta$  en la parte inferior de la cabeza globular, que causa que la cabeza globular retenga esencialmente su estructura terciaria, y carece de un dominio de fusión con membrana, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático.
16. La composición de la reivindicación 15, que incluye además una proteína portadora.
- 50 17. La composición de la reivindicación 15, en la que la flagelina

- a) incluye al menos un residuo de cisteína o
- b) incluye al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en flagelina de *Salmonella typhimurium*, flagelina de *E. coli*, flagelina de *S. muenchen*, flagelina de *Yersinia* y flagelina de *Campylobacter*, flagelina de *P. aeruginosa* y flagelina de *L. monocytogenes*.
- 5    **18.**    La composición de la reivindicación 15, en la que la hemaglutinina vírica de origen natural:
- a) es una hemaglutinina vírica de la gripe A; o
- b) es una hemaglutinina vírica de la gripe B; o
- c) es una hemaglutinina vírica de la gripe C; o
- 10    d) incluye la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7.
- 19.**    La composición de la reivindicación 15, en el que la porción de proteína incluye las SEQ ID NO: 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 24, 26, 28, 30, 32, 38, 29, 40, 41, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 179, 180, 181 o 182.
- 20.**    La composición de la reivindicación 15, que incluye además al menos una porción de una proteína de matriz 2.
- 15    **21.**    La composición de la reivindicación 15, en la que la flagelina carece de al menos una porción de una región de bisagra.
- 22.**    La composición de la reivindicación 15, en la que la porción de proteína de la hemaglutinina vírica de origen natural incluye una porción HA1-1 de la hemaglutinina vírica de gripe de origen natural o una porción HA1-2 de la hemaglutinina vírica de gripe de origen natural.
- 20    **23.**    El método o composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en los que la porción de proteína de la hemaglutinina vírica de gripe de origen natural incluye un péptido que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 70 %, una identidad de secuencia de aproximadamente un 80 %, una identidad de secuencia de aproximadamente un 85 % o una identidad de secuencia de aproximadamente un 90 % con al menos un miembro seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID NO: 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21,
- 25    24, 26, 28, 30, 32, 38, 39, 40, 41, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 179, 180, 181 y 182.
- 24.**    La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23, para uso en terapia.
- 25.**    La composición de la reivindicación 24, en la que la composición estimula la inmunidad protectora frente al virus de la gripe.
- 30    **26.**    Uso de la proteína preparada mediante el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 15-25 para la fabricación de una vacuna para estimular la inmunidad protectora frente al virus de la gripe.



**Diseño del dominio de unión a sustrato como vacuna de la gripe (PR8)**

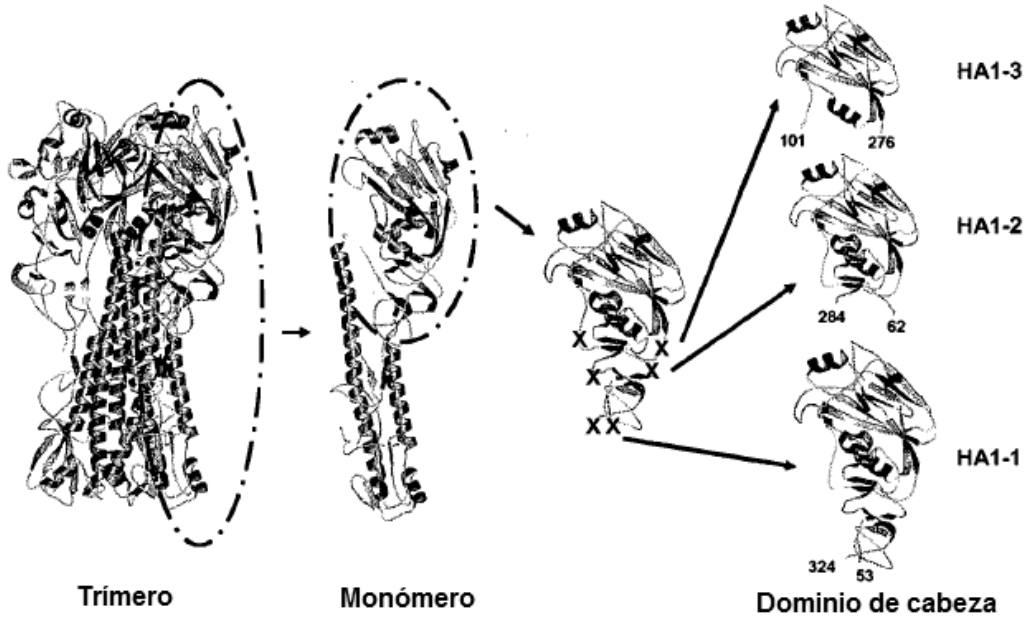
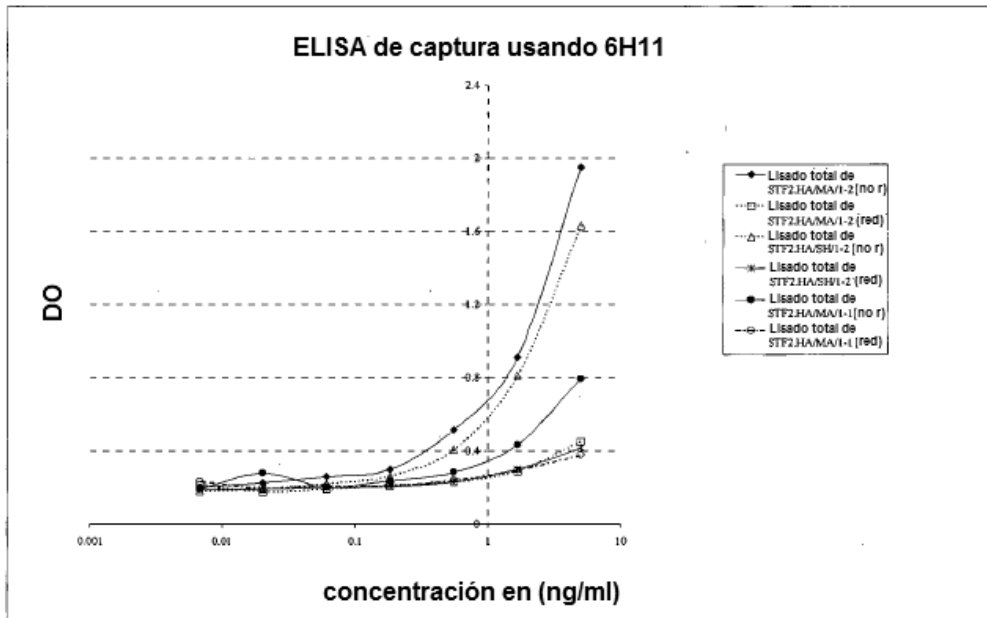
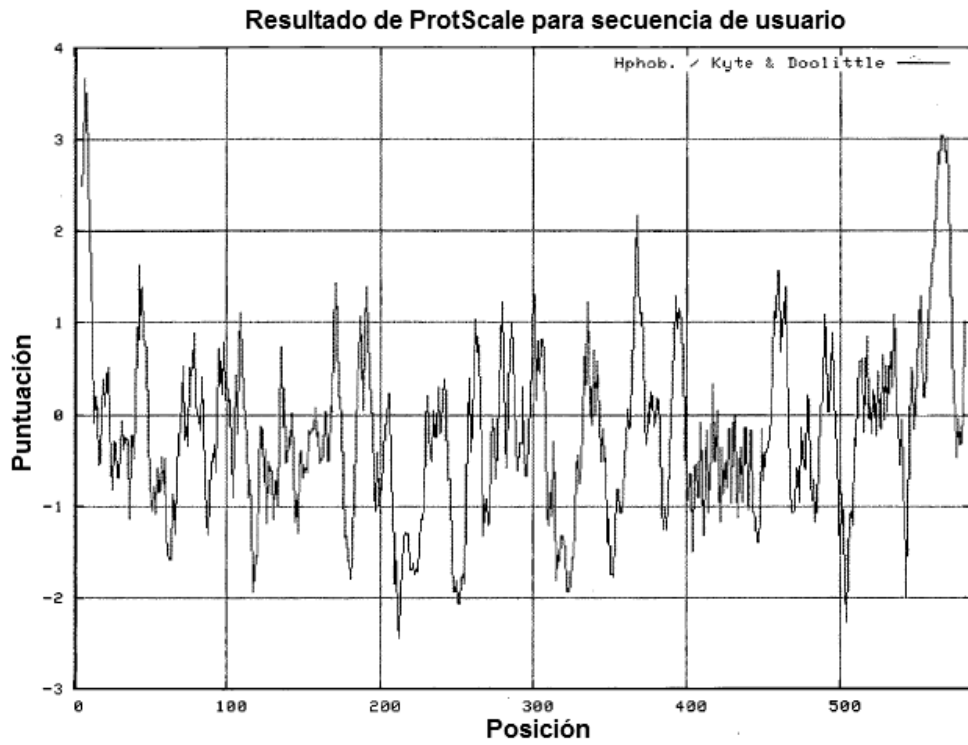
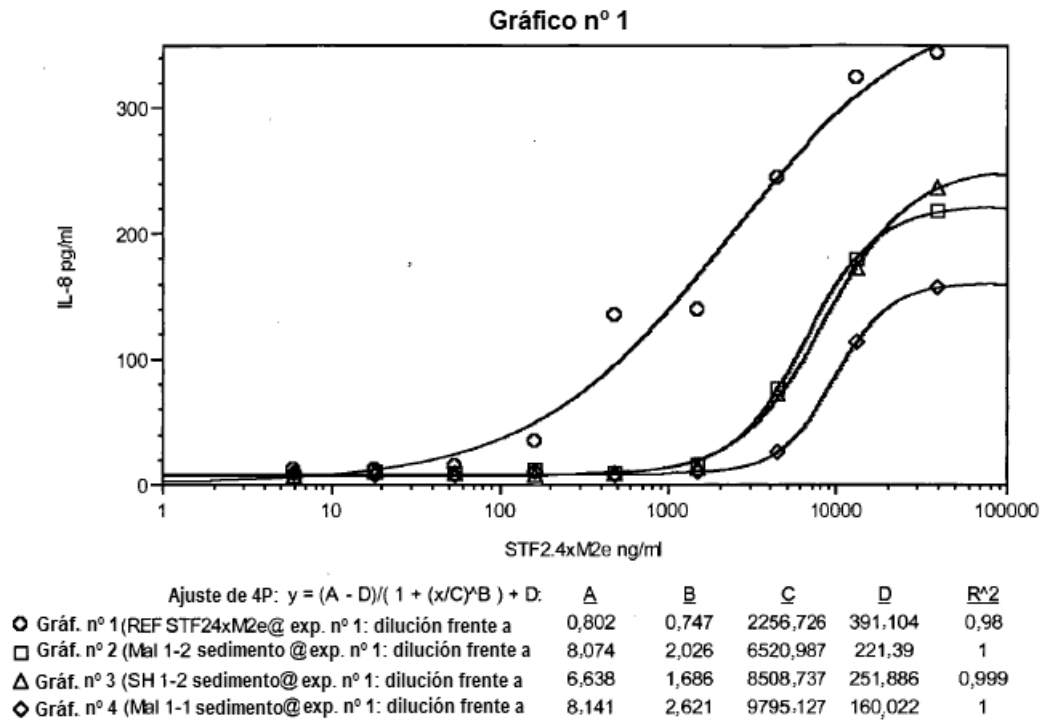


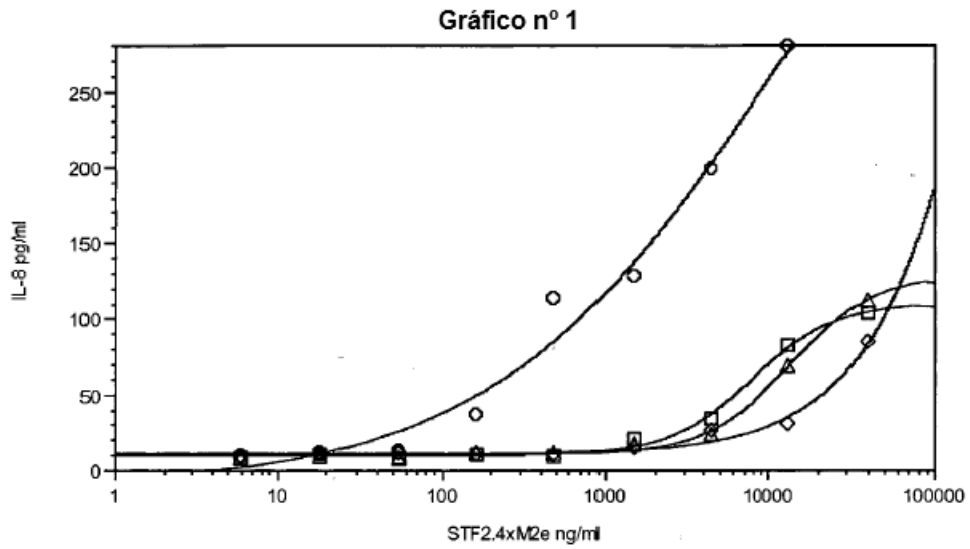
Figura 1





Opción de ajuste de curva- Valor de ponderación fijado: 1

**Figura 4**



Ajuste de 4P:  $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$ :

|   | A       | B     | C        | D        | R <sup>2</sup> |
|---|---------|-------|----------|----------|----------------|
| ○ Gráf. nº 1 (REF STF24xM2e @ exp. nº 1: dilución frente a  | -11,075 | 0,501 | 10458,24 | 530,647  | 0,982          |
| □ Gráf. nº 2 (Mal 1-2 sobren @ exp. nº 1: dilución frente a | 9,743   | 1,712 | 8003,096 | 110,268  | 0,996          |
| △ Gráf. nº 3 (SH 1-2 sobren @ exp. nº 1: dilución frente a  | 10,11   | 1,703 | 13620,02 | 128,77   | 0,997          |
| ◇ Gráf. nº 4 (Mal 1-1 sobren @ exp. nº 1: dilución frente a | 10,599  | 1,047 | 5,86e5   | 1302,212 | 0,983          |

Opción de ajuste de curva- Valor de ponderación fijado: 1

**Figura 5**

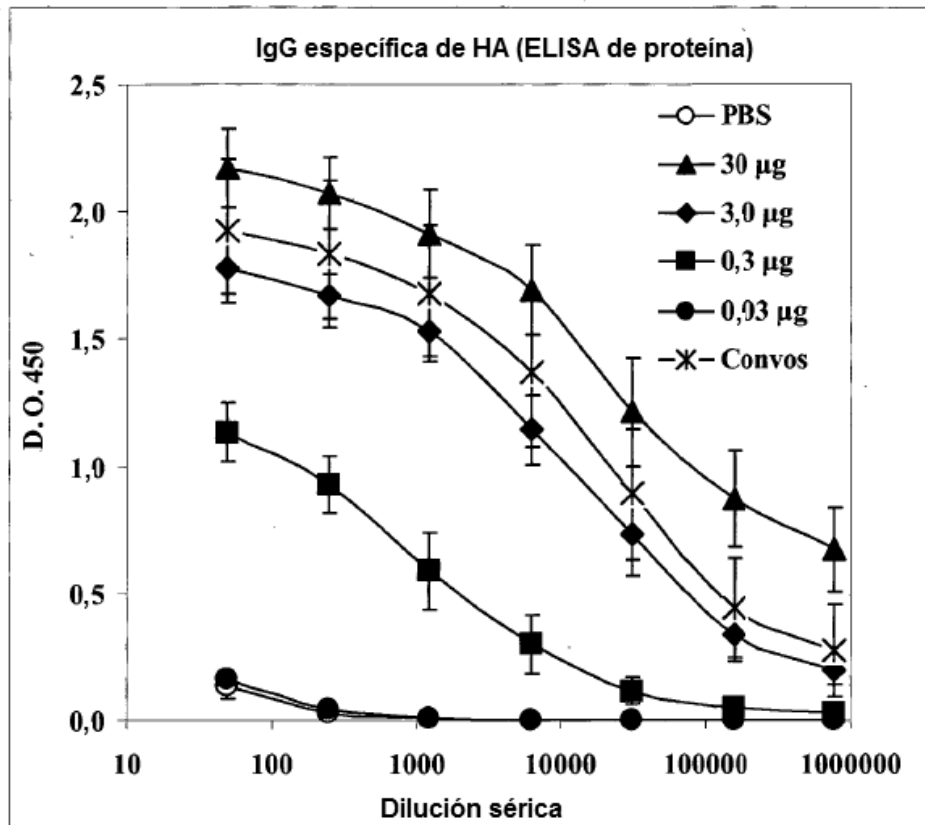


Figura 6

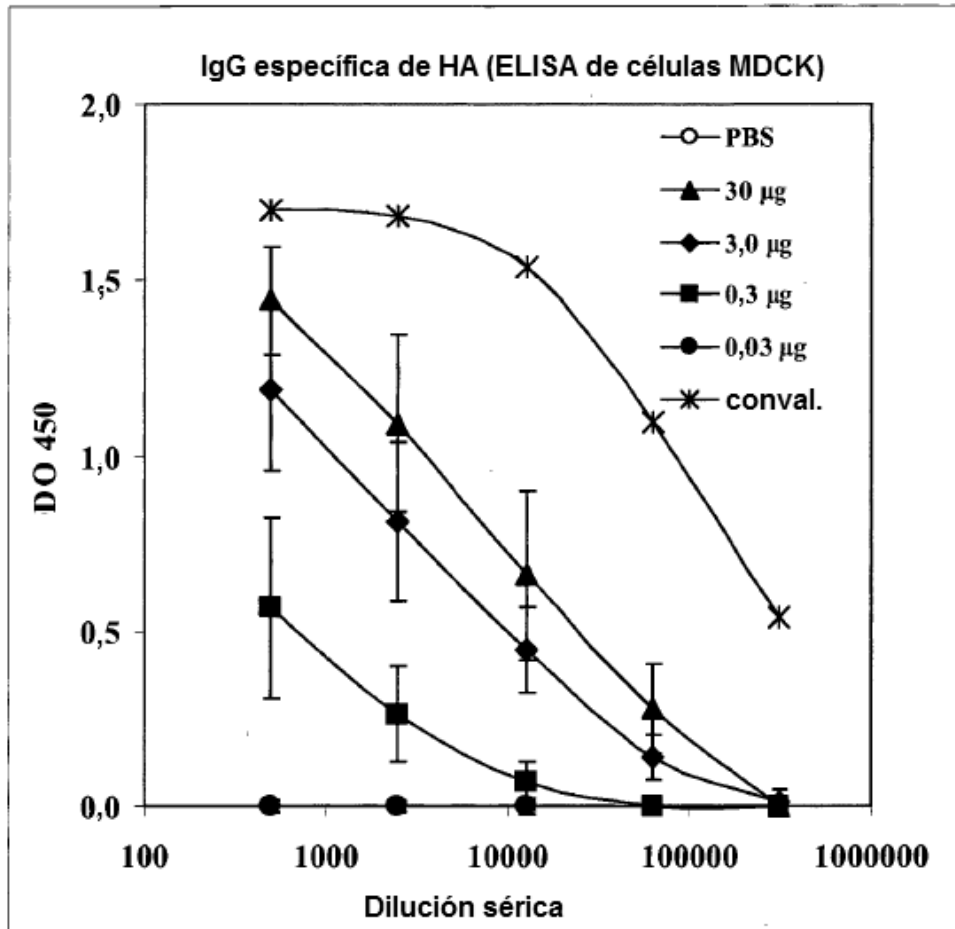


Figura 7

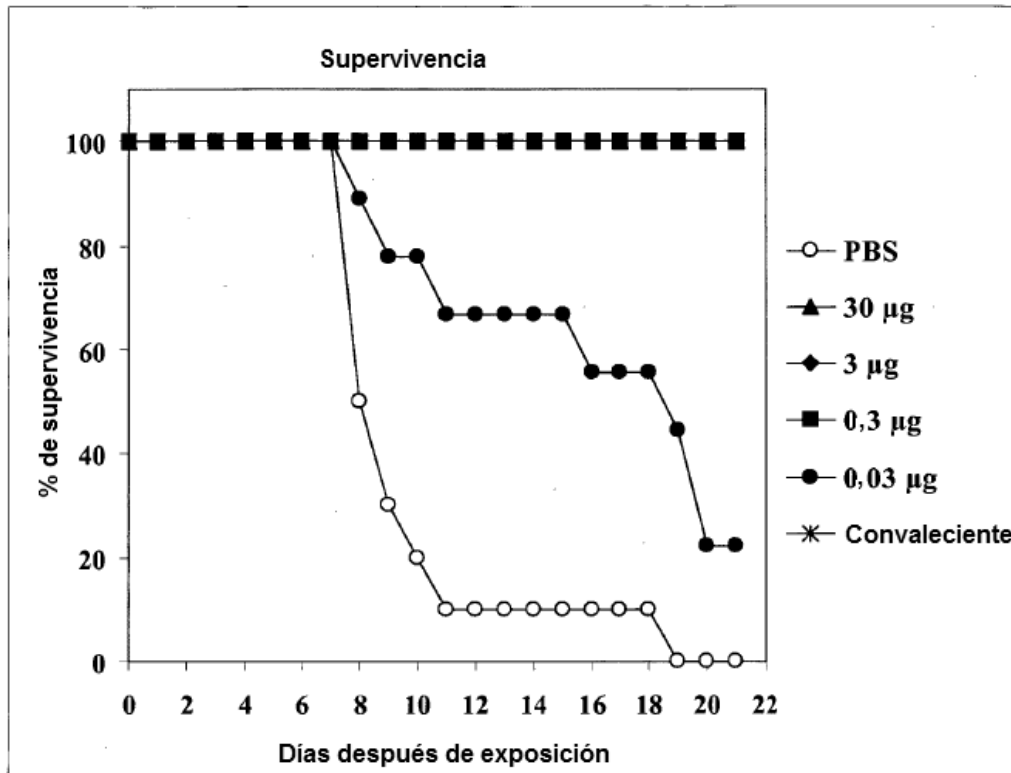


Figura 8A

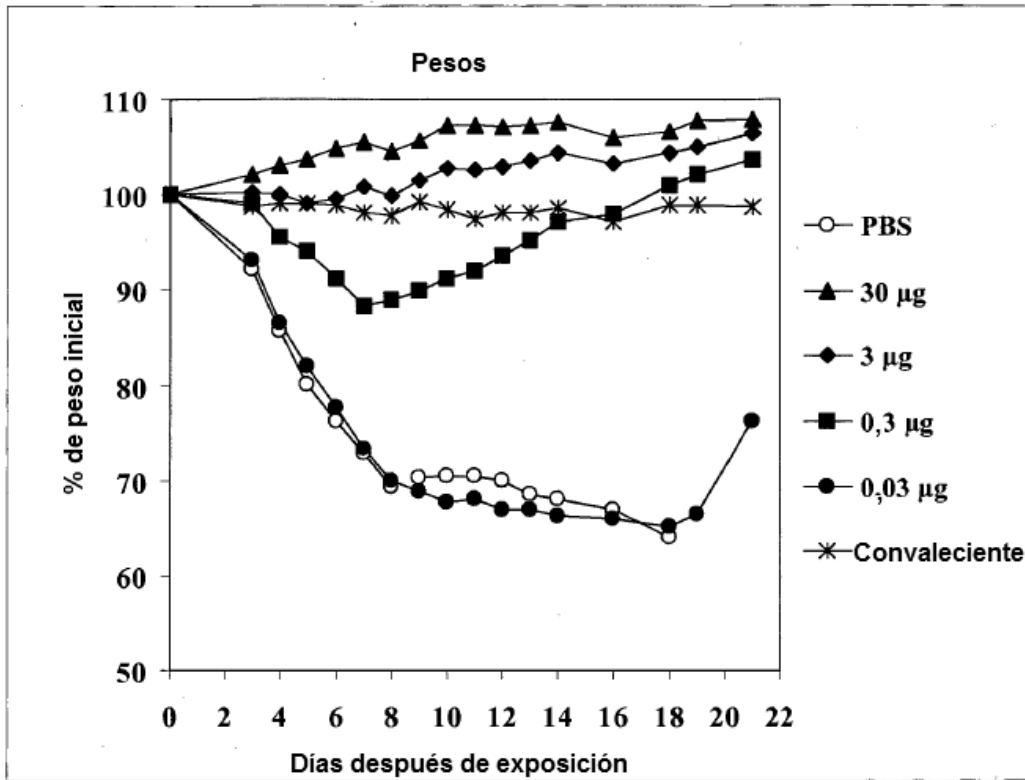


Figura 8B



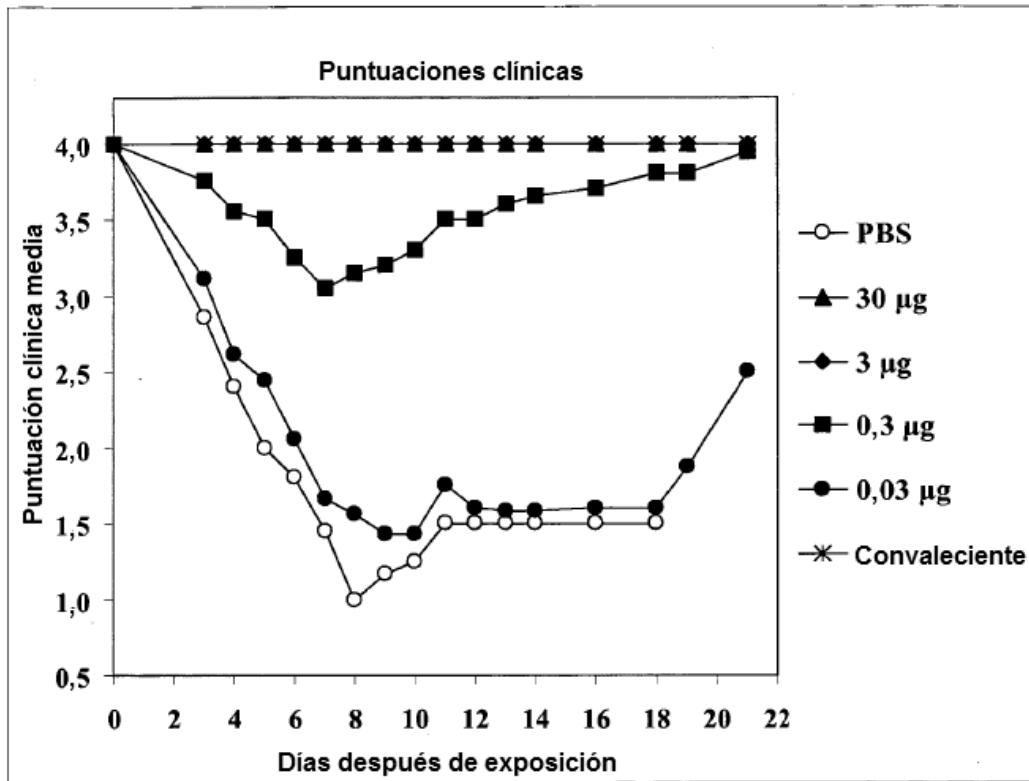


Figura 8C

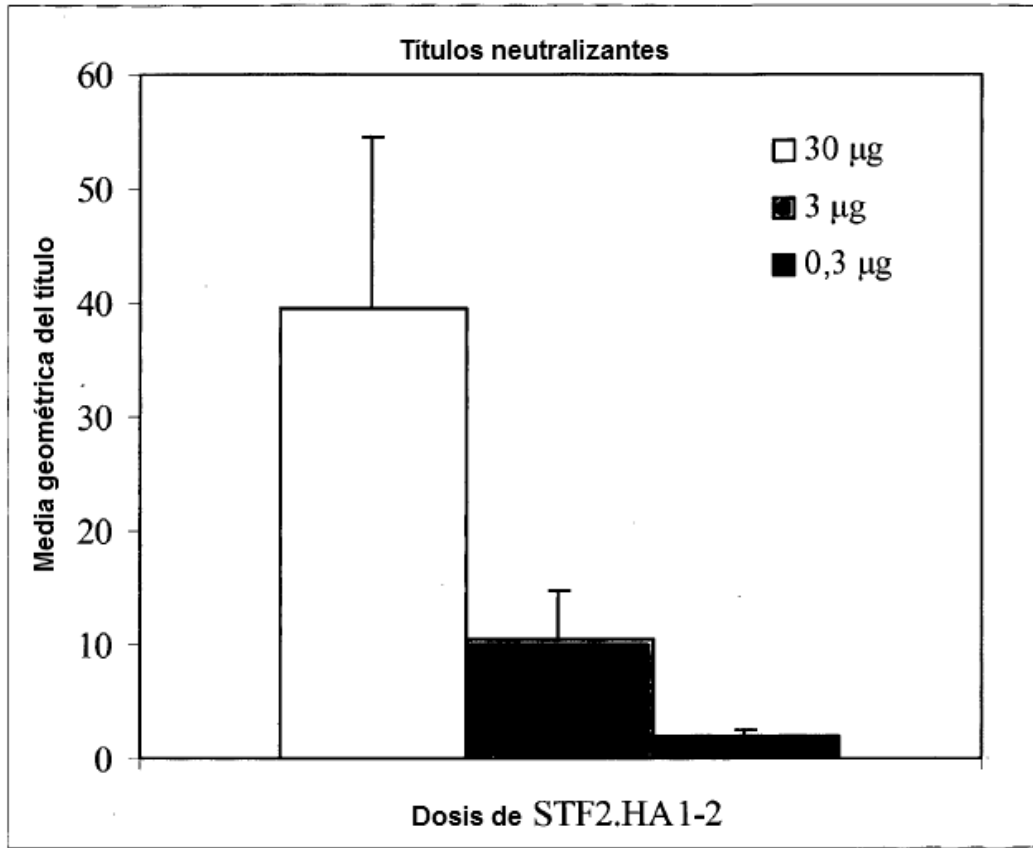


Figura 9

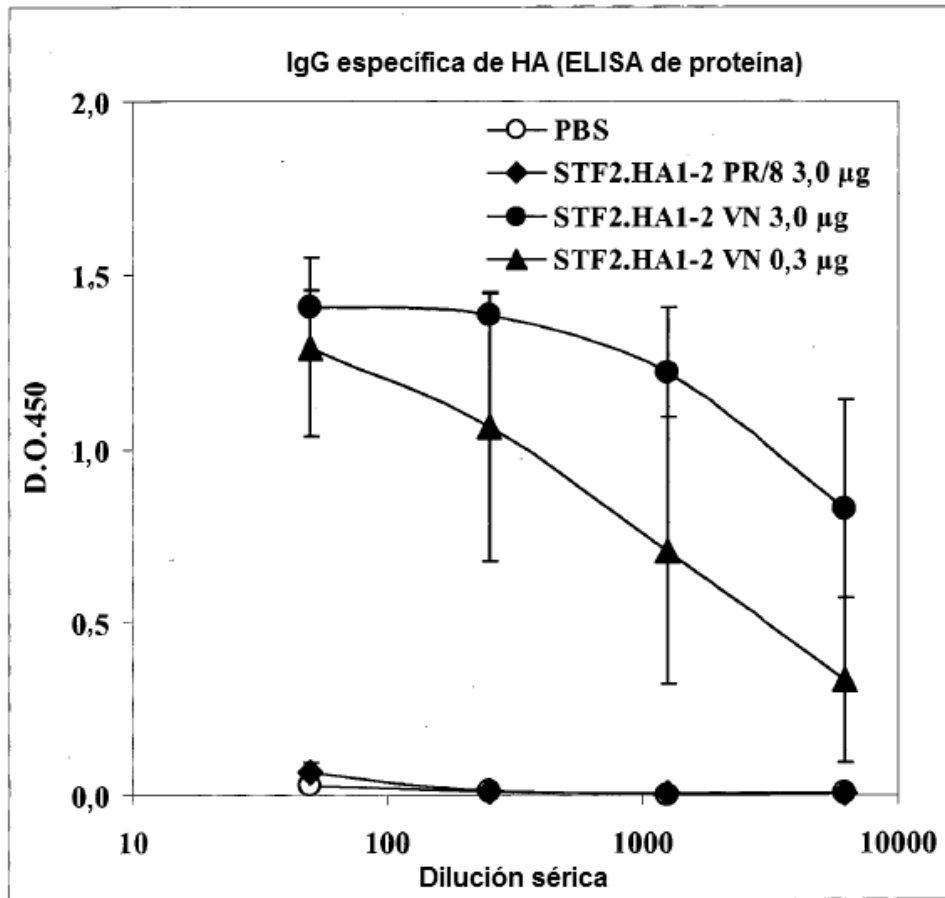


Figura 10A

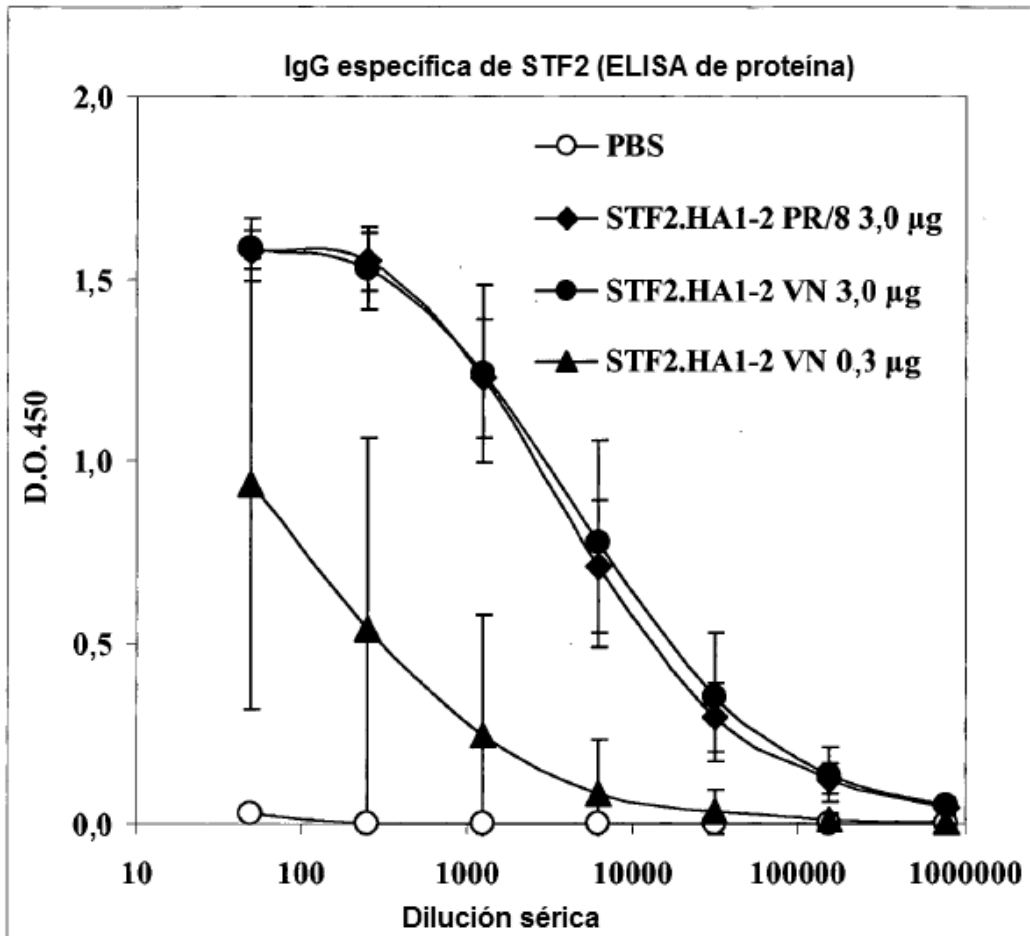


Figura 10B

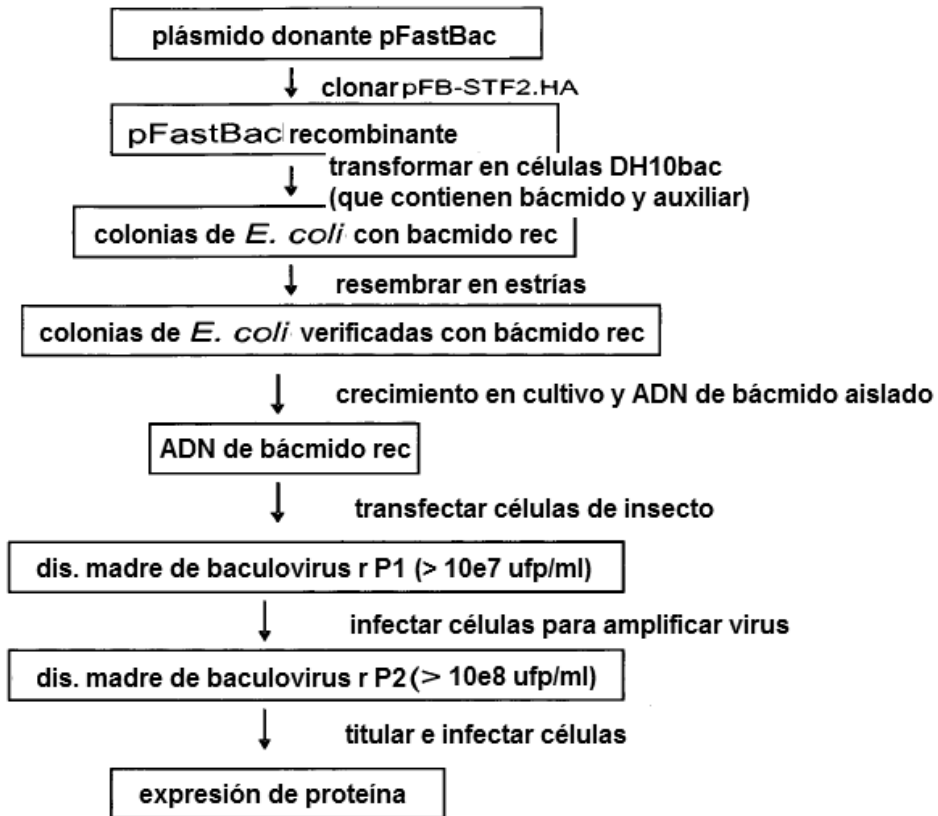


Figura 11

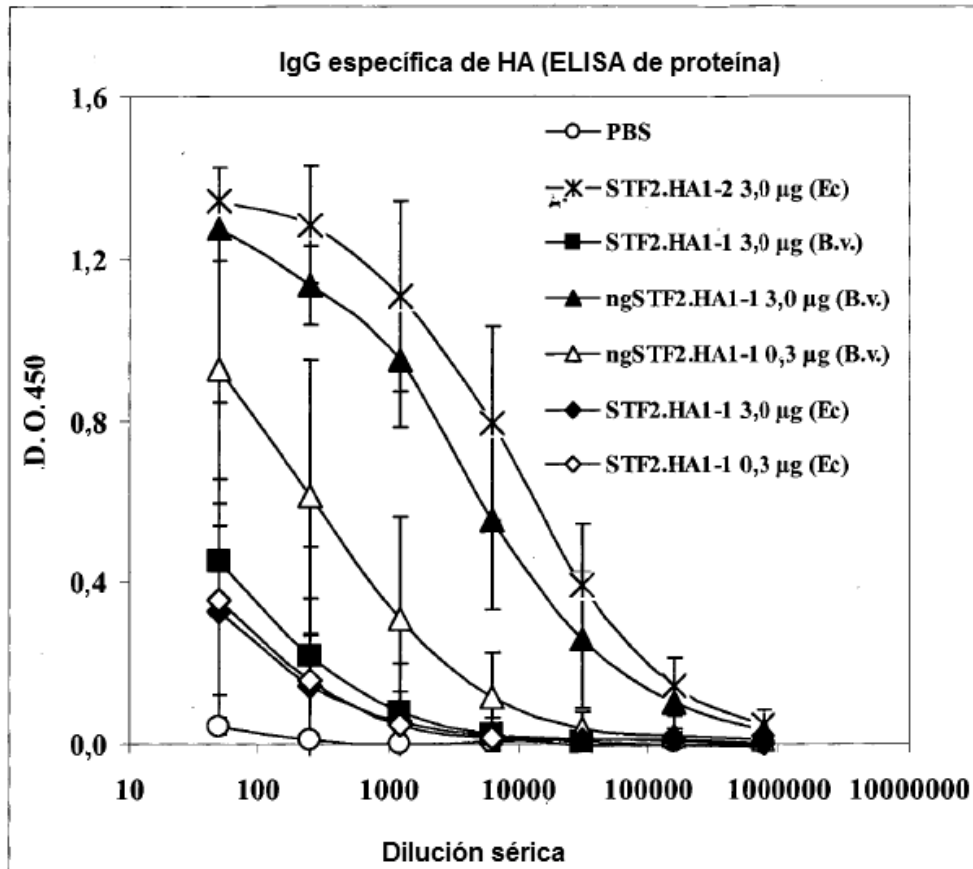


Figura 12A

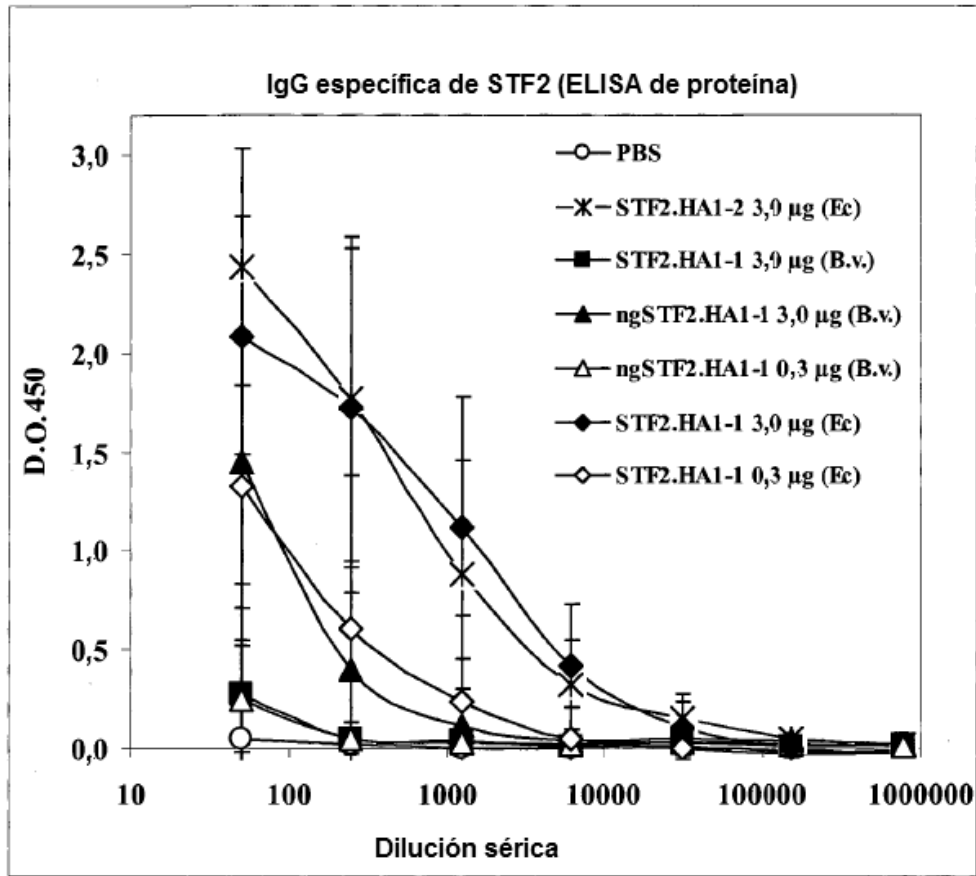


Figura 12B

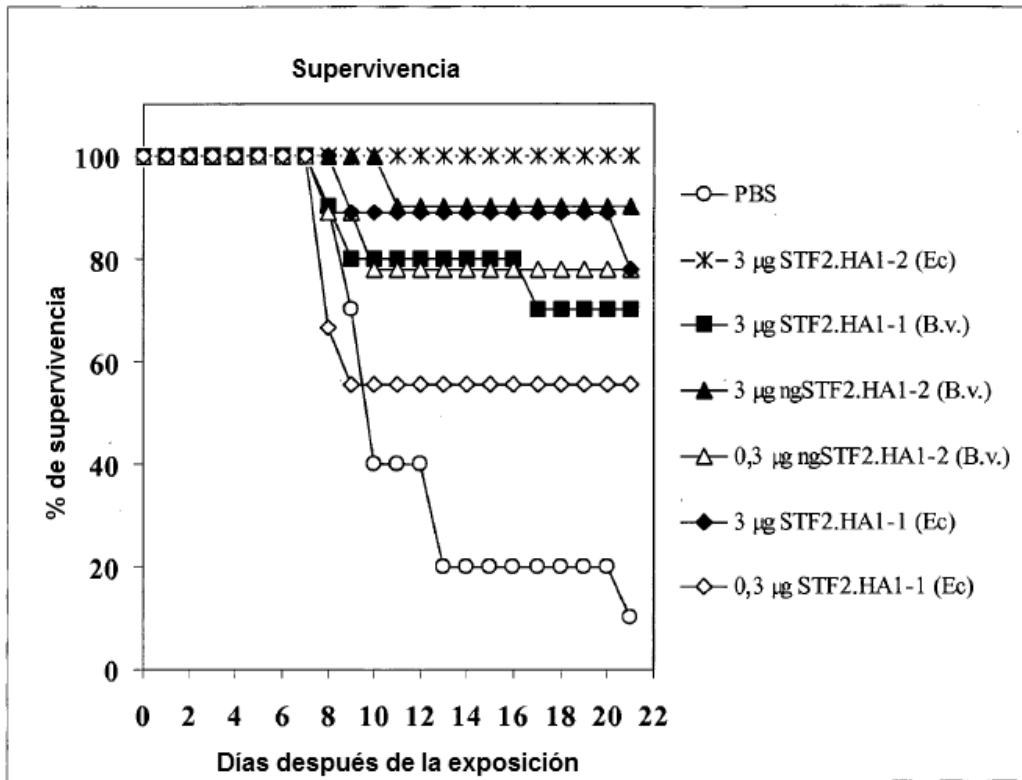


Figura 13A



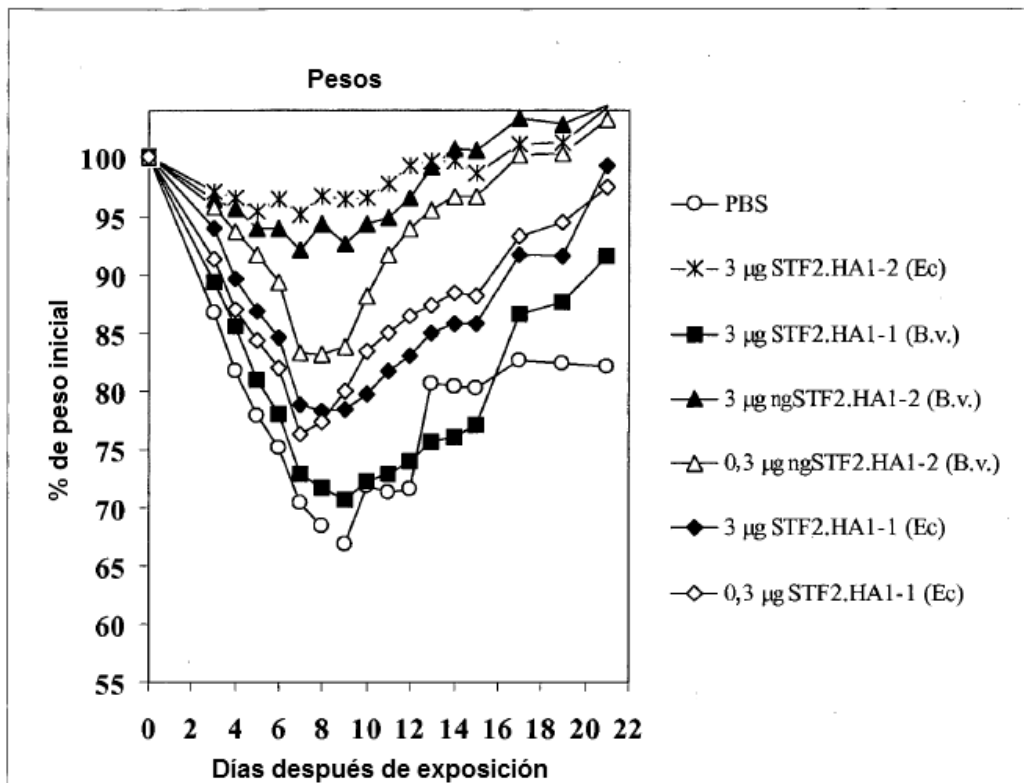


Figura 13B

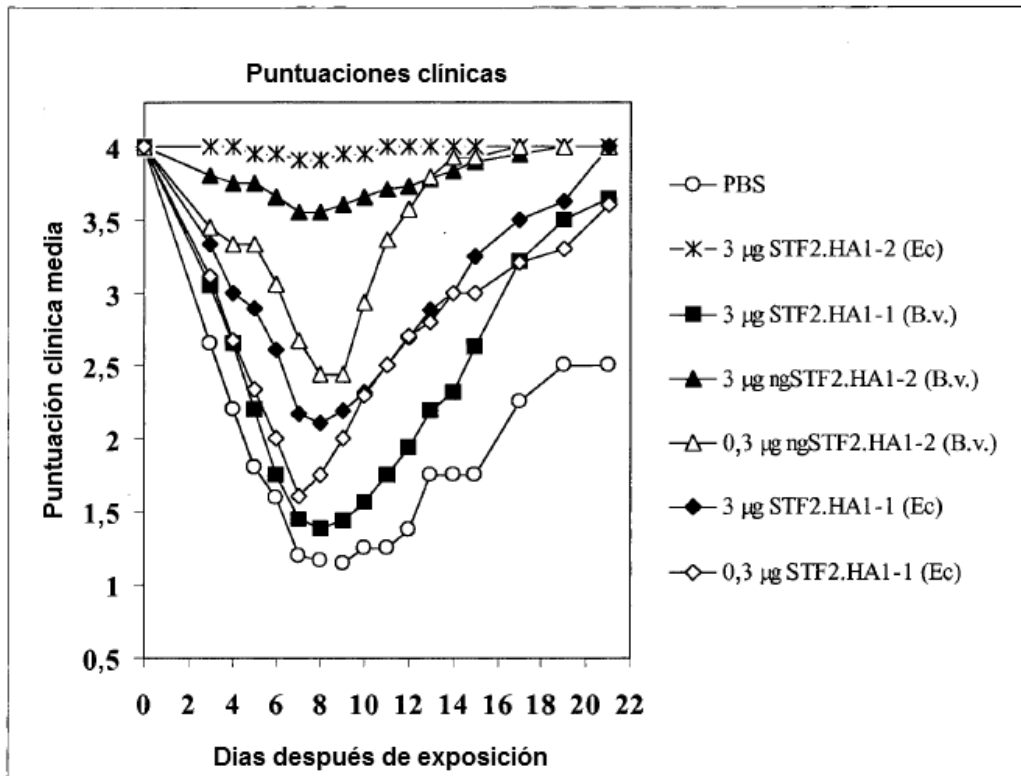


Figura 13C

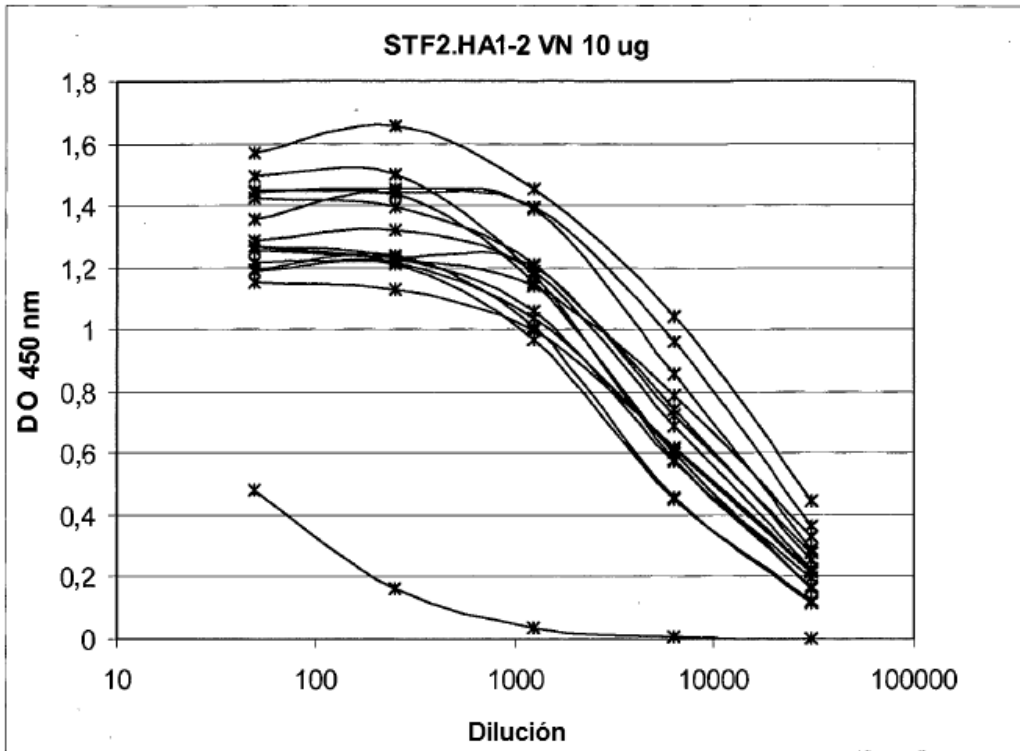


Figura 14

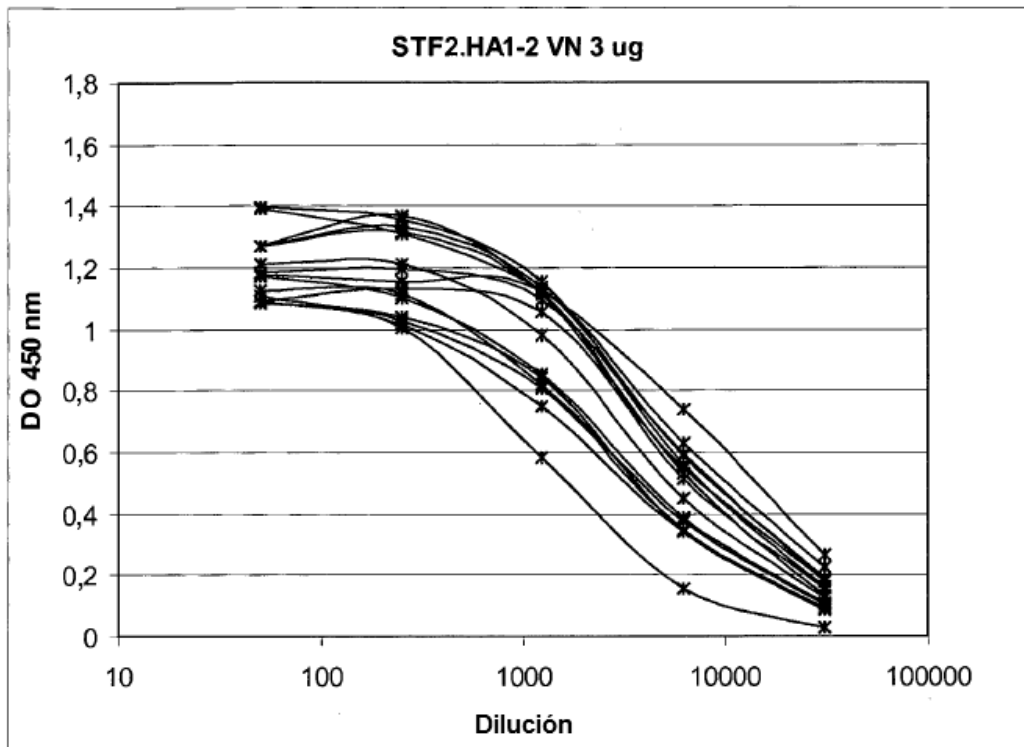


Figura 15

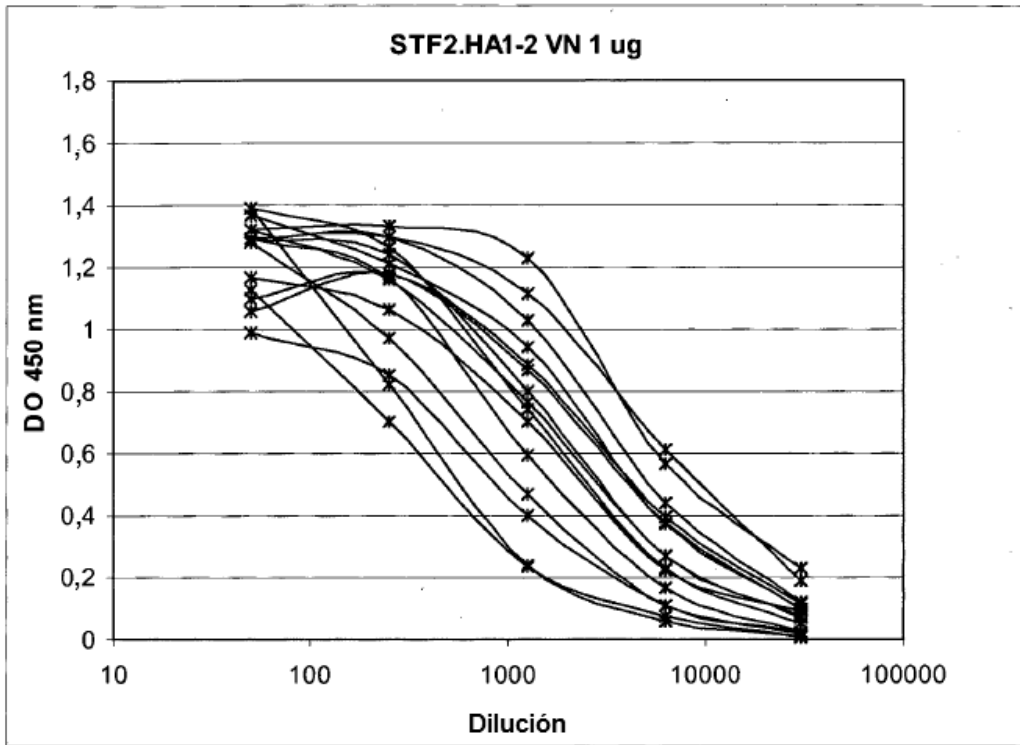


Figura 16

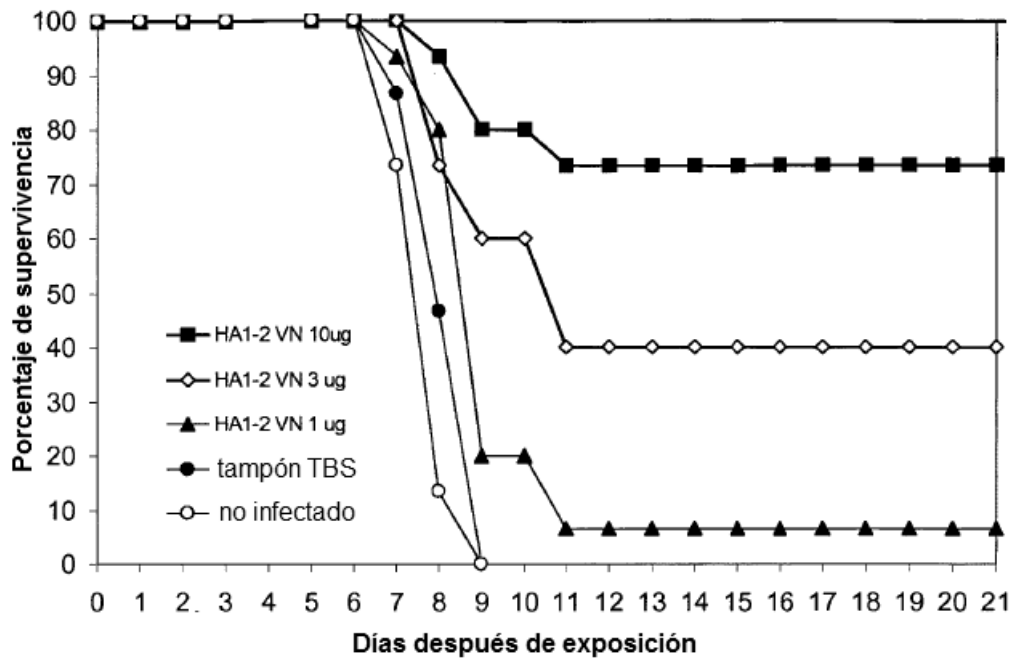


Figura 17

MAQVINTNSLSLLTQNNLN~~KSQSALGTAIERLSSGLRINSA~~DDAAGQAIANRFTANI~~KG~~  
LQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNNEORVRELAVOSANSTNSOSDLDSTFOAENITFORL  
NEIDRVSGOTQFNGV~~KVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDL~~QINSQTLGLDSLNVQ~~KAYD~~  
V~~K~~DTAVTT~~K~~AYANNGTTL~~DV~~SGLDDAAI~~K~~AATGGTNGTASVTGGAV~~K~~FDADNN~~K~~YFVTIG  
GFTGADAA~~K~~NGDYEVNVATDGTVT~~LAAGAT~~K~~T~~MPAGATT~~K~~TEVQEL~~K~~DTPAVVSADA~~K~~N  
ALIAGGVDATDANGAELV~~K~~MSYTD~~K~~NG~~K~~TIEGGYAL~~K~~AGD~~K~~YYAADYDEATGAI~~K~~K~~K~~TTS  
YTAADGTT~~K~~TAANQLGGVDG~~K~~TEVVTIDG~~K~~TYNAS~~K~~AAGHDF~~K~~QPELAEAAA~~K~~TENPL  
Q~~K~~TDAAFAQVDALRSDEGAVONRENSALTN~~I~~GN~~T~~VNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRA  
QILQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR

Figura 18

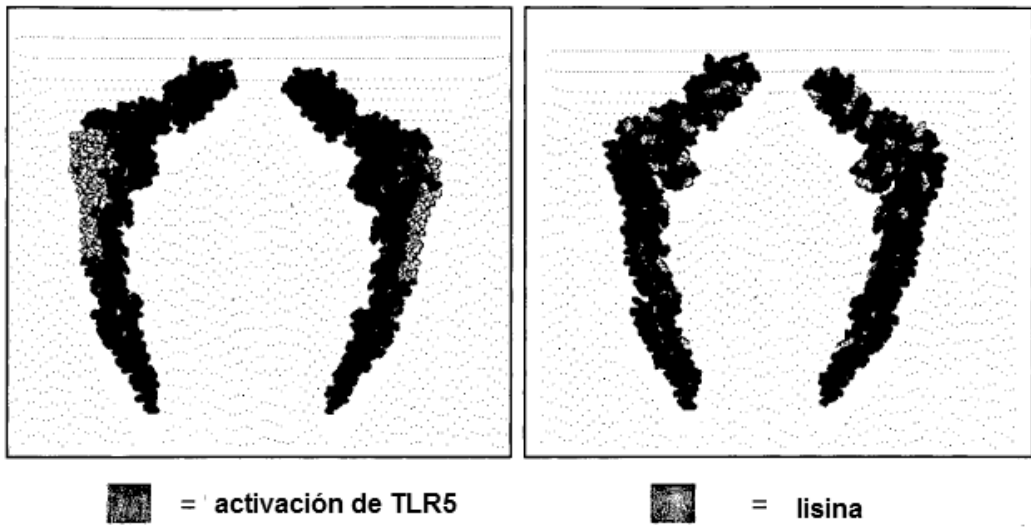
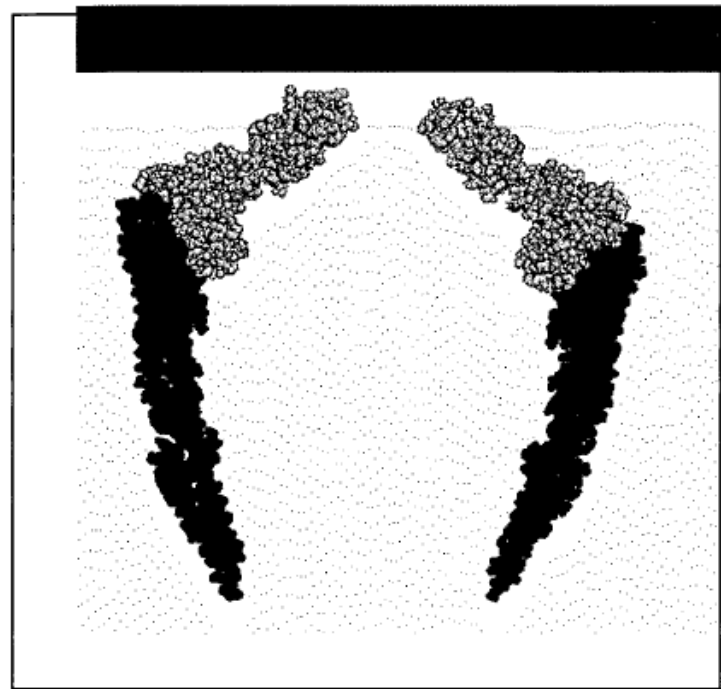


Figura 19





■ = constructo STF2Δ

Figura 20

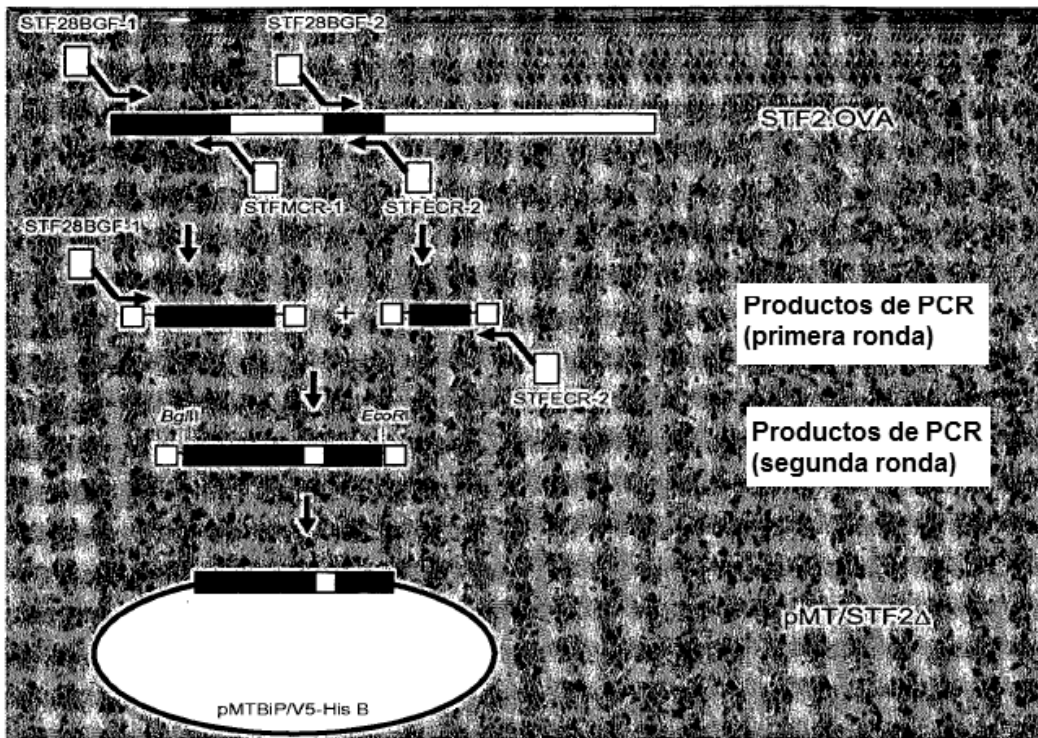


Figura 21

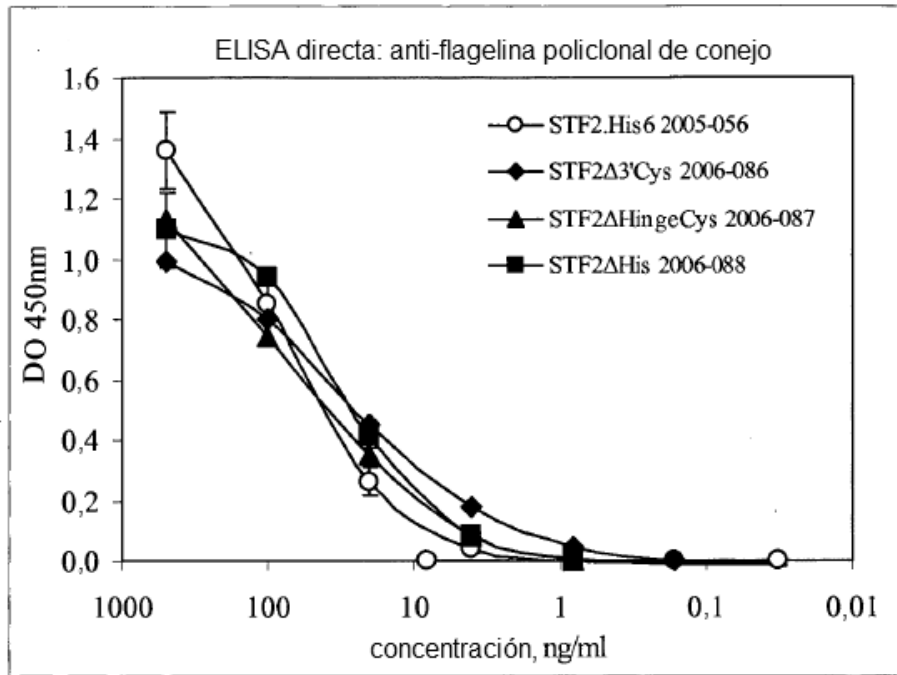


Figura 22

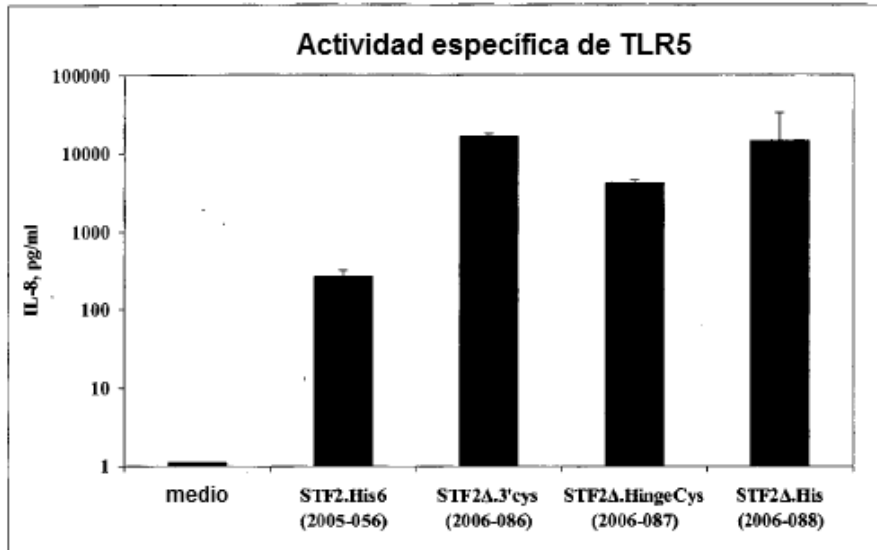


Figura 23

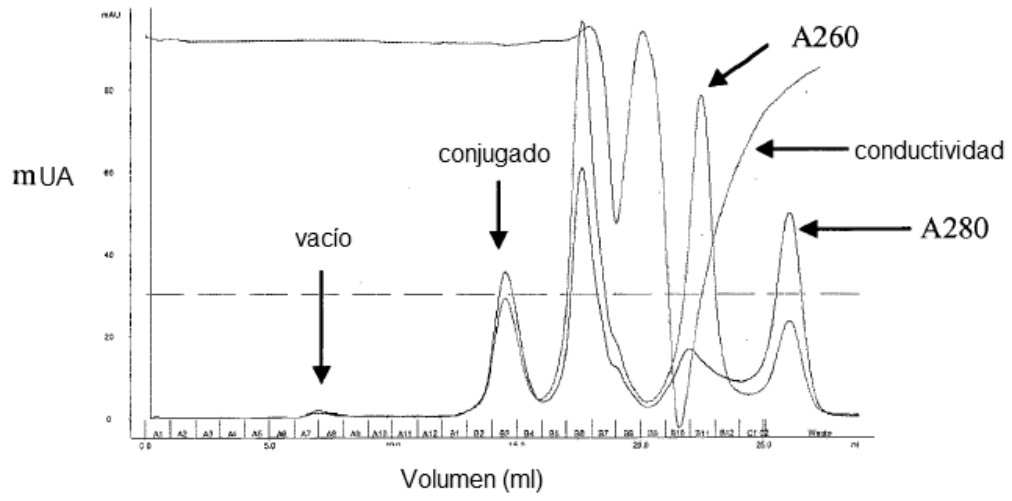


Figura 24

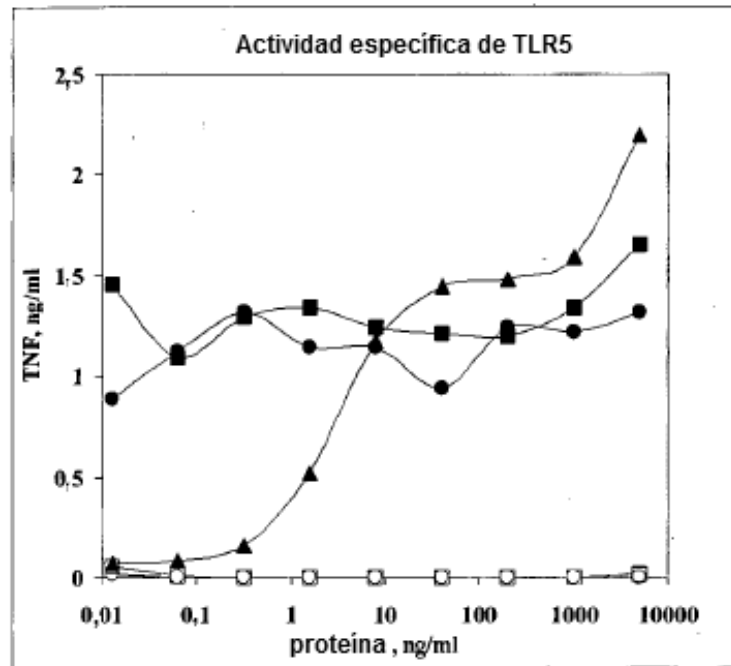


Figura 25

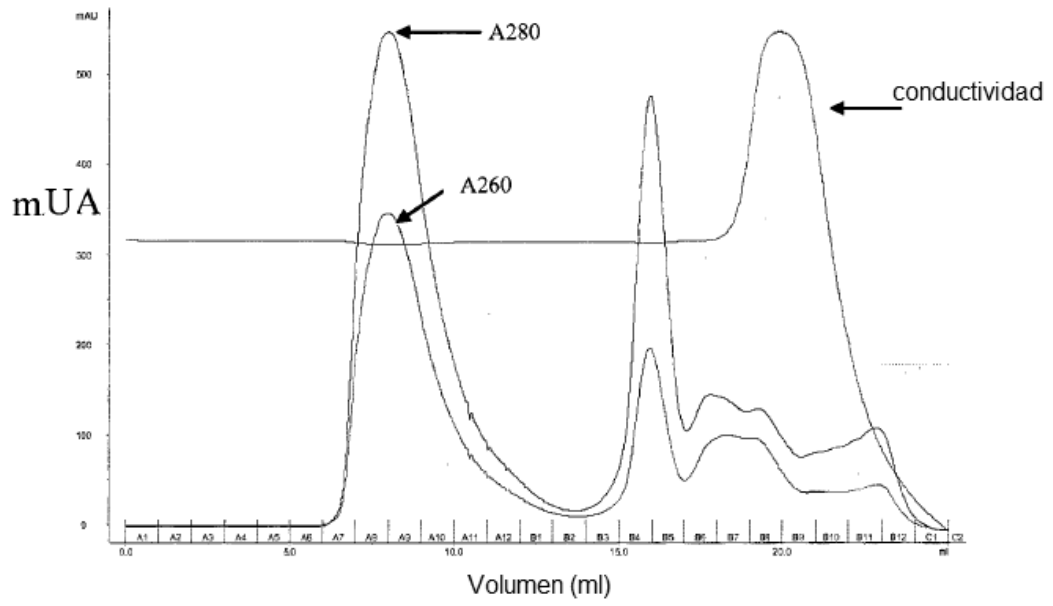


Figura 26

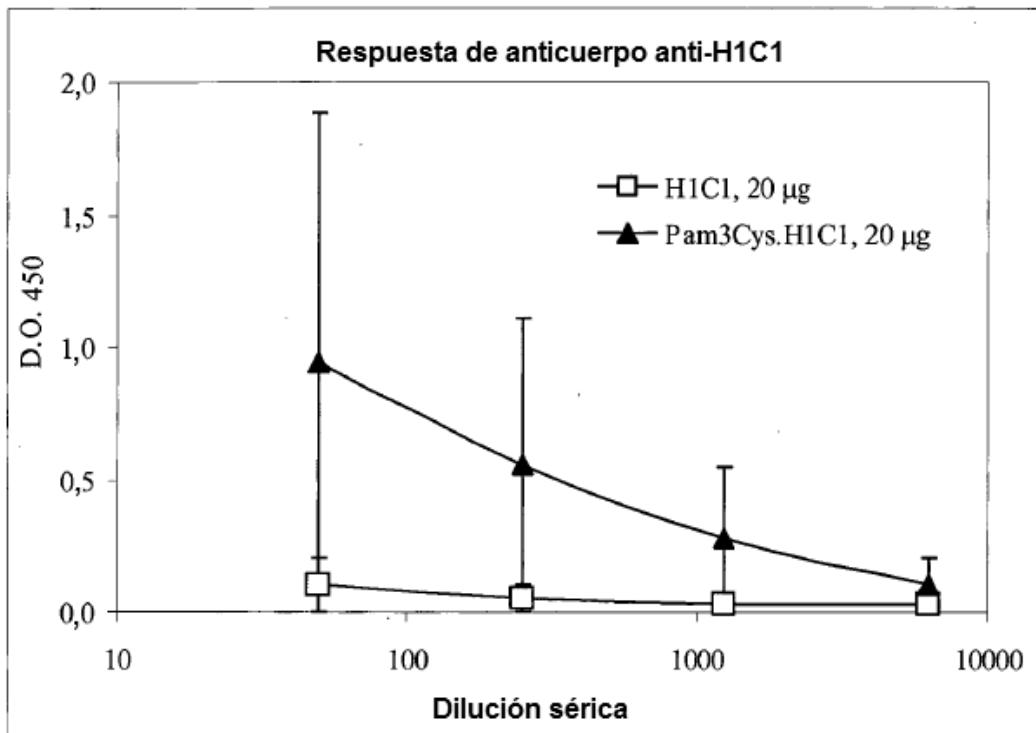


Figura 27



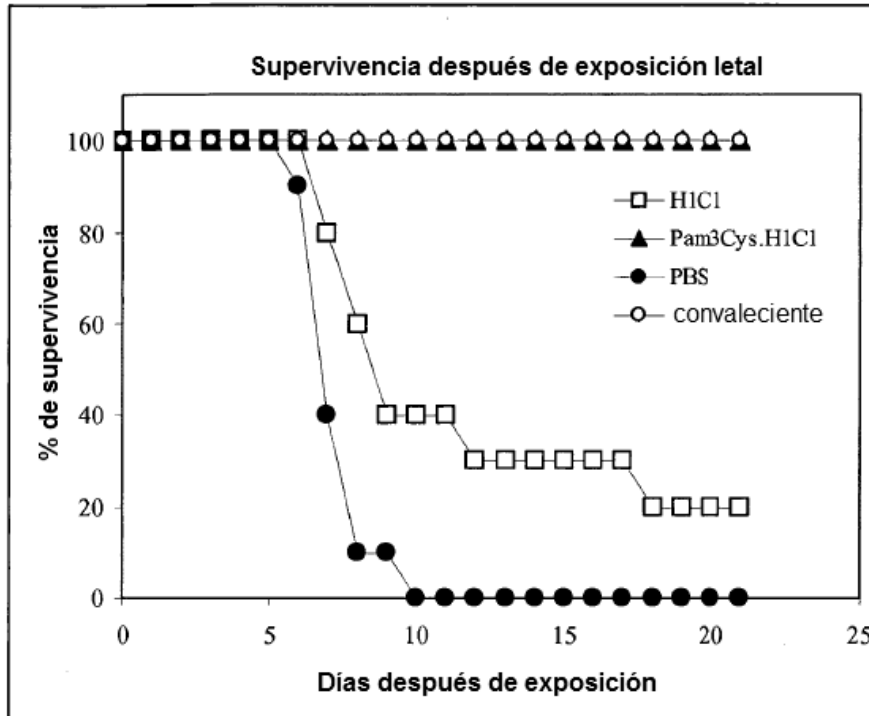


Figura 28

SEQ ID NO: 498 Secuencia aminoacídica de fljB/STF2 (región de bisagra subrayada)

MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTANIKG  
LTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQS~~DLDSIQAEITQRL~~  
NEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLDSLNVQKAYD  
VKDTAVTTKAYANNGTTLDVSGLDAAIKAAATGGTNGTASVTGGAVKFDADNNKYFVTIG  
GFTGADAAKNGDYEVNVATDGTVTLAAGATKTTMPAGATTKTEVQELKDTPAVVSADAKN  
ALIAGGVDATDANGAELVKMSYTDKNGKTIEGGYALKAGDKYYAADYDEATGAIKAKTTS  
YTAADGTTKTAANQLGGVDGKTEVVTIDGKTYNASKAAGHDFKAQPELAEAAAKTTENPL  
QKIDAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRA  
QILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR

**Figura 29**

SEQ ID NO 499: Secuencia de ácido nucleico de fljB/STF2 (región de bisagra subrayada)

ATGGCACAAGTAATCAACACTAACAGTCTGTGCGTGCTGACCCAGAATAACCTGAACAAA  
 TCCCAGTCCGCACTGGGCACCGCTATCGAGCGTCTGTCTTCTGGTCTGCGTATCAACAGC  
 GCGAAAGACGATGCGGCAGGTCAGGCGATTGCTAACCGTTTCACCGCGAACATCAAAGGT  
 CTGACTCAGGCTTCCCGTAACGCTAACGACGGTATCTCCATTGCGCAGACCACTGAAGGC  
 GCGCTGAACGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTGCGTGAACCTGGCGGTTTCACTGTGCT  
 AACAGCACCAACTCCCAGTCTGACCTCGACTCCATCCAGGCTGAAATCACCCAGCGCCTG  
 AACGAAATCGACCGTGTATCCGGCCAGACTCAGTTCAACGGCGTGAAAGTCTGGCGCAG  
 GACAACACCCTGACCATCCAGGTTGGCGCCAACGACGGTGAAACTATCGATATCGATCTG  
 AAGCAGATCAACTCTCAGACCCCTGGGTCTGGACTCACTGAACGTGCAGAAAGCGTATGAT  
GTGAAAGATACAGCAGTAACAACGAAAGCTTATGCCAATAATGGTACTACACTGGATGTA  
TCCGGTCTTGATGATGCAGCTATTAAGCGGCTACGGGTGGTACGAATGGTACGGCTTCT  
GTAACCGGTGGTGCAGTAAATTTGACGCAGATAATAACAAGTACTTTGTTACTATGGT  
GGCTTTACTGGTGCTGATGCCGCCAAAAATGGCGATTATGAAGTTAACGTTGCTACTGAC  
GGTACAGTAACCCTTGCGGCTGGCGCAACTAAAACCACAATGCCTGCTGGTGGCACAAC  
AAAACAGAAGTACAGGAGTAAAAGATACACCGGCAGTTGTTTCAGCAGATGCTAAAAAT  
GCCTTAATTGCTGGCGGCGTTGACGCTACCGATGCTAATGGCGCTGAGTTGGTCAAAATG  
TCTTATACCGATAAAAAATGGTAAGACAATTGAAGGCGTTATGCGCTTAAAGCTGGCGAT  
AAGTATTACGCCGAGATTACGATGAAGCGACAGGAGCAATTAAAGCTAAAACACTACAAGT  
TATACTGCTGCTGACGGCACTACCAAAACAGCGGCTAACCAACTGGGTGGCGTAGACGGT  
AAAACCGAAGTCGTTACTATCGACGGTAAAACCTACAATGCCAGCAAAGCCGCTGGTCAT  
GATTTCAAAGCACAAACCAGAGCTGGCGGAAGCAGCCGCTAAAACCACCGAAAACCCGCTG  
 CAGAAAATTGATGCCGCGCTGGCGCAGGTGGATGCGCTGCGCTCTGATCTGGGTGCGGTA  
 CAAAACCGTTTTCAACTCTGCTATACCAACCTGGGCAATACCGTAAACAATCTGTCTGAA  
 GCGCGTAGCCGTATCGAAGATCCGACTACGCGACCGAAGTTTCCAACATGTCTCGCGCG  
 CAGATTCTGCAGCAGGCCGCTACTTCCGTTCTGGCGCAGGCTAACCGGTTCCGCAGAAC  
 GTGCTGTCTCTGTTACGT

**Figura 30**

## ES 2 534 332 T3

SEQ ID NO: 502. Secuencia aminoacídica de fliC de *E. coli* (region de bisagra subrayada)

MAQVINTNSLSLITQNNINKNQSALSSSIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTSNIKG  
LTQAARNANDGISVAQTTEGALSEINNNLQRIRELTVQASTGTNSDSDLDSIQDEIKSRL  
DEIDRVSGQTQFNGVNVLAKDGSMKIQVGANDGQITITIDLKKIDSDTLGLNGFNVNGSGT  
IANKAATISDLTAAKMDAATNTITTTNNALTASKALDQLKDGDTVTIKADAAQTATVYTY  
NASAGNFSLSNVSNNNTSEKAGDVAASLLPPAGQTASGVYKAASGEVNFVDVANGKITIGG  
QKAYLTS DGNLTTNDAGGATAATLDGLFKKAGDQSIGFKKTASVTMGGTTYNFKTGADA  
DAATANAGVSFTDTASKETVLNKVATAKQKAAAADGDTSATITYKSGVQTYQAVFAAGD  
GTASAKYADKADVSNATATYTDADGEMTTIGSYTTKYSIDANNGKVTVDVSGTGTGKYAPK  
VGAEVVVSANGTLTTDATSEGTVTKDPLKALDEAISSIDKFRSSLGAIQNRLDSAVTNLN  
NTTTNLSEAQSRIQDADYATEVSNMSKAQIIQQAGNSVLAKANQVPQOVLSLLQG

**Figura 31**

SEQ ID NO: 503. Secuencia de ácido nucleico de fliC de *E. coli* (region de bisagra subrayada)

ATGGCACAAAGTCATTAATACCAACAGCCTCTCGCTGATCACTCAAAAATAATATCAACAAG  
AACCAGTCTGCGCTGTGAGTCTATCGAGCGTCTGTCTTCTGCTTGCATTAACAGC  
GCCAAGGATGACGCCGAGGTCAGGCGATTGCTAACCGTTTTACTTCTAACATTAAGGC  
CTGACTCAGGCTGCACGTAACGCCAACGACGGTATTTCCGTTGCGCAGACCACCGAAGGC  
GCGCTGTCCGAAATCAACAACAACCTTACAGCGTATCCGTGAACTGACGGTTCAGGCTTCT  
ACCGGGACTAACTCCGATTCAGATCTGGACTCCATTCAGGACGAAATCAAATCCCGTCTG  
GACGAAATTGACCGGTATCTGGCCAGACCCAGTTCAACGGCGTGAACGTACTGGCGAAA  
GACGGTTCAATGAAAATTCAGGTTGGTGCGAATGACGGCCAGACTATCACGATTGATCTG  
AAGAAAATTGACTCAGATACGCTGGGGCTGAATGGTTTTAACGTGAATGGTTCGGTACG  
ATAGCCAATAAAGCGGCGACCATTAGCGACCTGACAGCAGCGAAAATGGATGCTGCAACT  
AATACTATAACTACAACAAAATAATGCGCTGACTGCATCAAAGCGCTTGATCAACTGAAA  
GATGGTGACACTGTTACTATCAAAGCAGATGCTGCTCAAAGTCCACGGTTTATACATAC  
AATGCATCAGCTGGTAACTTCTCACTCAGTAATGTATCGAATAATACTTCAGAAAAAGCA  
GGTGATGTAGCAGCTAGCCTTCTCCCGCCGGCTGGGCAAAGTCTAGTGGTGTATATAAA  
GCAGCAAGCGGTGAAGTGAACCTTTGATGTTGATGCGAATGGTAAAATCACAATCGGAGGA  
CAGAAAGCATATTTAACTAGTGATGGTAACTTAACTACAAACGATGCTGGTGGTGCAGT  
GCGGCTACGCTTGATGGTTTTATCAAGAAAGCTGGTGATGGTCAATCAATCGGGTTAAG  
AAGACTGCATCAGTCACGATGGGGGGAACAACCTTATAACTTTAAAACGGGTGCTGATGCT  
GATGCTGCAACTGCTAACGCAGGGGTATCGTTCACTGATACAGCTAGCAAAGAAACCGTT  
TTAAATAAAGTGGCTACAGCTAAACAAGGCAAAGCAGCTGCAGCTGACGGTGATACATCC  
GCAACAATTACCTATAAATCTGGCGTTCAGACGTATCAGGCTGTATTTGCCCGAGGTGAC  
GGTACTGCTAGCGCAAAAATATGCCGATAAAGCTGACGTTTCTAATGCAACAGCAACATAC  
ACTGATGCTGATGGTGAATGACTACAATTGGTTCATACACCACGAAGTATTCATCGAT  
GCTAACAACGGCAAGGTAACCTGTTGATTCTGGAAGTGGTACGGGTAATATGCCCGAAA  
GTAGGGGCTGAAGTATATGTTAGTGCTAATGGTACTTTAACAACAGATGCAACTAGCGAA  
GGCACAGTAACAAAAGATCCACTGAAAGCTCTGGATGAAGCTATCAGCTCCATCGACAAA  
TTCCGTTCTTCCCTGGGTGCTATCCAGAACCCTGCTGGATTCCCGAGTCACCAACCTGAAC  
AACACCACTACCAACCTGTCCGAAGCGCAGTCCCGTATTTCAGGACGCCGACTATGCCGACC  
GAAGTGTCCAACATGTCCGAAAGCGCAGATCATTTCAGCAGGCCGGTAACTCCGTGCTGGCA  
AAAGCCAACCAGGTACCCGAGCAGGTTCTGTCTCTGCTGCAGGGTTAG

**Figura 32**

SEQ ID NO: 504. Secuencia aminoacídica de flagelina fliC de *Salmonella muenchen* (región de bisagra subrayada)

MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTANIKGLT  
 QASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANGTNSQSDLDSIQAEITQRLNEID  
 RVSGQTQFNGVKVLAQDNLTLIQVGANDGETIDIDLKEISSKTLGLDKLNVQDAYTPKETAV  
 TVDKTTYKNGTDTITTAQSNTDIQTAIGGGATGVTGADIKFKDGGYYLDVKGGASAGVYKATY  
 DETTKKVNIDTTDKTPLATAEATAIRGTATI THNQIAEVTKEGVDTTTVAAQLAAAGVTGAD  
 KDNTSLVKLSFEDKNGKVIDGGYAVKMGDDFYAATYDEKTGTITAKTTYTDGAGVAQTGAV  
 KFGGANGKSEVVTATDGKTYLASDLKHNFRGTGELKEVNTDKTENPLQKIDAALAQVDTLR  
 SDLGAVQNRNFNSAITNLGNTVNNLSSARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQ  
 VPQNVLSLLR

**Figura 33**

SEQ ID NO: 505. Secuencia de ácido nucleico de flagelina fliC de *Salmonella muenchen* (región de bisagra subrayada)

AATGGCACAAAGTCATTAATACAAACAGCCTGTGCGCTGTTGACCCAGAATAACCTGAACAAAT  
 CCCAGTCCGCTCTGGGCACCGCTATCGAGCGTCTGTCTTCCGGTCTGCGTATCAACAGCGCG  
 AAAGACGATGCGGCAGGTCAGGCGATTGCTAACCGTTTCACCGCGAACATCAAAGGTCTGAC  
 TCAGGCTTCCCGTAACGCTAACGACGGTATCTCCATTTGCGCAGACCACTGAAGGCGCGCTGA  
 ACGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTGCGTGAACCTGGCGGTTTCAGTCTGCTAACGGTACT  
 AACTCCCAGTCTGACCTTGACTCTATCCAGGCTGAAATCACCCAGCGTCTGAACGAAATCGA  
 CCGTGTATCCGGTCAGACTCAGTTC AACGGCGTGAAGTCCCTGGCGCAGGACAACACCCCTGA  
 CCATCCAGGTTGGTGCCAACGACGGTGAAACTATTGATATTGATTTAAAAGAAATTAGCTCT  
 AAAACACTGGGACTTGATAAGCTTAATGTCCAGGATGCCCTACACCCGAAAGAAACTGCTGT  
 AACCGTTGATAAAACTACCTATAAAAAATGGTACAGATACTATTACAGCCAGAGCAATACTG  
 ATATCCAAACTGCAATTGGCGGTGGTGCAACGGGGTTACTGGGGCTGATATCAAATTTAAA  
 GATGGTCAATACTATTTAGATGTTAAAGGCGGTGCTTCTGCTGGTGTATAAAAGCCACTTA  
 TGATGAAACTACAAAGAAAGTTAATATTGATACGACTGATAAAACTCCGTTAGCAACTGCGG  
 AAGCTACAGCTATTCGGGGAACGGCCACTATAACCCACAACCAAATTTGCTGAAGTAACAAAA  
 GAGGGTGTGATACGACCACAGTTGCGGCTCAACTTGCTGCTGCAGGGGTTACTGGTGCCGA  
 TAAGGACAATACTAGCCTTGTAATACTATCGTTCGAGGATAAAAACGGTAAGGTTATTGATG  
 GTGGCTATGCAGTGAATAAGGGCGACGATTTCTATGCCGCTACATATGATGAGAAAACAGGT  
 ACAATTACTGCTAAAACAACCACTTATACAGATGGTGTGCGGTTGCTCAAACCTGGAGCTGT  
 GAAATTTGGTGGCGCAAATGGTAAATCTGAAGTTGTTACTGCTACCGATGGTAAAACCTTACT  
 TAGCAAGCGACCTTGACAAACATAACTTCAGAACAGGCGGTGAGCTTAAAGAGGTTAATACA  
 GATAAGACTGAAAACCCACTGCAGAAAATGATGCTGCCTTGGCACAGGTTGATACACTTCG  
 TTCTGACCTGGGTGCGGTACAGAACCGTTTCAACTCCGCTATCACCACCTGGGCAATACCG  
 TAAATAACCTGTCTTCTGCCCCGTAGCCGTATCGAAGATTCCGACTACGCGACCGAAGTCTCC  
 AACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCTGGCGCAGGCTAACCA  
 GGTTCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA

**Figura 34**

SEQ ID NO: 506. Secuencia aminoacídica de pMT/STF2 (ligador subrayado)

**MKLCILLAVVAFVGLSLGRSA**QVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRI  
 NSAKDDAAGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQVRREL  
 AVQSANSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGAND  
 GETIDIDLKQINSQTLGLDLSLVQKAYDVKDTAVTTKAYANNGTTLDVSGLDAAIK  
 AATGGTNGTASVTGGAVKFDADNNKYFVTIGGFTGADAAKNGDYEVNVATDGTVTLA  
 AGATKTTMPAGATTKTEVQELKDTPAVVSADAKNALIAGGVDATDANGAELVKMSYT  
 DKNGKTIEGGYALKAGDKYYAADYDEATGAIKAKTTSYTAADGTTKTAANQLGGVDG  
 KTEVVTIDGKTYNASKAAGHDFKAQPELAEAAKTTENPLQKIDAALAQVDALRSDL  
 GAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQA  
 NQVPQNVLSLLRKGNSKLEGGLEFPRTSPVWWSADIQHSGRSSLEGPRFEGKPIP  
 NPLLGLDSTRTGHHHHH

**Figura 35**

SEQ ID NO: 507. Secuencia aminoacídica de pMT/STF2 (ligador subrayado)

**ATGAAGTTATGCATATTA**CTGGCCGTCGTTGGCCTCTCGCTCGGGAGATCT  
 GCACAAGTAATCAACACTAACAGTCTGTGCGTCTGACCCAGAATAACCTGAACAAATCC  
 CAGTCCGCACTGGGCACCGCTATCGAGCGTCTGTCTTCTGGTCTGCGTATCAACAGCGCG  
 AAAGACGATGCGGCAGGTCAGGCGATTGCTAACCGTTTCACCGCGAACATCAAAGGTCTG  
 ACTCAGGCTTCCCGTAAACGCTAACGACGGTATCTCCATTGCGCAGACCACTGAAGGCGCG  
 CTGAACGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTGCGTGAACCTGGCGGTTTCAGTCTGCTAAC  
 AGCACCAACTCCCAGTCTGACCTCGACTCCATCCAGGCTGAAATCACCCAGCGCCTGAAC  
 GAAATCGACCGTGTATCCGGCCAGACTCAGTTCAACGGCGTGAAAGTCTGGCGCAGGAC  
 AACACCCTGACCATCCAGGTTGGCGCCAACGACGGTGAAACTATCGATATCGATCTGAAG  
 CAGATCAACTCTCAGACCCTGGGTCTGGACTCACTGAACGTGCAGAAAGCGTATGATGTG  
 AAAGTACAGCAGTAACAACGAAAGCTTATGCCAATAATGGTACTACACTGGATGTATCG  
 GGTCTTGATGATGCAGCTATTAAAGCGGCTACGGGTGGTACGAATGGTACGGCTTCTGTA  
 ACCGGTGGTGCAGGTTAAATTTGACGCAGATAATAACAAGTACTTTGTTACTATTGGTGGC  
 TTTACTGGTGTGATGCCGCCAAAATGGCGATTATGAAGTTAACGTTGCTACTGACGGT  
 ACAGTAACCCCTGCGGCTGGCGCAACTAAAACCACAATGCCTGCTGGTGGCACAATAAAA  
 ACAGAAGTACAGGAGTTAAAAGATACACCGGCAGTTGTTTCAGCAGATGCTAAAAATGCC  
 TTAATTGCTGGCGGCGTTGACGCTACCGATGCTAATGGCGCTGAGTTGGTCAAAATGTCT  
 TATACCGATAAAAAATGGTAAGACAATTGAAGGCGGTTATGCGCTTAAAGCTGGCGATAAG  
 TATTACGCCGAGATTACGATGAAGCGACAGGAGCAATTAAAGCTAAAACATAAGTTAT  
 ACTGCTGCTGACGGCACTACCAAAACAGCGGCTAACCAACTGGGTGGCGTAGACGGTAAA  
 ACCGAAGTCGTTACTATCGACGGTAAAACCTACAATGCCAGCAAAGCCGCTGGTTCATGAT  
 TTCAAAGCACAAACCAGAGCTGGCGGAAGCAGCCGCTAAAACCACCGAAAACCCGCTGCAG  
 AAAATTGATGCCGCGCTGGCGCAGGTGGATGCGCTGCGCTCTGATCTGGGTGCGGTACAA  
 AACCGTTTCAACTCTGCTATCACCAACCTGGGCAATACCGTAAACAATCTGTCTGAAGCG  
 CGTAGCCGATCGAAGATTCGACTACGCGACCGAAGTTTCCAACATGTCTCGCGCGCAG  
 ATTCTGCAGCAGGCCGGTACTTCCGTTCTGGCGCAGGCTAACCAAGTCCCGCAGAACGTG  
 CTGTCTCTGTTACGTAAGGGCAATTCGAAGCTTGAAGGTCAATTGGAATTCCTTAGGACT  
AGTCCAGTGTGGTGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGCCGCTCGAGTCTAGAG  
GGCCCGGTTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGT  
ACCGTTCATCATCACCATCACCAT

**Figura 36**

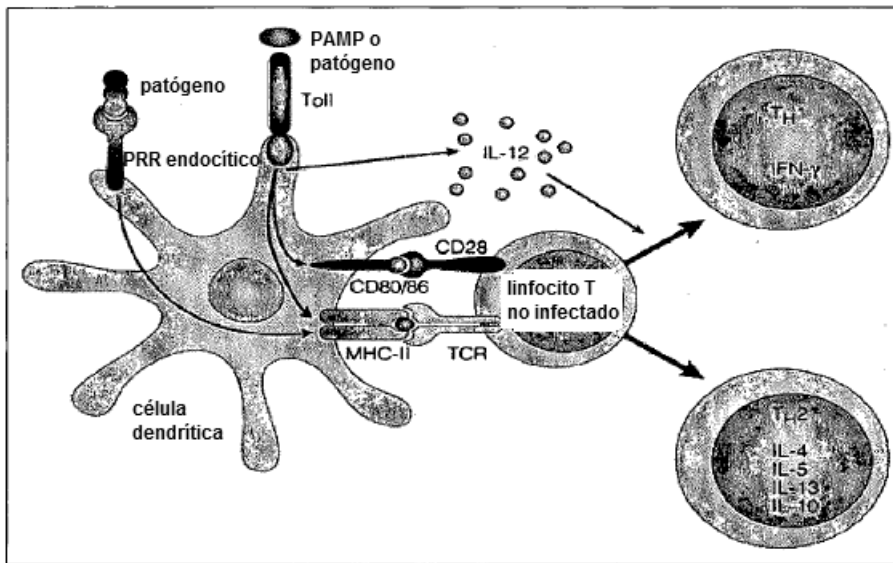


Figura 37

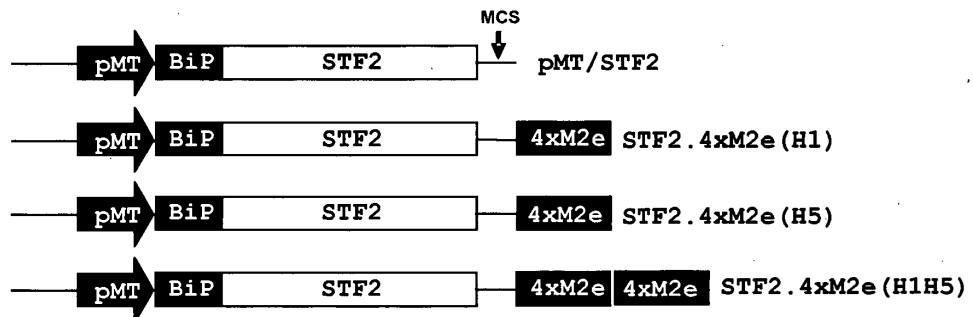


Figura 38A

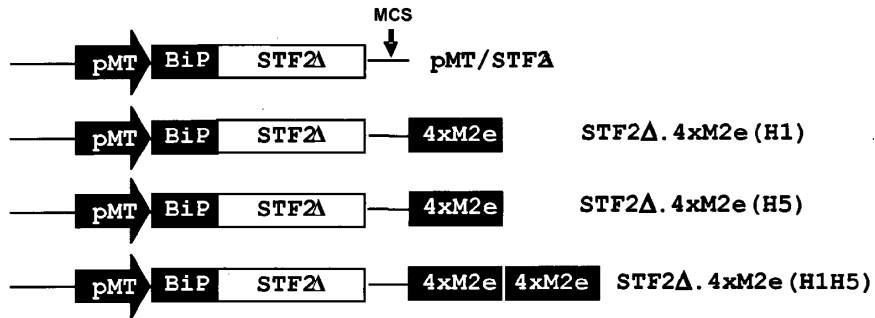


Figura 38B

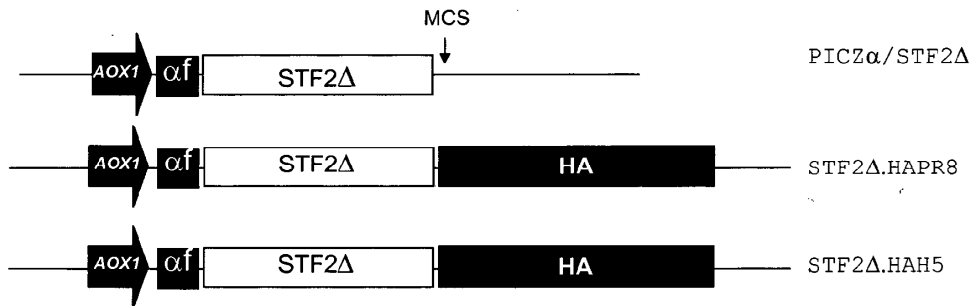


Figura 39

SEC ID NO: 585. Secuencia aminoacídica de pMT/STF2Δ

**MKLCILLAVVAFVGLSLGRSAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLS**  
 SGLRINSAKDDAAGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEI  
 NNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKV  
 LAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLDSLNVHGAPVDPASPWTEN  
 PLQIDAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDY  
 ATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLREFSRYPQWRPLTRTG  
 HHHHHH

Figura 40



SEQ ID NO: 586. Secuencia de ácido nucleico de pMT/STF2Δ

**ATGAAGTTATGCATATTACTGGCCGTCGTGGCCTTTGTTGGCCTCTCGCTCG  
GGAGATCTGCACAAGTAATCAACACTAACAGTCTGTTCGCTGCTGACCCAGAA  
TAACCTGAACAAATCCCAGTCCGCACTGGGCACCGCTATCGAGCGTCTGTCT  
TCTGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGGTGAGGCGATTG  
CTAACCGTTTCACCGCGAACATCAAAGGTCTGACTCAGGCTTCCCGTAACGC  
TAACGACGGTATCTCCATTGCGCAGACCACTGAAGGCGCGCTGAACGAAATC  
AACAAACACCTGCAGCGTGTGCGTGAAGTGGCGGTTTCAGTCTGCTAACAGCA  
CCAACCTCCAGTCTGACCTCGACTCCATCCAGGCTGAAATCACCCAGCGCCT  
GAACGAAATCGACCGTGTATCCGGCCAGACTCAGTTCAACGGCGTGAAAGTC  
CTGGCGCAGGACAACACCCCTGACCATCCAGGTTGGCGCCAACGACGGTGAAA  
CTATCGATATCGATCTGAAGCAGATCAACTCTCAGACCCCTGGGTCTGGACTC  
ACTGAACGTGCATGGAGCGCCGGTGGATCCTGCTAGCCCATGGACCGAAAAC  
CCGCTGCAGAAAATTGATGCCGCGCTGGCGCAGGTGGATGCGCTGCGCTCTG  
ATCTGGGTGCGGTACAAAACCGTTTCAACTCTGCTATCACCAACCTGGGCAA  
TACCGTAAACAATCTGTCTGAAGCGCGTAGCCGTATCGAAGATTCCGACTAC  
GCGACCGAAGTTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTTTGCAGCAGGCCGGTA  
CTTCCGTTCTGGCGCAGGCTAACAGGTCCCAGGACGACGTCGCTGTCTCTGT  
ACGTGAATTCTCTAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCACGCGTACCGGT  
CATCATCACCATCACCATTGA**

Figura 41

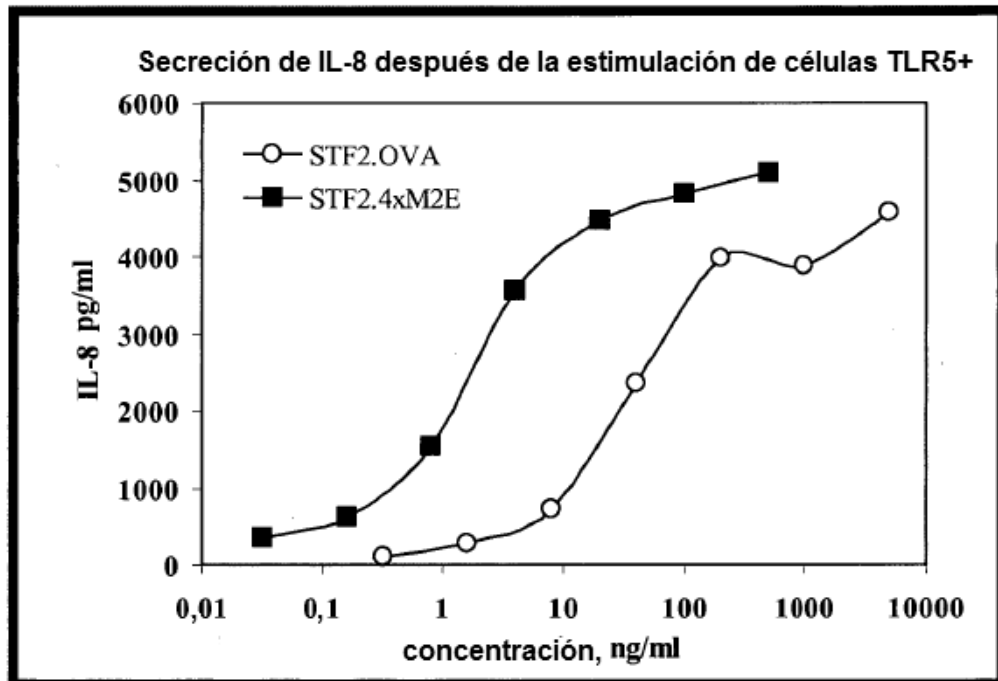


Figura 42

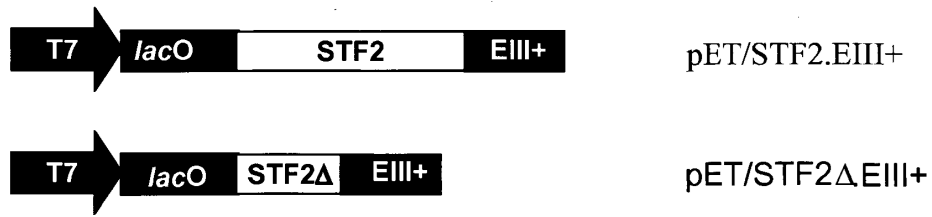


Figura 43

Empalme de dominios I/III de proteína de envoltura de flavivirus (dominio I 280-297, dominio III 298-406)

WN aa 281-307

WN LTSGHLKCRVKMEKLQLKGTTYGVCSK(SEQ ID NO: 691)  
 JE LTSGHLKCRLKMDKLALKGTTYGMCTE (SEQ ID NO: 692)  
 D1 IFAGHLKCRLKMDKLTLKGMSYVMCTG (SEQ ID NO: 639)  
 D2 LFTGHLKCRLRMDKLQLKGMSYSMCTG (SEQ ID NO: 694)  
 D3 IFAGHLKCRLKMDKLKLKGMSYAMCLN (SEQ ID NO: 695)  
 D4 MFAGHLKCCKVRMEKLRIKGMSYTMCSG (SEQ ID NO: 696)  
 xxxGHLKCRxxMxKLxLKGxxYxxCxx (SEQ ID NO: 697)  
 GHLKCRMKLLKGYC (SEQ ID NO: 698)

Figura 44

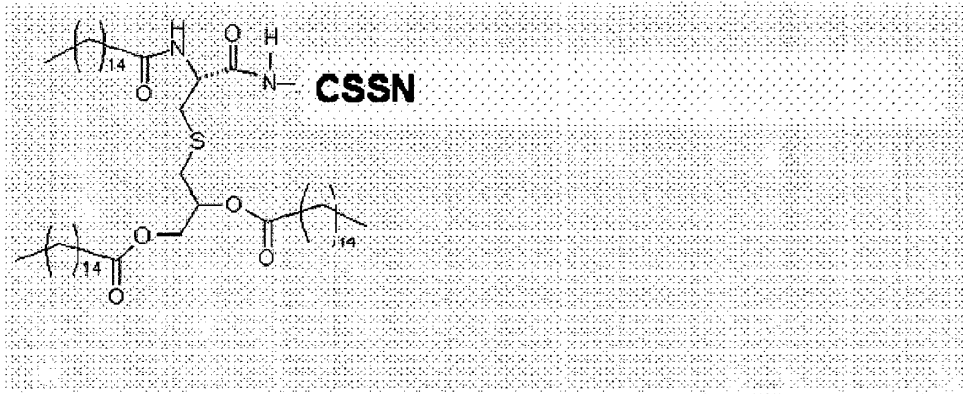


Figura 45

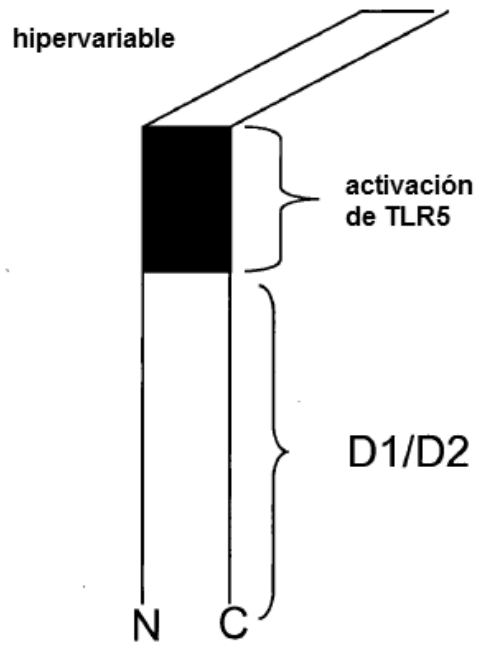


Figura 46

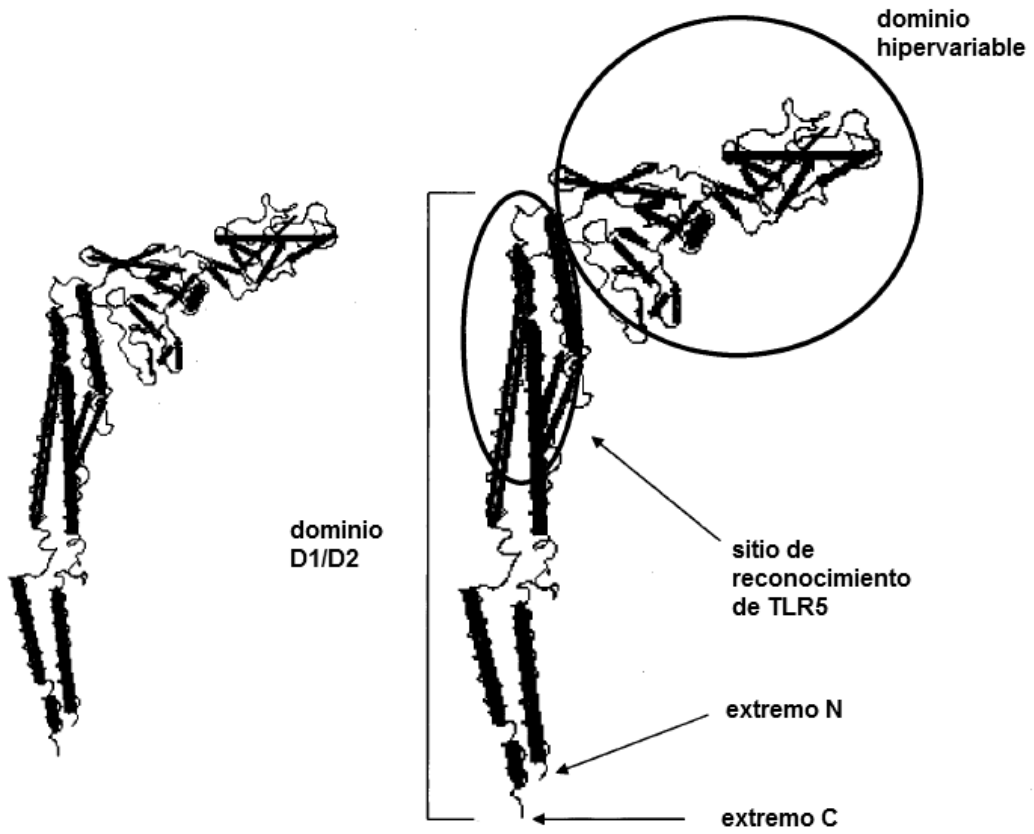
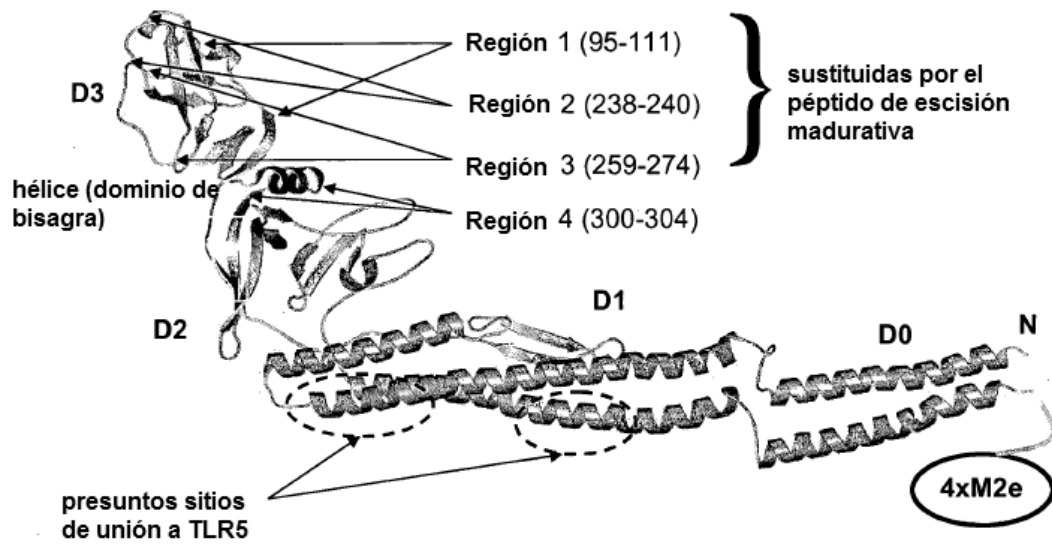


Figura 47



## Flagelina (**1UCU**)

Figura 48

## ES 2 534 332 T3

### Flagelina de *Pseudomonas aeruginosa* (número de acceso P21184)

```

      10          20          30          40 *          50          60
ALTVNTNIAS LNTQRNLNNS SASLNTSLQR LSTGSRINSA KDDAAGLQIA NRLTSQVNGL

      * 70          80          90          100          110          *  *
NVATKNANDG ISLAQTAEQA LQQSTNILQR MRDLSLQSAN GSNSDSERTA LNGEVKQLQK

      130          * 140          150          160          170          * 180
ELDRISNTTT FGGRKLLDGS FGVASFQVGS AANEIISVGI DEMSAESLNG TYFKADGGGA

      190          200          *  *          *          230          240
VTAATASGTV DIAIGITGGS AVNVKVDKMG NETAEQAAAK IAAAVNDANV GIGAFSDGDT

      *  *          260          270          280          *290          * 300
ISYVSKAGKD GSGAITSAVS GVVIADTGST GVGTAAGVTP SATAFAKTND TVAKIDISTA

*  310          * 320          330          *          350          360
KGAQSAVLVI DEAIKQIDAQ RADLGAVQNR FDNTINNLKN IGENVSAARG RIEDTDFAAE

      * 370          380          390
TANLTKNOVL QQAGTAILAQ ANQLPQSVLS LLR
    
```

**Figura 49**

### Secuencia de STF2

```

      10          *          30          40          *          50          *
MAQVINTNSL SLLTQNNLNK SQSALGTAIE RLSSGLRINS AKDDAAGQAI ANRFTANIKG

      70          80          90          100          110          120
LTQASRNAND GISIAQTTEG ALNEINNNLQ RVRELAVQSA NSTNSQSDLD SIQAEITQRL

      130          * 140          150          160          * 170          *180
NEIDRVSGQT QFNGVKVLAQ DNTLTIQVGA NDGETIDIDL KQINSQTLGL DSLNVQKAYD

      *  *          200          *          220          *          * 240
VKDTAVTTKA YANNGTTLDV SGLDDAAIKA ATGGTNGTAS VTGGAVKFDA DNNKYFVTIG

      *          260          270          * 280          *          *          *
GFTGADAACK GDYEVNVATD GTVTLAGAT KTTMPAGATT KTEVQELKDT PAVVSADAKN

      310          *          *  *          *340          * 350          * *360
ALIAGGVDAT DANGAELVKM SYTDKNGKTI EGGYALKAGD KYAAYDEA TGAIKAKTTS

      *          *          *          *          * 400          * 410          * 420
YTAADGTTKT AANQLGGVDG KTEVVITIDGK TYNASKAAGH DFKAQPELAE AAKTTTENPL

      * 430          440          450          460          470          480
QKIDAALQV DALRSDLGAV QNRFNSAITN LGNTVNNLSE ARSRIEDSDY ATEVSNMSRA

      490
QILQQAGTSV LAQANQVPQN VLSLLR
    
```

**Figura 50**

# ES 2 534 332 T3

## Flagelina de *Listeria monocytogenes* (número de acceso Q92DW3)

```

*      10 *      *20      30      *      40      50      *      60
MKVNTNIISL KTQEYLRKNN EGMTQAQERL ASGKRINSSL DDAAGLAVVT RMNVKSTGLD

*      70      80      90      100      *      *
AASKNSSMGI DLLQTADSAL SSMSSILQRM RQLAVQSSNG SFSDEDRKQY TAEFGSLIKE

130      *      140      150      *      160      *170      180
LDHVADTTNY NNIKLLDQTA TNAATQVSIQ ASDKANDLIN IDLFNAKGLS AGTITLGSGS

190      200      210      220      230      *
TVAGYSALSV ADADSSQEAT EAIDELINNI SNGRALLGAG MSRLSYNVSN VNNQSIATKA

250      *      *      270      280
SASSIEDADM AAEMSEMTKY KILTQTSISM LSQANQTPQM LTQLINS

```

**Figura 51**