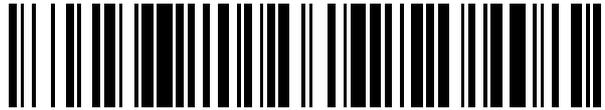


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 644**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01)
C07K 14/135 (2006.01)
C07K 14/165 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2008 E 12185712 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2540312**

54 Título: **VLPS quiméricas de la gripe aviar**

30 Prioridad:

19.07.2007 US 950707 P
07.09.2007 US 970592 P
20.05.2008 US 71835 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.08.2015

73 Titular/es:

NOVAVAX, INC. (100.0%)
9920 Belward Campus Drive
Rockville, MD 20850, US

72 Inventor/es:

SMITH, GALE y
PUSHKO, PETER

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 542 644 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

VLPS quiméricas de la gripe aviar

5 **Antecedentes de la invención**

El virus de la gripe es un miembro de la familia Ortomixoviridae (para una revisión, véase Murphy y Webster, 1996). Hay tres subtipos de virus de la gripe designados A, B y C. El virión de la gripe contiene un genoma de ARN de sentido negativo segmentado. El virión de la gripe incluye las siguientes proteínas: las proteínas hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), de la matriz (M1), proteína de los canales iónicos de protones (M2), nucleoproteína (NP), proteína básica de la polimerasa 1 (PBL), proteína básica de la polimerasa 2 (PB2), proteína ácida de la polimerasa (PA) y la proteína no estructural 2 (NS2). Las HA, NA, M1 y M2 están asociadas a la membrana, mientras que NP, PBL, PB2, PA y NS2 son proteínas asociadas a la nucleocápside. El NS1 es la única proteína no estructural no asociada con partículas de virión pero específica de las células infectadas con la gripe. La proteína M1 es la proteína más abundante en partículas de la gripe. Las proteínas HA y NA son glicoproteínas de la cubierta, responsables de la fijación del virus y la penetración de las partículas virales en la célula, y las fuentes de los principales epítomos inmunodominantes para la neutralización del virus y la inmunidad protectora. Las proteínas HA y NA se consideran los componentes más importantes para vacunas profilácticas contra la gripe debido a que son altamente inmunogénicas.

Hasta la fecha, todas las vacunas contra la gripe disponibles comercialmente para las cepas no pandémicas en Estados Unidos se han propagado en huevos de gallina embrionados. Aunque el virus de la gripe crece bien en los huevos de gallina, la producción de la vacuna depende de la disponibilidad de huevos. Los suministros de huevos deben organizarse y las cepas para la producción de vacunas deben seleccionarse antes de la próxima temporada de gripe, lo que limita la flexibilidad de este enfoque, y a menudo da lugar a retrasos y escasez en la producción y la distribución. Desafortunadamente, algunas cepas de la vacuna de la gripe no se replican bien en huevos embrionados de pollo y tienen que aislarse mediante cultivo celular en un procedimiento costoso y que consume tiempo.

Los sistemas para la producción de virus de la gripe en cultivo celular también se han desarrollado en los últimos años (véase, por ejemplo, Furminger. Vaccine Production, en Nicholson et al. (eds) Textbook of Influenza pp. 324 - 332; Merten et al. (1996) Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation, en Cohen & Shafferman (eds) Novel Strategies in Design and Production of Vaccines pp. 141 - 151). Normalmente, estos métodos implican la infección de células hospedadoras inmortalizadas adecuadas con una cepa seleccionada de virus. Aunque se eliminan muchas de las dificultades relacionadas con la producción de vacunas en huevos de gallina, no todas las cepas patógenas de la gripe crecen bien y se pueden producir de acuerdo con métodos de cultivo tisular establecidos. Además, muchas cepas con características deseables, por ejemplo, atenuación, sensibilidad a la temperatura y adaptación fría, adecuadas para la producción de vacunas vivas atenuadas, no se han cultivado con éxito en cultivos de tejidos utilizando métodos establecidos. Además, los virus atenuados vivos no han sido aceptados por el público en general debido a los temores de reversión a un virus virulento.

Las partículas similares a virus imitan la estructura general de una partícula de virus sin necesidad de contener material infeccioso. Las VLP carecen de genoma viral de ADN o ARN, pero conservan la estructura tridimensional de un virus auténtico. Las VLP tienen la capacidad de estimular respuestas mediadas por células B, respuestas proliferativas de células CD4 y respuestas de linfocitos T citotóxicos (véase, Schirmbeck et al. (1996) Eur. J. Immunol. 26:2812 - 2822). Además, las partículas similares a virus inducen respuestas de células T restringidas al MHC de clase I.

Sumario de la invención

La presente invención comprende un método para aumentar la eficiencia de la producción de VLP de la gripe que comprende expresar una M1 de la gripe aviar y las proteínas HA y NA de la gripe estacional en una célula hospedadora. La proteína M1 de la gripe aviar es una proteína M1 de la gripe A/Indonesia/5/05. Dicha HA o NA pueden tener actividad hemaglutinina y neuraminidasa, respectivamente.

La presente solicitud también describe una VLP quimérica que comprende una proteína M1 de la gripe aviar y al menos una proteína de la gripe no aviar. En una realización, dicha proteína de la gripe aviar no es HA y/o NA de un virus de la gripe no aviar. En otra realización, dicha proteína de la gripe no aviar no es una proteína de la gripe estacional. En otra realización, dicho HA o NA tiene actividad hemaglutinina o neuraminidasa, respectivamente. En otra realización, dichas HA y/o NA son proteínas quiméricas. En otra realización, las proteínas quiméricas comprenden secuencias de dominios externos de las proteínas HA y/o NA de la gripe no aviar fusionadas a los dominios terminales transmembrana y/o citoplásmicos de las HA y/o NA de la gripe aviar o heterólogos. En otra realización, dicha proteína de la gripe no aviar procede de un agente infeccioso.

La presente solicitud también describe una formulación antigénica que comprende una VLP quimérica que comprende una proteína M1 de la gripe aviar y al menos una proteína de la gripe no aviar. En una realización, dicha

VLP comprende HA y/o NA de un virus de la gripe no aviar. En otra realización, dicha HA o NA tienen actividad hemaglutinina o neuraminidasa, respectivamente. En otra realización, dichas HA y/o NA son proteínas quiméricas.

5 La presente solicitud también describe vacunas que comprenden una VLP quimérica que comprende una proteína M1 de la gripe aviar y al menos una proteína de la gripe no aviar. En una realización, dicha VLP comprende HA y/o NA de un virus de la gripe no aviar. En otra realización, dicha HA o NA tienen actividad hemaglutinina o neuraminidasa, respectivamente. En otra realización, dichas HA y/o NA son proteínas quiméricas.

10 La presente solicitud también describe un método para inducir inmunidad en un vertebrado que comprende la administración a dicho vertebrado de una VLP quimérica que comprende una proteína M1 de la gripe aviar y al menos una proteína de la gripe no aviar. En una realización, dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humoral. En una realización, dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria celular.

15 La presente solicitud también describe un método para prevenir y/o reducir una infección viral o síntoma de la misma que comprende la administración a un vertebrado de una VLP quimérica que comprende una proteína M1 de la gripe aviar y al menos una proteína de la gripe no aviar.

20 La presente solicitud también comprende un método de reducción de la gravedad de la gripe en una población, que comprende administrar la una VLP quimérica que comprende una proteína M1 de la gripe aviar y al menos una proteína de la gripe no aviar a suficientes individuos en dicha población con el fin de prevenir o disminuir la posibilidad de transmisión del virus de la gripe a otro individuo en dicha población.

Breve descripción de las figuras

25 La **Figura 1** representa un gel SDS-PAGE teñido derivado de VLP hechas de diferentes construcciones después del aislamiento a partir de un gradiente de sacarosa.

La **Figura 2** representa una transferencia de tipo Western teñida derivado de VLP hechas de diferentes construcciones después del aislamiento a partir de un gradiente de sacarosa.

30 La **Figura 3** es un gel SDS-PAGE teñido derivado de VLP hechas de HA y NA de tipo salvaje o híbridos de A / Indonesia / 5/05 M1 y A / Fujian / 411/2002.

La **Figura 4** representa una transferencia de tipo Western teñida derivada de VLP hechas de HA y NA de tipo salvaje o híbridos de A / Indonesia / 5/05 M1 y A / Fujian / 411/2002.

La **Figura 5** representa la secuencia de aminoácidos de la proteína SARS S con el dominio transmembrana y carboxiterminal de la HA de H5N1 de Indonesia (subrayado).

35 La **Figura 6** representa la secuencia de aminoácidos de la proteína M1 Indonesia H5N1.

La **Figura 7** representa el vector pFastBac 1 que contiene secuencias para SARS S con el dominio TM/CT de la HA de H5N1 y la proteína M1 de H5N1 de Indonesia.

La **Figura 8** representa las VLP quiméricas de SARS S/Indo M1 purificadas. La calle 1 es la tinción con azul de Coomassie. La calle 2 es la transferencia de tipo western, panel superior: anti SARS S; panel inferior: anti M1 de la gripe.

40 La **Figura 9** representa las VLP de SARS de tipo salvaje purificadas compuestas por las proteínas S, M y E de SARS. A) Tinción con azul de Coomassie; B) transferencia de tipo western, panel superior: anti SARS S; panel inferior: Anti-M de SARS.

45 La **Figura 10** representa el resultado del análisis del tamaño de partícula para las VLP quiméricas de S de SARS S / M1 de Indo con Malvern Zetasizer.

La **Figura 11A-C** representa la tinción negativa en el microscopio electrónico (ME) de las VLP quiméricas de S SARS S / M1 Indo. A) Imagen en ME para el control de amortiguación; B) Imágenes de ME seleccionadas para VLP; C) Imágenes de ME seleccionadas para VLP a una magnitud mayor.

50 La **Figura 12A-C** representa imágenes publicadas de ME para el SARS-CoV y coronavirus.

La **Figura 13** representa construcciones de expresión para la producción de VLP de B/Florida/4/06 en células de insecto Sf9. Se muestran las ubicaciones de los genes de HA, NA y M1, así como las ubicaciones del promotor poliédrico. También se muestran las construcciones para la expresión individual de los genes de HA y NA genes para fines de reactivos.

55 La **Figura 14** representa los niveles de expresión de VLP de la gripe B / Florida / 4/06 mediante tinción de Coomassie (panel izquierdo) y los ensayos de HA / NA (panel de la derecha). Calle 1. Muestra de las VLP de B / Florida / 4/06 que contienen la M1 de B/Florida/4/06. Calle 2. Muestra de las VLP de B / Florida / 4/06 que contienen la M1 de B/Ann Arbor/1/1986. Calle 3. Muestra de las VLP de B / Florida / 4/06 que contienen la M1 de A/Indonesia/5/05 (H5N1) Los paneles de la derecha muestran la actividad de HA y NA mediante los ensayos de la actividad enzimática de neuraminidasa y de hemaglutinación.

60 La **Figura 15** representa microscopía electrónica de VLP purificadas. Microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa de la gripe B / Florida / 6.4 VLP que contienen M1 de A / Indonesia / 5/05 (H5N1) (izquierda), B / Ann Arbor / 1/1986 (centro) y B / Florida / 4/06 (derecha).

Descripción detallada

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "formulación antigénica" o "composición antigénica" se refiere a una preparación que, cuando se administra a un vertebrado, especialmente a un ave o un mamífero, inducirá una respuesta inmunitaria.

10 Como se usa en el presente documento, el término "adyuvante" se refiere a un compuesto que, cuando se utiliza en combinación con un inmunógeno específico (por ejemplo, una VLP) en una formulación, aumenta o, de otra manera, altera o modifica la respuesta inmunitaria resultante. La modificación de la respuesta inmunitaria incluye la intensificación o la ampliación de la especificidad de uno o ambas respuestas inmunitarias, de anticuerpos y celulares. La modificación de la respuesta inmunitaria también puede significar la disminución o la supresión de ciertas respuestas inmunitarias específicas de antígeno.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "virus de la gripe aviar" se refiere a virus de la gripe que se encuentran principalmente en las aves, pero que también puede infectar a seres humanos o a otros animales. En algunos casos, los virus de la gripe aviar pueden transmitirse o propagarse de un ser humano a otro. Un virus de la gripe aviar que infecta a seres humanos tiene el potencial de causar una pandemia de gripe, es decir, la morbilidad y/o mortalidad en seres humanos. Una pandemia ocurre cuando una nueva cepa del virus de la gripe (un virus frente al que los humanos no tienen inmunidad natural) emerge, extendiéndose más allá de localidades individuales, posiblemente en todo el mundo, e infectando a muchos seres humanos a la vez.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "proteína quimérica" se refiere a construcciones que unen al menos dos proteínas heterólogas en una sola macromolécula (proteína de fusión).

25 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "VLP quimérica" se refiere a una partícula similar a un virus que comprende una proteína M1 aviar y al menos una proteína menos, o parte de la misma, que no es de un virus de la gripe aviar.

30 Como se usa en el presente documento, una "dosis efectiva" se refiere generalmente a la cantidad de la VLP de la invención suficiente para inducir inmunidad, para prevenir y/o mejorar la infección por el virus de la gripe o para reducir al menos un síntoma de la infección por la gripe y/o para mejorar la eficacia de otra dosis de una VLP. Una dosis eficaz puede referirse a la cantidad de la VLP suficiente para retrasar o minimizar la aparición de una infección de la gripe. Una dosis eficaz puede también referirse a la cantidad de la VLP que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o control de la infección de la gripe. Además, una dosis eficaz es la cantidad con respecto a las VLP de la invención solas, o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o control de una infección por el virus de la gripe. Una dosis eficaz también puede ser la cantidad suficiente para mejorar la propia respuesta inmunitaria de un sujeto (por ejemplo, de un ser humano) contra una posterior exposición al virus de la gripe. Los niveles de inmunidad pueden controlarse, por ejemplo, mediante la medición de anticuerpos neutralizantes secretores y/o en suero, por ejemplo, mediante neutralización de la placa, fijación del complemento, inmunoabsorción ligado a enzima o ensayo de microneutralización. En el caso de una vacuna, una "dosis efectiva" es una que previene la enfermedad o reduce la gravedad de los síntomas.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio externo", cuando se refiere a las proteínas asociadas a la membrana, se refiere al o los dominios de la proteína que son externos a la célula y/o al citosol y/o a un lumen. El dominio externo de una proteína también se conoce como un ectodominio.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "VLP de la gripe" se refiere a una VLP que comprende al menos una proteína de la gripe. Dichas VLP pueden comprender proteínas adicionales de la gripe y/o que no son de la gripe.

Como se usa en el presente documento, la expresión "actividad de hemaglutinina" se refiere a la capacidad de las proteínas que contienen HA, VLP o porciones de los mismos para unirse y aglutinar los glóbulos rojos (eritrocitos).

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "actividad de la neuraminidasa" se refiere a la actividad enzimática de las proteínas que contienen NA, VLP o porciones de las mismas para escindir residuos de ácido siálico a partir de sustratos que incluyen proteínas tales como fetuina.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "agente infeccioso" se refiere a los microorganismos que causan una infección en un vertebrado. Por lo general, los organismos son virus, bacterias, parásitos y / u hongos. La expresión también se refiere a diferentes variaciones antigénicas del mismo agente infeccioso.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "estimulador inmune" se refiere a un compuesto que mejora una respuesta inmunitaria a través de mensajeros químicos propios del cuerpo (citocinas). Estas moléculas comprenden diversas citocinas, linfocinas y quimiocinas con actividades inmunoestimuladoras, inmunopotenciadoras y proinflamatorias, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); factores de crecimiento (por ejemplo, factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM) (CSF)); y otras moléculas

inmunoestimuladoras, tales como el factor inflamatorio de macrófagos, el ligando Flt3, B7.1; B7.2, etc. Las moléculas estimuladoras inmunes se pueden administrar en la misma formulación que las VLP de la gripe, o por separado. O bien la proteína o un vector de expresión que codifica la proteína pueden administrarse para producir un efecto inmunoestimulador.

5 Como se usa en el presente documento, el término "inmunidad" se refiere a la inducción del sistema inmunitario de un vertebrado en el que dicha inducción tiene como resultado la prevención, mejora, y/o reducción de al menos un síntoma de una infección en dicho vertebrado. La inmunidad también puede referirse a una inhibición del título de la hemaglutinación (HI) título de ≥ 40 cuando las VLP de la invención se han administrado a un vertebrado y dichas VLP han inducido una respuesta inmunitaria contra una HA de un virus de la gripe.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína de la gripe aviar" se refiere a una proteína que es heteróloga a un virus de influenza aviar. Dicha proteína de la gripe no aviar puede expresarse de forma recombinante a partir de un vector de expresión y puede ser heteróloga para el vector de expresión.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "virus de la gripe estacional" se refiere a las cepas del virus de la gripe que se ha determinado que pasan dentro la población humana para una temporada de gripe determinada sobre la base de estudios epidemiológicos llevados a cabo por los Centros Nacionales de la gripe en todo el mundo. Estos estudios epidemiológicos y algunos virus de la gripe aislados son enviados a uno de los cuatro laboratorios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), uno de los cuales está en los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Atlanta para análisis detallados. Estos laboratorios prueban lo bien que los anticuerpos frente a la vacuna actual reaccionan con el virus circulante y nuevos virus de la gripe. Esta información, junto con la información sobre la actividad de la gripe, se resume y presenta a un comité asesor de la Food and Drug Administration (FDA) y en una reunión de la OMS. Estas reuniones dan lugar a la selección de tres virus (dos subtipos de virus de la gripe A y uno del virus de la gripe B) para entrar en las vacunas contra la gripe para el siguiente otoño e invierno. La selección se produce en febrero para el hemisferio norte y en septiembre para el hemisferio sur. Por lo general, uno o dos de las tres cepas de virus en la vacuna cambia cada año.

20 Como se usa en el presente documento, el término "vacuna" se refiere a una preparación de patógenos muertos o debilitados, o de determinantes antigénicos derivados que se utiliza para inducir la formación de anticuerpos o de inmunidad contra el patógeno. Una vacuna se administra para proporcionar inmunidad frente a la enfermedad, por ejemplo, la gripe, que está causada por virus de la gripe. Además, el término "vacuna" se refiere también a una suspensión o solución de un inmunógeno (por ejemplo, VLP) que se administra a un vertebrado para producir inmunidad protectora, es decir, la inmunidad que previene o reduce la gravedad de la enfermedad asociada con la infección. La presente invención proporciona composiciones de vacuna que son inmunogénicas y pueden proporcionar protección contra una enfermedad asociada con la infección.

30 Como se usa en el presente documento, el término "vertebrado" o "sujeto" o "paciente" se refiere a cualquier miembro del subfilo cordados, incluyendo, sin limitaciones, seres humanos y otros primates, incluyendo primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos. Los animales de granja, tales como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio, incluidos roedores tales como ratones, ratas y cobayas; aves, incluidas aves domésticas, salvajes y de caza tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos, y similares son también ejemplos no limitantes. Los términos "mamíferos" y "animales" se incluyen en esta definición. Se pretende cubrir individuos tanto adultos como neonatos.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "partícula similar a virus" (VLP) se refiere a una estructura que, en al menos un atributo, se asemeja a un virus pero que no se ha demostrado que sea infecciosa. Las partículas similares a virus de acuerdo con la invención no llevan información genética que codifica las proteínas de las partículas similares a virus. En general, las partículas similares a virus carecen de un genoma viral y, por lo tanto, no son infecciosas. Además, las partículas similares a virus a menudo se pueden producir en grandes cantidades mediante expresión heteróloga y pueden purificarse fácilmente.

55 **VLP de la invención y métodos de fabricación de VLP**

En general, las partículas similares a virus (VLP) carecen de un genoma viral y, por lo tanto, no son infecciosas. Además, las partículas similares a virus a menudo se pueden producir mediante expresión heteróloga y pueden purificarse fácilmente. La mayoría de las VLP comprenden al menos una proteína del núcleo viral. Esta proteína núcleo generalmente dirige la gemación y la liberación de las partículas a partir de una célula hospedadora. Ejemplos de tales proteínas comprenden M del VSR, M1 de la gripe, gag del VIH y la proteína del el virus de la estomatitis vesicular (VSV). En general, las VLP son útiles para la preparación de la formulación antigénica y/o vacunas contra agentes infecciosos, por ejemplo, la gripe.

65 Sin embargo, la producción de VLP no ha sido particularmente eficiente. Un objetivo de la producción de VLP es la optimización de las condiciones del cultivo para obtener la mayor productividad posible. Incluso los aumentos incrementales en la productividad pueden ser económicamente importantes y pueden salvar vidas. Los inventores

de la presente invención han descubierto inesperadamente que la expresión de M1 aviar en una célula hospedadora mejora significativamente la producción de VLP de células hospedadora.

5 Por lo tanto, la invención descrita en el presente documento comprende métodos de producir VLP quiméricas que comprenden una proteína M1 de la gripe A/Indonesia/5/05 aviar y la HA y/o NA de la gripe estacional. En otra realización, dichas HA o NA de la gripe estacional son A/Wisconsin/67/2005 y/o A/Fujian/411/02. En otra realización, dichas HA o NA tienen actividad hemaglutinina o neuraminidasa, respectivamente.

10 Las VLP quiméricas son útiles para preparar vacunas y composiciones inmunogénicas. Una característica importante de dicha VLP quiméricas es la capacidad para expresar proteínas en la superficie de dichas VLP de modo que el sistema inmunitario de un vertebrado puede inducir una respuesta inmunitaria contra dicha proteína. Sin embargo, no todas las proteínas se pueden expresar en la superficie de las VLP. Puede haber muchas razones por las que ciertas proteínas no se expresan, o se expresan poco, en la superficie de las VLP. Una razón es que
15 dicha proteína no está dirigida a la membrana de una célula hospedadora o que dicha proteína no tiene un dominio transmembrana. Las secuencias cerca del extremo carboxilo de la hemaglutinina de la gripe pueden ser importantes para la incorporación de HA en la bicapa lipídica de las nucleocápsides cubiertas por la gripe madura y para el ensamblaje de la interacción del trímero de HA con la proteína del núcleo de la gripe M1 (Ali, et al., (2000) J. Virol. 74, 8709 - 19). Por lo tanto, un método para superar la incapacidad para expresar proteínas de de la gripe no aviar en la superficie de VLP y/o para aumentar la expresión de dichas proteínas, es fusionar los dominios citoplásmicos
20 y/o transmembrana de la HA y/o NA de la gripe a una proteína de la gripe no aviar, creando así una proteína quimérica.

Por lo tanto en el presente documento se describen VLP quiméricas que comprenden al menos una proteína quimérica. Dicha proteína quimérica puede comprender al menos un dominio externo (ectodominio) de las
25 secuencias de las proteínas HA y/o NA de la gripe no aviar fusionadas a los dominios transmembrana y/o citoplásmicos terminales de una HA y/o NA heteróloga. En otra realización, dichos dominios transmembrana y/o citoplásmicos terminales heterólogos HA y/o NA proceden del virus de la gripe estacional y/o la gripe aviar. En otra realización, dichas HA y/o NA de la gripe no aviar proceden de cepa de la gripe estacional A / Wisconsin / 67/2005 y los dominios transmembrana y/o citoplásmicos terminales de HA y/o NA procede de una cepa de la gripe aviar. En
30 otra realización, dichas HA y/o NA de la gripe no aviar proceden de cepa de la gripe A/Fujian/411/02 y los dominios transmembrana y/o citoplásmicos terminales de HA y/o NA procede de una cepa de la gripe aviar. Dichos dominios transmembrana y/o citoplásmicos terminales de HA y/o NA de la gripe aviar se pueden derivar del grupo que consiste en virus de la gripe H9N2 y/o el virus de la gripe H5N1.

35 Dichas HA y/o NA de la cepa de la gripe H9N2 pueden aislarse de uno cualquiera de los virus de la gripe a partir del grupo que consiste en A/quail/Hong Kong/G1/97, A/Hong Kong/1073/99, A/Hong Kong/2108/03, Duck/HK/Y280/97, CK/HK/G9/97, Gf/HK/SSP607/03, Ph/HK/CSW1323/03, WDK/ST/4808/01, CK/HK/NT142/03, CK/HK/WF126/03, SCK/HK/WF285/03, CK/HK/YU463/03, CK/HK/YU577/03, SCK/HK/YU663/03, Ck/HK/CSW161/03, y GF/HK/NT101/03. En otra realización, dichas HA y/o NA de la cepa de la gripe H5N1 puede proceder del clado 1 y/o
40 el clado 2. En otra realización, dicho H5N1 procede del clado 1. En otra realización, dicho H5N1 procede del clado 2. En otra realización, dicho H5N1 se selecciona del grupo que consiste en A/Vietnam/1194/04, A/Vietnam/1203/04, A/Hongkong/213/03, A/Indonesia/2/2005, A/Bar headed goose/Quinghai/1A/2005, A/Anhui/1/2005 y A/Indonesia/5/05. En otra realización, dicha cepa de H5N1 es A/Indonesia/5/05.

45 Las VLP quiméricas descritas en el presente documento comprenden una proteína M1 de la gripe aviar. Dicha proteína M1 puede derivar de la cepa de la gripe H9N2 o H5N1. Dicha M1 de la gripe H9N2 pueden aislarse de uno cualquiera de los virus de la gripe a partir del grupo que consiste en A/quail/Hong Kong/G1/97, A/Hong Kong/1073/99, A/Hong Kong/2108/03, Duck/HK/Y280/97, CK/HK/G9/97, Gf/HK/SSP607/03, Ph/HK/CSW1323/03, WDK/ST/4808/01, CK/HK/NT142/03, CK/HK/WF126/03, SCK/HK/WF285/03, CK/HK/YU463/03, CK/HK/YU577/03,
50 SCK/HK/YU663/03, Ck/HK/CSW161/03, y GF/HK/NT101/03. En una realización, dicha cepa de la gripe H9N2 es A/Hongkong/213/03, A/Indonesia/2/2005, A/Bar headed goose/Quinghai/1A/2005, A/Anhui/1/2005 y A/Indonesia/5/05. En otra realización, dicha M1 puede proceder de la cepa de H5N1 de la gripe. En otra realización, dicha H5N1 se selecciona del grupo que consiste en A/Vietnam/1194/04, A/Vietnam/1203/04, A/Hongkong/213/03, A/Indonesia/2/2005, A/Bar headed goose/Quinghai/1A/2005, A/Anhui/1/2005 y A/Indonesia/5/05. En las VLP
55 producidas mediante los métodos de la invención, dicha cepa de H5N1 es A/Indonesia/5/05.

En otra realización de la invención, dichas VLP quiméricas comprenden proteínas quiméricas de virus de la gripe B. En una realización, dichas proteínas quiméricas comprenden dominios externos de las secuencias de las proteína HA y/o NA de la gripe fusionadas a los dominios transmembrana y/o citoplásmicos terminales de la citoplásmica y/o
60 transmembrana de las HA y/o NA heterólogos. En otra realización, dichas HA y/o NA heterólogas procede de la gripe estacional A / Wisconsin / 67/2005 y/o A / Fujian / 411/02 y/o de la gripe aviar A / Indonesia / /5/05. En otra realización, dichos virus de la gripe B son de B / Shanghai / 361/2002 y/o B / Hong Kong / 330/2001.

En el presente documento también se describen VLP quiméricas que comprenden una M1 aviar con un proteína de
65 otro agente infeccioso (proteína de la gripe no aviar). Dicha proteína de otro agente infeccioso puede ser una proteína de tipo 1 y/o de tipo 2. Una proteína de tipo 1 tiene un C-terminal situado en el citosol (el dominio

transmembrana se encuentra cerca del extremo C), mientras que una proteína de tipo II tiene un extremo N que se encuentra en el citosol (el dominio transmembrana se encuentra cerca del extremo N). En otra realización, dicha proteína puede comprender epítopos que pueden inducir una respuesta inmunitaria contra dicha proteína cuando se administra a un vertebrado. En otra realización, dicha proteína puede asociarse con la M1 de la gripe aviar directa o indirectamente. En otra realización, dicha proteína se expresa en la superficie de la VLP. En otra realización, dicha proteína, o porción de la misma, pueden fusionarse a una proteína heteróloga creando una proteína quimérica. por ejemplo, los dominios externos de las proteínas de agentes infecciosos, tales como virus de la gripe no aviar, coronavirus, VZV, Dengue, o la fiebre amarilla y/o otros agentes pueden usarse para generar proteínas quiméricas mediante la fusión de dichas proteínas de agentes infecciosos con una proteína que se asocia con la M1 de la gripe aviar. En una realización, dicha proteína que se asocia con la M1 de la gripe aviar es una proteína de la gripe. En otra realización, dicha proteína que se asocia con la M1 de la gripe aviar es una HA y/o NA de la gripe. En otra realización, dicha HA y/o NA es de un virus de la gripe estacional. En otra realización, dicha HA y/o NA es de un virus de la gripe aviar. En otra realización, dicho virus de la gripe aviar es H5N1. En otra realización, dicha cepa H5N1 es A / Indonesia / 5/05.

También se describe en el presente documento una VLP que comprende una proteína quimérica que comprende el dominio transmembrana y/o la cola citoplasmática de la HA de la gripe y/o NA de la gripe fusionados a una proteína de un agente infeccioso. En otra realización, el dominio transmembrana y/o la cola citoplasmática de la proteína HA y/o NA se extiende desde el extremo N o C a aproximadamente 0, 1, 2, 3 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 a aproximadamente 50 aminoácidos después del dominio transmembrana y se fusiona a dicha proteína de otro agente infeccioso. En otra realización, la porción de la proteína de otro agente infeccioso que comprende el dominio citoplasmático y el dominio transmembrana se reemplaza con un dominio citoplasmático y/o de transmembrana de una proteína de de la gripe (es decir, NA y/o HA de la gripe aviar y/o estacional). En otra realización, dicha HA y/o NA de la gripe estacional proceden de la cepa de la gripe A / Wisconsin / 67/2005 y/o A / Fujian / 411/02 y/o la gripe aviar A / Indonesia / 5.5. En otra realización, dicha M1 es de una cepa H5N1 de la gripe aviar. En otra realización, dicha M1 procede de la cepa de la gripe A / Indonesia / 5/05. En otra realización, dicha M1 procede de la cepa H9N2 de la gripe. En otra realización, dicha M1 es de la cepa de la gripe A / Hong Kong / 1073/1099. En otra realización, el dominio transmembrana y/o la cola citoplasmática de HA y/o NA de A / Wisconsin / 67/2005 se fusiona a una proteína de un agente infeccioso. En otra realización, el dominio transmembrana y/o la cola citoplasmática de HA y/o NA de A / Fujian / 411/02 se fusiona a una proteína de un agente infeccioso. En otra realización, el dominio transmembrana y/o la cola citoplasmática de HA y/o NA de A/Indonesia/5/05 se fusiona a una proteína de un agente infeccioso.

En otra realización, el dominio transmembrana y/o la cola citoplasmática de la HA de la gripe y/o NA de la gripe fusionado a una proteína de un agente infeccioso comprende una secuencia espaciadora entre los segmentos de proteínas. Dichas secuencias espaciales pueden ser cualquier aminoácido que no esté en la proteína. Esta secuencia espaciadora puede ser importante para la expresión de dicha proteína a partir de un agente infeccioso en la superficie de la VLP. Ejemplos de secuencias espaciadoras incluyen aminoácidos poli-G. Dicho espaciador puede tener de 1 a aproximadamente 100 aminoácidos de longitud.

Las VLP producidas de acuerdo con la invención pueden comprender más de una proteína de un agente infeccioso. En esta realización, dichas VLP son VLP multivariantes capaces de inducir una respuesta inmunitaria a varias proteínas de agentes infecciosos. En una realización, dichas VLP comprenden proteínas de al menos dos virus de la gripe diferentes. Por ejemplo dichas VLP multivariantes pueden comprender una HA y/o NA de un virus de la gripe estacional A y/o B. Esta realización también comprende la presentación de HA y/o NA de los tres virus de la gripe (dos subtipos de virus de la gripe A y el virus de la gripe B) que son elegidos por la OMS y el CDC (véase anteriormente) para que estén en las vacunas contra la gripe para el otoño y el invierno en una sola VLP. En otra realización, dichas VLP multivariantes comprenden proteínas de varios virus, bacterias y/o parásitos. Por ejemplo, dichas VLP comprenden las proteínas de la gripe y el VSR, gripe, VSR y parainfluenza. Otra realización, dichas proteínas son proteínas quiméricas en las que cada proteína comprende la HA y/o NA de un virus de la gripe. En una realización de acuerdo con la presente invención, dichas VLP multivalentes comprenden una proteína M1 A/Indonesia/5/05 y HA y/o NA de la gripe estacional.

También se describen en el presente documento VLP que comprenden proteínas quiméricas que comprenden una fusión entre la HA de la gripe con la proteína, o una porción de la misma, de un agente infeccioso. En otra realización, dichas proteínas quiméricas comprenden una fusión entre las proteínas, o una porción de la misma, de dos agentes infecciosos o variaciones antigénicas del mismo agente. Dicha proteína de fusión comprenderá agentes antigénicos de cada proteína a partir de dicho agente infeccioso. En otra realización, dicha proteína quimérica comprende un enlazador de aminoácidos entre las proteínas. Un ejemplo de esta forma de realización es una fusión entre la HA de la gripe y la proteína F de VSR. Un ejemplo de esta forma de realización es una fusión entre la HA de la gripe y la proteína F1 de VSR (por ejemplo, SEC ID N° 12). En otra realización, dicha proteína quimérica comprende el dominio transmembrana y/o citoplasmático de HA y/o NA de un virus de la gripe aviar. En otra realización, dichas VLP multivalentes comprenden una proteína M1 de la gripe aviar. En otra realización, dicho la gripe aviar es A/Indonesia/5/05.

Otra realización de la invención, los genes quiméricos (como se ha descrito anteriormente), que pueden estar optimizados por codones, se sintetizan y se clonan a través de una serie de etapas una construcción de bácmido seguido del rescate del baculovirus recombinante mediante aislamiento de placas y análisis de expresión. Las VLP para cada uno de estos objetivos pueden rescatarse mediante coinfección con el uso de dos baculovirus recombinantes (1) que expresan la M1 aviar y (2) que expresan la proteína quimérica de un agente infeccioso (por ejemplo, VZV, VSR, Dengue, fiebre amarilla) con dominio citoplásmico y/o transmembrana de HA y/o NA de un virus de la gripe estacional y/o aviar. En otra realización, las VLP pueden rescatarse mediante infección con el uso de un baculovirus recombinante que expresa la M1 aviar y la proteína quimérica de un agente infeccioso (por ejemplo, VZV, VSR, dengue, fiebre amarilla) con dominio citoplásmico y transmembrana de HA y/o NA de la gripe.

Los agentes infecciosos pueden ser virus, bacterias, hongos y/o parásitos. Una proteína que puede expresarse en la superficie de VLP quiméricas de la invención puede derivarse de virus, bacterias, hongos y/o parásitos. En otras realizaciones, las proteínas expresadas en la superficie de dichas VLP quiméricas pueden ser antígenos tumorales o de cáncer. Las proteínas derivadas de virus, bacterias, hongos y/o parásitos pueden inducir una respuesta inmunitaria (celular y/o humoral) en un vertebrado que prevendrá, tratarán, controlarán y/o mejorarán una enfermedad infecciosa en dicho vertebrado.

Los ejemplos no limitantes de virus del que dichas proteínas del agente infeccioso pueden derivar de son los siguientes: coronavirus (por ejemplo, el agente que causa SADRA), virus de la hepatitis A, B, C, D y E3, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del herpes 1, 2, 6 y 7, citomegalovirus, varicela zóster, virus del papiloma, virus Epstein Barr, virus de parainfluenza, virus respiratorio sincitial (VRS), metapneumovirus humano, adenovirus, virus bunya (por ejemplo virus hanta), virus coxsackie, picorna virus, rotavirus, rinovirus, virus de la rubéola, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la polio (varios tipos), virus adeno (varios tipos), virus de parainfluenza (varios tipos), la gripe aviar (de varios tipos), virus de la fiebre del transporte, encefalomielitis equina occidental y oriental, encefalomielitis japonesa, viruela aviar, virus de la rabia, virus cerebrales lentos, virus del sarcoma de Rous, Papovaviridae, Parvoviridae, Picomaviridae, Poxviridae (tales como viruela o vaccinia), Reoviridae (por ejemplo, Rotavirus), Retroviridae (HTLV-I, HTLV-II, Lentivirus), Togaviridae (por ejemplo, Rubivirus), irus de la enfermedad de Newcastle, virus de la fiebre del Nilo Occidental, encefalitis transmitida por garrapatas, fiebre amarilla, virus chikungunya y virus del dengue (todos los serotipos).

En otra realización, las proteínas específicas de virus pueden comprender: HA y/o NA del virus de la gripe (incluida aviar), proteína S de coronavirus, gp160, gp140 y/o gp41 del VIH, gp I a IV y Vp de varicela zóster, E y preM/M del virus de la fiebre amarilla, Dengue (todos los serotipos) o cualquier flavivirus. También se incluyen cualquiera de las proteínas de un virus que puede inducir una respuesta inmunitaria (celular y/o humoral) en un vertebrado que puede prevenir, tratar, controlar y/o mejorar una enfermedad infecciosa en dicho vertebrado.

Ejemplos no limitantes de bacterias del que dichas proteínas del agente infeccioso pueden derivar de son los siguientes: *B. pertussis*, *Leptospira pomona*, *S. paratyphi* A y B, *C. diphtheriae*, *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. fesi* y otras bacterias de gangrena gaseosa, *B. anthracis*, *P. pestis*, *P. multocida*, *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Hemophilus influenzae*, Actinomyces (por ejemplo, Norcardia), Acinetobacter, Bacillaceae (por ejemplo, *Bacillus anthracis*), Bacteroides (por ejemplo, *Bacteroides fragilis*), Blastomycosis, Bordetella, Borrelia (por ejemplo, *Borrelia burgdorferi*), Brucella, Campylobacter, Chlamydia, Coccidioides, Corynebacterium (por ejemplo, *Corynebacterium diphtheriae*), *E. coli* (por ejemplo, Enterotoxigenic *E. coli* and Enterohemorrhagic *E. coli*), Enterobacter (por ejemplo, *Enterobacter aerogenes*), Enterobacteriaceae (Klebsiella, Salmonella (por ejemplo, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, Serratia, Yersinia, Shigella), Erysipelothrix, Haemophilus (por ejemplo, *Haemophilus influenzae* type B), Helicobacter, Legionella (por ejemplo, *Legionella pneumophila*), Leptospira, Listeria (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*), Mycoplasma, Mycobacterium (por ejemplo, *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis*), Vibrio (por ejemplo, *Vibrio cholerae*), Pasteurellaceae, Proteus, Pseudomonas (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*), Rickettsiaceae, Spirochetes (por ejemplo, Treponema spp., Leptospira spp., Borrelia spp.), Shigella spp., Meningococcus, Pneumococcus and Streptococcus (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae* y los estreptococos de los Grupos A, B, C), Ureaplasmas. *Treponema pallidum*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella haemolytica*, toxoide de *Corynebacterium diphtheriae*, polisacárido meningocócico, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, toxoide de *Clostridium tetani* y *Mycobacterium bovis*.

Ejemplos no limitantes de parásitos del que dichas proteínas del agente infeccioso pueden derivar de son los siguientes: leishmaniasis (*Leishmania tropica mexicana*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania aethiops*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania chagasi*), tripanosomiasis (*Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*), toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*), esquistosomiasis (*Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma intercalatum*), malaria (*Plasmodium virax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*) Amebiasis (*Entamoeba histolytica*), Babesiosis (*Babesiosis microti*), Criptosporidiosis (*Cryptosporidium parvum*), Dientamoebiasis (*Dientamoeba fragilis*), Giardiasis (*Giardia lamblia*), helmintiasis y Trichomonas (*Trichomonas vaginalis*).

Ejemplos no limitantes de hongos del que dichas glicoproteínas pueden derivar de son los siguientes: Absidia (por ejemplo, *Absidia corymbifera*), Ajellomyces (por ejemplo, *Ajellomyces capsulatus*, *Ajellomyces dermatitidis*), Arthroderma (por ejemplo, *Arthroderma benhamiae*, *Arthroderma fulvum*, *Arthroderma gypseum*, *Arthroderma incurvatum*, *Arthroderma otae*, *Arthroderma vanbreuseghemii*), Aspergillus (por ejemplo, *Aspergillus fumigatus*,
 5 *Aspergillus niger*), Candida (por ejemplo, *Candida albicans*, *Candida albicans* var. *stellatoidea*, *Candida dublinensis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*), *Candida krusei* (*Issatschenkia orientalis*), *Candida parapsilosis*, *Candida pelliculosa* (*Pichia anomala*), *Candida tropicalis*), Coccidioides (por ejemplo, *Coccidioides immitis*), Cryptococcus (por ejemplo, *Cryptococcus neoformans* (*Filobasidiella neoformans*), Histoplasma (por ejemplo, *Histoplasma capsulatum* (*Ajellomyces capsulatus*), Microsporium (por ejemplo, *Microsporium canis*
 10 (*Arthroderma otae*), *Microsporium fulvum* (*Arthroderma fulvum*), *Microsporium gypseum*, Genus Pichia (por ejemplo, *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*), Pneumocystis (por ejemplo, *Pneumocystis jirovecii*), Cryptosporidium, *Malassezia furfur*, Paracoccidioides.

Las listas anteriores pretenden ser ilustrativas y de ningún modo pretenden limitar la invención a dichos organismos bacterianos, virales o parasitarias en particular.
 15

La invención también abarca variantes de dicha proteínas expresadas sobre o en las VLP quiméricas de la invención. Las variantes pueden contener alteraciones en las secuencias de aminoácidos de las proteínas constituyentes. El término "variante" con respecto a una proteína se refiere a una secuencia de aminoácidos que
 20 está alterada por uno o más aminoácidos con respecto a una secuencia de referencia. La variante puede tener cambios "conservadores", en los que un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, sustitución de leucina por isoleucina. Como alternativa, una variante puede tener cambios "no conservadores", por ejemplo la sustitución de una glicina con un triptófano. Variaciones minoritarias análogas también pueden incluir deleciones o inserciones de aminoácidos, o ambas. Las Guías para determinar qué restos de
 25 aminoácidos pueden sustituirse, insertarse o eliminarse sin eliminar la actividad biológica o inmunológica se pueden encontrar usando programas de ordenador bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el software DNASTAR.

Las variantes naturales pueden ocurrir debido a mutaciones en las proteínas. Estas mutaciones pueden conducir a variabilidad antigénica dentro de los grupos individuales de los agentes infecciosos, por ejemplo la gripe. Por lo
 30 tanto, una persona infectada con una cepa de la gripe desarrolla anticuerpos contra ese virus, como aparecen nuevas cepas de virus, los anticuerpos contra las cepas anteriores ya no reconocen el virus más nuevo y se puede producir reinfección. La invención abarca toda la variabilidad antigénica y genética de las proteínas de agentes infecciosos para hacer VLP quiméricas.

Los textos generales que describen las técnicas de biología molecular, que son aplicables a la presente invención, tales como clonación, mutación, cultivo de células y similares, incluyen Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning
 35 Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Sambrook et al., Molecular Cloning--A Laboratory Manual (3ª Ed.), Vol. 1 - 3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 2000 ("Sambrook") y Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a
 40 joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., ("Ausubel"). Estos textos describen mutagénesis, el uso de vectores, promotores y muchos otros temas relevantes relacionados con, por ejemplo, la clonación y la mutación de HA, NA y/o proteínas de agentes infecciosos, etc. Por lo tanto, la invención también abarca el uso de métodos conocidos de ingeniería de proteínas y tecnología de ADN recombinante para
 45 mejorar o alterar las características de las proteínas expresadas sobre o en las VLP de la invención. Varios tipos de mutagénesis se pueden utilizar para producir y/o aislar ácidos nucleicos variantes que codifican para moléculas de proteína y/o para modificar aún más / mutar las proteínas en o sobre las VLP de la invención. Incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis puntual aleatoria dirigida al sitio, recombinación homóloga (barajado de ADN), mutagénesis usando plantillas que contienen uracilo, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, mutagénesis de ADN modificado con fosforotioato, mutagénesis utilizando ADN dúplex con huecos o similares. Métodos adecuados adicionales
 50 incluyen reparación de apareamientos erróneos puntuales, mutagénesis usando cepas hospedadoras de reparación deficiente, selección - restricción y restricción-purificación, mutagénesis deleción, mutagénesis por síntesis total de genes, reparación de rotura de doble hebra y similares. La mutagénesis, por ejemplo, que implica construcciones quiméricas, también se incluye en la presente invención. En una realización, la mutagénesis puede guiarse mediante información conocida de la molécula de origen natural o la molécula alterada o mutada de forma natural, por
 55 ejemplo, secuencia, comparaciones de secuencias, propiedades físicas, estructura cristalina o similares.

La invención comprende además variantes de proteínas que muestran actividad biológica sustancial, por ejemplo, capaces de inducir una respuesta de anticuerpos eficaz cuando se expresa sobre o en las VLP de la invención. Dichas variantes incluyen deleciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones seleccionadas de
 60 acuerdo con normas generales conocidas en la técnica de un modo que tengan poco efecto sobre la actividad.

Los métodos de clonación dichas proteínas se conocen en la técnica. Por ejemplo, el gen que codifica una proteína específica del virus puede aislarse mediante RT-PCR a partir del ARNm poliadenilado extraído de células que
 65 habían sido infectadas con un virus (virus ADN o ARN) o PCR a partir de células que habían sido infectadas con un virus de ADN. El gen producto resultante puede clonarse como un inserto de ADN en un vector. El término "vector" se refiere al medio por el cual se puede propagar un ácido nucleico y/o transferir entre organismos, células, o

componentes celulares. Los vectores incluyen plásmidos, virus, bacteriófagos, provirus, fagemidos, transposones, cromosomas artificiales, y similares, que se replican de forma autónoma o pueden integrarse en un cromosoma de una célula hospedadora. Un vector también puede ser un polinucleótido de ARN desnudo, un polinucleótido de ADN desnudo, un polinucleótido compuesto por ADN y ARN dentro de la misma cadena, un ADN o ARN conjugado con poli-lisina, un ADN o ARN conjugado con un péptido, un ADN conjugado con un liposoma, o similares, que no se replica de forma autónoma. En muchas, pero no en todas, las realizaciones habituales, los vectores de la presente invención son plásmidos o bácidos.

Por lo tanto, en el presente documento se describen nucleótidos que codifican proteínas, incluyendo moléculas quiméricas, clonadas en un vector de expresión que puede expresarse en una célula que induce la formación de VLP de la invención. Un "vector de expresión" es un vector, tal como un plásmido, que es capaz de estimular la expresión, así como la replicación, de un ácido nucleico incorporado en el mismo. Normalmente, el ácido nucleico que se va a expresar está "unido operativamente" a un promotor y/o potenciador, y está sujeto a control regulador de la transcripción por el promotor y/o potenciador. En una realización, dichos nucleótidos codifican para una proteína y/o proteína quimérica de gripe no aviar (como se ha tratado anteriormente). En otra realización, dicho vector comprende los nucleótidos que codifican una proteína y/o proteína quimérica de la gripe no aviar y la M1 de la gripe aviar. En otra realización, dicho vector comprende los nucleótidos que codifican una proteína quimérica que comprende el dominio citoplasmático y/o transmembrana de HA y/o NA de la proteína de la gripe aviar y/o estacional. En otra realización, dichas HA y/o NA de gripe estacional proceden de la cepa de la gripe A / Wisconsin / 67/2005 y dichas HA y/o NA de la gripe aviar proceden de la cepa de la gripe A / Indonesia / 5/05. En otra realización, dicho vector comprende los nucleótidos que codifican M1 de la cepa de la gripe A / Indonesia / 5/05 y una proteína quimérica que comprende el dominio citoplasmático y/o transmembrana de HA y/o NA de A/Wisconsin/67/2005 (gripe estacional). En otra realización, dicho vector comprende los nucleótidos que codifican M1 de la cepa de la gripe A / Indonesia / 5/05 y una proteína quimérica que comprende el dominio citoplasmático y/o transmembrana de HA y/o NA de A/Indonesia/5/05 (gripe aviar).

En algunas realizaciones, dichas proteínas pueden comprender mutaciones que contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o supresiones silenciosas, pero no alteran las propiedades o actividades de la proteína codificada o cómo se hacen las proteínas. Las variantes nucleotídicas se pueden producir por diversas razones, por ejemplo para optimizar la expresión de codones para un hospedador concreto (cambio de codones en el ARNm humano a los preferidos por células de insecto tales como células Sf9). Véase la publicación de patente de EE.UU. 2005/0118191.

Además, los nucleótidos pueden ser secuenciados para asegurar que las regiones de codificación correctas se habían clonado y que no contienen mutaciones no deseadas. Los nucleótidos pueden ser subclonados en un vector de expresión (por ejemplo, baculovirus) para la expresión en cualquier célula. Lo anterior es solo un ejemplo de cómo las proteínas de la gripe (incluidas las proteínas quiméricas) pueden clonarse. Un experto en la técnica entiende que existen métodos adicionales y que son posibles.

La solicitud también describe construcciones y/o vectores que comprenden nucleótidos que codifican las proteínas M1 de la gripe aviar y no aviar y/o proteínas quiméricas (como se ha descrito anteriormente). Las construcciones y/o vectores que comprenden las proteínas M1 de la gripe aviar y no aviar y/o proteínas quiméricas, deberían unirse operativamente a un promotor apropiado, tal como el promotor de la polihedrina de AcMNPV (u otro baculovirus), el PL del fago lambda, el lac de *E. coli*, los promotores *phoA* y *tac*, los promotores de temprano y tardío de SV40, y los promotores de LTR retrovirales son ejemplos no limitantes. Otros promotores adecuados serán conocidos por el experto en la técnica dependiendo de la célula hospedadora y/o la tasa de expresión deseada. Las construcciones de expresión contendrán además sitios para el inicio y la terminación de la transcripción, y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción de codificación de los transcritos expresados por las construcciones incluirá, preferentemente, un codón de iniciación de la traducción al comienzo y un codón de terminación colocado adecuadamente al final del polipéptido que se va a traducir.

Los vectores de expresión incluirán, preferentemente, al menos un marcador seleccionable. Dichos marcadores incluyen resistencia a dihidrofolato reductasa, G418 o neomicina para cultivos celulares eucariotas y genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para cultivos en *E. coli* y otras bacterias. Entre los vectores preferidos se encuentran los vectores de virus, tales como baculovirus, poxvirus (por ejemplo, virus vaccinia, virus de la viruela aviar, virus de la viruela del canario, el virus de la viruela aviar, virus del mapache, virus de la viruela porcina, etc.), adenovirus (por ejemplo, adenovirus canino), herpesvirus y retrovirus. Otros vectores que se pueden utilizar con la invención comprenden vectores para uso en bacterias, que comprenden pQE70, pQE60 y pQE-9, vectores pBluescript, vectores Phagescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5. Entre los vectores eucarióticos preferidos están pFastBac1 pWINEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG, pSVK3, pBPV, pMSG, y pSVL. Para el experto en la técnica serán evidentes otros vectores adecuados.

A continuación, las construcciones recombinantes mencionadas anteriormente podrían usarse para transfectar, infectar, o transformar y pueden expresar M1 aviar y una proteína la gripe no aviar y/o proteínas quiméricas, en células eucarióticas y/o células procariotas. Por lo tanto, las células hospedadoras pueden comprender un vector (o vectores) que contienen ácidos nucleicos que codifican la proteína M1 y las proteínas quiméricas aviares, y permitir

la expresión de dichas construcciones en dicha célula hospedadora en condiciones que permiten la formación de VLP.

5 Entre las células hospedadoras eucarióticas se encuentran células de levadura, de insecto aviar, de planta, *C. elegans* (o nematodo) y las células hospedadoras de mamífero. Ejemplos no limitantes de células de insecto son células de *Spodoptera frugiperda* (Sf), por ejemplo Sf9, Sf21, células de *Trichoplusia ni* por ejemplo, células High Five y células *Drosophila* S2. Ejemplos de hongos (incluidas levaduras) células hospedadoras son: *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*), species of *Candida* including *C. albicans* y *C. glabrata*, *Aspergillus nidulans*, *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), *Pichia pastoris*, y *Yarrowia lipolytica*. Ejemplos de células de mamífero

10 son células COS, células de riñón de hámster bebé, células L de ratón, células LNCaP, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (HEK), y células de mono verde africano, células CVL, células HeLa, células MDCK, células Vero y Hep-2. Oocitos de *Xenopus laevis*, u otras células de origen anfibio, también se pueden utilizar. Las células hospedadoras procariontas incluyen células bacterianas, por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*, y micobacterias. También se pueden usar Oocitos de *Xenopus laevis*, u otras células de origen anfibio. Las células

15 hospedadoras procariontas incluyen células bacterianas, por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*, y *mycobacteria*.

Los vectores, por ejemplo, vectores que comprenden polinucleótidos de M1 de la gripe aviar y las proteínas no aviares y/o proteínas quiméricas, se pueden transfectar en células hospedadoras de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la introducción de ácidos nucleicos en células eucariotas puede ser por

20 coprecipitación en fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección, y transfección empleando reactivos de transfección de poliamina. En una realización, dicho vector es un baculovirus recombinante. En otra realización, dicho baculovirus recombinante se transfecta en una célula eucariota. En una realización preferida, dicha célula es una célula de insecto. En otra realización, dicha célula de insecto es una célula Sf9.

25 En otra realización, dicho vector y/o célula hospedadora comprenden nucleótidos que codifican M1 aviar y proteínas quiméricas y/o proteínas de la gripe no aviar. En otra realización, dicho vector y/o célula hospedadora consiste esencialmente en M1 aviar y proteínas quiméricas y/o proteínas de la gripe no aviar. En una realización adicional, dicho vector y/o célula hospedadora consiste en M1 aviar y proteínas quiméricas y/o proteínas de la gripe no aviar. Estos vectores y/o células hospedadoras contienen M1 y proteínas de la gripe no aviar y/o proteínas quiméricas, y

30 pueden contener marcadores adicionales, tales como un origen de replicación, marcadores de selección, etc.

La invención también proporciona métodos que aumentarán aún más la eficiencia de la producción de VLP. Por ejemplo, la adición de secuencias líder para la M1 aviar y las proteínas de la gripe no aviar y/o proteínas quiméricas puede mejorar la eficiencia del transporte de proteínas dentro de la célula. Por ejemplo, una secuencia señal

35 heteróloga puede fusionarse con M1 aviar y las proteínas de la gripe no aviar y/o proteínas quiméricas. En una realización, la secuencia señal puede derivar del gen de una preproteína de insectos y fusionarse a la M1 aviar y las proteínas de la gripe no aviar y/o proteínas quiméricas. En otra realización, el péptido señal es la secuencia señal de quitinasa, que funciona de manera eficiente en sistemas de expresión de baculovirus.

40 La invención también comprende un método para aumentar la eficiencia de la producción de VLP quiméricas que comprenden expresar una M1 de la gripe aviar y HA y/o NA de la gripe estacional. En una realización, dicha HA o NA tienen actividad hemaglutinina o neuraminidasa, respectivamente. Dicha M1 procede de la cepa de la gripe A / Indonesia / 5/05. En una realización, dichas HA y/o NA proceden de la cepa de la gripe A / Wisconsin / 67/2005.

45 En otra realización de la invención, el aumento en la producción de VLP, para VLP quiméricas o no quiméricas, es de aproximadamente 2 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 8 veces, aproximadamente 16 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 25 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 35 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 45 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 55 veces, aproximadamente 60 veces, aproximadamente 65 veces, aproximadamente 70 veces, aproximadamente 75 veces,

50 aproximadamente 80 veces, aproximadamente 85 veces, aproximadamente 90 veces, alrededor de 95 veces, aproximadamente 100 veces, o más cuando se compara con la producción de VLP que comprende una proteína M1 de la gripe no aviar en condiciones similares, por ejemplo la M1 de la gripe estacional. En una realización, la eficiencia de la producción de VLP de la gripe está aumentando en aproximadamente un 10 %, aproximadamente el 20 % sobre 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 % sobre 60 %, aproximadamente el 70 % sobre 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 100 %, alrededor de 150 %, aproximadamente el 200 %,

55 aproximadamente el 250 %, aproximadamente el 300 %, aproximadamente el 350 %, aproximadamente el 400 %, aproximadamente el 450 %, aproximadamente el 500 %, aproximadamente el 550 %, aproximadamente el 600 %, aproximadamente el 650 %, aproximadamente el 700 %, aproximadamente 750 %, aproximadamente 800 %, aproximadamente 850 %, aproximadamente 900 %, aproximadamente 950 %, aproximadamente 1000 % en comparación con la producción de VLP que comprende la proteína M1 de la gripe no aviar en condiciones similares. Una M1 preferida procede de A / Indonesia / 5/05 (SEC ID N° 3).

60

La invención también proporciona métodos para la producción de VLP, comprendiendo dichos procedimientos expresar una M1 aviar de acuerdo con las reivindicaciones y HA y/o NA estacional en condiciones que permiten la

65 formación de VLP. Dependiendo de la célula sistema de expresión y de la célula hospedadora seleccionada, las VLP se producen por el crecimiento de células hospedadoras transformadas por un vector de expresión en condiciones

en las que las proteínas recombinantes, incluidas la M1 aviar y la NA y HA estacional se expresan y se forman VLP. La selección de las condiciones de crecimiento adecuadas está dentro de la habilidad o una persona con habilidad de un experto ordinario en la técnica.

5 Los métodos para hacer crecer células diseñadas para producir VLP de la invención incluyen, pero no se limitan a, por lotes, por lotes con alimentación continua, técnicas de cultivo celular de perfusión continua alimentación
 10 continua. El cultivo celular significa el crecimiento y propagación de células en un biorreactor (una cámara de fermentación) donde las células se propagan y expresa la proteína (por ejemplo, proteínas recombinantes) para la purificación y el aislamiento. Normalmente, el cultivo celular se realiza en condiciones estériles de temperatura y
 15 atmosféricas controladas en un biorreactor. Un biorreactor es una cámara utilizada para cultivar células en el que las condiciones ambientales, tales como temperatura, atmósfera, agitación y/o pH, se pueden controlar. En una realización, dicho biorreactor es una cámara de acero inoxidable. En otra realización, dicho biorreactor es una bolsa de plástico preesterilizada (por ejemplo, Cellbag®, Wave Biotech, Bridgewater, NJ). En otra realización, dichas bolsas de plástico preesterilizados son alrededor bolsas de aproximadamente 50 l a 1.000 l.

Después, las VLP se aíslan utilizando métodos que conservan la integridad de las mismas, tales como por centrifugación en gradiente, por ejemplo, cloruro de cesio, sacarosa y yodixanol, así como técnicas de purificación estándar, incluyendo, por ejemplo, intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel.

20 El siguiente es un ejemplo de cómo se pueden fabricar, aislar y purificar las VLP de la invención. Normalmente, las VLP se produce a partir de líneas celulares recombinantes diseñadas mediante ingeniería genética para crear una VLP cuando dichas células se cultivan en cultivo celular (véase anteriormente). Un experto en la técnica entendería que existen métodos adicionales que pueden usarse para fabricar y purificar VLP de la invención, por lo tanto la invención no se limita al método descrito.

25 La producción de VLP de la invención se puede iniciar sembrando células Sf9 (no infectadas) en matraces de agitación, permitiendo que las células se expandan y aumentando a medida que las células crecen y se multiplican (por ejemplo, de un matraz de 125 ml a una bolsa Wave 50 l). El medio usado para cultivar la célula está formulado para la línea celular apropiada (medio libre de suero preferentemente, por ejemplo, medio para insectos ExCell-420, JRH). A continuación, dichas células están infectadas con el baculovirus recombinante a la multiplicidad de infección más eficiente (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 unidades formadoras de placas por célula). Una vez se ha producido la infección, la M1 de la gripe aviar y al menos una proteína heteróloga la gripe aviar se expresan a partir del genoma del virus, se autoensamblan en VLP y se secretan a partir de las células de aproximadamente 24 a 72 horas después de la infección. Por lo general, la infección es más eficiente cuando las células están en fase semilogarítmica de crecimiento ($4-8 \times 10^6$ células / ml) y al menos aproximadamente el 90 % es viable.

30 Las VLP de la invención pueden cosecharse aproximadamente a de 48 a 96 horas después de la infección, cuando los niveles de VLP en el medio de cultivo celular están cerca del máximo, pero antes de la extensa lisis celular. La densidad de las células Sf9 y la viabilidad en el momento de la cosecha puede ser de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células / ml a aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células / ml con una viabilidad al menos un 20 %, como se muestra mediante el ensayo de exclusión del colorante. A continuación, se retira y se aclara el medio. Se puede añadir NaCl al medio hasta una concentración de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1,0 M, preferentemente a aproximadamente 0,5 M, para evitar la agregación de VLP. La eliminación de las células y los desechos celulares del medio de cultivo celular que contiene VLP de la invención puede llevarse a cabo mediante filtración de flujo tangencial (TFF) con fibra hueca preesterilizada de un solo uso de 0,5 o 1,00 μm de cartucho de filtro o un dispositivo similar.

45 A continuación, las VLP en el medio de cultivo clarificado se pueden concentrar por ultrafiltración utilizando un cartucho de fibra hueca preesterilizado con un valor de corte del peso molecular de 500.000. Las VLP concentradas pueden diafiltrarse contra 10 volúmenes de pH 7,0 a 8,0 con solución salina taponada con fosfato (PBS) que contiene NaCl 0,5 M para eliminar los componentes del medio residuales.

50 Las VLP concentradas y diafiltradas pueden purificarse adicionalmente en un 20 % a 60 % de gradiente de sacarosa discontinuo a pH 7,2 con PBS con NaCl 0,5 M por centrifugación a 6.500 xg durante 18 horas a aproximadamente 4 °C a aproximadamente 10 °C. Por lo general, las VLP formarán una banda visible distintiva entre aproximadamente 30 % a aproximadamente 40 % de sacarosa o en la interfaz (en una etapa de gradiente de 20 % y 60 %) que se puede recoger a partir del gradiente y almacenar. Este producto se puede diluir a comprender NaCl 200 mM en preparación para la siguiente etapa en el proceso de purificación. Este producto contiene VLP y puede contener partículas de baculovirus intactas.

60 La purificación adicional de las VLP se puede lograr mediante cromatografía de intercambio aniónico, o centrifugación colchón de sacarosa isopícnica al 44 %. En la cromatografía de intercambio aniónico, la muestra del gradiente de sacarosa (véase anteriormente) se carga en la columna que contiene un medio con un anión (por ejemplo, Matrix Fractogel EMD TMAE) y se eluye a través de un gradiente de sal (de aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 1,0 M de NaCl) que se puede separar la VLP a partir de otros contaminantes (por ejemplo,

5 baculovirus y ADN / ARN). En el método del colchón de sacarosa, se añade la muestra que comprende las VLP a un colchón de sacarosa al 44 % y se centrifuga durante aproximadamente 18 horas a 30.000 g. Las VLP forman una banda en la parte superior del 44 % de sacarosa, mientras que el baculovirus precipitados en la parte inferior y otras proteínas contaminantes permanecen en la capa de sacarosa 0 % en la parte superior. Se recoge el pico o banda de la VLP.

10 Los baculovirus intactos se pueden inactivar, si se desea. La inactivación se puede realizar por métodos químicos, por ejemplo, formalina o β -propil-lactona (BPL). La eliminación y/o inactivación de baculovirus intactos se puede realizar también en gran medida mediante el uso de métodos selectivos de precipitación y cromatográficos conocidos en la técnica, como se ha ilustrado anteriormente. Los métodos de inactivación comprenden incubar la muestra que contiene las VLP en 0,2 % de BPL durante 3 horas a aproximadamente 25 °C a aproximadamente 27 °C. Los baculovirus también pueden inactivarse mediante la incubación de la muestra que contiene las VLP a 0,05 % de BPL a 4 °C durante 3 días y después a 37 °C durante una hora.

15 Después de la etapa inactivación / eliminación, el producto que comprenden VLP puede pasarse a través de otra etapa de diafiltración para eliminar cualquier reactivo de la etapa de inactivación y/o cualquier sacarosa residual, y colocar las VLP en el tampón deseado (por ejemplo, PBS). La solución que comprende VLP se puede esterilizar por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, filtración estéril) y se almacena en el refrigerador o congelador.

20 Las técnicas anteriores se pueden poner en práctica en varias escalas. Por ejemplo, matraces T, matraces de agitación, botellas rotatorias, hasta biorreactores de tamaño industrial. Los biorreactores pueden comprender un tanque de acero inoxidable o una bolsa de plástico preesterilizada (por ejemplo, el sistema vendido por Wave Biotech, Bridgewater, NJ). Un experto en la técnica sabrá lo que es más deseable para sus propósitos.

25 La expansión y la producción de vectores de expresión de baculovirus y la infección de las células con baculovirus recombinantes para producir VLP de la gripe recombinantes se puede lograr en células de insecto, por ejemplo células de insectos Sf9, como se ha descrito anteriormente. En una realización preferida, las células son Sf9 infectadas con baculovirus recombinantes diseñados por ingeniería genética para producir VLP de la invención.

30 **Formulaciones farmacéuticas o de vacuna y administración**

La solicitud también describe una formulación antigénica que comprende una VLP quimérica que comprende una proteína M1 de la gripe aviar y al menos una proteína de la gripe no aviar. En una realización, dicha VLP comprende HA y/o NA de un virus de la gripe no aviar. En otra realización, dicha HA o NA tienen actividad hemaglutinina o neuraminidasa, respectivamente. En otra realización, dichas HA y/o NA son proteínas quiméricas. En otra realización, dichas proteínas quiméricas comprenden secuencias de dominios externos de las proteínas HA y/o NA de la gripe no aviar fusionadas a los dominios terminales transmembrana y/o citoplásmicos de la HA aviar y región citoplásmica de NA. En otra realización, dichas HA y/o NA de la gripe no aviar proceden de la cepa de la gripe A / Wisconsin / 67/2005 y dichas HA y/o NA de la gripe aviar proceden de la cepa de gripe A / Indonesia / 5/05. En otra realización, dicha M1 es de la cepa de gripe A/Indonesia/5/05. En otra realización, dichas HA y/o NA proceden de la cepa de la gripe A/Wisconsin/67/2005.

45 La solicitud también describe una vacuna que comprende una VLP quimérica que comprende una proteína M1 de la gripe aviar y al menos una proteína de la gripe no aviar. En una realización, dicha VLP comprende HA y/o NA de un virus de la gripe no aviar. En otra realización, dicha HA o NA tienen actividad hemaglutinina o neuraminidasa, respectivamente. En otra realización, dichas HA y/o NA son proteínas quiméricas. En otra realización, dichas proteínas quiméricas comprenden secuencias de dominios externos de las proteínas HA y/o NA de la gripe no aviar fusionadas a los dominios terminales transmembrana y/o citoplásmicos de la HA aviar y región citoplásmica de NA. En otra realización, dichas HA y/o NA de la gripe no aviar proceden de la cepa de la gripe A / Wisconsin / 67/2005 y dichas HA y/o NA de la gripe aviar proceden de la cepa de gripe A / Indonesia / 5/05. En otra realización, dicha M1 es de la cepa de gripe A/Indonesia/5/05. En otra realización, dichas HA y/o NA proceden de la cepa de la gripe A/Wisconsin/67/2005.

55 Las composiciones farmacéuticas útiles en el presente documento contienen un vehículo farmacéuticamente aceptable, incluyendo cualquier diluyente o excipiente adecuado, que incluye cualquier agente farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de una respuesta inmunitaria perjudicial para el vertebrado que recibe la composición, y que pueden administrarse sin toxicidad indebida y una VLP de la invención. Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea de EE.UU., la farmacopea europea u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. Estas composiciones pueden ser útiles como composiciones de vacuna y/o antigénicas para inducir una respuesta inmunitaria protectora en un vertebrado.

65 La solicitud también describe una formulación antigénica que comprende una VLP quimérica que comprende una proteína M1 de la gripe aviar y al menos una proteína de la gripe no aviar. En una realización, dicha VLP comprende HA y/o NA de un virus de la gripe no aviar. En otra realización, dicha HA o NA tienen actividad hemaglutinina o

neuraminidasa, respectivamente. En otra realización, dichas HA y/o NA son proteínas quiméricas. En otra realización, dichas proteínas quiméricas comprenden secuencias de dominios externos de las proteínas HA y/o NA de la gripe no aviar fusionadas a los dominios terminales transmembrana y/o citoplásmicos de la HA aviar y región citoplásmica de NA. En otra realización, dichas HA y/o NA de la gripe no aviar proceden de la cepa de la gripe A / Wisconsin / 67/2005 y dichas HA y/o NA de la gripe aviar proceden de la cepa de gripe A / Indonesia / 5/05. En otra realización, dicha M1 es de la cepa de gripe A/Indonesia/5/05. En otra realización, dichas HA y/o NA proceden de la cepa de la gripe A/Wisconsin/67/2005.

La solicitud también describe una vacuna que comprende una VLP quimérica que comprende una proteína M1 de la gripe aviar y al menos una proteína de la gripe no aviar. En una realización, dicha VLP comprende HA y/o NA de un virus de la gripe no aviar. En otra realización, dicha HA o NA tienen actividad hemaglutinina o neuraminidasa, respectivamente. En otra realización, dichas HA y/o NA son proteínas quiméricas. En otra realización, dichas proteínas quiméricas comprenden secuencias de dominios externos de las proteínas HA y/o NA de la gripe no aviar fusionadas a los dominios terminales transmembrana y/o citoplásmicos de la HA aviar y región citoplásmica de NA. En otra realización, dichas HA y/o NA de la gripe no aviar proceden de la cepa de la gripe A / Wisconsin / 67/2005 y dichas HA y / o NA de la gripe aviar proceden de la cepa de gripe A / Indonesia / 5/05. En otra realización, dicha M1 es de la cepa de gripe A/Indonesia/5/05. En otra realización, dichas HA y/o NA proceden de la cepa de la gripe A/Wisconsin/67/2005.

Dichas formulaciones comprenden una formulación que comprende VLP que comprenden una proteína M1 aviar y al menos una proteína de una proteína de la gripe no aviar (por ejemplo, una proteína de un agente infeccioso descrita anteriormente) y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, tampón acuoso isotónico estéril y combinaciones de los mismos. Una discusión minuciosa de vehículos, diluyentes y otros excipientes farmacéuticamente aceptables se presenta en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co. N.J., edición actual). La formulación debe adaptarse al modo de administración. En otra realización, la formulación es adecuada para administración a seres humanos, preferentemente es estéril, no particulada y/o apirógena.

La composición, si se desea, puede también contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes o tamponadores del pH. La composición puede ser una forma sólida, tal como un polvo liofilizado adecuado para la reconstitución, una solución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida, o polvo. La formulación oral puede incluir vehículos estándar tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

La solicitud también describe un paquete o kit farmacéutico que comprenden uno o más contenedores cargados con uno o más de los ingredientes de las formulaciones de vacuna de la invención. En una realización, el kit comprende dos recipientes, uno que contiene VLP y el otro contiene un adyuvante. En otra realización, el kit comprende dos recipientes, uno que contiene VLP liofilizadas y el otro que contiene una solución para resuspender dichas VLP. Asociados con dicho(s) envase(s) puede adjuntarse una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, en la que se refleja la aprobación de la agencia de la fabricación, uso o venta del producto para administración en seres humano.

La solicitud también prevé que la formulación de VLP se envase en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre que indique la cantidad de composición. En una realización, la composición de VLP se suministra como un líquido. En otra realización como un polvo liofilizado esterilizado en seco o un concentrado sin agua en un contenedor herméticamente sellado y se puede reconstituir, por ejemplo con agua o solución salina, en la concentración adecuada para administrar a un sujeto. En una realización, dicho recipiente comprende al menos aproximadamente 50 µg/ml, más preferentemente al menos aproximadamente 100 µg/ml, al menos aproximadamente 200 µg/ml, al menos 500 µg /ml o al menos 1 mg/ml de un antígeno asociado con las VLP de la invención.

En una realización alternativa, la composición de VLP se suministra en forma líquida en un recipiente herméticamente cerrado que indica la cantidad y la concentración de la composición de VLP. La forma líquida de la composición de VLP se suministra en un recipiente herméticamente cerrado con al menos aproximadamente 50 µg/ml, más preferentemente al menos aproximadamente 100 µg/ml, al menos aproximadamente 200 µg/ml, al menos 500 µg /ml o al menos 1 mg/ml de un antígeno asociado con las VLP de la invención.

En general, las VLP producidas de acuerdo con la invención se administran en una cantidad eficaz (como se ha definido anteriormente) suficiente para estimular una respuesta inmunitaria contra uno o más agentes infecciosos. Preferentemente, la administración de la VLP de la invención produce inmunidad contra un agente infeccioso. Normalmente, la dosis se puede ajustar dentro de este intervalo basándose en, por ejemplo, la edad, el estado físico, el peso corporal, el sexo, la dieta, el momento de la administración, y otros factores clínicos. La formulación de vacuna profiláctica se administra sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección subcutánea o intramuscular usando una aguja y una jeringa o un dispositivo de inyección sin aguja. Alternativamente, la formulación de vacuna se administra por vía intranasal, ya sea mediante gotas, aerosol de partícula grande (mayor que aproximadamente

10 micras), o aerosoles en el tracto respiratorio superior. Mientras que cualquiera de las vías anteriores de liberación da lugar a una respuesta inmunitaria, la administración intranasal confiere el beneficio añadido de provocar inmunidad de la mucosa en el sitio de entrada de muchos virus, incluyendo la gripe y el VSR.

- 5 Por lo tanto, la solicitud también describe un método de la formulación de una vacuna o composición antigénica que induce inmunidad frente a una infección o al menos un síntoma de la misma a un mamífero, que comprende la adición a dicha formulación de una dosis efectiva de VLP.

10 Los procedimientos de administrar una composición que comprende VLP (formulaciones de vacuna y/o antigénicas) incluyen, entre otros, la administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (p. ej., las vías intranasal y oral o pulmonar o mediante supositorios). En una realización específica, las composiciones de la presente invención se administran por vía intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica o intradérmica. Las composiciones se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (p. ej., mucosa oral, mucosa conjuntiva, nasofaringe, orofaringe, vagina, uretra, vejiga urinaria y mucosa intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. En algunas realizaciones, las vías de administración intranasal o por otra mucosa de una composición que comprende VLP pueden inducir un anticuerpo u otra respuesta inmunitaria que es sustancialmente mayor que otras vías de administración. En otra realización, las vías de administración intranasal u otras mucosas de una composición que comprenden las VLP pueden inducir un anticuerpo u otra respuesta inmunitaria que inducirá protección cruzada contra otras cepas u organismos que causan la infección. Por ejemplo, una VLP que comprende la proteína la gripe, cuando se administra a un vertebrado, puede inducir protección cruzada contra varias cepas de la gripe. La administración puede ser sistémica u oral.

25 En otra realización, la formulación de vacuna y/o formulación antigénica se administra de una manera tal que sea dirigida a los tejidos de la mucosa con el fin de provocar una respuesta inmunitaria en el sitio de la inmunización. Por ejemplo, los tejidos mucosos como el tejido linfoide asociado al intestino (TLAI) pueden ser el objetivo de la inmunización mediante la administración oral de composiciones que contienen adyuvantes con propiedades especialmente dirigidas a la mucosa. Los tejidos de la mucosa adicionales también pueden ser objetivos, como el tejido linfoide nasofaríngeo (TLNF) y el tejido linfoide asociado a los bronquios (TLAB).

30 Las formulaciones de vacuna y/o antigénicas también pueden administrarse según un calendario dosificación, por ejemplo, una administración inicial de la composición de vacuna con administraciones de refuerzo posteriores. En realizaciones particulares, una segunda dosis de la composición se administra en cualquier momento desde dos semanas a un año, preferentemente de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5 a aproximadamente 6 meses, después de la administración inicial. Además, se puede administrar una tercera dosis después de la segunda dosis y desde aproximadamente tres meses a aproximadamente dos años, o incluso más, preferentemente de aproximadamente 4, a aproximadamente 5 o 6 meses, o de aproximadamente 7 meses hasta aproximadamente un año después de la administración inicial. La tercera dosis se puede administrar opcionalmente cuando no se detectan niveles de inmunoglobulinas específicas en el suero y/o orina, o son muy bajos, o secreciones de la mucosa del sujeto después de la segunda dosis. En una realización preferida, se administra la segunda dosis aproximadamente un mes después de la primera administración y una tercera dosis se administra aproximadamente seis meses después de la primera administración. En otra realización, la segunda dosis se administra aproximadamente seis meses después de la primera administración. En otra realización, dichas VLP pueden administrarse como parte de una terapia de combinación. Por ejemplo, las VLP se pueden formular con otras composiciones inmunogénicas, antivirales y/o antibióticos.

50 La dosificación de la formulación farmacéutica la puede determinar fácilmente el experto en la materia, por ejemplo, mediante identificación primero de las dosis eficaces para provocar una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica, por ejemplo, midiendo el título en suero de las inmunoglobulinas específicas de virus o midiendo la relación de inhibición de los anticuerpos en muestras de suero, o en muestras de orina o en secreciones mucosas. Dichas dosis pueden determinarse a partir de estudios con animales. Una lista no limitante de los animales utilizados para estudiar la eficacia de las vacunas incluye cobayas, hámster, hurones, chinchillas, ratón y rata del algodón. La mayoría de los animales no son hospedadores naturales de los agentes infecciosos, pero aún pueden servir en los estudios de diversos aspectos de la enfermedad. Por ejemplo, a cualquiera de los animales anteriores se puede administrar un candidato a vacuna, por ejemplo, VLP, para caracterizar parcialmente la respuesta inmunitaria inducida, y/o para determinar si se ha producido algún anticuerpo neutralizante. Por ejemplo, muchos estudios se han realizado en el modelo de ratón porque los ratones son de tamaño pequeño y su bajo coste permite a los investigadores realizar estudios a mayor escala.

65 Además, se pueden realizar estudios clínicos en seres humanos para determinar la dosis efectiva recomendada para seres humanos por un experto en la materia. Tales estudios clínicos son rutinarios y bien conocidos en la técnica. La dosis precisa que se va utilizar dependerá también de la vía de administración. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo con animales o *in vitro*.

También como es bien conocido en la técnica, la inmunogenicidad de una composición concreta se puede potenciar mediante el uso de estimuladores no específicos de la respuesta inmunitaria, conocidos como adyuvantes. Los adyuvantes se han utilizado experimentalmente para promover un aumento generalizado de la inmunidad contra antígenos desconocidos (por ejemplo, patente de EE.UU. N° 4.877.611). Los protocolos de inmunización han utilizado adyuvantes para estimular las respuestas durante muchos años, y como tales, los adyuvantes son bien conocidos para un experto normal en la técnica. Algunos adyuvantes afectan a la forma en que se presentan antígenos. Por ejemplo, la respuesta inmunitaria aumenta cuando los antígenos proteicos se precipitan con alumbre. La emulsificación de antígenos también prolonga la duración de la presentación de antígenos. La inclusión de cualquier adyuvante descrito en Vogel et al., "A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2ª Edición)," se contempla dentro del alcance de esta invención.

Los ejemplos de adyuvantes preferidos incluyen adyuvante completo de Freund (un estimulador no específico de la respuesta inmunitaria que contiene *Mycobacterium tuberculosis* muertas), adyuvantes incompletos de Freund y adyuvante de hidróxido de aluminio. Otros adyuvantes comprenden GMCSP, BCG, hidróxido de aluminio, compuestos de MDP, tales como thur-MDP y nor-MDP, CGP (MTP-PE), lípido A, y monofosforil lípido A (MPL). RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, MPL, dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS) en una emulsión de 2 % de escualeno / Tween 80 también se contempla. También se puede usar antígenos Novasomes®, MHC MF-59.

En una realización, el adyuvante es una vesícula lipídica paucilamelar que tiene de aproximadamente dos a aproximadamente diez bicapas dispuestas en forma de conchas sustancialmente esféricas separadas por capas acuosas que rodean una gran cavidad central amorfa libre de bicapas lipídicas. Las vesículas lipídicas paucilamelares pueden actuar para estimular la respuesta inmunitaria de varias maneras, como estimuladores no específicos, como vehículos del antígeno, como vehículos de adyuvantes adicionales, y combinaciones de los mismos. Las vesículas lipídicas paucilamelares actúan como estimuladores inmunes no específicos cuando, por ejemplo, una vacuna se prepara entremezclando el antígeno con las vesículas preformadas de tal manera que el antígeno permanece extracelular a las vesículas. Al encapsular un antígeno dentro de la cavidad central de la vesícula, la vesícula actúa tanto como un estimulador inmunológico como un vehículo del antígeno. En otra realización, las vesículas están principalmente hechas de vesículas no fosfolipídicas. En otra realización, las vesículas son Novasomes. Las Novasomes® son vesículas paucilamelares no fosfolipídicas que varían de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 500 nm. Comprenden Brij 72, colesterol, ácido oleico y escualeno. Se han demostrado que las Novasomes son un adyuvante eficaz para los antígenos de la gripe (véanse las patentes de Estados Unidos 5.629.021, 6.387.373, y 4.911.928).

Otro método de inducir una respuesta inmunitaria se puede lograr mediante la formulación de las VLP de la invención con "estimuladores inmunes." Estos son mensajeros químicos propios del cuerpo (citocinas) para aumentar la respuesta del sistema inmune. Los estimuladores inmunitarios incluyen, entre otros, diversas citocinas, linfocinas y quimiocinas con actividades inmunoestimuladoras, inmunopotenciadoras y proinflamatorias, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); factores de crecimiento (por ejemplo, factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM) (CSF)); y otras moléculas inmunoestimuladoras, tales como el factor inflamatorio de macrófagos, el ligando Flt3, B7.1; B7.2, etc. Las moléculas inmunoestimuladoras se pueden administrar en la misma formulación que las VLP del VSR o se pueden administrar por separado. O bien la proteína o un vector de expresión que codifica la proteína pueden administrarse para producir un efecto inmunoestimulador. Por tanto, en una realización, la solicitud describe formulaciones antigénicas y de vacuna que comprenden un adyuvante y/o un estimulador inmunológico.

Por lo tanto, en el presente documento se describe una formulación que comprende una VLP quimérica que comprende un M1 aviar y al menos una proteína de la gripe no aviar (o al menos una proteína de un agente infeccioso) y adyuvante y/o un estimulador inmune. En otra realización, dichos adyuvantes son Novasomes. En otra realización, dicha formulación es adecuada para administración a seres humanos. En otra realización, la formulación se administra a un vertebrado por las vías oral, intradérmica, intranasal, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea. En otra realización, diferentes VLP quiméricas se mezclan juntas para crear una formulación multivalente. Estas VLP pueden comprender VLP de HA y/o NA de diferentes cepas de virus de la gripe (por ejemplo, gripe A y/o gripe B) o proteína de diferentes agentes infecciosos (por ejemplo, VSR, coronavirus, VIH).

Aunque se prefiere la estimulación de la inmunidad con una sola dosis, se pueden administrar dosis adicionales por la misma vía u otra diferente para lograr el efecto deseado. En neonatos y lactantes, por ejemplo, pueden ser necesarias las administraciones múltiples para provocar suficientes niveles de inmunidad. La administración puede continuar a intervalos durante la infancia, como sea necesario para mantener niveles suficientes de protección contra las infecciones. Del mismo modo, los adultos que son particularmente susceptibles a sufrir infecciones graves o repetidas, tales como, por ejemplo, los trabajadores de la salud, trabajadores de guarderías, los familiares de niños pequeños, los ancianos y las personas con función cardiopulmonar comprometida pueden requerir múltiples vacunas para establecer y/o mantener la respuesta inmunitaria protectora. Los niveles de inmunidad inducida pueden controlarse, por ejemplo, mediante la medición de cantidades de anticuerpos neutralizantes secretores y séricos, y mediante ajustes de dosis ajustadas o repetición de vacunaciones según sea necesario para obtener y mantener los niveles deseados de protección.

Métodos de estimular una respuesta inmunitaria

Como se ha mencionado anteriormente, las VLP producidas mediante la invención son útiles para la preparación de composiciones que estimulan una respuesta inmunitaria que confiere inmunidad frente a agentes infecciosos. Tanto la inmunidad mucosa como celular pueden contribuir a la inmunidad a los agentes infecciosos y a enfermedades. Los anticuerpos secretados localmente en el tracto respiratorio superior son un factor importante en la resistencia a la infección natural. La inmunoglobulina A secretora (sIgA) está implicada en la protección del tracto respiratorio superior y la IgG en suero en la protección del tracto respiratorio inferior. La respuesta inmunitaria inducida por una infección protege contra la reinfección con el mismo virus o una cepa viral antigénicamente similar. Por ejemplo, la gripe sufre cambios frecuentes e impredecibles; por lo tanto, después de la infección natural, el periodo de protección eficaz proporcionado por la inmunidad del hospedador puede ser de solo unos pocos años contra las nuevas cepas de virus que circulan en la comunidad.

Las VLP producidas por la invención pueden inducir la inmunidad en un vertebrado (por ejemplo, un ser humano) cuando se administran a dicho vertebrado. La inmunidad es el resultado de una respuesta inmunitaria contra las VLP de la invención que protege o mejora la infección o al menos reduce un síntoma de la infección en dicho vertebrado. En algunos casos, si dicho vertebrado está infectado, dicha infección será asintomática. La respuesta puede no ser una respuesta de protección total. En este caso, si dicho vertebrado está infectado con un agente infeccioso, el vertebrado experimentará reducción de los síntomas o una menor duración de los síntomas en comparación con un vertebrado no inmunizado.

La solicitud también describe un método para inducir inmunidad en un vertebrado que comprende la administración a dicho vertebrado de una VLP que comprende una proteína M1 de la gripe aviar y al menos una proteína de la gripe no aviar. En una realización, dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humoral. En otra realización, dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria celular. En otra realización, dicha proteína de la gripe aviar no es HA y/o NA de un virus de la gripe no aviar. En otra realización, dicha proteína de la gripe no aviar no es una proteína de la gripe estacional. En otra realización, dicho HA o NA tiene actividad hemaglutinina o neuraminidasa, respectivamente. En una realización, dichas HA y/o NA son proteínas quiméricas. En otra realización, dichas proteínas quiméricas comprenden secuencias de dominios externos de las proteínas HA y/o NA de la gripe no aviar fusionadas a los dominios terminales transmembrana y/o citoplásmicos de la HA aviar y región citoplásmica de NA. En otra realización, dichas HA y/o NA de la gripe no aviar proceden de la cepa de la gripe A / Wisconsin / 67/2005 y dichos dominios citoplásmico y/o transmembrana de las HA y/o NA de la gripe aviar proceden de la cepa de gripe A / Indonesia / 5/05. En otra realización, dicha M1 es de la cepa de gripe A/Indonesia/5/05. En otra realización, dichas HA y/o NA proceden de la cepa de la gripe A/Wisconsin/67/2005.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo" es una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancialmente o parcialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, delta, epsilon y mu, así como la miríada de genes de la región variable de las inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican como cadenas kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como γ , μ , α , δ , o ϵ , que, a su vez, definen las clases de inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Una unidad estructural de inmunoglobulina típica (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, en el que cada par tiene una cadena "ligera" y una cadena "pesada" (aproximadamente 50 - 70 kDa). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos mediante digestión con varias peptidasas.

En otra realización, la solicitud describe método para inducir una respuesta celular de protección frente a una infección o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis efectiva de VLP de la invención, en el que dichas VLP comprenden una proteína M1 de la gripe aviar y al menos una proteína de la gripe no aviar. La inmunidad celular también desempeña un papel en la recuperación de la infección y puede prevenir la complicación adicional y contribuir a la inmunidad a largo plazo.

Como se ha mencionado anteriormente, las VLP producidas por la invención pueden prevenir o reducir al menos un síntoma de una infección en un sujeto cuando se administra a dicho sujeto. La mayoría de los síntomas de la mayoría de las infecciones son bien conocidos en la técnica. Así, el comprende la prevención o reducción de al menos un síntoma asociado con una infección. Una reducción en un síntoma puede determinarla subjetivamente u objetivamente, por ejemplo, autoevaluación por el sujeto, mediante la evaluación de un clínico o mediante la realización de un ensayo apropiado o medición (por ejemplo, la temperatura del cuerpo), incluyendo, por ejemplo, una evaluación de calidad de vida, un retraso de la progresión de una infección o síntomas adicionales, menor gravedad de los síntomas o ensayos adecuados (por ejemplo, títulos de anticuerpos y/o ensayo de activación de células T). La evaluación objetiva comprende evaluaciones tanto en animales como en seres humanos.

La solicitud describe un método para prevenir y/o reducir una infección o síntoma de la misma que comprende la administración a dicho vertebrado de una VLP quimérica que comprende una proteína M1 de la gripe aviar y al

menos una proteína de la gripe no aviar. En una realización, dicha infección es una infección viral. En otra realización, dicha infección viral es una infección de la gripe.

5 Una estrategia para el control de enfermedades infecciosas durante un brote, por ejemplo de gripe, es la vacunación universal de los individuos sanos, incluidos los niños. Por ejemplo, la vacunación con las vacunas antigripales actuales de aproximadamente el 80 % de los escolares de una comunidad ha disminuido las enfermedades respiratorias en adultos y el exceso de muertes en ancianos (Reichert *et al.*, 2001). Este concepto se conoce como inmunidad de la comunidad o "inmunidad de grupo" y se cree que desempeña una parte importante de la protección de la comunidad contra las enfermedades. Dado que las personas vacunadas tienen anticuerpos que neutralizan y el agente infeccioso, por ejemplo, el virus de la gripe, es mucho menos probable que transmitan dicho agente a otras personas. Por lo tanto, incluso las personas que no han sido vacunados (y aquellos cuyas vacunas se han debilitado o cuyas vacunas no son plenamente eficaces) a menudo pueden estar protegidos por la inmunidad de grupo porque las personas vacunadas alrededor de ellos no están enfermando. La inmunidad de grupo es más eficaz a medida que el porcentaje de personas vacunadas aumenta. Se cree que aproximadamente el 95 % de las personas de la comunidad debe estar protegida por una vacuna para lograr la inmunidad de grupo. Las personas que no están inmunizadas aumentan la probabilidad de que ellos y otros sufran la enfermedad.

20 Por tanto, en el presente documento también se describe un método de reducción de la gravedad de una enfermedad infecciosa en una población, que comprende administrar una VLP que comprende una proteína M1 de la gripe aviar y al menos una proteína de la gripe no aviar a suficientes individuos en dicha población con el fin de prevenir o disminuir la posibilidad de transmisión a otro individuo en dicha población. En una realización, dicha enfermedad infecciosa está causada por el virus de la gripe. La solicitud también incluye un método para inducir la inmunidad a un agente infeccioso a una población o comunidad con el fin de reducir la incidencia de infecciones entre los individuos inmunocomprometidos o los individuos no vacunados administrando las VLP de la invención a una población en una comunidad. En una realización, la mayoría de los niños en edad escolar son inmunizados mediante la administración de las VLP de la invención. En otra realización, la mayoría de los individuos sanos en una comunidad se inmunizan mediante la administración de las VLP de la invención. En otra realización, las VLP de la invención son parte de una estrategia de "vacunación dinámica". ". Vacunación dinámica es la producción constante de una vacuna de baja eficacia que está relacionada con una cepa pandémica emergente, pero, debido a una deriva antigénica, puede no proporcionar una protección completa en un mamífero (véase Germann *et al.*, 2006).

Esta invención se ilustra además con los ejemplos siguientes, que no deben interpretarse como limitantes.

35 Ejemplos

Ejemplo 1

40 Expresión de VLP de gripe estacional y aviar a partir de dos vectores de baculovirus

Las proteínas M1 y HA de la gripe estacional y aviar se clonaron y expresaron en un sistema de expresión de baculovirus. En este ejemplo, la A/Indonesia/5/05 se clonó en uno de baculovirus y HA y/o NA se clonaron en otro vector de baculovirus. Ambos virus fueron coinfectados en células de insecto Sf9 y se cultivaron en condiciones que permiten la formación de VLP. Las células que comprenden HA y M1 estacional, HA y M1 o aviar o una combinación de HA y M1 estacionales y aviares se cultivaron en condiciones que permiten la formación de VLP. Las cepas de la gripe estacional utilizadas para estos experimentos fueron A/Fujian/411/2002 and A/Wisconsin/67/2005 la cepa de la gripe aviar utilizada fue A/Indonesia/5/05.

50 A continuación, se cosecharon las VLP y se aislaron partir del sobrenadante por centrifugación y por un gradiente de etapas discontinuas de sacarosa. La fracción que comprende las VLP se recogió de la parte superior del gradiente. Las VLP aisladas del gradiente de sacarosa se analizaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western. Estos datos se ilustran en las Figuras 1 y 2.

55 La figura 1 es un gel de SDS-PAGE teñido. Las calles en el gel comprenden lo siguiente: 1 a 5, A/Fujian M1 con 4 HA diferentes o sola; 6 to 10, A/Indo/ M1 con 4 HA diferentes o sola; 11 a 14, varios controles.

60 La comparación de las bandas en el gel, las calles que conforman las VLP que comprenden M1 aviar tienen bandas más fuertes de M1 y HA en las mismas calles, mientras que las calles que conforman la gripe estacional no lo hacen. Las bandas de M1 y HA en la misma calle son indicativas de la asociación de HA con M1. Esta asociación es indicativa de la formación de VLP que comprende HA y M1. Estos datos proporcionan evidencia de que las proteínas de la gripe aviar forman VLP más eficientes que la M1 de la gripe estacional, bien con cubiertas homólogas o heterólogas. Estos datos también muestran que M1 de la gripe aviar está fuertemente expresada y es estable en comparación con la M1 de la gripe estacional.

65 La Figura 2 es una transferencia de tipo Western que muestra la expresión de M1. Esta transferencia muestra que la M1 de la gripe aviar se expresa fuertemente en comparación con la M1 estacional. La intensidad de las bandas

indica que hay más M1, y por lo tanto, más VLP.

Ejemplo 2

5 Expresión de VLP de gripe estacional y aviar a partir de un vector de baculovirus

Las proteínas M1 y HA de la gripe estacional y aviar se clonaron y expresaron en un sistema de expresión de baculovirus. En este ejemplo se clonaron HA y NA de A / Indonesia / 5/05 y A / Fujian / 411/2002 en un vector baculovirus baculovirus. El virus recombinante se infectó en células de insecto Sf9 y se cultivó en condiciones que permiten la formación de VLP. Las células que comprenden HA y M1 estacional, HA y M1 o aviar o una combinación de HA y M1 estacionales y aviares se cultivaron en condiciones que permiten la formación de VLP. Las cepas de la gripe estacional utilizadas para estos experimentos fueron A/Fujian/411/2002 and A/Wisconsin/67/2005 la cepa de la gripe aviar utilizada fue A/Indonesia/5/05.

15 A continuación, se cosecharon las VLP y se aislaron partir del sobrenadante por centrifugación y por un gradiente de etapas discontinuas de sacarosa. La fracción que comprende las VLP se recogió de la parte superior del gradiente. Las VLP aisladas del gradiente de sacarosa se analizaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western. Estos datos se ilustran en las Figuras 3 y 4.

20 La figura 3 es un gel de SDS-PAGE teñido. Las calles en el gel comprenden lo siguiente: 1 y 2 es VLP de A / Fujian (M1, HA y NA) y la calle 3 comprende M1 de A / Indo / I con HA y Nade A / Fujian.

La comparación de las bandas en el gel, la calle que conforma las VLP de A/Indo/ M1 tienen bandas más fuertes de M1 y HA en las mismas calles, mientras que las calles que comprenden conforman A/Fujian no lo hacen. Las bandas de M1, HA NA en la misma calle son indicativas de la asociación de HA y NA con M1. Esta asociación es indicativa de la formación de VLP que comprende HA, NA y M1. Estos datos proporcionan evidencia de que las proteínas de la gripe aviar forman VLP con mayor eficiencia que las VLP basadas en la M1 de la gripe estacional. Estos datos también muestran que M1 de la gripe aviar está fuertemente expresada y es estable en comparación con la M1 de la gripe estacional.

30 La Figura 4 es una transferencia de tipo Western que muestra la expresión de M1. Esta transferencia muestra que las VLP que comprenden M1 endo de A/Indo/ y HA y NA de A/Fujian se expresa fuertemente en comparación con las VLP de A/Fujian. La intensidad de las bandas indica que hay más M1, HA y NA en las calles de las VLP de M1 aviar, y por lo tanto, más VLP.

Ejemplo 3

Expresión de construcciones quiméricas de HA y NA de gripe B utilizando la proteína de la matriz común de A / Indonesia / 5/05 para montar las VLP

40 Las secuencias siguientes muestran las secuencias transmembrana y terminal derivadas de HA y NA de A / Indonesia / 5/05 (subrayado). Las secuencias transmembrana y terminales de las moléculas de HA y NA pueden determinarse usando software de predicción mediante GCG / Accelrys o software similar, así como por otros métodos. La localización exacta de las uniones para las secuencias de Indonesia / /5/05 puede variar.

45 Las secuencias siguientes son ejemplos de HA de una cepa B quimérica con un extremo de HA de A / Indonesia/ 5/05, así como NA quimérica de la cepa B con una sustitución de A/indo de las Regiones endodominio y transmembrana. Estas secuencias se coexpresarse en un sistema de expresión de baculovirus con una proteína M1 de la gripe aviar para producir VLP quiméricas que expresan antígenos de la gripe B en la superficie de las VLP.
50 Hemaglutinina, HA, del virus de la gripe B (B / Hong Kong / 557/2000 (SEC ID N° 1)

```

1   mkaiivllmv vtsnadriect gitssnsphv vktatqgevn vtgviplttt ptkshfanlk
61   gtrtrgklcp dclnctdlv algrpmcvgt tpsakasilh evrpvtsgcf pimhdrtkir
121  qlpnllrgye nirlstqnv daekapggpy rlgtsqscpn atsksgffat mawavpkdnn
181  knatnpltve vpyvcteged qitvwgfhsd nktqmknlyg dsnpqkftss angvtthyvs
241  qiggfpdqte dgglpqsgrl vvdymvqkpg ktgtivyqrg vllpqkvwca sgrskvikgs
301  lpligeadcl hekygglnks kpyytgehak aigncpiwvk tplklangtk yrppakllke
361  rgffgaiagf leggwegmia gwhgytshga hgvavaadlk stqeainkit knlnslsele
421  vknlqrlsga mdelhneile ldekvdldra dtissqiela vllsnegiin sedehllale
481  rklkmlgps avdigngcfe tkhkcngtcl driaagtfn gefslptfdfs lnitaaslnd
541  dglndhtQIL SIYSTVASSL ALAIMMAGLS LWMCSNGSLQ CRICI

```

Neuraminidasa, NA, de Flu B/Shanghai/361/02 ISDN129538 (SEC ID N° 2)

MNPNQKIITIGSICMVGIVSLMLQIGNMISSDILLKFKSTTEITAPTMLPDCANASNVQAVNRSATKGVTLTLLPEPE
 WTYPRLSCPGSTFQKALLISPHRFGETKGNAPLI IREPFIACGPKECKHFALTHYAAQPGGYNGTREDRNLRLHL
 ISVKLGKIPTVENSIFHMAAWSGACHDGKEWTYIGVDGPDSNALLKIKYGEAYTDTYHSYANNILRTQESACNCIG
 GNCYLMITDGSASGISECRFLKIREGRI I KEI FPTGRVKHTEECTCGFASNKTI ECACRDNSYAKRPFVKLNVEDT
 TAEIRLMCTETYLDTPRDDGSITGPCESENGKSGGGIKGGFVHQRMASKIGRWYSRTMSKTKRMGMGLYVKYDGD
 WIDSDALALSGVMVSMEEP GWYSFGFEIKDKKCDVPCIGIEMVHDGGKETWHSAAATAYCLMGSGQLLWDTVTGVDM
 AL

5 M1 de A/Indonesia (SEC ID N° 3)

MSLLTEVETY VLSIIPSGPL KAEIAQKLED VFAGKNTDLE ALMEWLKTRP
 ILSPLTKGIL GFVFTLTVPS ERGLQRRRFV QNALNGNGDP NNMDRAVKLY
 KKLKREITFH GAKEVLSYS TGALASCMGL IYNRMGTVT EVAFGLVCAT
 CEQIADSQHR SHRQMATITN PLIRHENRMV LASTTAKAME QMAGSSEQAA

 EAMEVANQAR QMVQAMRTIG THPNSSAGLR DNLLLENLQAY QKRMGVQMQR
 FK

10

Ejemplo 4

Fabricación de VLP quiméricas con proteína S de coronavirus

15 *Materiales y métodos*

Las células de insecto sf9 *Spodoptera frugiperda* (ATCC CRL-1711) se mantuvieron como suspensión en medio sin suero para insectos HyQ SFX (Hyclone, Logan, UT) a 28 °C. Se utilizó un sistema de expresión en baculovirus Bacto-Bac (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 1 vector de transferencia pFastBac en células de *E. coli* DHIOBac para la generación de vectores de baculovirus recombinantes que expresan genes de S de SARS S y de m1 del virus de la gripe.

La secuencia de aminoácidos de la proteína spike (S) de la cepa Urbani del coronavirus del SARS (SARS-CoV) se obtuvo de NCBI con número de acceso AAP 13441. La secuencia de aminoácidos de la hemaglutinina del virus de la gripe A (A / Indonesia / 5/05 (H5N1)) se obtuvo del NCBI con número de acceso ABP51969. Para construir la proteína quimérica S del SARS, el dominio transmembrana y el carboxilo terminal (TM / TC) de la proteína S (aa 1196-1255) se eliminó, y se añadieron los TM / CT de la HA de Indonesia H5N1 (aa 531-568) después del amino ácido 1195 de la proteína S. La secuencia de aminoácidos de la proteína S-HA quimérica se muestra en la Figura 5 (SEC ID N° 10). La secuencia de aminoácidos de la proteína de la matriz 1 (M1) del virus de la gripe H5N1 Indonesia se obtuvo de NCBI con número de acceso ABW06359 (Figura 6).

Las secuencias de ADN optimizadas por codones de M1 y S quiméricas para la expresión en células de insectos se sintetizaron en Geneart (Alemania) y se subclonaron en los sitios BamHI y HindIII de pFastBac 1 individualmente. El fragmento SnaBI / PvuI que contiene la secuencia de codificación de M1 de pFastBac1-ML se cortó y se insertó en el fragmento HpaI / PvuI que contiene la secuencia de codificación de S de pFastBac 1 -S. El vector en tándem resultado que expresa dos proteínas se muestra en la Figura 7. Este vector se utilizó para transformar DHIOBac obtener el báculo que se transfirió en las células Sf9 para obtener el baculovirus recombinante.

40 *Expresión de VLP, purificación y caracterizaciones*

Las células de insecto Sf9 se infectaron durante 64 horas a una densidad celular de 2×10^6 células / ml con baculovirus recombinantes que expresan tanto S de SARS quimérica como M1 de Indo a una Mdl= 1. Los sobrenadantes del cultivo se cosecharon mediante centrifuga a 4.000 g. Los sobrenadantes libres de células se concentraron por ultrafiltración (UF) con un filtro con MWCO de 500 kDa de fibra hueca (GE Healthcare). El material retenido se intercambió con tampón con diafiltración (DF) a TrisCl 25 mM a pH 8,0, NaCl 300 mM. El material retenido de UF / DF se cargó en una columna de intercambio iónico (Fractogel TMAE, EMD) en equilibrio en el mismo tampón. Las VLP pasaron a través de la columna mientras que el baculovirus y el ADN se unieron a la columna. El flujo a través de las fracciones que contenían VLP se concentró aún más con ultrafiltración antes de la carga en una columna de exclusión por tamaño Sephacryl S500 (GE Healthcare).

El conjunto del pico de VLP de la columna de exclusión por tamaño se analizó con SDS-PAGE (4-12 % Bis-Tris NuPage, Invitrogen) y densitometría para determinar la pureza. Las VLP también se analizaron con el analizador de tamaño de partícula (Malvern Zetasizer nanoSERIES NanoZS) y microscopía electrónica. Los anticuerpos utilizados en este estudio procedían de los siguientes proveedores: Anti-S de SARS de conejo e IgG normal anti-conejo (IMGNEX), anti-M de SARS de conejo (Abgent), anti-M1 de gripe de ratón (Serotec).

55

Resultados

5 Las VLP quiméricas de S de SARS/M1 de Indo purificadas se analizaron por SDS-PAGE, transferencia de tipo Western y densitometría (Figura 8). La pureza de la proteína S de SARS fue del 13,7 % y la pureza de la proteína M1 Indo fue del 67,6 %. La pureza combinada para S y M1 es 81,3 %. La transferencia de tipo Western confirmó la identidad de S y M1 (Figura 8, calle 2).

10 El baculovirus recombinante que expresó la proteína spike (S) de SARS, las proteínas de la membrana (M) y de la cubierta (E) en tándem también se expresaron. Los inventores expresaron y purificaron las VLP de SARS de tipo salvaje con el mismo protocolo que se utiliza para purificar las VLP quiméricas. La pureza de las VLP de SARS de tipo salvaje (no son proteínas de la gripe) se analizaron por SDS-PAGE y transferencia de tipo Western (Figura 9). Las proteínas S y M apenas se pueden ver en el gel teñido con Coomassie y las proteínas contaminantes eran mucho más prominentes. Los datos indican que las VLP de tipo salvaje de SARS son insuficientes para formar en el sistema de expresión de células de insecto de baculovirus, mientras que las VLP quiméricas de S SARS S / M1 de
15 Indo mejoran en gran medida el rendimiento y la pureza de las VLP producto.

A continuación, analizaron el tamaño promedio de partícula de las VLP quiméricas purificadas para ser 159,2 nm (Figura 10). Se realizaron imágenes de las VLP quiméricas con microscopia electrónica (ME) con tinción negativa (Figura 11). El tamaño y la morfología de las VLP quiméricas son muy similares a las imágenes de ME publicados del coronavirus del SARS (Figura 12). Tienen un diámetro de aproximadamente 100 nm con la estructura de corona en el borde exterior. La ME con inmuno-oro con el anticuerpo anti-S de SARS confirmó que las proteínas S de SARS se localizaban en la superficie de las VLP quiméricas (Figura 12).

25 Los inventores han diseñado una VLP quimérica que comprende el gen principal de spike (S) de coronavirus (CoV) que causa el SARS. Se fabricó una glicoproteína de la envoltura quimérica de S de CoV mediante la sustitución de Los dominios transmembrana y C-terminal (endodominio) con secuencias análogas de la HA de la gripe aviar (cepa A/Indonesia/5/05 H5N1). Se produjeron altos niveles inesperados de VLP de SARS en células de insecto Sf9 infectadas con un baculovirus que expresa la glicoproteína quimérica S de SAR y la proteína de la matriz M1 aviar.
30 Las VLP quiméricas que comprenden la proteína S tienen la morfología que es casi idéntica a la de CoV tipo salvaje con la proteína recombinante, quimérica S formando una corona sobre en una envoltura lipídica en partículas esféricas con un núcleo de M1 de la gripe aviar. Estas VLP quiméricas de SARS-gripe aviar recombinantes se producen de manera eficiente en células de insecto y se purificaron como se ha descrito anteriormente.

35 Estos datos proporcionan un excelente ejemplo de que la M1 aviar, por ejemplo, la proteína M1 de Indonesia H5N1, puede formar VLP quiméricas con el antígeno de superficie de otros virus tales como el SARS-CoV. Las VLP quiméricas con la proteína de la gripe aviar como columna vertebral pueden purificarse a través de un procedimiento de fabricación que requiere sólo dos etapas de cromatografía. El tamaño y la morfología de las VLP quiméricas son similares a los virus de tipo salvaje que llevan el mismo antígeno de superficie.
40

Ejemplo 5

VLP quiméricas de la gripe B

45 El antígeno del virus de la gripe B es un componente importante de las vacunas contra la gripe estacional. Los niveles de expresión del antígeno de la gripe B son de vital importancia para garantizar una liberación oportuna de un número suficiente de dosis de la vacuna de la gripe, de lo contrario puede producirse escasez de vacunas. Las VLP de la gripe B para B/Florida/4/06 consiste en tres proteínas, HA (SEC ID N° 8), NA (SEC ID N° 9), y M1 (matriz), que se montan en la estructura de VLP. Los genes de HA y NA se obtuvieron mediante RT-PCR del virus de gripe B/Florida/4/06. Con el fin de mejorar los niveles de expresión de las VLP de la gripe B se fabricaron VLP utilizando
50 tres proteínas M1 diferentes. Una proteína M1 se deriva del virus B/Florida/4/06. El segundo gen de M1 se obtiene de la cepa de la gripe B/Ann Arbor/1/1986, que se utiliza a menudo para la preparación de virus de genomas reordenados de la gripe B en la industria actual de las vacuna contra la gripe. La tercera M1 se obtiene del irus de gripe aviar A/Indonesia/5/05 (H5N1). Por lo tanto, se han producido tres tipos de VLP de gripe B/Florida/4/06 en las
55 células Sf9, y los niveles de expresión se han comparado.

Métodos. Los baculovirus se diseñaron para expresar los genes de HA, NA, y M1 de longitud completa genes de la gripe. Los genes de HA y NA se obtuvieron mediante RT-PCR del virus de gripe B/Florida/4/06. El gen de M1 también se ha generado mediante RT-PCR del virus de gripe B/Florida/4/06. Alternativamente, el gen de M1 de B / Ann Arbor / 1/1986 se sintetizó (GeneArt, Alemania) y el gen de M1 de la gripe A / Indonesia / 5/05 (H5N1) también se sintetizó (GeneArt, Alemania). Cada gen se clonó en un vector pFastBacl bajo el control del promotor de polihedrina de baculovirus (Invitrogen). Después se combinaron los genes de HA, NA, y M1 en vectores de tándem como se muestra en la Figura 13. A continuación, construcciones en tándem de los genes se transfirieron a vectores de bácmidos de baculovirus AcMNPV (Invitrogen), los ADN del bácmido se purificaron y se utilizaron para transfectar
60 células de insecto Sf9. Los baculovirus recombinantes resultantes se purificaron en placas y se prepararon reservas de virus en células Sf9.
65

Aproximadamente 30 ml de células Sf9, a aproximadamente 2×10^6 células / ml en matraces de agitación de 125 ml, se infectaron con baculovirus recombinantes que expresan los genes de HA, NA, y M1 a una multiplicidad de infección (Mdl) de 1 - 3 partículas infecciosas por ml (u_{if}), se incubaron a 27 ° C con agitación constante, después se recogieron a 66- 72 horas después de la infección. Los medios se retiraron por centrifugación a baja velocidad. Después se aclararon los medios de comunicación utilizando filtración a través de filtros de 0,45 μm y los medios se sometieron a ultracentrifugación durante 1 hora a 26.000 rpm a través de una capa de sacarosa al 30 %. Los sedimentos se resuspendieron en 200 ml de PBS y se analizaron por SDS-PAGE y transferencia de tipo Western (Figura 14). También se analizaron los sedimentos resuspendidos según su capacidad de aglutinar los glóbulos rojos de cobaya in vitro. Los datos se muestran en la Figura 14. Los precipitados resuspendidos también se han analizado por microscopia electrónica de transmisión con tinción negativa.

Resultados. M1 derivada de la gripe A / Indonesia / 5/05 (H5N1) mostró niveles de expresión significativamente más altos por tinción de gel de Coomassie (Figura 14, calle 3) en comparación con las VLP fabricadas usando M1 de B B/Florida/4/06 o M1 de B/Ann Arbor/1/1986. Además, los títulos de HA de las VLP que contienen la M1 de gripe A / Indonesia / 5/05 (H5N1) fueron 4-8 veces mayores en comparación con los otros dos tipos de VLP. La microscopia electrónica de las VLP que contienen M1 de gripe A / Indonesia / 5/05 (H5N1) tenía una concentración más alta de VLP y forma esférica más regular en comparación con las otras dos VLP (Figura 15).

20 Ejemplo 6

Fabricación de VLP quiméricas con la proteína F1 del VSR

Las células de insecto *Spodoptera frugiperda* Sf9 se mantienen y cultivan esencialmente como se ha descrito anteriormente. Las secuencias de ADN optimizadas por codones de la M1 de la gripe (SEC ID N° 3) y F1 quimérica del VSR HA TM/CY (SEC ID N° 12)) para la expresión en células de insecto se sintetizan y se subclonan en vector pFastBac 1. El vector resultante expresa ambas proteínas. Este vector se utiliza para transformar DHIOBac ara obtener el báculo que se transfecta en células Sf9 para obtener el baculovirus recombinante.

Las células de insecto Sf9 se infectan durante 64 horas a una densidad celular de 2×10^6 células / ml con baculovirus recombinantes que expresan F1 de VSR y M1 de Indo quiméricas (SEC ID N° 3) a una Mdl = 1. Los sobrenadantes del cultivo se recogen por centrifugación a 4.000 g. Los sobrenadantes libres de células se concentran por ultrafiltración (UF) con un filtro de fibra hueca de MWCO de 500 kDa (GE Healthcare). El material retenido se intercambia con tampón con diafiltración (DF) a TrisCl 25 mM a pH 8,0, NaCl 300 mM. El material retenido de UF / DF se carga en una columna de intercambio iónico (Fractogel TMAE, EMD). Las VLP pasan a través de la columna mientras que el baculovirus y el ADN se unen a la columna. El flujo a través de las fracciones que contenían VLP se concentra aún más con ultrafiltración antes de la carga en una columna de exclusión por tamaño Sephacryl S500 (GE Healthcare).

El conjunto del pico de VLP de la columna de exclusión por tamaño se analiza con SDS-PAGE (4-12 % Bis-Tris NuPage, Invitrogen) y densitometría para determinar la pureza. Las VLP también se analizan con el analizador de tamaño de partícula (Malvern Zetasizer nanoSERIES NanoZS), SDS PAGE, análisis Western y microscopia electrónica.

Todas las patentes, publicaciones y solicitudes de patentes se incorporan en el presente documento por referencia en la misma medida que si cada publicación, patente o solicitud de patente individual citada estaba específica e individualmente indicada para su incorporación por referencia.

La descripción detallada anterior se ha dado para claridad de comprensión únicamente y no debe entenderse que hay limitaciones innecesarias de la misma, ya que las modificaciones serán obvias para los expertos en la técnica. No es una admisión de que cualquier información proporcionada en el presente documento es técnica anterior o pertinente a las invenciones reivindicadas en el presente documento o de que cualquier publicación específica o implícitamente citada es técnica anterior.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para aumentar la eficiencia de la producción de partículas similares al virus de la gripe (VLP) en una célula hospedadora, que comprende expresar en una célula hospedadora una proteína de la matriz de la gripe aviar (M1) y las proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) de la gripe estacional humana, en el que la proteína M1 de la gripe aviar es una proteína M1 de la gripe A/Indonesia/5/05, y en el que dicho aumento de la eficiencia de la producción de VLP es con relación a una célula hospedadora que expresa dichas proteínas HA y NA con una proteína M1 de la gripe estacional.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína HA de la gripe tiene actividad hemaglutinina.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína NA de la gripe tiene actividad neuraminidasa.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en el que la célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en: una célula de levadura, una célula de insecto, una célula de anfibio, una célula aviar y una célula de mamífero.
5. El método de la reivindicación 4, en el que la célula hospedadora es una célula de insecto seleccionada del grupo que consiste en: una célula Sf9, una célula Sf21 y una célula de *Trichoplusia ni*.
- 20 6. El método de la reivindicación 5, en el que la célula de insecto es una célula Sf9.

FIGURA 1

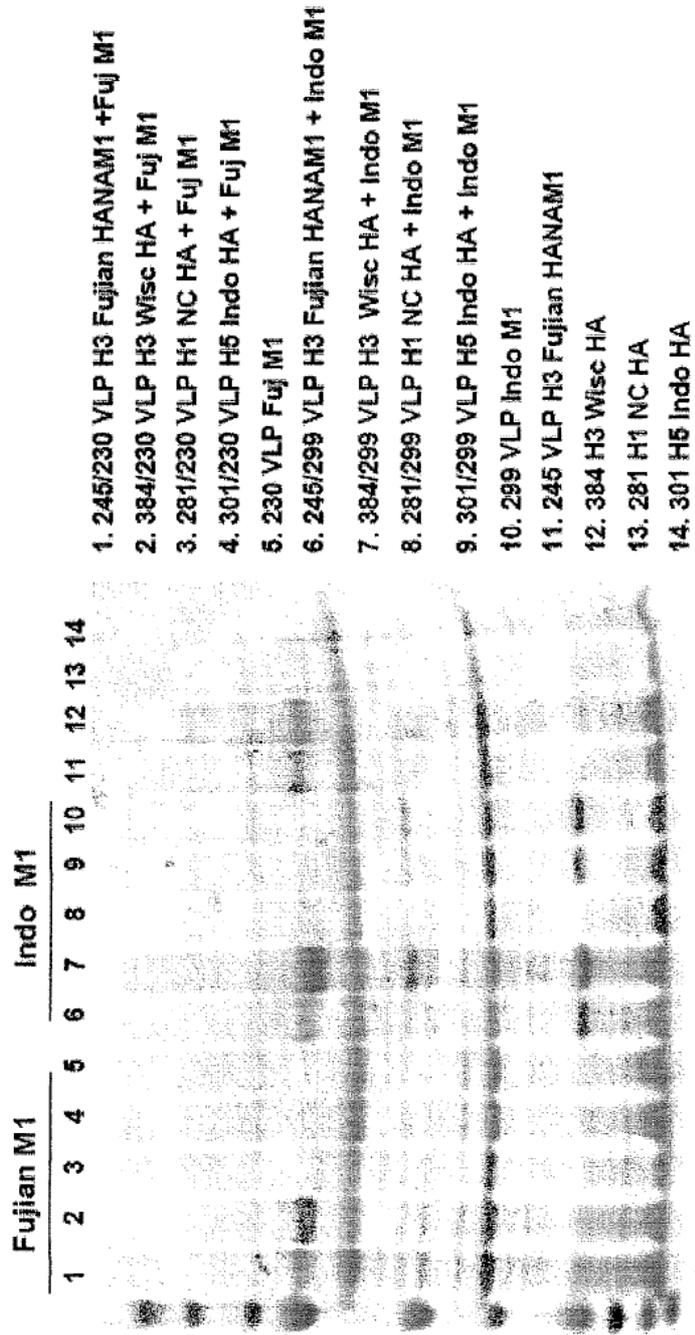


FIGURA 2

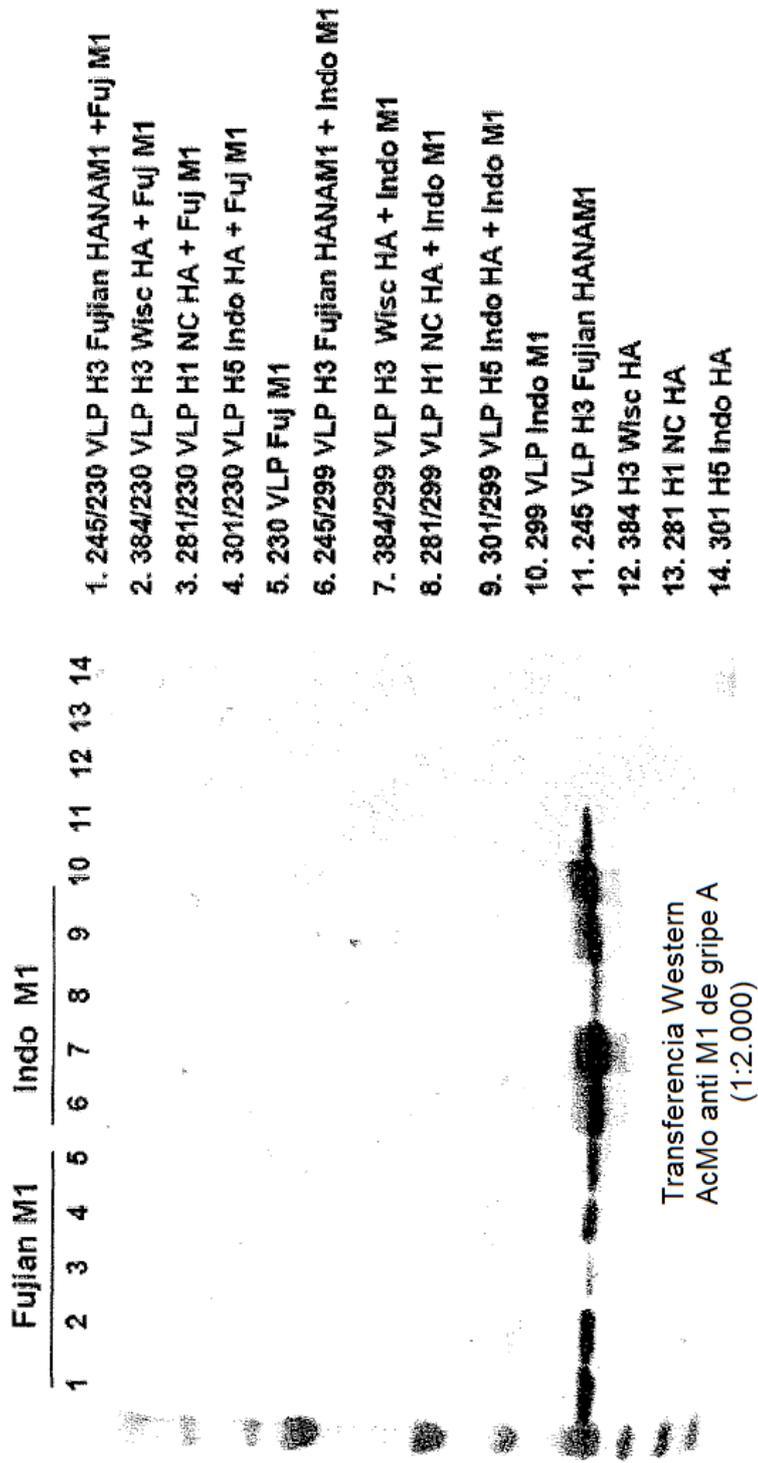


FIGURA 3

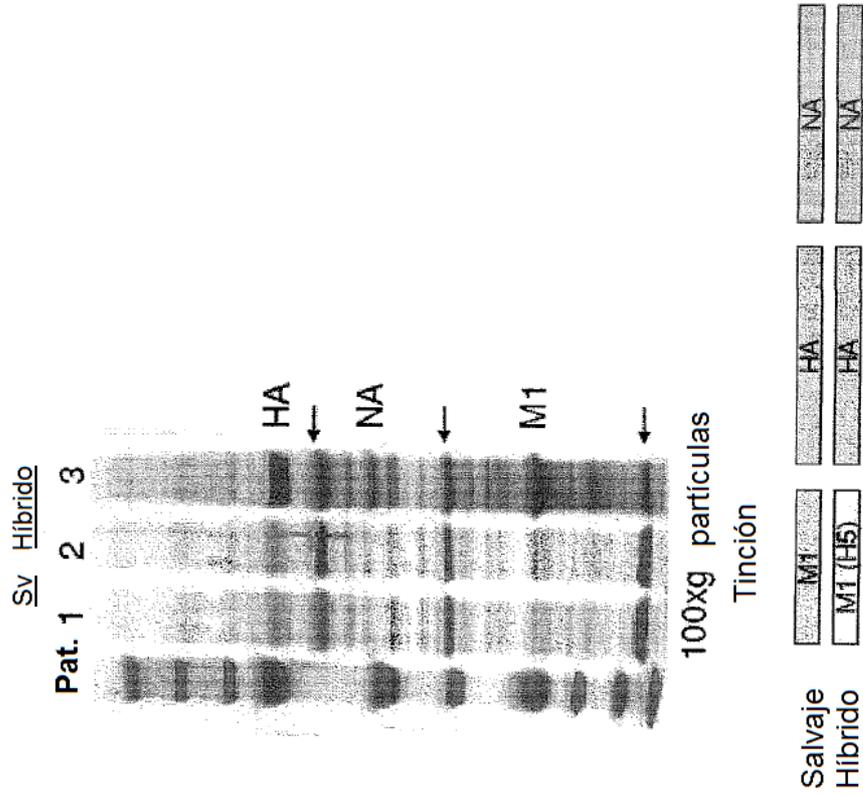


Figura 4

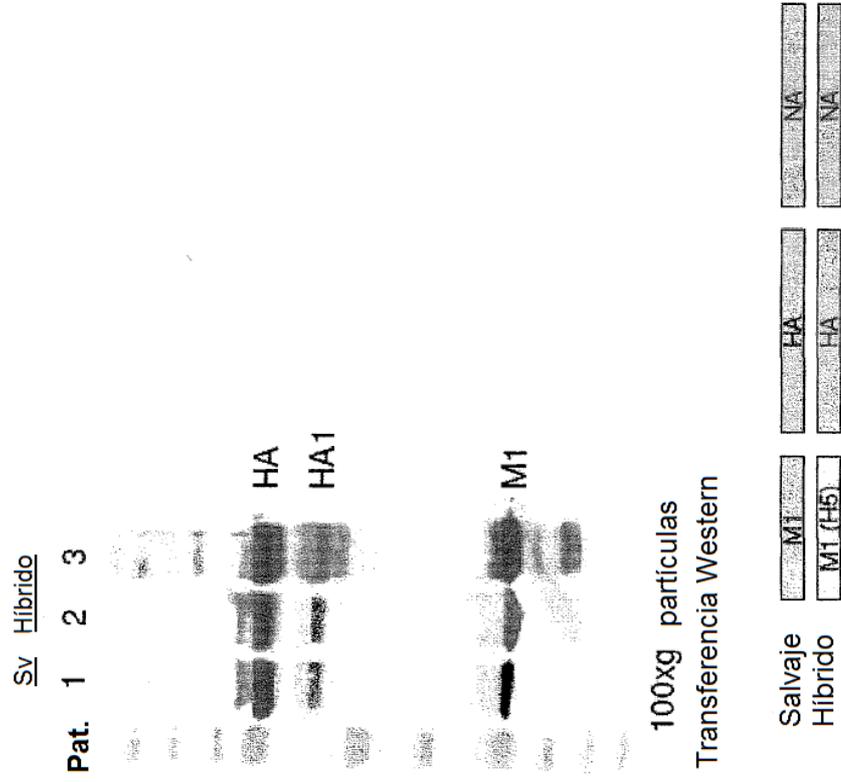


Figura 5

1 MFIFLLFLTL TSGSLLDRCT TFDDVQAPNY TQHTSSMRGV YYPDEIFRSD TLYLTQDLFL
 61 PFYSNVTGFH TINHTFGNPV IPFKDGIYFA ATEKSNVVRG WVFGSTMNKK SOSVIIINNS
 121 TNVVIRACNF ELCDNPEFAV SKPMGTQTHH MIFDNAFNCT FEYISDAFSL DVSEKSGNFK
 181 HLREFVFRNK DGFELYVYKGY QPIDVVRDLF SGFNTLKPFI KLPLGINITN FRAILTAFSP
 241 AQDIWGTSA A YFVGYLKP TFM LKYDENG TITDAVDCSQ NPLAELKCSV KSFEIDKGIY
 301 QTSNFRVPS GDVVRFPNIT NLCPPFGEVFN ATKFPVYAW ERKISNCVA DYSLYNSTF
 361 FSTFKCYGS ATKLNLDLCS NVYADSFVVK GDDVRQIAPG QTVIADYNY KLPDDDFMGCV
 421 LAMNTRNIDA TSTGNVNYKY FYLRHGKLRP FERDISNVVP SPDGKPCPP ALNCYWPLND
 481 YGFYTTTGIG YQPYRVVVLV FELLNAPATV CGPKLSTDLI KNQCVNFNFN GLTGTGVLTP
 541 SSKRFQPFQ FGRDVSDFTD SVRDPKTSEI LDISPCSFEG VSVITPGTNA SSEVAVLYQD
 601 VNCTDVSTAI HADQLTFAWR IYSTGNVVFQ TQAGCLIGAE HVDTSYECDI PIGAGICASY
 661 HTVSLRSTS QKSIVAYTMS IGADSSIAYS NNTIAIPTNF SISITTEVMP VSMAKTSVDC
 721 NMYICGDS TE CANLLQYGS FCTQLNRALS GIAAEQDRNT REVFAQVKQM YKTPTLKYFG
 781 GFNFSQILPD PLKPTKRSFI EDLLFNKVTL ADAGFMKQYG ECLGDINARD LICAQKFENGL
 841 TVLPPLLTDD MIAAYTAALV SGTATAGWTF GAGAALQIPF AMQAYRFNG IGVTONVLYE
 901 NQKQIANQFN KAISQIQESL TTTSTALGKL QDVVNQNAQA INTLVKQLSS NFGAISSVLN
 961 DILSRLDKVE AEVQIDRLIT GRLOSLQTYV TQQLIRAAEI RASANLAATK MSECVLGQSK
 1021 RVDFCGKGYH LMSFQAAPH GVVELHVTVV PSQERNFTA PAICHEGKAY FPREGVFEVN
 1081 GTSWFITQRN FFSPLITTD NTFVSGNCDV VIGIINNTVY DPLQPELDSF KEELDKYFKN
 1141 HTSPDVLGD IGINASVVN IQKEIDRLNE VAKNINESLI DLQELGKYEQ YIKWPQILSI
 1201 YSTVASSLAL AIMMAGLSLW MCSNGSLQCR ICI (SEC ID N° 10)

Figura 6

1 MSLLEVEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQKLEDFAGKNTDLEALMEWLKTRP
 51 ILSPLTKGILGFVFTLTVPSEGLQRRRFVQNALNGNDPNNMDRAVKLY
 101 KLIKREITFHGAKEVLSYSTGALASCMLIYNRMGTVTEVAFGLVCAT
 151 CEQIADSQHRSHRQMATITNPLIRHENRMVLA STTAKAMEQ MAGSSEQAA
 201 EAMEVANQARQMVQAMRTIGTHPNSSAGLRDNLLENLQAYQKRMGVQMQR
 251 FK (SEC ID N° 3)

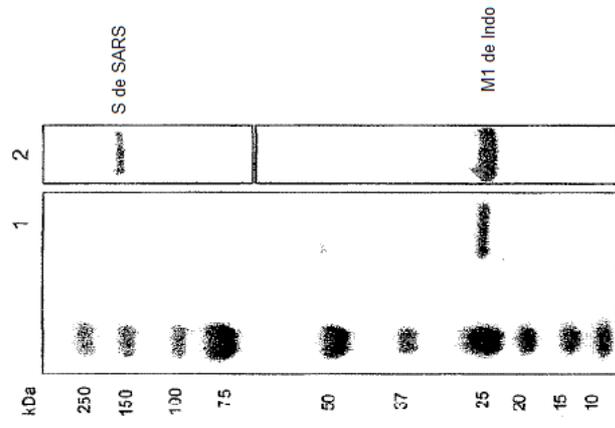


Figura 8

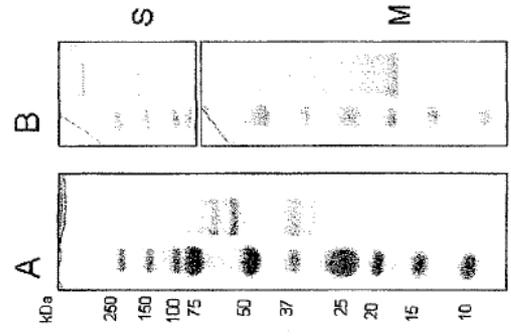
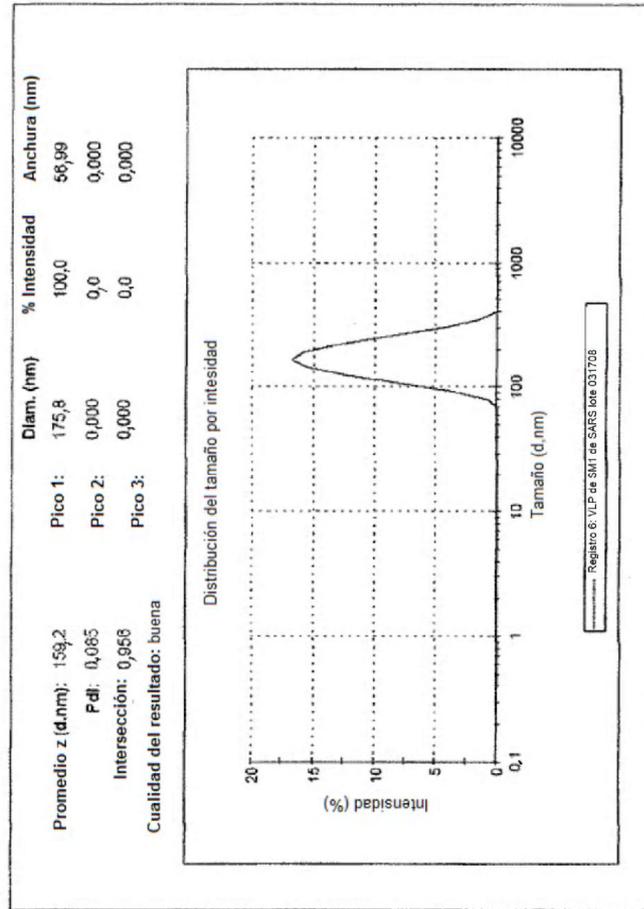
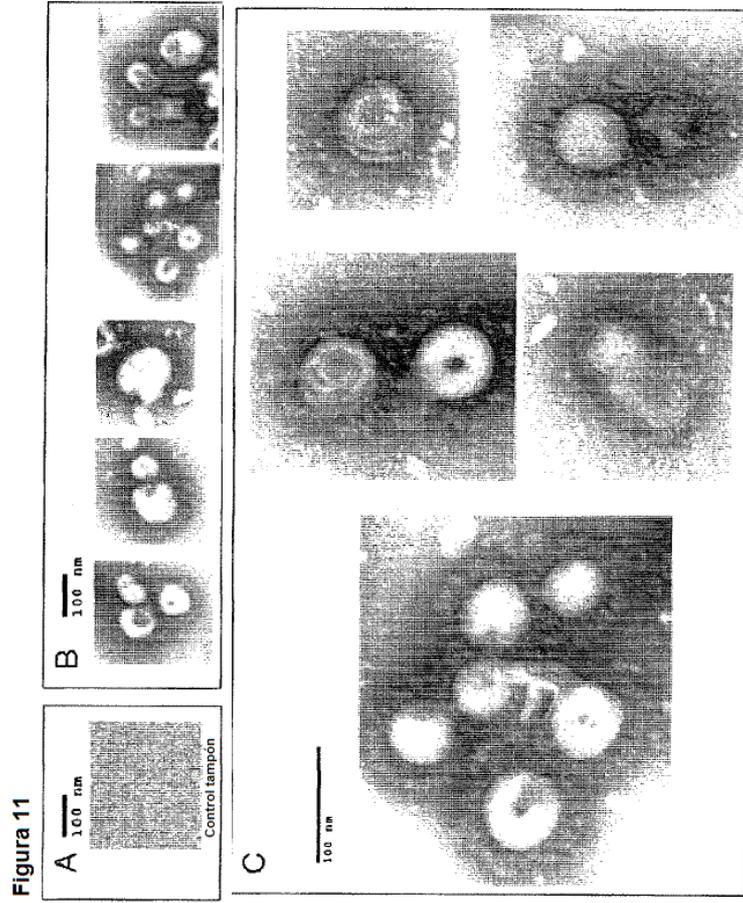
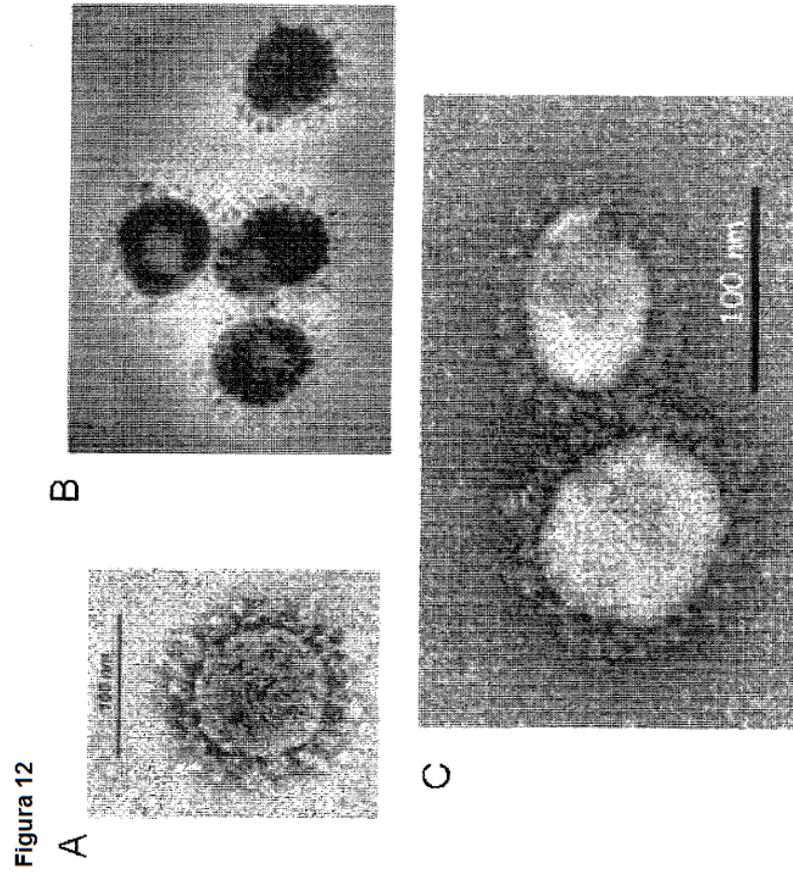


Figura 9

Figura 10







Construcciones de VLP de gripe B/Florida/4/06

Figura 13

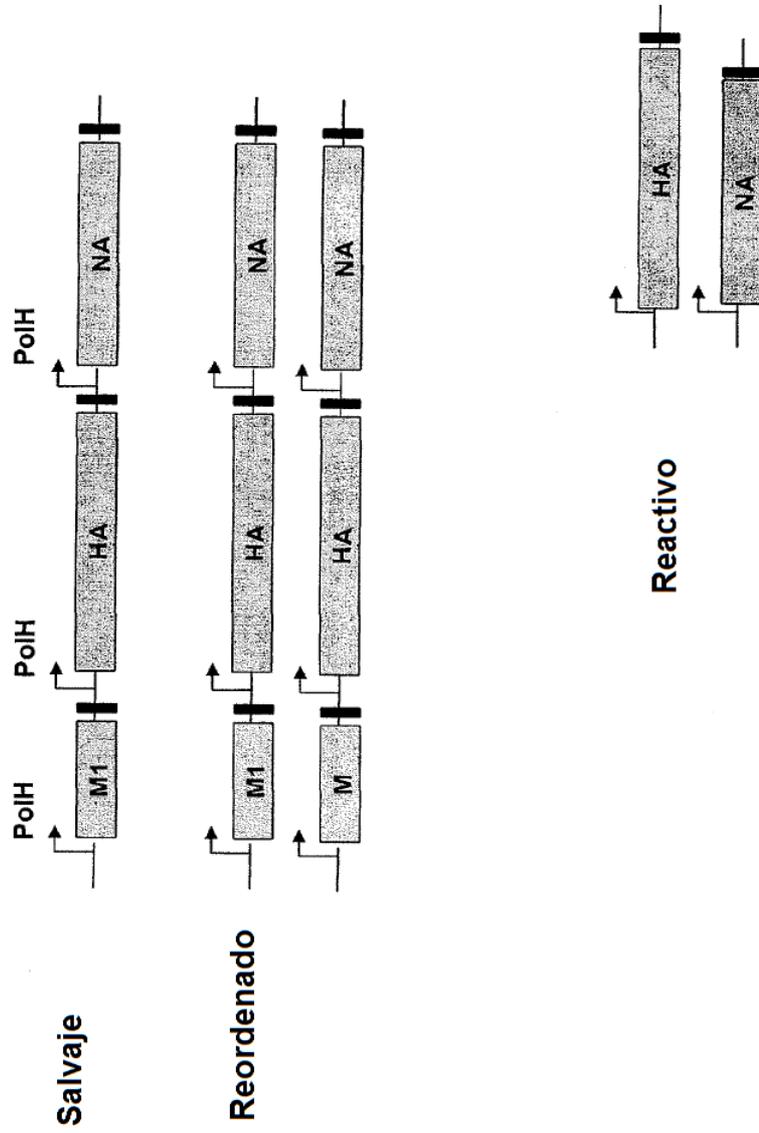
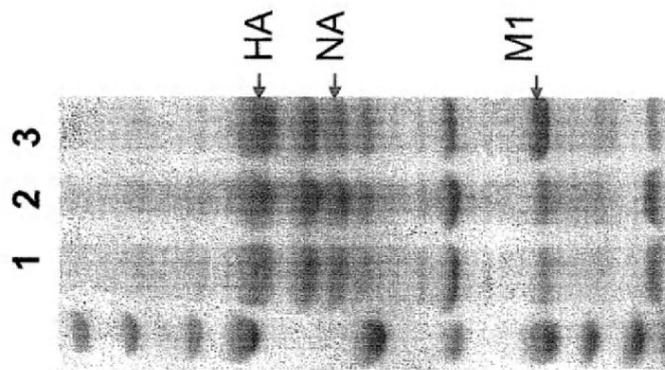


Figura 14

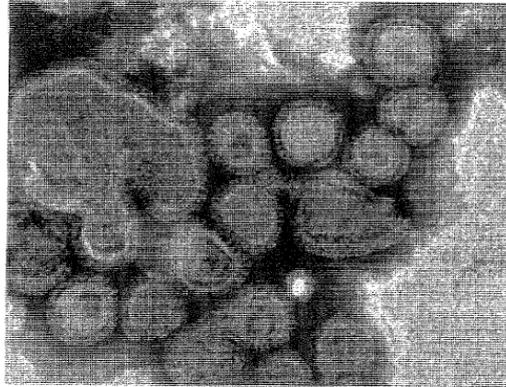


calle	cepa	HA cobaya	NA mu/mg
1	540 Inf B Fla M SV	4096	2055
2	539 Inf B Fla M AA	2048	1604
3	538 Inf B Fla M1 Indo	16.384	1785

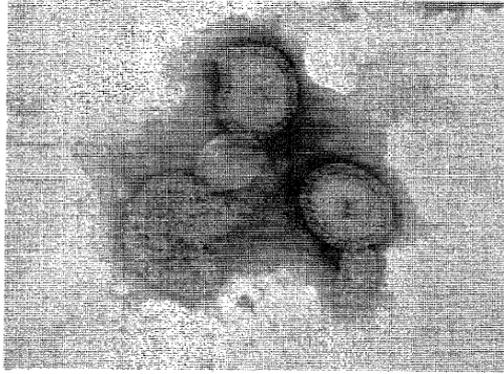
Figura 15

Gripe B/Florida/4/06

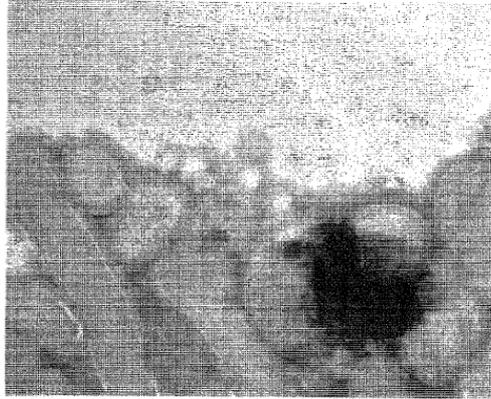
M1 aviar (BV538)



M1 B/AA (BV539)



M1 SV (BV540)



100 nm

Aum. directo: 120000x