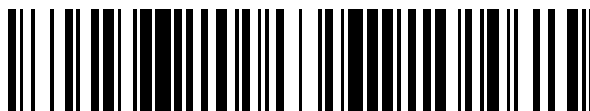


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 678**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

C07K 14/11 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2010** **E 10724012 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015** **EP 2435074**

54 Título: **Ensayo de agentes extraños**

30 Prioridad:

28.05.2009 EP 09161368

28.05.2009 US 181835 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.03.2016

73 Titular/es:

ABBOTT BIOLOGICALS B.V. (100.0%)

C.J. van Houtenlaan 36

1381 CP Weesp, NL

72 Inventor/es:

SCHOEN, PIETER JOSEPH;

KERSTEN, ALEXANDER JEROEN;

MEDEMA, JEROEN KRISTIAAN y

THUS, JOHANNES LAMBERTUS GERARDUS

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 563 678 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

Ensayo de agentes extraños

Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de la industria farmacéutica y se refiere a un método para ensayar agentes extraños en una composición que comprende al menos un agente activo y a un proceso para producir una composición farmacéutica llevando a cabo dicho método. Además, la presente invención también se refiere al uso de una construcción de polinucleótido para ensayar la presencia o ausencia del agente activo o de cualquier agente extraño o infeccioso en una composición que se va a ensayar. Además, se refiere a polinucleótidos, construcciones de polinucleótido que comprenden polinucleótidos particulares y células huésped que comprenden estos polinucleótidos o construcciones de polinucleótido útiles para el campo de las preparaciones de antígenos de virus, principalmente relacionadas con el virus de influenza. También se proporcionan organismos no humanos, animales transgénicos o microorganismos que contienen dichos polinucleótidos y/o construcciones de polinucleótido. Además, se refiere a un anticuerpo específico para un polipéptido codificado por dicho polinucleótido y a un método para producir dicho anticuerpo, así como al uso de un anticuerpo producido frente a un producto de expresión de una construcción de polinucleótido para la purificación de un agente activo. La presente invención también está dirigida a un kit de partes.

Descripción de la técnica anterior

En el campo de la industria farmacéutica existe la demanda de producir composiciones que estén desprovistas de contaminantes tales como agentes extraños o adventicios, ya que éstos pueden resultar en efectos secundarios indeseados. Esta demanda es un reto particularmente en el campo de las vacunas. La ausencia de agentes extraños o adventicios también puede ser un asunto normativo.

Para asegurar que las composiciones no contienen contaminaciones, las composiciones respectivas pueden ensayarse para comprobar si contienen o no dichos contaminantes.

En general, dichos ensayos pueden basarse por ejemplo en la detección de un posible agente extraño que está presente en una composición, opcionalmente con una amplificación anterior del agente extraño.

A este respecto, WO 0172964 A2 describe un método de PCR cuantitativa para la detección y cuantificación simultánea de un agente adventicio viable en una muestra de materiales derivados biológicamente. Este método comprende medir la cantidad de un polinucleótido en una muestra usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa, incubar la muestra en condiciones que permitan la replicación del agente, medir la cantidad del polinucleótido en la muestra después de un periodo de incubación usando una PCR cuantitativa y comparar la cantidad del polinucleótido presente en la muestra antes y después del periodo de incubación. Un incremento en la cantidad de polinucleótido indica la presencia de un agente viable en la muestra.

WO 2007/100397 A2 se refiere a la identificación o determinación de la presencia o ausencia de un virus contaminante adventicio en una muestra que comprende poner en contacto ácidos nucleicos de la muestra con al menos una pareja de cebadores, y determinar la masa molecular del producto de amplificación por espectrometría de masa.

Otra posibilidad es neutralizar el agente activo que está presente en la composición que se va a ensayar antes del ensayo del agente adventicio. Después de la neutralización del agente activo, la composición neutralizada se añade a una línea celular específica o se ensaya en modelos animales. Si la línea celular presenta efectos patogénicos, la composición contiene agentes adventicios.

En este contexto, US 2004/0005546 A1 proporciona un método para la detección de agentes adventicios en una composición que comprende un reovirus mediante el uso de una ribozima que escinde específicamente el genoma del reovirus, inactivando de esta manera el virus. Un plásmido que codifica esta ribozima se introduce en células que son susceptibles a infección por reovirus. Las células transfectadas, mediante la expresión de la ribozima, son capaces de inactivar el reovirus y así no serán infectadas por el virus. Las células que expresan ribozima se someten entonces a una composición que contiene reovirus, y cualesquiera efectos patogénicos causados por la preparación de reovirus indicarán la presencia de un agente adventicio. WO 03072811 A2 se refiere esencialmente al mismo principio.

La neutralización del agente activo en la composición también puede conseguirse por el uso de un anticuerpo específico para el agente activo, como se describe, por ejemplo, en la Farmacopea Europea, capítulo 2.6.16. Por ejemplo, si el agente activo es un antígeno de virus vacuna, este antígeno de virus vacuna puede neutralizarse por antisuero que contiene anticuerpos que se unen específicamente al antígeno. Para preparar antisuero, se usa un antígeno inmunizante producido en cultivo celular u otro sistema (por ejemplo, huevos de gallinas embrionados) de una especie diferente a la usada para la producción de la vacuna y que carece de agentes extraños.

EP 0 236 145 A se refiere a procesos para la producción de glicoproteínas de HCMV, anticuerpos de éstas y vacunas de HCMV, y vectores recombinantes de éstos.

EP 1 997 831 A1 se refiere a antígenos de vacuna quiméricos frente al virus de la influenza aviar (AI). Los antígenos quiméricos descritos en EP 1 997 831 A1 comprenden las subunidades del virus de la influenza aviar, acopladas a moléculas co-estimuladoras que aumentan tanto el sistema inmune humoral como celular.

WO 2008/124331 A1 define nuevas secuencias diseñadas para proteger a un huésped frente a una cepa virulenta de virus de influenza A H5N1 y describe secuencias con optimización de codones que codifican las proteínas virales antigénicas hemaglutinina y neuraminidasa.

Sin embargo, a pesar de los métodos descritos anteriormente para llevar a cabo el ensayo de agentes extraños, todavía existe una necesidad de un método de ensayo mejorado, en particular de un método de ensayo no específico para la posible identificación de contaminantes infecciosos no especificados y de herramientas útiles para realizar ensayos adecuados, y consecuentemente de un sistema de producción mejorado para composiciones farmacéuticas, en particular en el campo de las vacunas.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un contenido como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La etapa de determinar la presencia o ausencia de agentes extraños en la composición puede comprender:

a) usar un animal no humano que se ha inoculado, preferiblemente inmunizado, con una construcción de polinucleótido que comprende una secuencia que codifica al menos una parte del agente activo, e inocular dicho animal con la composición que se va a ensayar,

b) evaluar el porcentaje de animales vivos después de un determinado periodo de tiempo, en el que en el caso de que al menos el 80% de los animales inoculados sobreviva y no muestre evidencia de infección durante dicho periodo de tiempo se considera que la composición no contiene agentes extraños, y en el caso en el que menos del 80% de los animales inoculados sobreviva y/o al menos un animal muestre evidencia de infección durante dicho periodo de tiempo se considera que la composición contiene agentes extraños.

Además, la etapa de determinar la presencia o ausencia de agentes extraños en la composición puede comprender:

a) inocular un animal no humano con la composición que se va a ensayar, que contiene agente activo neutralizado o inactivado,

b) evaluar el porcentaje de animales vivos después de un determinado periodo de tiempo, en el que en el caso de que al menos el 80% de los animales inoculados sobreviva y no muestre evidencia de infección durante dicho periodo de tiempo se considera que la composición no contiene agentes extraños, y en el caso en el que menos del 80% de los animales inoculados sobreviva y/o al menos un animal muestre evidencia de infección durante dicho periodo de tiempo se considera que la composición contiene agentes extraños.

La etapa de determinar la presencia o ausencia de agentes extraños en la composición que se va a ensayar puede llevarse a cabo por ejemplo de dos maneras: Una posibilidad es neutralizar el agente activo que está presente en la composición que se va a ensayar antes de inocular un organismo de ensayo de un animal no humano, con la composición. Esta neutralización se lleva a cabo *in vitro*, es decir, no en el organismo de ensayo en sí mismo. El organismo de ensayo se inocula con la composición que se va a ensayar después de que la composición se ha neutralizado. La otra posibilidad es que la etapa de neutralización se lleve a cabo *in situ*, por ejemplo, en el organismo de ensayo en sí mismo. Esto se consigue por una inmunización activa del organismo de ensayo con la construcción de polinucleótido que comprende una secuencia que codifica al menos una parte del agente activo. Haciendo esto, el organismo de ensayo produce anticuerpos que están dirigidos frente al menos una parte del agente activo. Tan pronto como el organismo de ensayo se inocula con la composición que se va a ensayar (y que contiene agente activo todavía no neutralizado), estos anticuerpos, a su vez, son capaces de neutralizar el agente activo. Por lo tanto, la determinación de la presencia o ausencia de agentes extraños en la composición que se va a ensayar puede llevarse a cabo en el mismo organismo de ensayo sin ninguna necesidad de una etapa de neutralización *in vitro* del agente activo. Esto reduce significativamente el tiempo necesario para llevar a cabo el método de ensayo, el número de organismos de ensayo necesarios e incrementa adicionalmente la robustez y seguridad del ensayo.

Los animales no humanos pueden seleccionarse del grupo que consiste en ratones adultos, ratones lactantes, y cobayas, y en el que el porcentaje de animales vivos y la aparición de una evidencia de infección se evalúa después de un periodo de al menos 7 a 10 días, opcionalmente después de un periodo de 21 días después de la inoculación con la composición que se va a ensayar en el caso en el que el animal inoculado sea un ratón adulto, después de un periodo de 14 días después de la inoculación con la composición que se va a ensayar en el caso en el que el animal inoculado sea un ratón lactante, y después de un periodo de al menos 42 días después de la inoculación con la composición que se va a ensayar en el caso en el que el animal inoculado sea una cobaya.

La inoculación de la composición que se va a ensayar puede llevarse a cabo intracerebralmente y/o intraperitonealmente.

La etapa de determinar la presencia o ausencia de agentes extraños en la composición puede llevarse a cabo según requerimientos reguladores, preferiblemente según los requerimientos de la Farmacopea Europea, 2005, capítulo 2.6.16.

La composición que se va a ensayar puede ser una muestra de un cultivo celular a partir del cual se produce el agente activo, o un producto derivado de dicho cultivo celular.

Además, alternativamente es posible que la composición que se va a ensayar sea un virus de siembra, o una composición que contiene un virus de siembra, respectivamente. Un virus de siembra en el significado de la presente invención es un virus que se pretende usar para la producción de un antígeno o una vacuna. Por ejemplo, un virus de siembra puede estar alterado genéticamente para convertirlo en seguro y capaz de crecer en cultivo celular o en huevos.

La composición puede ser una composición farmacéutica, preferiblemente una preparación de vacuna o un producto intermedio de ésta.

El agente activo puede ser un antígeno, preferiblemente un virus inactivado o atenuado, más preferiblemente un antígeno viral tal como un antígeno de virus fragmentados, un antígeno de subunidad de virus, o un virosoma, o el agente activo comprende al menos un componente de un virus o una partícula de virus, preferiblemente el agente activo es una partícula de virus influenza.

El agente activo puede ser un antígeno codificado por una secuencia de polinucleótido.

El anticuerpo y el agente activo pueden no derivar del uso de la misma construcción de polinucleótido.

Las construcciones de polinucleótido pueden diferenciarse en al menos un elemento estructural y/o funcional, preferiblemente se diferencian respecto al polipéptido que codifican.

El anticuerpo puede usarse para ensayar virus como agentes extraños, por ejemplo virus seleccionados del grupo que consiste en *Pneumovirinae*, tal como el género *Pneumovirus*, incluyendo el virus sincitial respiratorio (RSV); *Morbillivirus* de la familia *Paramyxoviridae*, tal como virus del sarampión; *Enterovirus* de la familia *PicoARNviridae*, tal como virus *Coxsackie*, por ejemplo coxsackie B5, virus echo, grupo de enterovirus A-D, y rinovirus; *Reoviridae* de mamíferos, en particular ortoreovirus (por ejemplo, reovirus de mamíferos tales como reovirus 1, 2, y 3) y rotavirus; miembros de *Retroviridae*, por ejemplo *Orthoretrovirinae*, tales como los retrovirus, *Metapneumovirus* de la familia *Paramyxoviridae*, tales como metapneumovirus humano (HMPV), o virus parainfluenza tipo 1, 2, 3, y 4; *Rubulavirus* de la familia *Paramyxoviridae*, tales como virus de las paperas; *Togaviridae*, tales como *Rubellavirus*; *Coronaviridae*, tales como el coronavirus SARS y otros coronavirus humanos tales como coronavirus OC43, 229E, NL63, y HKU1; *Rinovirus* de la familia *PicoARNviridae*, tales como cepas M de Rinovirus; virus de la Varicela Zóster (VZV), también conocido como virus del herpes humano 2 (HHV3); *Polyomaviridae*, tales como el poliomavirus SV-40, el poliomavirus BK y el poliomavirus JC; *Circovirus* porcinos; *PicoARNvirus* porcinos, tales como virus de la enfermedad vesicular porcina (SVDV) y virus Teschen-Talfan; miembros de *Parvoviridae*, tales como parvovirus canino (CPV), bocavirus o parvovirus porcinos; Virus de parainfluenza (PIV); miembros de *Orthomyxoviridae*, incluyendo virus influenza tipo A y B; miembros de *Paramyxoviridae paramyxovirinae*, incluyendo PIV-1, PIV-2 y PIV-3; *Herpesviridae*, tales como virus del herpes simple 1 y 2, virus del herpes simple humano tipo 6, 7 u 8, citomegalovirus y virus de Epstein Barr; *Adenoviridae*, tales como los adenovirus, incluyendo adenovirus humano, de simio y aviar, tales como adenovirus aviar 1; *Circovirus* aviares; *Reoviridae* aviar, en particular ortoreovirus, tales como reovirus aviares; miembros de *Papillomaviridae*, incluyendo virus del papiloma humano; miembros de *Flaviviridae*, tales como el virus del Nilo Occidental; y *BiARNviridae*, tales como virus de la enfermedad bursal infecciosa (también conocido como virus gumboro), y/o en el que el anticuerpo se usa para ensayar bacterias como agentes extraños, por ejemplo, bacterias *Chlamydia*, incluyendo *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* y *C. psittaci*; y *Mycoplasma*.

La construcción de polinucleótido puede comprender una secuencia codificadora de HA (hemaglutinina) y/o NA (neuraminidasa).

En una realización preferida, la construcción de polinucleótido comprende cualquiera de estas secuencias codificadoras de HA y/o NA, bien sola o en combinación una con la otra. También es posible que la construcción de polinucleótido contenga sólo partes de estas secuencias. Preferiblemente, la construcción de polinucleótido contiene la secuencia completa o una parte de la secuencia que codifica H1, H2, H3, H5, H6, H7, N1, N2, N3 o N7, bien sola o en combinación, preferiblemente H5 sola. En una realización preferida adicional, la construcción de polinucleótido comprende secuencias o parte de las secuencias que codifican H1N1, H2N2, H3N2, H6N1, H7N3 o H7N7, preferiblemente las secuencias o parte de las secuencias que codifican H5N1.

La construcción de polinucleótido puede comprender la secuencia que codifica al menos una parte del agente activo con optimización de codones, en particular con optimización de codones para el sujeto usado para inmunización con la construcción de polinucleótido.

- 5 El agente activo puede comprender un antígeno de influenza y la construcción de polinucleótido puede comprender una secuencia que tiene al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, y más preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia con el ácido nucleico mostrado en SEQ ID NO: 1 ó 2.

El agente activo puede comprender un antígeno de influenza y la construcción de polinucleótido comprende una secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 1 ó 2.

Descripción detallada de la invención

- 10 La presente invención se describe ahora con más detalle por realizaciones y ejemplos preferidos, que se presentan para propósitos ilustrativos.

La presente invención proporciona un método eficiente, rápido y fiable para la detección de contaminaciones en composiciones mediante el uso de anticuerpos que se unen específicamente a los agentes activos que están presentes en la composición, con la condición de que dicho anticuerpo se haya producido frente a un producto de expresión de una construcción de polinucleótido que comprende una secuencia que codifica al menos una parte del agente activo. Se encontró que los anticuerpos, que se han preparado usando construcciones de polinucleótido recombinantes para la inmunización, son particularmente ventajosos y útiles para la neutralización o inactivación de agentes activos antes del ensayo de agentes extraños o adventicios. Dichos anticuerpos son especialmente adecuados en el ensayo de agentes extraños en composiciones que contienen sustancias proteínicas como agentes activos. Como las construcciones de polinucleótido que se van a usar para preparar los anticuerpos se preparan sintéticamente y comprenden un polinucleótido que codifica al menos una parte de una secuencia de aminoácidos presente en el agente activo dado, las construcciones de polinucleótido codifican secuencias homólogas a la diana que se va a neutralizar o inactivar, pero no están contaminadas con los agentes extraños o adventicios cuando se añaden los anticuerpos a la composición durante el ensayo. Al contrario, otros ensayos inmunológicos de agentes extraños usando anticuerpos que se generarían por inmunización de los animales con un agente activo dado en sí mismo podrían dar lugar a la formación de anticuerpos que son 0 para agentes extraños que están presentes en la composición, elevando de esta manera el riesgo de resultados falsos negativos. Esta producción no deseada de dichos anticuerpos en los animales podría inducirse por ejemplo por contaminantes que resultan de un sistema de cultivo celular en el que se ha producido el agente activo. Sin embargo, como consecuencia, a diferencia del uso de inmunización con construcciones de polinucleótido para la producción de anticuerpos según la presente invención, los anticuerpos que son entonces específicos para los agentes extraños neutralizarían a los agentes extraños durante el ensayo, dando lugar de esta manera a errores en el análisis. El método según la presente invención permite evitar o al menos reducir el riesgo de la formación de anticuerpos específicos para las contaminaciones. Así, por ejemplo, pueden evitarse los resultados falsos negativos del ensayo de los agentes extraños. Además, se disminuye el riesgo de que se produzca reactividad cruzada. Además las construcciones de polinucleótido pueden ensayarse directamente en sistemas de ensayo apropiados para mostrar la ausencia de agentes extraños contaminantes, por ejemplo, las construcciones pueden ensayarse directamente por PCR para una amplia gama de contaminantes potenciales o aplicando los métodos como se describe en la Farmacopea Europea, capítulo 2.6.16.

- 40 En particular, se ha encontrado que mediante la inmunización directa de un sujeto con una construcción de polinucleótido que codifica, por ejemplo, un antígeno viral tal como un antígeno viral de influenza, es posible generar rápidamente anticuerpos que se unen específicamente a este antígeno viral de influenza, con vista a que el ensayo posterior no responde principalmente al virus influenza en sí mismo. Por lo tanto, usando el método según la presente invención, ya no es necesario generar los anticuerpos específicos, por ejemplo, inmunizando a un animal con el virus de tipo salvaje o con una partícula de virus en sí misma obtenida durante el proceso de la preparación de vacunas, lo que reduce significativamente el tiempo necesario para la generación de anticuerpos que se van a usar para la etapa de ensayo posterior. Además, ya no es necesario depender de la identificación y cultivo de una cepa con reactividad cruzada, ya que las construcciones de polinucleótido pueden prepararse tan pronto como se ha identificado una cepa de virus de influenza (potencial) pandémica o estacional. Esto es particularmente útil en el caso de un brote pandémico o estacional de influenza, ya que existe una necesidad de un lanzamiento rápido de vacunas pandémicas o estacionales al mercado. Mediante la aplicación del método según la invención, pueden generarse rápidamente anticuerpos específicos dirigidos frente a estos antígenos de influenza y usarse para propósitos de ensayo y tratamiento adicional opcional durante el proceso de las preparaciones de vacuna de influenza. Por lo tanto, la presente invención reduce los tiempos de preparación para el lanzamiento de vacunas. Como los anticuerpos generados también pueden usarse para ensayos de calidad a los que se someten las vacunas o sus productos intermedios, tales como ensayos de agentes extraños, la presente invención también da lugar a una calidad mejorada de las vacunas. Además, mediante la aplicación de la enseñanza de la presente invención, podría ser posible usar adicionalmente un lote de producción costoso después de que se hayan detectado los agentes extraños sometiendo este lote a un tratamiento especial para inactivar o eliminar el agente adventicio detectado.

En definitiva, mediante la aplicación del método según la invención, puede conseguirse una calidad y seguridad mejoradas de las composiciones ensayadas y un gasto del ensayo del agente adventicio. Como consecuencia, pueden reducirse los tiempos de preparación para el lanzamiento de las composiciones ensayadas.

En el significado de la presente invención, el término “agente extraño” o “agente adventicio” se refiere a contaminaciones que podrían estar presentes en la composición que se va a ensayar. Un agente adventicio o extraño es un agente que no se pretende que esté incluido en una composición y puede influir adversamente en las propiedades de un producto que contiene las composiciones. Por ejemplo, si la composición constituye una preparación farmacéutica o debe usarse como tal, un agente adventicio puede ser, por ejemplo, un agente infeccioso (patógeno), concretamente un agente capaz de infectar a un ser humano o animal. Dicho agente infeccioso puede ser un microorganismo, por ejemplo, bacterias, hongos, algas, un virus o partes de éstos. Los virus también son capaces de crecer frecuentemente en sistemas tales como cultivos celulares que se usan para la producción de biológicos. Además, la composición también puede estar contaminada con ADN de la célula huésped.

Las líneas celulares usadas típicamente en la producción de biológicos, en particular para producir partículas virales, son líneas celulares de mamíferos incluyendo MDCK, CHO, BHK, Vero, MRC-5, PER.C6, WI-38 y semejantes. Los ejemplos de virus y bacterias infecciosos que podrían infectar no deliberadamente dichas células, y representar así agentes extraños o adventicios potenciales que se van a ensayar según la invención, incluyen, por ejemplo, virus seleccionados del grupo que consiste en *Pneumovirinae*, tal como el género *Pneumovirus*, incluyendo el virus sincitial respiratorio (RSV); *Morbillivirus* de la familia *Paramyxoviridae*, tal como virus del sarampión; *Enterovirus* de la familia *PicoARNviridae*, tal como virus *Coxsackie*, por ejemplo coxsackie B5, virus echo, grupo de enterovirus A-D, y rinovirus; *Reoviridae* de mamíferos, en particular ortoreovirus (por ejemplo, reovirus de mamíferos tales como reovirus 1, 2, y 3) y rotavirus; miembros de *Retroviridae*, por ejemplo *Orthoretrovirinae*, tales como los retrovirus, *Metapneumovirus* de la familia *Paramyxoviridae*, tales como metapneumovirus humano (HMPV), o virus parainfluenza tipo 1, 2, 3, y 4; *Rubulavirus* de la familia *Paramyxoviridae*, tales como virus de las paperas; *Togaviridae*, tales como *Rubellavirus*; *Coronaviridae*, tales como el coronavirus SARS y otros coronavirus humanos tales como coronavirus OC43, 229E, NL63, y HKU1; *Rinovirus* de la familia *PicoARNviridae*, tales como cepas M de Rinovirus; virus de la Varicela Zóster (VZV), también conocido como virus del herpes humano 2 (HHV3); *Polyomaviridae*, tales como el poliomavirus SV-40, el poliomavirus BK y el poliomavirus JC; *Circovirus* porcinos; *PicoARNvirus* porcinos, tales como virus de la enfermedad vesicular porcina (SVDV) y virus Teschen-Talfan; miembros de *Parvoviridae*, tales como parvovirus canino (CPV), bocavirus o parvovirus porcinos; Virus de parainfluenza (PIV); miembros de *Orthomyxoviridae*, incluyendo virus influenza tipo A y B; miembros de *Paramyxoviridae paramyxovirinae*, incluyendo PIV-1, PIV-2 y PIV-3; *Herpesviridae*, tales como virus del herpes simple 1 y 2, virus del herpes simple humano tipo 6, 7 u 8, citomegalovirus y virus de Epstein Barr; *Adenoviridae*, tales como los adenovirus, incluyendo adenovirus humano, de simio y aviar, tales como adenovirus aviar 1; *Circovirus* aviares; *Reoviridae* aviar, en particular ortoreovirus, tales como reovirus aviares; miembros de *Papillomaviridae*, incluyendo virus del papiloma humano; miembros de *Flaviviridae*, tales como el virus del Nilo Occidental; y *BiARNviridae*, tales como virus de la enfermedad bursal infecciosa (también conocido como virus gumboro), y bacterias, tales como bacterias *Chlamydia*, incluyendo *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* y *C. psittaci*; y *Mycoplasma*.

Mediante la aplicación del método según la invención, la presencia de agentes extraños o adventicios, respectivamente, en una composición puede ensayarse de una manera eficiente, diligente, y fiable. Dicha composición que se va a ensayar puede ser cualquier composición que debe cumplir determinados requerimientos de calidad o cualesquiera muestras aguas arriba de éstas. Dichas composiciones pueden usarse en kits de ensayo, por ejemplo, para detectar enfermedades o agentes infecciosos en cualesquiera líquidos o muestras corporales de seres humanos o animales. El método según la invención también es adecuado para ensayar composiciones usadas para cualquier uso de laboratorio tal como propósitos analíticos o preparativos. Las composiciones adicionales que se van a ensayar con el significado de la presente invención pueden ser, por ejemplo, muestras de un cultivo celular, a partir del cual se produce el agente activo, o productos de aislamiento o purificación o cualquier producto intermedio de éstos. Las muestras pueden tomarse en cualquier etapa el proceso. La composición también puede ser un producto derivado de este cultivo celular. De nuevo, este producto puede ser un producto que deriva del cultivo celular en cualquier etapa, lo que significa que el producto puede ser bien un precursor del producto final o el producto final en sí mismo, o cualquier producto intermedio. Además, es posible alteARNtivamente que la composición que se va a ensayar sea un virus de siembra, o una composición que contiene un virus de siembra, respectivamente. Un virus de siembra en el significado de la presente invención es un virus que se pretende usar para la producción de un antígeno o una vacuna.

Otras composiciones son composiciones farmacéuticas. Preferiblemente, la composición es una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica puede usarse en, o sobre, el cuerpo para prevenir, diagnosticar, aliviar, tratar o curar una enfermedad en seres humanos o animales. Preferiblemente, dicha composición farmacéutica es una preparación de vacuna o un producto intermedio de ésta. En el caso de que la composición farmacéutica sea una preparación de vacuna, también es posible ensayar determinadas muestras de los lotes de vacuna. Otras composiciones que se van a ensayar son, por ejemplo, cualquier muestra de una etapa de proceso que eventualmente da lugar a un producto farmacéutico o de vacuna, por ejemplo, una muestra de cultivos celulares a partir de los cuales deriva el agente activo, o cualquier producto intermedio.

Como las contaminaciones con un agente adventicio pueden ocurrir, o pueden ensayarse adecuadamente, en cualquier momento durante el proceso de fabricación, el método según la invención puede realizarse en cualquier etapa durante la fabricación de dicha composición.

La composición que se va a ensayar comprende al menos un agente activo. Un agente activo en el significado de la presente invención indica cualquier material químico o biológico o compuesto que es el principio activo en la composición. En el caso de una composición farmacéutica, el agente activo puede ser un compuesto fármaco, tal como un fármaco biofarmacéutico, y especialmente un polipéptido expresado. Preferiblemente, el agente activo es un antígeno, preferiblemente el antígeno es un virus inactivado o atenuado, y más preferiblemente el antígeno es un antígeno viral. Los ejemplos de estos antígenos virales son por ejemplo partículas de virus tales como partículas de virus parcialmente fragmentados tales como antígenos de virus fragmentados, antígenos de cubierta purificados tales como antígenos de subunidades de virus o virosomas. Un virosoma es una vesícula de fosfolípidos en bicapa unilamellar con un diámetro medio adecuado, por ejemplo en el intervalo de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 150 nm. Esencialmente, los virosomas representan cubiertas de virus vacías reconstituidas, desprovistas de la nucleocápside incluyendo el material genético del virus fuente. Los virosomas no son capaces de replicarse pero son vesículas activas de fusión pura que contienen glicoproteínas de cubierta viral funcionales tales como hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) del virus influenza intercaladas en la membrana de fosfolípidos en bicapa. También se prefiere que el agente activo comprenda al menos un componente de un virus o una partícula de virus, preferiblemente el agente activo es una partícula de virus influenza.

Como el método según la presente invención es especialmente útil en el campo de la producción de vacunas pandémicas, según una realización preferida, el agente activo es un antígeno o componente de vacuna derivado de una partícula de virus influenza, que puede estar presente en vacunas de influenza. Estas vacunas de influenza pueden estar basadas en cualquier cepa de influenza adecuada. Las vacunas de influenza incluyen típicamente antígenos de al menos una cepa de virus influenza A, B y C, preferiblemente de al menos una cepa de influenza A o B. Las cepas recomendadas para vacunas pueden cambiar de estación a estación. También puede ser posible que la vacuna se base en más de una cepa de influenza adecuada. Por ejemplo, la vacuna de influenza puede incluir dos cepas de influenza A y una cepa de influenza B. También puede ser posible además que la vacuna pueda ser no sólo una mono vacuna sino también una vacuna bi, tri o multivalente, preferiblemente la vacuna es una vacuna trivalente. Las vacunas de influenza que contienen el agente activo, preferiblemente el antígeno o el componente de vacuna derivado de una partícula de virus influenza, pueden fabricarse por cualquier técnica que es conocida para un experto en la técnica. Por ejemplo, las vacunas pueden fabricarse usando construcciones de polinucleótido que codifican el agente activo o parte del agente activo, o infectando huevos o células con preparaciones de virus vivos. Preferiblemente, las vacunas se fabrican infectando huevos o células con preparaciones de virus vivos. En el caso en el que la fabricación de vacunas esté basada en células, se usan las células que son capaces de albergar virus en crecimiento, por ejemplo, células de mamíferos tales como MDCK (células de riñón canino Madin-Darby), CHO (células de ovario de hámster chino), BHK (células de riñón de cría de hámster), Vero (células derivadas de células epiteliales de riñón del mono verde africano), MRC-5 (fibroblastos de pulmón humano secundarios), PER.C6 (células derivadas de células retinales embrionarias humanas), WI-38 (células derivadas de tejido de pulmón fetal humano) y semejantes. Habitualmente, el virus o la preparación de virus vivos, respectivamente, se inyecta en las células en las que se multiplica. Las paredes exteriores de las células se retiran, recogen, purifican, e inactivan. En una fabricación basada en huevos, habitualmente el virus o preparación de virus vivos, respectivamente, se inyecta en el huevo y se acumula en el fluido que rodea el embrión. El embrión se infecta de manera que el virus pueda multiplicarse. Después de un determinado periodo de tiempo, el virus se recoge, purifica, e inactiva químicamente. Este virus o pares del virus se usan para producir la vacuna.

El término "polinucleótido" tal y como se usa en la presente memoria debe entenderse que significa una molécula de ácido nucleico bicatenaria o monocatenaria, por ejemplo, una molécula de ADN, ADNc, ADN genómico, ARN y/o ARNm o semejantes. La molécula de ácido nucleico puede estar presente bien como la cadena codificadora o como la cadena complementaria. El polinucleótido puede ser de una fuente natural o producirse por tecnología génica o procesos químicos y métodos de síntesis o puede haber derivado de éstos. Preferiblemente, la secuencia de polinucleótido codifica un antígeno como el agente activo.

El anticuerpo generado en la etapa a), que se ha producido frente a un producto de expresión de una construcción de polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la menos una parte del agente activo, se pone en contacto posteriormente con una composición que comprende al menos un agente activo, en el que el anticuerpo se une específicamente al agente activo, por ejemplo, formando un complejo antígeno-anticuerpo.

En lo que sigue, los anticuerpos usados en el método de la presente invención se describen con detalle. Derivan de una construcción de polinucleótido o vector. El término "construcción de polinucleótido" o "vector", respectivamente, indica una molécula que se usa para introducir polinucleótidos exógenos (o insertos, respectivamente) en células huésped u organismos huésped. La construcción de polinucleótido comprende un polinucleótido como se ha descrito anteriormente, preferiblemente la construcción de polinucleótido o vector es una secuencia de ADN o ARN, y más preferiblemente una secuencia de ADN. La construcción de polinucleótido contiene una secuencia de polinucleótido, o un inserto, respectivamente, que codifica uno o más (poli)péptidos o proteínas. Este polinucleótido, o inserto, respectivamente, puede ser una molécula de ácido nucleico bicatenaria o monocatenaria, por ejemplo, una molécula de ADN, ADNc, ADN genómico, ARN y/o ARNm o semejantes. La molécula de ácido nucleico puede estar presente

bien como la cadena codificadora o como la cadena complementaria. El polinucleótido puede ser de una fuente natural o producirse por tecnología génica o procesos químicos y métodos de síntesis o puede haberse derivado de éstos. Preferiblemente, la secuencia de polinucleótido codifica (poli)péptidos o proteínas que representan al menos una parte del agente activo.

En el significado de la presente invención, la expresión "anticuerpo que se ha producido frente a un producto de expresión de una construcción de polinucleótido" indica que el anticuerpo se obtiene por inmunización de organismos adecuados con la construcción de polinucleótido o produciendo anticuerpos en células o sistemas celulares. Los anticuerpos generados obtenidos de esta inmunización específica, opcionalmente aislados, se unen (opcionalmente específicamente) a (poli)péptidos, que están codificados por una secuencia que está comprendida por la construcción de polinucleótido, en el que los (poli)péptidos representan al menos una parte de los agentes activos.

Preferiblemente, la construcción de polinucleótido o vector, respectivamente, usados en el método según la presente invención comprende a) una región promotora, b) un polinucleótido o inserto, respectivamente, como se describe en la presente memoria, que está unido de manera operativa a la región promotora, y c) opcionalmente, secuencias reguladoras unidas de manera operativa a éstos, que pueden actuar como señales de transcripción, terminación y/o poliadenilación, secuencias potenciadoras y/o secuencias que codifican señales líder y/o secuencias que aseguran una unión a ribosoma eficiente, por ejemplo, una secuencia consenso Kozak. Las secuencias promotoras y/o reguladoras adecuadas son muy conocidas para un experto en la técnica de la biología molecular. En cualquier caso, el experto en la técnica puede encontrar secuencias promotoras y/o reguladoras adecuadas en la bibliografía, por ejemplo, en revistas científicas relevantes y bases de datos génicas, o pueden aislarlas de cualquier organismo deseado usando métodos estándar tales como se describen en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Press, (2000).

Las secuencias de polinucleótido o insertos, respectivamente, que son adecuadas para las construcciones de polinucleótido usadas en el método según la invención pueden determinarse por un experto en la técnica tomando como base la secuencia que codifica el polipéptido que forma al menos una parte del agente activo. En el caso de antígenos virales como agentes activos, las secuencias de nucleótidos que codifican estos antígenos virales se conocen habitualmente, por ejemplo, en el caso de virus o vacunas se preparan por una estrategia de "genética inversa" (véase, por ejemplo, Neumann et al., "Reverse Genetics of Influenza Virus", *Minireview, Virology* 287, 243-250, 2001, las referencias citadas en ella así como técnicas de genética inversa posteriores). La secuencia de polinucleótido completa o partes de ésta que codifican un polipéptido adecuado pueden elegirse por un experto en la técnica e introducirse en la construcción de polinucleótido. Un polipéptido adecuado es un polipéptido que es capaz de incitar una respuesta de anticuerpo efectiva en el sujeto inmunizado. Los polipéptidos adecuados pueden encontrarse, por ejemplo, en bases de datos que son conocidas para los expertos en la técnica, tales como la base de datos PubMed (por ejemplo, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/145284465?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence_ResultsPanel.Sequence_RVDocSum y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>). Preferiblemente, el polipéptido comprende uno o más determinantes antigénicos (epítomos). También es posible que la construcción de polinucleótido contenga un polipéptido que no sólo codifica un agente activo o una parte de un agente activo, sino que también codifica uno o más agentes activos adicionales o partes de otros agentes activos. También es posible que se usen diferentes construcciones de polinucleótido que contienen diferentes polinucleótidos o insertos, respectivamente. Sin embargo, esto podría depender de la presencia y del número de diferentes agentes activos que están presentes en la composición. Así, si hay diferentes tipos de agentes activos presentes, se preparan diferentes tipos de construcciones de polinucleótido, comprendiendo cada tipo una secuencia que codifica un polipéptido que representa al menos una parte de un tipo de agente activo.

Preferiblemente, la construcción de polinucleótido o vector usado en el método de la presente invención es un vector de expresión. Un vector de expresión es un vector que es capaz de controlar la expresión (es decir, la transcripción y la traducción) de los genes que contiene. Incluso más preferiblemente, el vector es un vector de expresión plasmídico de mamíferos, Un ejemplo para dicho vector es el plásmido (p) pCMV. Preferiblemente, un vector usado en la presente invención contiene las características siguientes: a) un promotor de citomegalovirus (CMV), b) una secuencia consenso Kozak que se pone delante del codón de inicio ATG para asegurar una unión a ribosoma eficiente y por lo tanto el nivel máximo de traducción de proteína, y c) una señal de terminación de la transcripción, una señal poli (A), que se pone al final de la secuencia que codifica un (poli)péptido o proteína que representa al menos una parte del agente activo para asegurar una parada apropiada de la transcripción. La secuencia codificadora (es decir, el polinucleótido) puede subclonarse en el vector en sitios de restricción adecuados. El plásmido resultante (construcción de polipéptido o vector, respectivamente, preferiblemente una construcción de ADN o vector) puede usarse entonces para la transformación de células huésped adecuadas tales como células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, células de algas, células de plantas, o células de insectos, preferiblemente células bacterianas tales como células de *E. coli*. Las células huésped transformadas se cultivan en un medio adecuado y se recogen y lisan, y el plásmido se recupera. Los protocolos adecuados para los procedimientos mencionados anteriormente pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Press, (2000), Davis, et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier (1986), y Ausubel, et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience (1988).

Con el fin de caracterizar el polinucleótido plasmídico producido, pueden usarse en general análisis de restricción, electroforesis en gel y métodos bioquímicos y de biología molecular adicionales como método analítico. Estos métodos así como métodos usados para la generación de la construcción de polinucleótido descrita anteriormente son muy conocidos y se han publicado muchos tratados sobre métodos de polinucleótidos recombinantes, incluyendo Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Press, (2000), Davis, et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier (1986), y Ausubel, et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience (1988).

La transformación de las células huésped puede usarse para la amplificación del vector de expresión. Este vector de expresión amplificado puede usarse entonces, a su vez, por ejemplo, para inmunizar un sujeto como se describe más adelante.

Con el fin de generar anticuerpos o antisuero que se une específicamente al agente activo que está presente en la composición que se va a ensayar, en una realización preferida de la invención, se inmuniza un sujeto con la construcción de polinucleótido que comprende un polinucleótido o inserto, respectivamente, que codifica al menos una parte del agente activo. Esta inmunización directa de un sujeto adecuado con la construcción de polinucleótido da lugar a una generación más rápida de anticuerpos dirigidos frente al producto de expresión, ya que, por ejemplo, pueden evitarse etapas del proceso que podrían ser necesarias en el caso en el que la inmunización se lleve a cabo con el agente activo, por ejemplo, el (poli)péptido, en sí mismo. Dicha etapa del proceso requerida en otro caso puede ser por ejemplo la purificación laboriosa del (poli)péptido. El método diligente que ahorra tiempo según la presente invención es particularmente ventajoso en el caso en el que el agente activo sea un antígeno viral, una partícula de virus, un virosoma o cualesquiera partes de los mencionados anteriormente, ya que se puede proporcionar más rápidamente el ensayo de una vacuna segura, de alta calidad. Esto es ventajoso en particular en el caso de un brote pandémico o estacional de influenza, ya que existe la necesidad de un lanzamiento rápido de vacunas pandémicas o estacionales al mercado. Mediante la aplicación del método según la invención, pueden generarse rápidamente anticuerpos específicos dirigidos frente a, y que son homólogos a, la presente cepa pandémica o estacional de estos antígenos de influenza y usarse en la generación de preparaciones de vacuna de influenza. Pueden aplicarse situaciones similares a otras preparaciones de vacuna. Además, como la inmunización puede llevarse a cabo con una construcción de polinucleótido sintética, el riesgo de inmunizar a un animal adecuado con contaminaciones se reduce sustancialmente. Como consecuencia, el riesgo de generar anticuerpos dirigidos frente a estas contaminaciones puede evitarse o al menos reducirse, evitando por lo tanto, por ejemplo, resultados del ensayo del agente extraño falsos negativos. Esto aumentará significativamente la seguridad y calidad de las composiciones ensayadas.

El sujeto también puede inmunizarse con dos o más tipos diferentes de construcciones de polinucleótido, portando cada tipo un polinucleótido diferente. El sujeto que se va a inmunizar es un sujeto no humano, tal como un animal adecuado, por ejemplo, una oveja, una cabra, un conejo, una rata, un ratón, un perro, o una cobaya, preferiblemente, un conejo, un ratón, una cobaya o una rata, y más preferiblemente un conejo. La inmunización del animal adecuado puede llevarse a cabo siguiendo procedimientos estándar muy conocidos. En general, la construcción de polinucleótido opcionalmente purificada se introduce preferiblemente en tejido animal por varios métodos de administración, tales como inyección de la construcción de polinucleótido en disolución salina, usando una aguja hipodérmica estándar, administración por pistola de genes o inyección neumática. Además, la administración puede llevarse a cabo mediante aplicaciones tópicas, o puede llevarse a cabo una administración mediada por citofectina. El animal inmunizado produce entonces anticuerpos que son específicos para al menos partes de, o el total de, los (poli)péptidos o proteínas expresados. Los anticuerpos producidos están presentes en la sangre del sujeto inmunizado y pueden recuperarse por procedimientos estándar que son muy conocidos para los expertos en la técnica. También es posible preparar muestras de suero a partir de la sangre recogida de los sujetos inmunizados. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales, dependiendo de la naturaleza del (poli)péptido o proteína que se está expresando. El término "anticuerpo monoclonal" en el significado de la presente invención indica anticuerpos que tienen la misma especificidad antigénica, es decir, anticuerpos que son todos específicos para el mismo epítipo (determinante antigénico). Esto significa, si el (poli)péptido que se está expresando corresponde a un único epítipo, entonces los anticuerpos son "anticuerpos monoclonales" en los términos de la presente invención. En el caso en el que el (poli)péptido o proteína que se está expresando comprenda más de un epítipo, los anticuerpos específicos que se están produciendo por el animal inmunizado son "anticuerpos policlonales" en los términos de la presente invención.

Después de un determinado periodo de tiempo, por ejemplo hasta 100 días y habitualmente hasta 70 días o hasta 50 días, preferiblemente alrededor de 70 días después de la inmunización, los anticuerpos específicos generados por los animales inmunizados pueden obtenerse según métodos muy conocidos para los expertos en la técnica. Preferiblemente, los animales se exanguinan y se obtienen muestras de suero que contienen los anticuerpos. En una realización preferida, el anticuerpo que se va a usar para la etapa a) está representado simplemente por una muestra de suero obtenida del animal inmunizado.

Antes de la etapa b), el agente activo se neutraliza o inactiva por unión del anticuerpo. Preferiblemente la unión es específica.

El término "unión específica" en el significado de la presente invención indica que el anticuerpo según la presente invención presenta especificidad para el agente activo que está presente en la composición que se va a ensayar, y, por lo tanto, se une selectivamente a dicho agente activo pero no a los agentes extraños que están potencialmente presentes en la composición que se va a ensayar. En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo usado en el método según la presente invención se une exclusivamente a dicho agente activo y nada en absoluto a los agentes extraños que están potencialmente presentes. En el caso en el que el agente activo sea un antígeno como se ha descrito anteriormente, la unión específica del anticuerpo al agente activo también podría ser una reacción cruzada, lo que significa que el anticuerpo según la presente invención presenta reactividad cruzada. El término "reactividad cruzada" en el significado de la presente invención, indica la capacidad de un anticuerpo particular de reaccionar con dos o más antígenos que poseen un epítipo común o altamente homólogo. Éste podría ser el caso, por ejemplo, en situaciones en las que dos o más agentes activos, o dos o más antígenos, respectivamente, estén presentes en la composición que se va a ensayar.

Un agente activo neutralizado en el significado de la presente invención es un agente activo que interacciona con el anticuerpo específico, por ejemplo, que forma un complejo con el anticuerpo específico, y que por lo tanto esencialmente no es ya capaz de ser efectivo. En una realización preferida, el agente activo neutralizado es completamente inefectivo. Un agente activo inefectivo en el significado de la presente invención no es ya capaz por ejemplo de llevar a cabo su función, tal como su función farmacológica. También podría ser que el agente activo inefectivo no sea ya capaz de causar efectos patogénicos cuando se pone en contacto con líneas celulares detectoras sensibles al agente activo o cuando se administra a animales de ensayo. Por cada una de las medidas mencionadas anteriormente, se asegura que el ensayo del agente adventicio al menos principalmente no responde al agente activo en sí mismo.

En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo específico reacciona con el antígeno viral o la partícula de virus, o el al menos un componente del antígeno viral o la partícula de virus, y, así, destruye o inhibe su patogenicidad, por ejemplo, su infectividad y/o virulencia. La potencia neutralizadora del anticuerpo específico puede ensayarse opcionalmente antes de llevar a cabo la etapa b). Pueden llevarse a cabo ensayos de neutralización que son muy conocidos para los expertos en la técnica. Un ejemplo de dicho ensayo de neutralización es mezclar los anticuerpos específicos obtenidos o el suero que contiene los anticuerpos específicos con una cepa de referencia que reacciona de manera cruzada con los anticuerpos específicos. La cepa de referencia que ha reaccionado puede inocularse en líneas celulares detectoras que son sensibles a infecciones con la cepa de referencia, tales como líneas celulares Vero, MRC-5 o MDCK. Estas líneas celulares detectoras se observan durante un periodo de tiempo adecuado, por ejemplo, durante aproximadamente 14 días, y se evalúan para la presencia de efectos patogénicos. Otra posibilidad de ensayar la potencia neutralizadora de un anticuerpo es ensayar la infectividad de la preparación neutralizada ensayando la infectividad en un modelo de huevo (este ensayo se describe por ejemplo en la Farmacopea Europea, capítulo 2.6.16). Un efecto patogénico es un efecto adverso en el crecimiento o mantenimiento de una célula, particularmente los efectos asociados con infecciones microbianas y/o virales. Los efectos patogénicos incluyen, pero no están limitados a, efectos citopáticos (CPE), ruptura celular, inhibición del crecimiento, inhibición de la síntesis de proteínas, o apoptosis. Un CPE es un cambio observable en la estructura celular que puede variar con los tipos celulares y causar la muerte, y puede determinarse según el conocimiento establecido en la técnica. Por ejemplo, algunos de los efectos más comunes de la infección viral son cambios morfológicos tales como redondeado celular y desprendimiento del sustrato, lisis celular, formación de sincitios y formación de cuerpos de inclusión. Una actividad neutralizadora se caracteriza por una reducción de los CPE e inhibición de hemaglutinación, o por una hemadsorción reducida de las células sanguíneas rojas a células infectadas. La actividad neutralizadora también puede caracterizarse por un ensayo de hemaglutinación en sobrenadantes celulares.

Sin embargo, dichos ensayos de neutralización son ensayos de referencia. Esto significa que si la potencia neutralizadora de un anticuerpo pudiera mostrarse una vez para un sistema desarrollado dado, este ensayo de neutralización no tiene que llevarse a cabo consistentemente para este sistema.

Si se encuentra que el suero o anticuerpo ensayado, respectivamente, no tiene una actividad neutralizadora suficiente, podría llevarse a cabo una optimización adicional respecto al diseño del vector, especie usada para la inmunización, dosis y ruta de administración de las construcciones de ADN o vectores, respectivamente, esquemas de inmunización y recogida de sangre, y formato del ensayo de potencia neutralizadora. "Actividad neutralizadora suficiente" en el significado de la presente invención indica que el complejo anticuerpo/agente activo no es capaz de causar efectos detectables cuando se realiza un ensayo de neutralización adecuado.

Según el método inventivo, en la etapa b) se determina la presencia o ausencia del agente extraño o adventicio, respectivamente. Estos ensayos pueden llevarse a cabo en ratones adultos, ratones lactantes y cobayas según requerimientos farmacopeicos, por ejemplo según los requerimientos de la Farmacopea Europea, 2005, capítulo 2.6.16. (lote de virus de siembra). Para los virus propagados en tejidos aviares, se lleva a cabo un ensayo de virus aviares como se describe en la Farmacopea Europea, 2005, capítulo 2.6.16. (lote de virus de siembra y recogida de virus).

Además, la construcción también puede usarse para la inmunización activa de los sistemas de ensayo animales antes de la inoculación con la composición que se va a ensayar como se describe en el capítulo 2.6.16. de la

Farmacopea Europea, 2005, capítulo (2.6.16.). Esto haría que la neutralización anterior del virus de siembra ya no sea necesaria, sin alterar la capacidad del modelo de ensayo animal para responder a agentes contaminantes. Esto incrementará adicionalmente la robustez del sistema de ensayo, reducirá el número de animales usados en el marco del ensayo según 2.6.16., y reducirá significativamente el tiempo necesario para mostrar conformidad con 2.6.16.

El anticuerpo y el agente activo pueden no obtenerse usando la misma construcción de polinucleótido, preferiblemente ADN. Una construcción de polinucleótido puede someterse a diferentes propósitos bien de generar anticuerpos frente al agente activo para ensayo de agentes adventicios según la presente invención, o para producir el agente activo en una escala preparativa, esto significa que la construcción de polinucleótido que se usa para la producción del agente activo, por ejemplo, el antígeno viral o la partícula de virus, no se usa para la generación de los anticuerpos específicos que neutralizan o inactivan este agente activo.

La expresión "no se obtiene usando la misma construcción de polinucleótido" indica que la construcción de polinucleótido se diferencia en al menos un componente estructural y/o funcional, por ejemplo, respecto a determinadas partes de la construcción completa o se ha preparado en un sistema diferente. Por ejemplo, un experto en la técnica sabe que las construcciones de polinucleótido o vectores, respectivamente, pueden diferenciarse respecto a los elementos funcionales que contienen, dependiendo de para qué se pretenda usarlas. Si un vector se usa sólo, por ejemplo, para multiplicar el polinucleótido o inserto, respectivamente, en una célula huésped adecuada, debe contener al menos un origen de replicación (ori) que permita la replicación semi-independiente del vector y el inserto comprendido en la célula huésped. Además, dichos vectores pueden contener elementos funcionales adicionales, tales como un sitio de clonación múltiple (MCS) que incluye protuberancias de nucleótidos para la inserción de un inserto, o múltiples sitios consenso de enzimas de restricción que permiten la inserción del polinucleótido. Si se desea la transcripción del inserto, el vector debe contener además una secuencia promotora. Sin embargo, estos vectores carecen típicamente de secuencias funcionales que son necesarias para la expresión del polinucleótido. En el caso en el que se desea la expresión del polinucleótido con el fin de provocar una generación aumentada de anticuerpos frente a polipéptido expresado, los vectores comprenden además una secuencia de poliadenilación que crea una cola de poliadenilación al final del pre-ARNm transcrito que protege al ARNm de exonucleasas y asegura la terminación de la transcripción y traducción. Además, la cola de poliadenilación estabiliza la producción de ARNm. Además, se favorece sólo una longitud mínima de la región no traducida (UTR) o ninguna UTR, ya que las UTR contienen características específicas que pueden impedir la transcripción o traducción. Además, estos vectores también deben comprender una secuencia Kozak en el ARNm, que ensambla el ribosoma para la traducción del ARNm.

En el caso en el que el agente activo que está presente en una composición que se va a ensayar sea un antígeno viral o una partícula de virus generada usando una construcción de polinucleótido, por lo tanto, el antígeno viral o una partícula de virus se genera usando una construcción de polinucleótido que es preferiblemente diferente de la construcción de polinucleótido usada para la inmunización de un animal adecuado, es decir, usada para la generación de anticuerpos para la etapa a) que preferiblemente se unen específicamente al producto de expresión de la secuencia de polinucleótido que está comprendida por la construcción de polinucleótido usada para la inmunización. Por ejemplo, estas construcciones de polinucleótido pueden diferenciarse respecto a la presencia de una secuencia de poliadenilación, una región no traducida o una región promotora, y más preferiblemente respecto a la presencia de una secuencia de poliadenilación.

Si de otra manera las construcciones de polinucleótido usadas para la producción del agente activo no codificaran sólo la secuencia de este agente activo sino también una secuencia que codifica una contaminación, entonces, después de la inmunización de un sujeto con esta construcción de polinucleótido, esta secuencia que codifica la contaminación además de la secuencia que codifica el agente activo se expresará en dicho sujeto. Como resultado, el sujeto inmunizado generará anticuerpos que son específicos no sólo para el agente activo, sino también para el (poli)péptido contaminante. Como consecuencia, estos anticuerpos específicos de contaminación podrían neutralizar las contaminaciones, dando lugar de esta manera a resultados del ensayo falsos negativos.

Sin embargo, mediante el uso de diferentes construcciones de polinucleótido, los resultados del ensayo falsos negativos se evitan en un ensayo de agentes extraños ya que no se generaron anticuerpos frente a este polipéptido contaminante. Como se ha descrito anteriormente, las construcciones de polinucleótido pueden diferenciarse en elementos estructurales y/o funcionales, dependiendo de para qué se pretende usarlas: En el caso en el que la construcción de polinucleótido se usa, según la presente invención, para la generación de anticuerpos específicos, se usa preferiblemente un vector de expresión, ya que se desea la expresión del polinucleótido que codifica al menos una parte del agente activo en el sujeto inmunizado. AlteARNtivamente, también es posible que las construcciones de polinucleótido se diferencien respecto al polinucleótido respectivo que codifican: Mediante la aplicación de la presente invención no es necesario, por ejemplo, que el vector de expresión usado para la inmunización de un sujeto porte la secuencia de polinucleótido que codifica el agente activo completo. Para la generación de anticuerpos específicos en un sujeto inmunizado también podría ser adecuado que el vector de expresión sólo porte una secuencia de polinucleótido que codifica una parte del agente activo, tal como que codifica una o más regiones conservadas del agente activo.

Además, en una realización preferida de la presente invención, la secuencia de polinucleótido que codifica al menos una parte del agente activo puede someterse a optimización de codones, en particular optimización de codones para

el sujeto usado para la inmunización con la construcción de polinucleótido (véase más adelante). Llevando a cabo las modificaciones indicadas anteriormente - usando diferentes elementos estructurales y/o funcionales, expresando una secuencia de polinucleótido que codifica, por ejemplo, sólo una parte del agente activo y optimización de codones de la secuencia de polinucleótido - el riesgo de expresar además una secuencia que codifica contaminaciones es casi inexistente. Esto es particularmente ventajoso si la composición que se va a ensayar debe cumplir requerimientos de alta calidad, por ejemplo, para usarse para composiciones farmacéuticas tales como vacunas. Además, las modificaciones del polinucleótido mencionadas anteriormente podrían dar lugar además a una proporción de expresión significativamente mejorada, resultando de esta manera en una producción de anticuerpo aumentada y así capacidad de neutralización aumentada.

En una realización preferida adicional, la construcción de polinucleótido que comprende la secuencia que codifica al menos una parte del agente activo se somete a optimización de codones, en particular optimización de codones para el sujeto usado para la inmunización con la construcción de polinucleótido. Como sabe un experto en la técnica, cada aminoácido específico está codificado por un mínimo de un codón y un máximo de seis codones. Las investigaciones previas han mostrado que el uso de codones en genes que codifican los polipéptidos celulares está sesgado entre especies (Kanaya, S. Y. Yamada, Y. Kudo y T. Ikemura (1999), "Studies of codon usage and tARN genes at 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis*' tARNs: gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis", *Gene* 238: 143-155). La degeneración del código genético ofrece a un experto en la técnica entre otras cosas la posibilidad de adaptar la secuencia de polinucleótido a la preferencia de codones de la célula huésped diana, optimizando de esta manera la expresión del polipéptido de unión a antígeno deseado de la presente invención. Un experto en la técnica sabe cómo adaptar la secuencia de polinucleótido a la preferencia de codones de la célula huésped diana u organismo que se inmuniza con la construcción de polinucleótido. Por ejemplo, si el organismo inmunizado es un animal adecuado tal como un conejo, una oveja, una cabra, una rata o un ratón, la secuencia de polinucleótido puede adaptarse a la preferencia de codones del animal respectivo. Existen algunas herramientas de software (algoritmos) para optimizar cada diseño de gen tanto para uso de codones específico de organismo como para uso de parejas de codones específico de organismo, por ejemplo, "Protein Translation Engineering® technologies" por CODA genomics.

El anticuerpo se usa para neutralizar o inactivar el agente activo dado, con un ensayo posterior para virus y/o bacterias como agentes extraños. Estos virus y/o bacterias ensayados pueden seleccionarse por ejemplo del grupo que consiste en *Pneumovirinae*, tal como el género *Pneumovirus*, incluyendo el virus sincitial respiratorio (RSV); *Morbillivirus* de la familia *Paramyxoviridae*, tal como virus del sarampión; *Enterovirus* de la familia *PicoARNviridae*, tal como virus *Coxsackie*, por ejemplo coxsackie B5, virus echo, grupo de enterovirus A-D, y rinovirus; *Reoviridae* de mamíferos, en particular ortoreovirus (por ejemplo, reovirus de mamíferos tales como reovirus 1, 2, y 3) y rotavirus; miembros de *Retroviridae*, por ejemplo *Orthoretrovirinae*, tales como los retrovirus, *Metapneumovirus* de la familia *Paramyxoviridae*, tales como metapneumovirus humano (HMPV), o virus parainfluenza tipo 1, 2, 3, y 4; *Rubulavirus* de la familia *Paramyxoviridae*, tales como virus de las paperas; *Togaviridae*, tales como *Rubellavirus*; *Coronaviridae*, tales como el coronavirus SARS y otros coronavirus humanos tales como coronavirus OC43, 229E, NL63, y HKU1; *Rinovirus* de la familia *PicoARNviridae*, tales como cepas M de Rinovirus; virus de la Varicela Zóster (VZV), también conocido como virus del herpes humano 2 (HHV3); *Polyomaviridae*, tales como el poliomavirus SV-40, el poliomavirus BK y el poliomavirus JC; *Circovirus* porcinos; *PicoARNvirus* porcinos, tales como virus de la enfermedad vesicular porcina (SVDV) y virus Teschen-Talfan; miembros de *Parvoviridae*, tales como parvovirus canino (CPV), bocavirus o parvovirus porcinos; Virus de parainfluenza (PIV); miembros de *Orthomyxoviridae*, incluyendo virus influenza tipo A y B; miembros de *Paramyxoviridae paramyxovirinae*, incluyendo PIV-1, PIV-2 y PIV-3; *Herpesviridae*, tales como virus del herpes simple 1 y 2, virus del herpes simple humano tipo 6, 7 u 8, citomegalovirus y virus de Epstein Barr; *Adenoviridae*, tales como los adenovirus, incluyendo adenovirus humano, de simio y aviar, tales como adenovirus aviar 1; *Circovirus* aviares; *Reoviridae* aviar, en particular ortoreovirus, tales como reovirus aviares; miembros de *Papillomaviridae*, incluyendo virus del papiloma humano; miembros de *Flaviviridae*, tales como el virus del Nilo Occidental; y *BiARNviridae*, tales como virus de la enfermedad bursal infecciosa (también conocido como virus gumboro), bacterias *Chlamydia*, incluyendo *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* y *C. psittaci*; y *Mycoplasma*.

En una realización preferida adicional del método según la invención, el polipéptido que está contenido en la construcción de polinucleótido comprende una secuencia codificadora de hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA). La hemaglutinina puede encontrarse por ejemplo en la superficie de los virus influenza. Es una glicoproteína antigénica que es responsable de la unión del virus a la célula que está siendo infectada. Hasta la fecha, se conocen al menos 16 antígenos HA de influenza diferentes. Estos subtipos se denominan H1 a H16. NA es una enzima que escinde las uniones glicosídicas del ácido neuramínico. Hasta la fecha, se conocen al menos nueve subtipos de neuraminidasa de influenza. Estos subtipos pueden encontrarse, por ejemplo, en bases de datos que son conocidas para los expertos en la técnica, tales como la base de datos PubMed (por ejemplo, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore> y http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/145284465?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence_ResultsPanel.Sequence_RVDocSum). En una realización preferida, la construcción de polinucleótido comprende cualquiera de estas secuencias codificadoras de HA y/o NA, bien solas o en combinación unas con otras. También es posible que la construcción de polinucleótido contenga sólo partes de estas secuencias. Preferiblemente, la construcción de polinucleótido contiene la secuencia completa o una parte de la secuencia que codifica H1, H2, H3,

H5, H6, H7, N1, N2, N3 o N7, bien solas o en combinación, preferiblemente H5. En una realización preferida adicional, la construcción de polinucleótido comprende secuencias o parte de las secuencias que codifican H1N1, H2N2, H3N2, H6N1, H7N3 o H7N7, preferiblemente las secuencias o parte de las secuencias que codifican H5N1.

En una realización preferida adicional del método según la invención, el agente activo comprende un antígeno de influenza y la construcción de polinucleótido comprende una secuencia de polinucleótido que tiene, por ejemplo, al menos 90%, preferiblemente, por ejemplo, al menos 95%, y lo más preferiblemente, por ejemplo, 100% de identidad de secuencia con el ácido nucleico mostrado en SEQ ID NO: 1 ó 2. Dichas secuencias de polinucleótido se someten a optimización de codones para una expresión eficiente y así el concepto de inmunización basada en vector de ADN de antígeno de influenza en un sujeto mamífero, preferiblemente para una o ambas secuencias codificadoras de HA y NA de influenza, más particularmente aquellas relacionadas con H5 y N1, respectivamente. La construcción de polinucleótido también puede comprender, por ejemplo, secuencias de polinucleótido que hibridan con una cadena complementaria de las secuencias de nucleótidos mencionadas anteriormente (ácido nucleico mostrado en SEQ ID NO: 1 ó 2) o que son degeneradas de las secuencias de nucleótidos mencionadas anteriormente. Los términos "hibridar" o "hibridación" describen el proceso por el cual un polinucleótido monocatenario se empareja por bases con una cadena de polinucleótido complementaria. En el contexto de la presente invención, el término "hibridación" significa una hibridación en condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente en condiciones astringentes, por ejemplo como se describe en Sambrook et al. (2000), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. Las condiciones astringentes adecuadas incluyen disoluciones de sal de aproximadamente 0,9 molar a temperaturas de 35 grados C a 65 grados C. Las condiciones de hibridación astringente pueden comprender las condiciones siguientes:

Tampón de hibridación: 7% SDS
250 mM NaCl
250 mM tampón K-fosfato pH 7,0
1 mM EDTA

Temperatura de hibridación: 58 grados C a 60 grados C

Tiempo de hibridación: toda la noche

Tampón de lavado: (I) 2 x SSC, 0,1% SDS
(II) 0,2 x SSC, 0,1% SDS

Temperatura y tiempo de lavado: cada uno 2 x 30 min a 55 grados C a 60 grados C.

Los polinucleótidos mencionados anteriormente que tienen, por ejemplo, al menos 90%, preferiblemente, por ejemplo, al menos 95%, y lo más preferiblemente, por ejemplo, 100% de identidad de secuencia con el ácido nucleico mostrado en SEQ ID NO: 1 ó 2 también comprenden fragmentos, derivados, análogos o partes de las secuencias de polinucleótido. Los fragmentos, derivados, análogos o partes también pueden ser variaciones o mutaciones naturales, en los que estas mutaciones pueden haber ocurrido de forma natural o pueden haberse introducido, por ejemplo, por mutagénesis dirigida. Además, las variaciones pueden comprender además secuencias sintéticas.

El término "fragmentos" debe entenderse como partes de la secuencia de polinucleótido que son lo suficientemente largos como para codificar uno de los polipéptidos descritos. El término "derivado" en este contexto significa que las secuencias se diferencian de las secuencias de polinucleótido descritas anteriormente en una o varias posiciones, pero tienen un alto grado de homología con estas secuencias. La homología aquí significa una identidad de secuencia de al menos 40%, particularmente una identidad de al menos 60% ó 70%, preferiblemente de al menos 80%, 82%, 84%, 86% u 88%, y particularmente preferiblemente de al menos 90%, 92%, 94%, 96% ó 98%. Las variaciones de las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente pueden estar causadas, por ejemplo, por delección, sustitución, inserción o recombinación.

Con el fin de determinar el porcentaje de homología (= identidad) entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos, las dos secuencias se alinean, y se comparan los aminoácidos o nucleótidos en cada posición. Si una posición en las secuencias está ocupada por el mismo aminoácido o el mismo nucleótido, entonces las moléculas en esta posición son homólogas (= idénticas). El porcentaje de homología entre las dos secuencias es una función del número de posiciones comunes que son idénticas (es decir, homología = número de posiciones idénticas por número total de posiciones x 100).

La homología se calcula sobre el área total de la secuencia de aminoácidos o nucleótidos. Con el fin de comparar diferentes secuencias, están disponibles para el experto en la técnica una variedad de programas basados en diferentes algoritmos. Los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman proporcionan resultados especialmente fiables. Para los alineamientos de secuencia y comparaciones, pueden usarse los programas "PileUp" (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151 153) o "Gap" y "BestFit"

[Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) y Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981)), que están incluidos en el paquete de software GCG [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EEUU 53711 (1991)]. Los valores de homología de secuencia mencionados anteriormente como porcentajes pueden determinarse mediante el programa "Gap" sobre el área de secuencia total con los ajustes siguientes: Peso de Hueco: 50, Peso de Longitud: 3, Concordancia Promedio: 10.000 y Falta de Concordancia Promedio: 0,000. Estos ajustes pueden usarse como ajustes estándar para los análisis de homología de secuencia.

El uso de las construcciones de polinucleótido según la invención permite proporcionar ensayos rápidos, eficientes y fiables para composiciones que contienen agentes activos. Mediante el uso de anticuerpos que se proporcionan inmunizando un sujeto con una construcción de polinucleótido, se evitan las contaminaciones que podrían ocurrir cuando se inmuniza al sujeto con el agente activo en sí mismo. Como consecuencia, el uso de las construcciones de polinucleótido inventivas evita resultados del ensayo falsos negativos. Además, se acelera la generación de los anticuerpos usados en los ensayos respectivos. Como una consecuencia, el ensayo es más rápido. Esto puede ser particularmente ventajoso si el agente activo en la composición que se va a ensayar está constituido por, o deriva de, una partícula de virus, ya que los tiempos de preparación para el lanzamiento de vacunas podrían reducirse significativamente. Esto es particularmente importante para vacunas producidas en la base de tecnología de cultivo celular.

En general, mediante el uso de la construcción de polinucleótido que comprende una secuencia que codifica al menos una parte de un agente activo para producir un anticuerpo específico frente a dicho agente activo, la ausencia de cualquier actividad de la composición indica que el anticuerpo ha inactivado o neutralizado el agente activo y que no están presentes más antígenos en la composición que se va a ensayar.

La ausencia de cualquier actividad respondedora a un agente activo dado en la composición que se va a ensayar significa que el agente activo que está presente en la composición se ha neutralizado o inactivado por la unión específica del anticuerpo al agente activo. El agente activo neutralizado interacciona con el anticuerpo específico, por ejemplo, forma un complejo con el anticuerpo, y por lo tanto esencialmente no es capaz de ser efectivo más, preferiblemente el agente activo neutralizado es completamente inefectivo. Un agente activo inefectivo en el significado de la presente invención, por ejemplo, no es ya capaz de llevar a cabo su función, tal como su función farmacológica o inmunológica. También podría ser que el agente activo inefectivo no es ya capaz de causar efectos patogénicos cuando se pone en contacto con líneas celulares detectoras sensibles al agente activo. La potencia neutralizadora del anticuerpo puede ensayarse como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, una composición que se ha encontrado que es activa todavía contiene agentes activos y, así, es efectiva.

La construcción de polinucleótido, el agente activo, la composición que se va a ensayar y el agente extraño o infeccioso se describen anteriormente, así como la inmunización de un sujeto adecuado y la neutralización del agente activo. Preferiblemente, el agente activo es un antígeno, más preferiblemente un antígeno viral o una partícula de virus, o el agente activo comprende al menos un componente de un virus o una partícula de virus, preferiblemente el agente activo es una partícula de virus influenza. Preferiblemente, la composición que se va a ensayar es una muestra de un cultivo celular a partir del cual se produce el agente activo o un producto derivado de este cultivo celular, también se prefiere que la composición que se va a ensayar sea una composición farmacéutica, preferiblemente una preparación de vacuna o un producto intermedio de ésta. También se prefiere que la composición que se va a ensayar sea un virus de siembra, o una composición que contiene un virus de siembra, respectivamente.

Se prefiere además que el agente extraño o infeccioso sea un virus como se ha descrito anteriormente.

Mediante el uso de una construcción de polinucleótido que comprende una secuencia que codifica al menos una parte de un agente activo para producir un anticuerpo específicamente frente a dicho agente activo, pueden llevarse a cabo por ejemplo ensayos de control (negativo o positivo). En dicho ensayo control, una composición debe ensayarse particularmente respecto a si el agente activo (frente al cual está dirigido el anticuerpo) está presente o no en la composición. Para este propósito, el anticuerpo que se proporciona por inmunización de un sujeto adecuado con la construcción de polinucleótido se pone en contacto con la composición que se va a ensayar. En el caso en el que la composición ensayada no muestre ninguna actividad después de la adición del anticuerpo específico, el agente activo está presente en la composición. Opcionalmente, antes de poner en contacto la composición que se va a ensayar con el anticuerpo específico, puede ensayarse la potencia neutralizadora del anticuerpo como se ha descrito anteriormente.

Mediante el uso de una construcción de polinucleótido que comprende una secuencia que codifica al menos una parte de un agente activo para producir un anticuerpo específicamente frente a dicho agente activo, puede llevarse a cabo un ensayo de agentes extraños. El ensayo de los agentes extraños se lleva a cabo como se ha descrito anteriormente.

La presente invención también se refiere a un proceso para ensayar una composición farmacéutica en cualquier etapa de la producción de ésta, en particular una vacuna, en el que en al menos un punto de tiempo del proceso de producción se lleva a cabo un método para ensayar agentes extraños en la composición como se ha descrito anteriormente. El ensayo de los agentes extraños puede llevarse a cabo en cualquier etapa del proceso de

producción o fabricación, respectivamente, de la composición farmacéutica. Preferiblemente, el ensayo puede llevarse a cabo en los lotes de siembra o en las recogidas de virus, y más preferiblemente el ensayo puede llevarse a cabo en los lotes de siembra. Además, también puede llevarse a cabo una vez o repetidamente, por ejemplo, al comienzo y/o al final del cultivo celular, o en medio. El ensayo de los agentes extraños también puede llevarse a cabo en la preparación de vacuna ya preparada, incluyendo por ejemplo el ensayo de una o más muestras de un lote de producción.

Opcionalmente, se lleva a cabo una etapa de tratamiento de la composición farmacéutica, en particular la vacuna o un producto intermedio de ésta, y/o un cultivo celular a partir del cual deriva la composición farmacéutica o la vacuna, mediante el cual el agente extraño se elimina y/o inactiva. Los métodos adecuados para la eliminación del agente extraño de la composición o cultivo celular respectivo son conocidos para el experto en la técnica y comprenden métodos de inactivación o eliminación química y/o física, por ejemplo, métodos de filtración, métodos de adsorción, tratamientos químicos, por ejemplo, por formaldehído o beta-propiolactona, tratamientos físicos tales como calentamiento y/o irradiación electromagnética (por ejemplo, tratamiento con UV-C, o irradiación con radiación gamma), o semejantes. Un beneficio adicional de los métodos útiles de la presente invención reside en que, una vez se ha demostrado la presencia de un agente extraño, la etapa de eliminación del agente extraño puede adaptarse específicamente para eliminar y/o inactivar dicho agente extraño. Por ejemplo, si el agente extraño que está presente en la composición que se va a ensayar se identifica (opcionalmente), puede usarse un método específico de eliminación y/o inactivación, que se sabe que elimina y/o inactiva particularmente dicho agente extraño. Mediante la eliminación y/o inactivación de dicho agente extraño, por ejemplo, podría evitarse el descarte del lote completo de la composición, ahorrando por lo tanto tiempo y dinero.

Además, también se describe el uso de un anticuerpo que se ha producido frente a un producto de expresión de una construcción de polinucleótido que comprende una secuencia que codifica al menos una parte del agente activo, en el que el anticuerpo se une específicamente al agente activo, para la purificación de dicho agente activo, y en el que el anticuerpo y el agente activo no se obtienen usando la misma construcción de polinucleótido. Los términos "anticuerpos que se han producido frente a un producto de expresión de una construcción de polinucleótido" y "el anticuerpo y el agente activo no se obtienen usando la misma construcción de polinucleótido" se describen anteriormente. El término "purificación" tal y como se usa en la presente memoria incluye, pero no está limitado a, purificación por afinidad, que se usa para purificar proteínas reteniéndolas en una columna a través de su afinidad para otras proteínas tales como anticuerpos (que se han producido como se describe en la presente memoria) que se han inmovilizado en un soporte sólido, por ejemplo, una columna, y separación, por ejemplo, la separación de diferentes antígenos. Preferiblemente, el agente activo es un antígeno de virus, en particular un antígeno de influenza. El uso del anticuerpo según la presente invención permite la purificación rápida y altamente específica de las partículas de virus que se originan a partir de o representan la cepa de virus cuya purificación se desea, ya que los anticuerpos usados para la purificación se producen específicamente frente a un producto de expresión de esta cepa de virus.

Preferiblemente, el anticuerpo que se usa para la purificación de un agente activo es un anticuerpo como se ha definido anteriormente. Se prefiere además que el anticuerpo que se usa para propósitos de purificación comprenda además una etiqueta de afinidad para unión a una fase sólida.

Además, se describe un polinucleótido que comprende una secuencia que tiene, por ejemplo, al menos 90%, y preferiblemente, por ejemplo, al menos 95% de identidad de secuencia con el ácido nucleico mostrado en SEQ ID NO: 1 ó 2. Lo más preferiblemente, el polinucleótido tiene un ácido nucleico mostrado en SEQ ID NO: 1 ó 2. Con respecto a dicho polinucleótido, se hace referencia a la descripción anterior.

También se describe una construcción de polinucleótido que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que tiene, por ejemplo, al menos 90%, y preferiblemente, por ejemplo, al menos 95% de identidad de secuencia con el ácido nucleico mostrado en SEQ ID NO: 1 ó 2. Lo más preferido, la construcción de polinucleótido comprende un polinucleótido que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO: 1 ó 2. Con respecto a dicho polipéptido, se hace referencia a la descripción anterior. La construcción de polinucleótido también se describe anteriormente.

También se describen células huésped procariotas o eucariotas que comprenden los polinucleótidos como se ha descrito anteriormente o una construcción de polinucleótido que comprende dicho polinucleótido. Preferiblemente, las células huésped se transforman de forma estable o transitoria con las construcciones de polinucleótido descritas anteriormente. Respecto al procedimiento de transformación se indica que la transformación puede llevarse a cabo según protocolos estándar. Sin embargo, se hace referencia a Sambrook et al. (2000), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar organismos no humanos, animales transgénicos así como microorganismos transgénicos que contienen los polinucleótidos descritos anteriormente o los vectores o construcciones de polinucleótido descritos anteriormente, respectivamente.

Preferiblemente, las células huésped o los animales o microorganismos expresan y sintetizan el polipéptido de unión a antígeno.

Estas células huésped pueden ser cualesquiera células procariotas o eucariotas, preferiblemente células de microorganismos, más preferiblemente células bacterianas, de levadura, hongo y alga. Entre las células de microorganismos particularmente preferidas están las células de *Escherichia coli*, células de *Streptomyces*, células de *Pichia pastoris* o células de *Schizosaccharomyces*, y las más preferidas son células de *Escherichia coli*.

- 5 La construcción de polinucleótido así como la inmunización del sujeto adecuado se describe anteriormente. Los anticuerpos pueden recuperarse por cualquier procedimiento estándar que es conocido para los expertos en la técnica. Los anticuerpos pueden usarse, por ejemplo, para neutralizar o purificar el antígeno específico.

- La construcción de polinucleótido que comprende la secuencia que codifica al menos una parte de un agente activo puede tener al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia con el ácido nucleico mostrado en SEQ ID NO: 1 ó 2, o la construcción de polinucleótido que comprende una secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 1 ó 2, y se usa para la transformación de células huésped adecuadas tales como células bacterianas, células de levadura, células de hongos, células de algas, células de plantas, o células de insectos, preferiblemente células bacterianas tales como células de *E. coli*. Las células huésped transformadas se cultivan en un medio adecuado y se recogen y lisan, y se recupera la construcción de polinucleótido. La construcción de polinucleótido amplificada puede usarse entonces para la inmunización de un sujeto como se ha descrito anteriormente. Este sujeto inmunizado genera, a su vez, anticuerpos dirigidos frente al producto de expresión de la construcción de polinucleótido, por ejemplo, en este caso frente a la proteína que es al menos una parte de un agente activo. Estos anticuerpos pueden usarse entonces para ensayar agentes extraños en una composición que comprende al menos un agente activo, en el que el agente activo está codificado al menos parcialmente por la secuencia que tiene al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia con el ácido nucleico mostrado en SEQ ID NO: 1 ó 2, o en el que el agente activo está codificado al menos parcialmente por la secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 1 ó 2.

Respecto al método de ensayo para dichos agentes extraños en una composición, se hace referencia a la descripción anterior.

- 25 Los dibujos y ejemplos siguientes, que ilustran la presente invención con más detalle, se presentan para propósitos ilustrativos.

Descripción breve de los dibujos

- La **Fig. 1** muestra la secuencia de nucleótidos del antígeno hemaglutinina con optimización de codones (HA; SEQ ID NO: 1). El primero y los últimos tres nucleótidos (subrayados) representan el codón de inicio y de parada, respectivamente.

La **Fig. 2** muestra la secuencia de nucleótidos del antígeno neuraminidasa con optimización de codones (NA; SEQ ID NO: 2). El primero y los últimos tres nucleótidos (subrayados) representan el codón de inicio y de parada, respectivamente.

- La **Fig. 3** muestra el mapa de la construcción de ADN pCMV-HA, que comprende la secuencia con optimización de codones que codifica HA.

La **Fig. 4** muestra el mapa de la construcción de ADN pCMV-NA, que comprende la secuencia con optimización de codones que codifica NA.

- La **Fig. 5** muestra las secuencias de ADN plasmídico totales de pCMV-HA. Las enzimas de restricción para la construcción de plásmido están subrayadas, y la secuencia del gen HA optimizada por el algoritmo CODA está en negrita.

La **Fig. 6** muestra las secuencias de ADN plasmídico totales de pCMV-NA. Las enzimas de restricción para la construcción de plásmido están subrayadas, y la secuencia del gen NA optimizada por el algoritmo CODA está en negrita.

Ejemplos

- 45 **1. Preparación del polipéptido que codifica HA y NA y la construcción de ADN**

Los vectores de ADN se han preparado a partir de las secuencias conocidas de las proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) del virus influenza A/Viet Nam/1194/2004 (H5N1) (las secuencias que codifican la HA y la NA, respectivamente, se describen en la base de datos PubMed, véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/145284463?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence_ResultsPanel.Sequence_RVDocSum y http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/145284406?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence_ResultsPanel.Sequence_RVDocSum).

Las secuencias codificadoras de HA y NA se optimizaron por ordenador, por ejemplo, como se describe en Roth, D.A. et al., "Translational Engineering and Synthetic Biology", Landes Bioscience, 2007. Específicamente, el uso de

codones y uso de pares de codones de las secuencias codificadoras de HA y NA se optimizaron según *Oryctolagus cuniculus*. En un intervalo de variación de homología razonable descrito en la descripción anterior, la optimización de codones podría llevarse a cabo asimismo para otros sujetos que se van a inmunizar por las secuencias codificadoras de HA y NA proporcionadas. Las regiones no traducidas en 5' aguas arriba también se optimizaron para evitar estructuras de ARN secundarias no deseadas que podrían dificultar el inicio de la traducción. Los genes de HA y NA optimizados por el algoritmo CODA se ensamblaron y clonaron en vectores pCMV, que están disponibles comercialmente en una gama completa de proveedores, tales como Clontech Laboratories, Inc. Ambas construcciones de pCMV contenían las características siguientes:

- Un vector de expresión de mamíferos dirigido por un promotor de citomegalovirus (CMV), que se usó para producir un alto nivel de transcritos de ARN,

- Una secuencia consenso Kozak situada delante del codón de inicio ATG para asegurar una unión a ribosoma eficiente y por lo tanto el nivel máximo de traducción de proteína,

- Una señal de terminación de la transcripción, la señal poli (A), se situó al final del gen para asegurar una parada apropiada de la transcripción.

Los genes de HA y NA optimizados por el algoritmo CODA se sub-clonaron en el vector dirigido por el promotor CMV usando enzimas de restricción (Nhe I y Xba I) y se denominaron pCMV-HA y pCMV-NA, respectivamente. Las secuencias correctas se confirmaron por digestión con enzima de restricción y por secuenciación de ADN. Los mapas de vectores y las secuencias de ADN se listan en las Figuras 3-6.

Las construcciones de ADN se transfectaron separadamente en células de *E. coli*, a partir de las cuales se preparó un Banco de Células Primario ("Master Cell Bank", MCB). El MCB se ensayó para esterilidad, bacteriófagos, retención de marcador plasmídico, e identificación del plásmido según métodos estándar conocidos para los expertos en la técnica.

2. Producción de plásmidos

La producción de plásmidos a granel se realizó a partir de un cultivo de *E. coli*, seguido del aislamiento, purificación y caracterización de plásmido posterior. El plásmido a granel purificado se ensayó para integridad del ADN, proporción DO 260/280, análisis en gel de agarosa, análisis de restricción, secuencia de ADN, proteínas contaminantes, y endotoxinas según métodos estándar conocidos para los expertos en la técnica.

3. Inmunización de los animales y generación del antisuero

Posteriormente, se generó antisuero inmunizando 2 grupos de 6 conejos cada uno. Cada conejo se inoculó con 0,5 ml de material de ADN (es decir, el plásmido) el día de estudio 0, 28, y 56. Cada dosis consistió en 1,0 mg del ADN total. Un grupo de conejos se inmunizó con ADN de HA monovalente y el otro grupo de conejos se inmunizó con una mezcla bivalente 1:1 de ADN de HA y NA. Se recogieron muestras de sangre pre y post-inmunización de todos los animales en el día 0, 28, 35, 42 y 56. Todos los animales se sacrificaron por exanguinación el día de estudio 70. Todos los conejos eran sanos, activos y desprovistos de cualquier signo clínico sugerente de problemas relacionados con la dosificación o artículo de ensayo a lo largo del periodo de observación. Todos los conejos eran sanos y sobrevivieron a lo largo del periodo de estudio y no mostraron ninguna reacción adversa al antígeno.

La sangre obtenida que contiene los anticuerpos generados puede procesarse, por ejemplo, para obtener muestras de suero que contienen anticuerpos neutralizadores específicos, o para obtener anticuerpo aislado específico para el producto de expresión del plásmido/vector.

4. Ensayo de neutralización

Las muestras de suero pueden prepararse a partir de la sangre recogida y puede llevarse a cabo el ensayo de la potencia neutralizadora frente a Virus de Siembra de Trabajo (WSV) de la cepa de referencia pandémica NIBRG-14. NIBRG-14 es una cepa semejante a A/Viet Nam/1194/2004 reasociada usada para la fabricación de vacunas; esta cepa puede obtenerse de NIBSC (véase <http://www.nibsc.ac.uk/> y http://www.nibsc.ac.uk/flu_site/pandemic.html). Estos ensayos de neutralización de suero pueden realizarse como sigue:

Puede mezclarse WSV diluido dos veces con una serie de cuatro diluciones de 3 veces de los 12 sangrados de conejo finales. Estas diluciones de suero pueden prepararse en un matraz separado, y la homogeneización y recubrimiento de los bordes puede realizarse girando la disolución ligeramente a lo largo del matraz. El WSV puede pipetarse directamente en la dilución de suero, y la dilución resultante puede homogeneizarse suavemente. Después, la dilución puede transferirse a un nuevo matraz limpio e incubarse durante 2 horas a 37°C girando suavemente en una placa de giro.

Un día antes de la inoculación de las células, pueden prepararse matraces de 75 cm² de cada línea celular: 6 matraces para WSV neutralizado, uno para controles positivos e inhibición, y uno para control negativo.

Controles positivos

Los controles positivos correspondieron a la inoculación de aproximadamente 1.000 TCID₅₀ ("Dosis Infecciosa de Cultivo Tisular", cantidad de un agente patógeno que producirá cambio patológico en el 50% de los cultivos celulares) de virus de Parainfluenza Humano 3. Un control positivo puede inocularse en el día 0 y usarse como control positivo para los ensayos de hemadsorción y/o hemaglutinación en el día 14.

5 Controles de inhibición

Las células diana pueden inocularse con la muestra que se va a ensayar a la que previamente se han adicionado aproximadamente 1.000 TCID₅₀ de virus de Parainfluenza Humano 3.

Control negativo

- 10 Para el control negativo, el medio de dilución específico para cada línea celular puede inocularse por matraz. Este control puede tratarse en las mismas condiciones que la muestra que se va a ensayar.

Inoculación

- 15 La disolución de WSV que ha reaccionado, es decir, potencialmente neutralizada, puede inocularse entonces en tres líneas celulares detectoras (células Vero (obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) CCL-81; Yasumunra Y. et al., 1962), células MRC-5 (obtenidas de ATCC CCL-171; Jacobs J.P. et al., 1970) y células MDCK (ECACC 84121903; S.H. Darby, 1958)). Pueden inocularse 3 ml de cada disolución (medio de dilución, muestra que se va a ensayar) en cada matraz para el WSV potencialmente neutralizado y controles. Después de 70 minutos +/- 10 minutos a 37°C +/- 2°C, el inóculo puede retirarse. El medio de supervivencia puede añadirse entonces para obtener un volumen final de 20 ml. Los matraces de cultivo pueden ponerse a 37°C +/- 2°C en presencia de 5 +/- 0,5% CO₂.
- 20 Las células inoculadas pueden observarse regularmente durante 14 días bajo microscopio invertido y evaluarse para la presencia de efecto citopático (CPE) y actividad hemaglutinante. La potencia neutralizadora puede detectarse por observación del CPE, por ensayos de hemadsorción y por ensayos de hemaglutinación.

4.1 Observación del CPE

Las células pueden observarse regularmente durante el periodo de ensayo bajo microscopio invertido.

25 4.2 Ensayos de hemadsorción

- Los ensayos de hemadsorción pueden llevarse a cabo al final del periodo de ensayo (día 14). Las células en monocapa pueden lavarse una vez o dos veces con tampón PBS. Después, puede añadirse en cada pocillo una disolución que contiene 0,4% de tres tipos de eritrocitos (humano, de cobaya Hartley y gallo) preparados en PBS. La hemadsorción es específica de una infección viral y positiva cuando un tipo de eritrocitos se fija en las células.
- 30 Después de incubación a 5°C +/- 3°C durante aproximadamente 30 minutos, las células pueden someterse a un examen por microscopía. Las placas se incuban a 37°C +/- 2°C durante aproximadamente 30 minutos adicionales antes de una segunda observación.

4.3 Ensayos de hemaglutinación

- 35 Los ensayos de hemaglutinación pueden llevarse a cabo en los sobrenadantes de cultivos celulares de matraces usados para los ensayos de hemadsorción en el día 14. El sobrenadante puede recuperarse y aclararse con una centrifugación a baja velocidad. El sobrenadante aclarado puede ponerse entonces en placas de 6 pocillos. Después, puede añadirse en cada pocillo una disolución que contiene 0,25% de los tres tipos de eritrocitos (humano, de cobaya Hartley y gallo) preparados en PBS. Después de aproximadamente 30 minutos a 5°C +/- 3°C, los sobrenadantes pueden someterse a un examen por microscopía. Las placas de 6 pocillos pueden incubarse entonces a 37°C +/- 2°C durante aproximadamente 30 minutos adicionales antes de una segunda observación.

La muestra ensayada se considera desprovista de contaminantes virales usando líneas celulares específicas, por observación de la ausencia de CPE viral y ausencia de actividad de hemadsorción y/o de hemaglutinación específica.

- 45 Adicionalmente, los 48 sangrados interinos pueden ensayarse según el mismo procedimiento, excepto que sólo se usa una línea celular (MDCK). Los resultados pueden compararse con los obtenidos usando suero preparado después de inocular conejos con un virus semejante a A/Viet Nam/1203/2004 reasociado inactivado, una cepa que se sabe que induce anticuerpos con reactividad cruzada en hurones frente a A/Viet Nam/1194/2004.

4.4 Huevos embrionados de gallina

- 50 Según la Farmacopea Europea 6ª Edición, capítulo 2.6.16, los ensayos hemaglutinantes pueden llevarse a cabo usando huevos embrionados de gallina.

Brevemente, pueden usarse huevos SPF (desprovistos de patógeno específico) (origen de los huevos: Couvoir de Cerveloup, 400, domaine de Cerveloup 38210 Vourey, Francia) que se mantuvieron a 12°C +/- 3°C después de la

recepción hasta que pudieron incubarse. La incubación puede tener lugar a 37°C +/- 2°C en una atmósfera a 70% de humedad.

Preparación de las muestras

- 5 Los WSV pueden neutralizarse con antisuero de conejo u oveja. Puede añadirse 1% de antibióticos en disolución acuosa para evitar contaminaciones bacterianas de los huevos. Después, las muestras pueden inyectarse en los huevos con agujas de jeringa adecuadas.

Pre-incubación de los huevos

- 10 En el momento de la recepción y antes de la pre-incubación, los huevos pueden observarse por encima, y los huevos dañados pueden desecharse. Después, los huevos pueden pre-incubarse a 37°C durante 9-11 días. Al final del periodo de pre-incubación, los huevos pueden observarse bajo luz fría con el fin de evitar calentamiento y se desecharon los huevos no fertilizados o los huevos sin embrión vivo.

Inoculación

- 15 Para el análisis de la muestra que se va a ensayar (WSV potencialmente neutralizado), pueden inocularse 30 huevos después de 9-11 días de incubación a través de la ruta alantoica, y para ensayar los controles, pueden inocularse 25 huevos:

Como control negativo, los huevos pueden inocularse con PBS suplementado con antibióticos (por ejemplo, 10 huevos), con antisuero de conejo no diluido solo (por ejemplo, 5 huevos), y con dos tipos de antisuero de oveja solo (por ejemplo, 5 huevos por tipo).

Como control positivo para el ensayo de hemaglutinación, puede usarse el virus Sendai (no diluido).

- 20 La inoculación puede llevarse a cabo como sigue:

Después de la desinfección de las cáscaras de los huevos, puede hacerse un agujero en la cáscara y pueden inocularse 0,5 ml de las muestras que se van a ensayar en 55 huevos a través de la ruta alantoica. Los agujeros en las cáscaras de los huevos pueden llenarse, y los huevos pueden incubarse a 37°C +/- 2°C durante 7 días.

- 25 Al final del periodo de incubación, los fluidos alantoicos de los embriones vivos pueden recogerse después de observación. En el caso de que se observen embriones muertos, el fluido de los embriones respectivos puede almacenarse a < -70°C y 5°C +/- 3°C (en el caso de contaminación bacteriana) para investigaciones adicionales.

Ensayos de hemaglutinación

Al final del periodo de incubación, los ensayos de hemaglutinación pueden llevarse a cabo como sigue:

- 30 Los fluidos pueden aclararse por centrifugación (2.500 g, 10 minutos), y 200 µl de los fluidos pueden distribuirse en cuatro placas de 96 pocillos (50 µl por pocillo) con el fin de realizar ensayos de hemaglutinación. Brevemente, en los pocillos de dos placas de 96 pocillos, pueden añadirse 50 µl de una disolución que contiene 0,5% de los eritrocitos (cobayas, adquiridos en Charles River Laboratory, Francia); y en las otras dos placas de 96 pocillos, pueden añadirse 50 µl de una disolución que contiene 0,5% de los eritrocitos (gallina). La mitad de las placas puede incubarse a 5°C +/- 3°C, la otra mitad a temperatura ambiente. Después de dos horas de incubación, las placas pueden evaluarse para actividades de hemaglutinación.

Las muestras que se van a ensayar se consideran desprovistas de contaminaciones virales, en el caso en el que no pueda observarse actividad de hemaglutinación específica en los fluidos recogidos de huevos inoculados.

5. Ensayo para agentes adventicios/extraños

- 40 El suero neutralizador puede usarse entonces para ensayo de agentes adventicios. Estos ensayos pueden llevarse a cabo según los requerimientos farmacopeicos (Farmacopea Europea capítulo 2.6.16). Estos ensayos pueden llevarse a cabo en ratones adultos, ratones lactantes y cobayas según requerimientos farmacopeicos, por ejemplo según los requerimientos de la Farmacopea Europea, 2005, capítulo 2.6.16. (lote de virus de siembra). Respecto al ensayo que puede llevarse a cabo en ratones lactantes, se indica que los ratones lactantes también pueden inocularse con la composición que se va a ensayar al 1-2 día(s) de edad. Para los virus propagados en tejidos
- 45 aviares, puede llevarse a cabo un ensayo de virus aviares como se describe en la Farmacopea Europea, 2005, capítulo 2.6.16. (lote de virus de siembra y recogida de virus).

5.1 Ratones adultos: ratones CD1

- 50 Pueden aclimatarse tres grupos de, por ejemplo, 10 ratones adultos CD1 (15-20 g, por ejemplo, adquiridos en Charles River Laboratory) durante al menos 48 horas. Un grupo puede recibir el suero neutralizado (30 µl inyectados intracerebralmente (ic), 500 µl inyectados intraperitonealmente (IP)), un grupo puede mantenerse en el caso de aparición de muerte en el periodo de observación y un grupo puede usarse como control negativo.

Los ratones pueden observarse regularmente durante el periodo de ensayo (una o dos veces al día).

No hay virus presentes en la muestra que se va a ensayar, si el 80% de los ratones adultos del grupo que recibió la muestra neutralizada sobrevivió al final del periodo de observación (21 días).

5.2 Ratones lactantes CD1

- 5 Pueden inocularse 30 ratones a la edad de 1-2 día(s) (adquiridos, por ejemplo, en Charles River Laboratory) con el suero neutralizado, 10 ratones pueden usarse como control negativo. Cada ratón lactante recibe 10 µl Ic. y 100 µl IP del suero que se va a ensayar. Los ratones pueden observarse regularmente durante el periodo de ensayo (una o dos veces al día).

- 10 No hay virus presentes en la muestra que se va a ensayar, si el 80% de los ratones adultos del grupo que recibió la muestra neutralizada sobrevivió al final del periodo de observación (14 días).

5.3 Cobayas Hartley

De nueve cobayas (350-450 g, adquiridas, por ejemplo, en Charles River Laboratory, Francia), se pueden inyectar IP a un grupo de cinco animales 5.000 µl de la muestra que se va a ensayar. Cuatro animales pueden observarse durante el periodo de ensayo de 42 días como controles negativos.

- 15 No hay virus presentes en la muestra que se va a ensayar, si no se detecta signo de infección viral (es decir, muerte o lesión macroscópica) durante el periodo de ensayo.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Solvay Pharmaceuticals B.V.	
5	<120> Ensayo de agentes extraños	
	<130> WK 1280	
	<160> 4	
10	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
	<211> 1698	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> antígeno del codón optimizado que codifica hemaglutinina (HA)	
20	<400> 1	
	atggagaaaa ttgtgctgct gttcgccatt gtgtccctgg tgaagtccga ccagatctgc 60	
	atcggctatc acgccaacaa ctccaccgag caggctcgaca ccattatgga aaagaatgtg 120	
	accgtgaccc atgcacaaga catcctggaa aagaccacaca acggcaaact gtgcgacctg 180	
	gacggcgtga agccctgat cctgcgcgac tgctccgtgg ctgggtgggt gctgggaaac 240	
	cctatgtgcg acgagttcat caatgtgccc gagtggctct acatcgttga gaaagccaac 300	
	cccgtcaacg acctgtgtta ccccggtgac ttcaacgact acgaggagct caagcacctg 360	
	ctctcccga tcaaccactt cgagaaaatc cagatcatcc ccaaactctc ctggtccagc 420	
	cacgaagcct cctcggcgt gtctccgct tgctccctacc agggcaagtc ctctttcttc 480	
	cgcaacgtcg tgtggctgat caaaaagaac tccacctacc ccaccattaa gcggtcctac 540	
	aacaacacca accaggaaga cctgctggtg ctgtggggca tccaccatcc caacgacgcc 600	
	gctgagcaga ccaagctgta ccagaaccct accacctaca tctccgtcgg gacatccaca 660	
	ctgaaccagc gcctcgtgcc ccgcattgcc acccgcagca aggtgaatgg gcagtcgggc 720	
	cgcatggagt tcttctggac aatcctgaag cccaacgacg ctatcaactt cgagtccaac 780	
	ggcaacttca tcgctccga gtatgcctac aagatcgta aaaagggcga ctccacaatc 840	
	atgaagtccg agttggagta cggcaactgc aacaccaagt gccagacacc catgggcgt 900	
	atcaactcct ccatgccctt ccacaacatc catccctga ccattggcga gtgccccaaag 960	
	tacgtcaagt ccaaccggct ggtcctggct accggcctcc gcaactcccc tcaaaggga 1020	
	cgcaggcgca aaaagagagg cctgttcgga gccatagctg ggttcattga gggaggggtg 1080	
	cagggcattg tggatgggtg gtacggctac catcactcca acgagcaggg ctccgggtat 1140	
	gccgccgaca aggagtccac ccagaaggcc attgacggcg tgaccaacaa ggtgaacagc 1200	
	atcatcgaca agatgaacac ccagttcgag gctgttggcc gggagttcaa caacttggag 1260	
	cgccgcatcg agaacctgaa caaaaagatg gaggacggct tcctggatgt gtggacctac 1320	

ES 2 563 678 T3

aacgctgagc tcctgggtgct gatggagaac gagcggaccc tggacttcca cgactccaac 1380
gtcaagaacc tgtacgacaa agtgcgcctc cagctgcggg acaacgcaa ggagctcggg 1440
aatggctgct tcgagttcta ccacaagtgc gacaacgagt gtatggagtc cgtgcgcaat 1500
ggcacctacg actatcccca gtactccgaa gaggcccgcc tgaagcgca agagatctcc 1560
ggggtgaagt tggagtccat tggcatctac cagatcctga gcatctactc caccgtggct 1620
tcctccctcg cctcgccat tatgggtggct ggctgtccc tgtggatgtg ctccaacggc 1680
tccttgcaat gtcgctaa 1698

<210> 2
<211> 1350
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> antígeno del codón optimizado que codifica neuraminidasa (NA)

<400> 2
atgaacccca accagaagat catcaccatt ggcagcatct gcatggtgac cgggatcggt 60
agcctgatgc tgcagatcgg caacatgatc agcatctggg tgtccacag catccatacc 120
ggcaaccagc accagtccga gcccatctcc aacaccaacc tgctgaccga gaaagctgtc 180
gcctccgtga agctggctgg caactcctcc ctgtgtccta tcaatgggtg ggctgtgtac 240
tccaaggaca actccattcg catcggcagc aaaggggatg tcttcgtgat ccgcgagcct 300
ttcatctcct gtagccacct cgaatgccgg accttcttcc tgacacaagg agccctgctg 360
aacgacaagc actccaacgg caccgtgaag gaccgctctc cccaccgcac cctgatgtcc 420
tgccccgtcg gcgaagcccc tagccctac aactcccggt tcgagtcctg cgctggagc 480
gcctctgcct gtcatgatgg gacctcttgg ctgaccattg gcatctccgg ccctgataat 540
ggagcagtggt ctgtgctgaa gtacaacggc atcatcaccg ataccattaa gtctggcg 600
aacaacatcc tccgaccca ggagtcgag tgtgcctgtg tcaatggctc gtgctttacc 660
gtgatgaccg atgggccaag caatggacaa gcctccaca agatcttcaa gatggaaaag 720
ggcaagggtg tgaagtccgt cgagttggac gccctaatt accactacga ggagtgcagc 780
tgttaccctg acgtgggga gatcacctgt gtgtgcaggg acaactggca cgggagcaac 840
aggccttggg tctccttcaa ccagaacttg gagtaccaga tcggctacat ctgttccggg 900
gtgttcgggg ataatcccag gcctaacgat ggcaccgggt cctgtggccc tgtgagctcc 960
aacggcgagc gcgggggtcaa gggttctcgt ttcaaatatg gcaatggcgt gtggatcggg 1020
cgcaccaagt ccacaaactc ccggtccggc ttgagatga tctgggaccc caatggatgg 1080
accgagacag acagctcctt ctccgtcaag caggacattg tggctatcac cgactggagc 1140
gggtacagcg gcagcttctg gcagcaccgc gagctcacag gcctcgactg cattcggccc 1200
tgcttttggg tggaactgat ccggggacgg cctaaggaga gcacaatctg gacctccggc 1260
tcagcatct ccttctcggc cgtgaactcc gacacagtgg ggtggtcctg gcctgacgga 1320
gctgaactgc ccttcacat tgacaagtaa 1350

15 <210> 3
<211> 5687

<212> ADN
<213> Artificial

<220>

5 <223> secuencias de ADN de todo el plásmido de pCMV-HA

<400> 3

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta	60
ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatatatg gctcatgtcc	120
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg	180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc	240
gcctggctga ccgcccacg acccccgcgc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat	300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc	360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcg cccctattg acgtcaatga	420
cggtaaattg cccgcctggc attatgcccga gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg	480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacac	540
caatgggctg ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt	600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataaccc	660
cgccccgttg acgcaaattg gcggtagggc tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc	720
togtttagtg aaccgtcaga tcactagaag ctttatttgc gtagttttatc acagttaaatt	780
tgctaacgca gtcagtgtt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggtc	840
gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaagggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa	900
actgggcttg togagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggctcttac	960
tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta	1020
aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagcgcc accatggaga aaattgtgct	1080
gctgttcgcc attgtgtccc tgggtgaagtc cgaccagatc tgcacggct atcacgcaa	1140
caactccacc gagcaggtcg acaccattat ggaaaagaat gtgaccgtga cccatgcaca	1200
agacatcctg gaaaagaccc acaacggcaa actgtgcgac ctggacggcg tgaagcccct	1260
gatcctgcgc gactgctccg tggctgggtg gctgctggga aaccctatgt gcgacgagtt	1320
catcaatgtg cccgagtggg cctacatcgt tgagaaagcc aaccccgta acgacctgtg	1380
ttaccccggt gacttcaacg actacgagga gctcaagcac ctgctctccc ggatcaacca	1440
cttcgagaaa atccagatca tccccaaatc ctctgggtcc agccacgaag cctccctcgg	1500

cgtgtcctcc gcttgtccct accagggcaa gtctccttc ttcgcaacg tcgtgtggct 1560
 gatcaaaaaag aactccacct accccacct taagcgggtcc tacaacaaca ccaaccagga 1620
 agacctgctg gtgctgtggg gcatccacca tcccaacgac gccgtgagc agaccaagct 1680
 gtaccagaac cctaccacct acatctccgt cgggacatcc aactgaacc agcgccctgt 1740
 gccccgcatt gccaccgca gcaaggtgaa tgggcagtc gcccgcatgg agttcttctg 1800
 gacaatcctg aagcccaacg acgctatcaa cttcgagtc aacggcaact tcatcgctcc 1860
 cgagtatgcc tacaagatcg ttaaaaagg cgactccaca atcatgaagt ccgagttgga 1920
 gtacggcaac tgcaacacca agtgccagac acccatgggc gctatcaact cctccatgcc 1980
 ctccacaac atccatcccc tgaccattgg cgagtgcgcc aagtacgtca agtccaaccg 2040
 gctggctctg gctaccggcc tccgcaactc ccctcaaagg gaacgcaggc gcaaaaagag 2100
 aggcctgttc ggagccatag ctgggttcat tgaggagggg tggcagggca tggtaggatg 2160
 gtggtacggc taccatcact ccaacgagca gggctccggg tatgccgccg acaaggagtc 2220
 caccagaag gccattgacg gcgtgaccaa caaggtgaac agcatcatcg acaagatgaa 2280
 caccagttc gaggtgttg gccgggagtt caacaacttg gagcgccgca tcgagaacct 2340
 gaacaaaaag atggaggacg gcttctctga tgtgtggacc tacaacgctg agtccttgt 2400
 gctgatggag aacgagcggc ccctggactt ccacgactcc aacgtcaaga acctgtacga 2460
 caaagtgcgc ctccagctgc gggacaacgc caaggagctc gggaatggct gcttcgagtt 2520
 ctaccacaag tgcgacaacg agtgtatgga gtccgtgcgc aatggcacct acgactatcc 2580
 ccagtactcc gaagaggccc gcctgaagcg cgaagagatc tccggggtga agttggagtc 2640
 cattggcatc taccagatcc tgagcatcta ctccaccgtg gcttctctcc tcgccctcgc 2700
 cattatggtg gctggcctgt ccctgtggat gtgctccaac ggctccctgc aatgtcgcta 2760
 atctagagtc gacctgggcg gccgcttcga gcagacatga taagatacat tgatgagttt 2820
 ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta tttgtgaaat ttgtgatgct 2880
 attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag ttaacaaca caattgcatt 2940
 cattttatgt ttcaggttca gggggagatg tgggaggttt tttaaagcaa gtaaaacctc 3000
 tacaaatgtg gtaaaatcga taagtatccg ggctggcgta atagcgaaga ggcccgacc 3060
 gatcgccctt cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggacgcgcc tcgtacggcg 3120
 cattaagcgc ggcggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgccc 3180
 tagcgccgcg tctttctgct ttcttccctt cctttctcgc cacttcgcg ggctttcccc 3240
 gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg 3300
 acccaaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg 3360
 tttttcgccc ttgtacgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg 3420
 gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt ataagggtt ttgccgattt 3480

cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat ttttaacaaaa 3540
 tattaacgct tacaatttcc tgatgcggta ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc 3600
 acaccgcata tgggtgactc tcagtacaat ctgctctgat gccgcatagt taagccagcc 3660
 ccgacacccg ccaacacccg ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgctcc eggcateccg 3720
 ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc 3780
 accgaaacgc gcgagacgaa agggcctcgt gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat 3840
 gataataatg gtttcttaga cgtcagggtg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc 3900
 tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcattgagac aataaccctg 3960
 ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc 4020
 ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct tcctgttttt gctcaccag aaacgctggt 4080
 gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct 4140
 caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac 4200
 ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcgggtatt atcccgatt gacgccgggc aagagcaact 4260
 cggtcgccgc atacactatt ctcaaatga cttgggtgag tactcaccag tcacagaaaa 4320
 gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga 4380
 taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt 4440
 tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga 4500
 agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctga gcaatggcaa caacgttgcg 4560
 caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat 4620
 ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat 4680
 tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc 4740
 agatggtaag ccctcccgta tcgtagttag ctacacgacg gggagtcagg caactatgga 4800
 tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgctcactg attaagcatt ggtaactgtc 4860
 agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag 4920
 gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaa atccctaac gtgagttttc 4980
 gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt 5040
 tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccacgg ctaccagcgg tggtttgttt 5100
 gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat 5160
 accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc 5220
 accgcctaca tacctcgctc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa 5280
 gtcgtgtctt accgggttg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg 5340
 ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag 5400

atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag 5460
gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa 5520
cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt 5580
gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg 5640
gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catggctcga cagatct 5687

<210> 4
<211> 5339
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> secuencias de ADN de todo el plásmido de pCMV-NA

<400> 4
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagtatt taatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
gcctggctga ccgcccaacg acccccgcgc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtccg cccctattg acgtcaatga 420
cggtaaattg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact ttctacttg 480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggt atgcggtttt ggcagtacac 540
caatgggctg ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataaccc 660
cgccccgttg acgcaaattg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc 720
tcgttttagt aaccgtcaga tcaactagaag ctttattgct gtagtttata acagttaaatt 780
tgctaacgca gtcagtgttt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggtc 840
gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa 900
actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcacctt ttggtcttac 960
tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta 1020
aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagcgcc accatgaacc ccaaccagaa 1080
gatcatcacc attggcagca tctgcatggg gaccgggatc gttagcctga tgctgcagat 1140
cggcaacatg atcagcatct ggggtgtcca cagcatccat accggcaacc agcaccagtc 1200
cgagcccatc tccaacacca acctgctgac cgagaaagct gtcgcctccg tgaagctggc 1260
tggcaactcc tccctgtgtc ctatcaatgg gtgggctgtg tactccaagg acaactccat 1320
tcgcatcggc agcaaagggg atgtcttcgt gatccgcgag cctttcatct cctgtagcca 1380

cctcgaatgc	cggacotttet	tcctgacaca	aggagccctg	ctgaacgaca	agcaetccaa	1440
cggcaccgtg	aaggaccgct	ctccccaccg	caccctgatg	tcctgccccg	tcggcgaagc	1500
ccctagcccc	tacaactccc	ggttcgagtc	cgtcgccttg	agcgccctctg	cctgtcatga	1560
tgggacctct	tggctgacca	ttggcatctc	cggccctgat	aatggagcag	tggctgtgct	1620
gaagtacaac	ggcatcatca	ccgataccat	taagtccttg	cgcaacaaca	tcctccgcac	1680
ccaggagtcc	gagtgtgcct	gtgtcaatgg	ctcgtgcttt	accgtgatga	ccgatgggccc	1740
aagcaatgga	caagcctccc	acaagatctt	caagatggaa	aagggcaagg	tggatgaagtc	1800
cgtcgagttg	gacgccccct	attaccacta	cgaggagtgc	agctgttacc	ctgacgctgg	1860
ggagatcacc	tgtgtgtgca	gggacaactg	gcacgggagc	aacaggcctt	gggtctcctt	1920
caaccagaac	ttggagtacc	agatcggtca	catctgttcc	ggggtgttcg	gggataatcc	1980
caggcctaac	gatggcaccg	ggtcctgttg	ccctgtgagc	tccaacggcg	caggcgggggt	2040
caagggcttc	tcgttcaaatt	atggcaatgg	cgtgtggatc	gggcgcacca	agtccacaaa	2100
ctcccggctc	ggcttcgaga	tgatctggga	ccccaatgga	tggaccgaga	cagacagctc	2160
cttctccgtc	aagcaggaca	ttgtggctat	caccgactgg	agcgggtaca	gcggcagctt	2220
cgtgcagcac	cccagactca	caggcctcga	ctgcattcgg	ccctgctttt	gggtggaact	2280
gatccgggga	cggcctaagg	agagcacaat	ctggacctcc	ggctccagca	tctccttctg	2340
cggcgtgaac	tccgacacag	tggggtggtc	ctggcctgac	ggagctgaac	tgccttcac	2400
cattgacaag	taatctagag	tcgacctggg	cggccgcttc	gagcagacat	gataagatac	2460
attgatgagt	ttggacaaaac	cacaactaga	atgcagtga	aaaaatgctt	tatttgtgaa	2520
atttgtgatg	ctattgcttt	atttgtaaac	attataagct	gcaataaaca	agttaacaac	2580
aacaattgca	ttcattttat	gtttcagggt	cagggggaga	tgtgggaggt	tttttaaagc	2640
aagtaaaacc	tctacaaatg	tggtaaaatc	gataagtatc	cgggctggcg	taatagcgaa	2700
gaggcccgca	ccgatcgccc	ttcccaacag	ttgcgcagcc	tgaatggcga	atggacgcgc	2760
cctgtagcgg	cgcattaage	gcggcgggtg	tgggtggttac	gcgcagcgtg	accgctacac	2820
ttgccagcgc	cctagcgccc	gtccctttcg	ctttcttccc	ttcctttctc	gccacgttcg	2880
cgggctttcc	ccgtcaagct	ctaaatcggg	ggctcccttt	agggttccga	tttagtgctt	2940
tacggcacct	cgaccccaaa	aaacttgatt	aggggtgatg	ttcacgtagt	gggccatcgc	3000
cctgatagac	ggttttttcgc	cctttgacgt	tggagtccac	gttctttaat	agtggactct	3060
tgttcctaac	tggaaacaaca	ctcaacccta	tctcgggtcta	ttcttttgat	ttataagggga	3120
ttttgccgat	ttcggcctat	tggttaaaaa	atgagctgat	ttaacaaaaa	tttaacgcga	3180
attttaacaa	aatattaacg	cttacaatth	cctgatgcgg	tattttctcc	ttacgcatct	3240
gtgcggatt	tcacaccgca	tatggtgcac	tctcagtaca	atctgctctg	atgccgcata	3300

gttaagccag ccccgacacc cgccaacacc cgtgacgcg ccctgacggg cttgtctgct	3360
cccggcaccc gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagagggt	3420
ttcacccgtca tcaccgaaac gcgcgagacg aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata	3480
ggttaatgtc atgataataa tggttttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt	3540
gcgcggaacc cctatttggt tattttttcta aatacattca aatatgtatc cgtcatgag	3600
acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca	3660
tttccgtgtc gcccttatto ccttttttgc ggcattttgc ctccctgttt ttgctcacc	3720
agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat	3780
cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc	3840
aatgatgagc acttttaaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgtt ttgacgccgg	3900
gcaagagcaa ctccgtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc	3960
agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat	4020
aaccatgagt gataaacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga	4080
gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaaact cgccttgatc gttgggaacc	4140
ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc	4200
aacaacgttg cgcaaacat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt	4260
aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc	4320
tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctcgcg gtatcattgc	4380
agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca	4440
ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca	4500
ttggtaactg tcagaccaag ttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt	4560
ttaattttaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta	4620
acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg	4680
agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc	4740
ggtggtttgt ttgccgcatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag	4800
cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa	4860
gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc	4920
cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc	4980
gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc gaacgaccta	5040
caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag	5100
aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgaggagct	5160
tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg ttctgccacc tctgacttga	5220
gcgtcgattt ttgtgatgtc cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc	5280
ggccttttta cggttcctgg ccttttctg gccttttct cactggctc gacagatct	5339

REIVINDICACIONES

1. Un método para ensayar agentes extraños en una composición que comprende al menos un agente activo, comprendiendo el método:

5 a) inmunizar a un sujeto no humano con una construcción de polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que forma al menos una parte del agente activo, con el fin de generar un anticuerpo producido frente al producto de expresión de dicha construcción de polinucleótido, poner en contacto el anticuerpo así generado con la composición que comprende al menos un agente activo, en el que el anticuerpo se une específicamente al agente activo, y

10 b) determinar la presencia o ausencia de agentes extraños en la composición posteriormente a la etapa a) en un modelo animal,

en el que el agente activo se neutraliza o inactiva por unión del anticuerpo antes de la etapa b).

2. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa de determinar la presencia o ausencia de agentes extraños en la composición comprende:

15 a) usar un animal no humano que se ha inoculado con dicha construcción de polinucleótido, e inocular dicho animal no humano con la composición que se va a ensayar,

20 b) evaluar el porcentaje de animales vivos después de un determinado periodo de tiempo, en el que en el caso de que al menos el 80% de los animales inoculados sobreviva y no muestre evidencia de infección durante dicho periodo de tiempo se considera que la composición no contiene agentes extraños, y en el caso en el que menos del 80% de los animales inoculados sobreviva y/o al menos un animal muestre evidencia de infección durante dicho periodo de tiempo se considera que la composición contiene agentes extraños.

3. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa de determinar la presencia o ausencia de agentes extraños en la composición comprende:

25 a) inocular un animal no humano con la composición que se va a ensayar que contiene agente activo neutralizado o inactivado,

30 b) evaluar el porcentaje de animales vivos después de un determinado periodo de tiempo, en el que en el caso de que al menos el 80% de los animales inoculados sobreviva y no muestre evidencia de infección durante dicho periodo de tiempo se considera que la composición no contiene agentes extraños, y en el caso en el que menos del 80% de los animales inoculados sobreviva y/o al menos un animal muestre evidencia de infección durante dicho periodo de tiempo se considera que la composición contiene agentes extraños.

35 4. El método según la reivindicación 2 ó 3, en el que los animales no humanos se seleccionan del grupo que consiste en ratones adultos, ratones lactantes, y cobayas, y en el que el porcentaje de animales vivos y la aparición de una evidencia de infección se evalúa después de un periodo de al menos 7 a 10 días, opcionalmente después de un periodo de 21 días después de la inoculación con la composición que se va a ensayar en el caso en el que el animal inoculado sea un ratón adulto, después de un periodo de 14 días después de la inoculación con la composición que se va a ensayar en el caso en el que el animal inoculado sea un ratón lactantes, y después de un periodo de al menos 42 días después de la inoculación con la composición que se va a ensayar en el caso en el que el animal inoculado sea una cobaya.

40 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la inoculación de la composición que se va a ensayar se lleva a cabo intracerebralmente y/o intraperitonealmente.

6. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición que se va a ensayar es una muestra de un cultivo celular a partir del cual se produce el agente activo, o un producto derivado de dicho cultivo celular, o un virus de siembra o una composición que contiene un virus de siembra, respectivamente.

45 7. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición es una composición farmacéutica, preferiblemente una preparación de vacuna o un producto intermedio de la preparación de vacuna.

8. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente activo es un antígeno, preferiblemente un antígeno viral, o en el que el agente activo comprende al menos un componente de una partícula de virus, preferiblemente el agente activo es una partícula de virus influenza.

50 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo se usa para ensayar virus como agentes extraños.

10. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la construcción de polinucleótido comprende una secuencia codificadora de HA (hemaglutinina) y/o NA (neuraminidasa).
- 5 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la construcción de polinucleótido que comprende la secuencia que codifica al menos una parte del agente activo se somete a optimización de codones, en particular optimización de codones para un sujeto usado para la inmunización con la construcción de polinucleótido.
- 10 12. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la construcción de polinucleótido comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que tiene al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia con el ácido nucleico mostrado en SEQ ID NO: 1 ó 2, o la construcción de polinucleótido comprende un polinucleótido que tiene una secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 1 ó 2.
13. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la construcción de polinucleótido está contenida en un organismo no humano, un animal no humano transgénico o un microorganismo.
14. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo es específico para un polipéptido codificado por un polinucleótido como se define en la reivindicación 12.
- 15 15. El método según la reivindicación 14, en el que el anticuerpo se produce por un método que comprende:
 - a) proporcionar una construcción de polinucleótido como se define en la reivindicación 12, e
 - b) inmunizar un sujeto adecuado con dicha construcción de polinucleótido.
- 20 16. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente activo comprende un antígeno de influenza y la construcción de polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, y más preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia con el ácido nucleico mostrado en SEQ ID NO: 1 ó 2, incluso más preferiblemente el agente activo comprende un antígeno de influenza y la construcción de polinucleótido comprende una secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 1 ó 2.
- 25 17. Un proceso para ensayar una composición farmacéutica en cualquier etapa de la producción de ésta, en particular una vacuna, incluyendo, en al menos un punto de tiempo del proceso de producción de ésta, llevando a cabo un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16; y, opcionalmente, una etapa de tratamiento de la composición farmacéutica, en particular la vacuna, o un producto intermedio del proceso de producción, y/o tratamiento de un cultivo celular a partir del cual deriva la composición farmacéutica o la vacuna, por un tratamiento capaz de eliminar y/ inactivar un agente extraño.

Fig. 1

ATGGAGAAAATTGTGCTGCTGTTTCGCCATTGTGTCCCTGGTGAAGTCCGACCAGATCTGCATCGGCTA
 TCACGCCAACAACTCCACCGAGCAGGTTCGACACCATTATGGAAAAGAATGTGACCGTGACCCATGCAC
 AAGACATCCTGGAAAAGACCCACAACGGCAAACCTGTGCGACCTGGACGGCGTGAAGCCCCTGATCCTG
 CGCGACTGCTCCGTGGCTGGGTGGCTGCTGGGAAACCCTATGTGCGACGAGTTCATCAATGTGCCCGA
 GTGGTCCTACATCGTTGAGAAAGCCAACCCCGTCAACGACCTGTGTTACCCCGGTGACTTCAACGACT
 ACGAGGAGCTCAAGCACCTGCTCTCCCGGATCAACCACTTCGAGAAAATCCAGATCATCCCCAAATCC
 TCCTGGTCCAGCCACGAAGCCTCCCTCGGCGTGTCTCCGCTTGTCCCTACCAGGGCAAGTCCTCCTT
 CTTCCGCAACGTCGTGTGGCTGATCAAAAAGAAGTCCACCTACCCACCATTAAAGCGGTCTTACAACA
 ACACCAACCAGGAAGACCTGCTGGTGTGTGGGGCATCCACCATCCCAACGACGCCGCTGAGCAGACC
 AAGCTGTACCAGAACCCTACCACCTACATCTCCGTCGGGACATCCACACTGAACCAGCGCCTCGTGCC
 CCGCATTGCCACCCGCAGCAAGGTGAATGGGCAGTCCGGCCGCATGGAGTTCTTCTGGACAATCCTGA
 AGCCCAACGACGCTATCAACTTCGAGTCCAACGGCAAACCTTCATCGCTCCCGAGTATGCCTACAAGATC
 GTTAAAAAGGGCGACTCCACAATCATGAAGTCCGAGTTGGAGTACGGCAAACCTGCAACACCAAGTGCCA
 GACACCCATGGGCGCTATCAACTCCTCCATGCCCTTCCACAACATCCATCCCCTGACCATTGGCGAGT
 GCCCCAAGTACGTCAAGTCCAACCGGCTGGTCTCTGGCTACCGGCCTCCGCAACTCCCCTCAAAGGGAA
 CGCAGGCGCAAAAAGAGAGGCCTGTTTCGGAGCCATAGCTGGGTTCATTGAGGGAGGGTGGCAGGGCAT
 GGTGGATGGGTGGTACGGCTACCATCACTCCAACGAGCAGGGCTCCGGGTATGCCGCCGACAAGGAGT
 CCACCCAGAAGGCCATTGACGGCGTGACCAACAAGGTGAACAGCATCATCGACAAGATGAACACCCAG
 TTCGAGGCTGTTGGCCGGGAGTTCAACAACCTGGAGCGCCGCATCGAGAACCTGAACAAAAAGATGGA
 GGACGGCTTCCTGGATGTGTGGACCTACAACGCTGAGCTCCTGGTGCTGATGGAGAACGAGCGGACCC
 TGGACTTCACGACTCCAACGTCAAGAACCTGTACGACAAAGTGC GCCTCCAGCTGCGGGACAACGCC
 AAGGAGCTCGGGAATGGCTGCTTCGAGTTCTACCACAAGTGC GACAACGAGTGTATGGAGTCCGTGCG
 CAATGGCACCTACGACTATCCCCAGTACTCCGAAGAGGCCCGCCTGAAGCGCGAAGAGATCTCCGGGG
 TGAAGTTGGAGTCCATTGGCATCTACCAGATCCTGAGCATCTACTCCACCGTGGCTTCCTCCCTCGCC
 CTCGCCATTATGGTGGCTGGCCTGTCCCTGTGGATGTGCTCCAACGGCTCCCTGCAATGTCGCTAA

Fig. 2

ATGAACCCCAACCAGAAGATCATCACCATTGGCAGCATCTGCATGGTGACCGGGATCGTTAGCCTGAT
 GCTGCAGATCGGCAACATGATCAGCATCTGGGTGTCCCACAGCATCCATACCGGCAACCAGCACCAGT
 CCGAGCCCATCTCCAACACCAACCTGCTGACCGAGAAAGCTGTGCGCTCCGTGAAGCTGGCTGGCAAC
 TCCTCCCTGTGTCTTATCAATGGGTGGGCTGTGTACTCCAAGGACAACCTCCATTTCGCATCGGCAGCAA
 AGGGGATGTCTTCGTGATCCGCGAGCCTTTCATCTCCTGTAGCCACCTCGAATGCCGGACCTTCTTCC
 TGACACAAGGAGCCCTGCTGAACGACAAGCACTCCAACGGCACCGTGAAGGACCGCTCTCCCCACCGC
 ACCCTGATGTCTGCCCGTCGGCGAAGCCCCTAGCCCCTACAACCTCCCGGTTTCGAGTCCGTGCGCTG
 GAGCGCCTCTGCCTGTCATGATGGGACCTCTTGGCTGACCATTGGCATCTCCGGCCCTGATAATGGAG
 CAGTGGCTGTGCTGAAGTACAACGGCATCATCACCAGATACCATTAAGTCTGGCGCAACAACATCCTC
 CGCACCCAGGAGTCCGAGTGTGCCTGTGTCAATGGCTCGTGCTTTACCGTGATGACCGATGGGCCAAG
 CAATGGACAAGCCTCCCACAAGATCTTCAAGATGGAAAAGGGCAAGGTGGTGAAGTCCGTTCGAGTTGG
 ACGCCCCTAATTACCACTACGAGGAGTGCAGCTGTTACCCTGACGCTGGGGAGATCACCTGTGTGTGC
 AGGGACAACCTGGCACGGGAGCAACAGGCCTTGGGTCTCCTTCAACCAGAACTTGGAGTACCAGATCGG
 CTACATCTGTTCCGGGGTGTTCGGGGATAATCCCAGGCCTAACGATGGCACCGGGTCTGTGGCCCTG
 TGAGCTCCAACGGCGCAGGCGGGGTCAAGGGCTTCTCGTTCAAATATGGCAATGGCGTGTGGATCGGG
 CGCACCAAGTCCACAAACTCCCGGTCCGGCTTCGAGATGATCTGGGACCCCAATGGATGGACCGAGAC
 AGACAGCTCCTTCTCCGTCAAGCAGGACATTGTGGCTATCACCGACTGGAGCGGGTACAGCGGCAGCT
 TCGTGCAGCACCCCGAGCTCACAGGCCTCGACTGCATTTCGGCCCTGCTTTTGGGTGGAACCTGATCCGG
 GGACGGCCTAAGGAGAGCACAATCTGGACCTCCGGCTCCAGCATCTCCTTCTGCGGCGTGAACCTCCGA
 CACAGTGGGGTGGTCCTGGCCTGACGGAGCTGAACTGCCCTTACCATTGACAAGTAA

FIG. 3

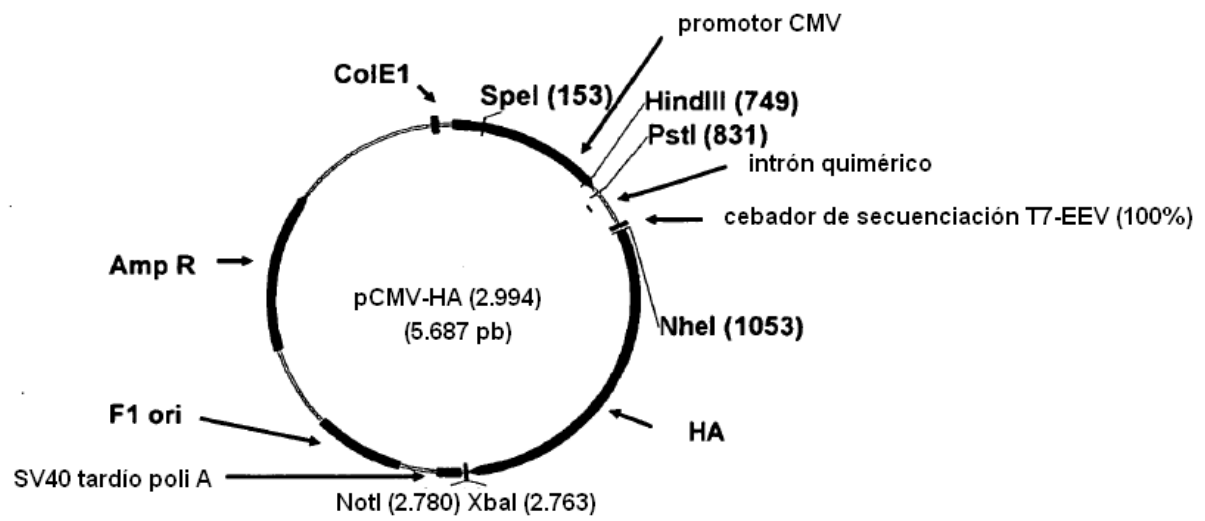


FIG. 4

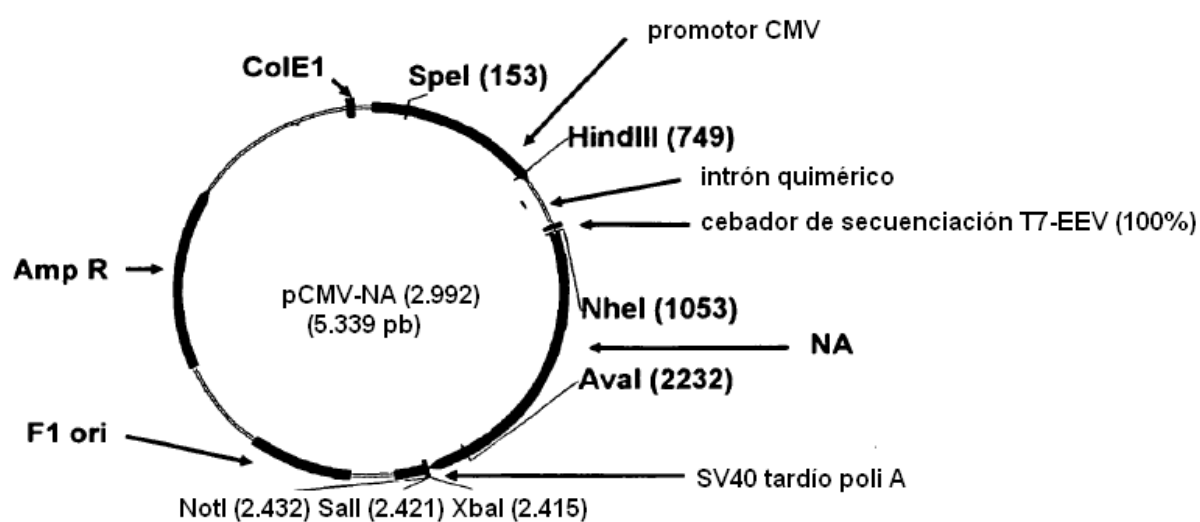


Fig. 5

TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCAT
 TGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGACCGCCATGT
 TGGCATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT
 GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCAT
 TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTG
 GAGTATTTACGGTAAACTGCCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCGCCCCCTAT
 TGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCTTA
 CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAAT
 GGGCGTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTT
 GTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTGACGCAATGG
 GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCACTAGA
 AGCTTTATTGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGTGCTTCTGACACAACAGTCTC
 GAACCTAAGCTGCAGAAGTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTT
 AAGGAGACCAATAGAACTGGGCTGTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTTCTGATAGGCACCTATT
 GGTCTTACTGACATCCACTTTGCCCTTCTCTCCACAGGTGCCACTCCAGTTCAATTACAGCTCTTA
 AGGCTAGAGTACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCGCCACC**ATGGAGAAAATTGTGCTGCTGTTCCG**
CCATTGTGTCCCTGGTGAAGTCCGACCAGATCTGCATCGGCTATCACGCCAACAACTCCACCGAGCAG
GTCGACACCATTATGGAAAAGAATGTGACCGTGACCCATGCACAAGACATCCTGGAAAAGACCCACAA
CGGCAAACTGTGCGACCTGGACGGCGTGAAGCCCTGATCCTGCGCGACTGCTCCGTGGCTGGGTGGC
TGCTGGGAAACCTATGTGCGACGAGTTCATCAATGTGCCCAGTGGTCCCTACATCGTTGAGAAAGCC
AACCCCGTCAACGACCTGTGTTACCCCGGTGACTTCAACGACTACGAGGAGCTCAAGCACCTGCTCTC
CCGGATCAACCACTTCGAGAAAATCCAGATCATCCCCAAATCCTCCTGGTCCAGCCACGAAGCCTCCC
TCGGCGTGTCTCCGCTTGTCCCTACCAGGGCAAGTCTCTCTTCTTCGCAACGTGCTGTGGCTGATC
AAGAGAACTCCACCTACCCACCAATTAAGCGGTCTTACAACAACACCAACCAGGAAGACCTGTGGT
GCTGTGGGGCATCCACCATCCCAACGACGCGCTGAGCAGACCAAGCTGTACCAGAACCCTACCACCT
ACATCTCCGTGCGGACATCCACACTGAACCAGCGCTCGTGCCCCGATTGCCACCCGCAGCAAGGTG
AATGGGCAGTCCGGCCGCATGGAGTTCCTTCTGGACAATCCTGAAGCCCAACGACGCTATCAACTTCGA
GTCCAACGGCAACTTCATCGCTCCCGAGTATGCCTACAAGATCGTTAAAAAGGGCGACTCCACAATCA
TGAAGTCCGAGTTGGAGTACGGCAACTGCAACACCAAGTGCCAGACACCCATGGGCGCTATCAACTCC
TCCATGCCCTTCCACAACATCCATCCCCTGACCATTGGCGAGTGCCCCAAGTACGTCAAGTCCAACCG
GCTGGTCCCTGGCTACCGGCCTCCGCAACTCCCCTCAAAGGGAACGCAGGCGCAAAAAGAGAGGCCTGT
TCGGAGCCATAGCTGGGTTTATTGAGGGAGGGTGGCAGGGCATGGTGGATGGGTGGTACGGCTACCAT
CACTCCAACGAGCAGGGCTCCGGGTATGCCGCCGACAAGGAGTCCACCCAGAAGGCCATTGACGGCGT
GACCAACAAGGTGAACAGCATCATCGACAAGATGAACACCCAGTTCGAGGCTGTTGGCCGGGAGTTCA
ACAACCTTGAGCGCCGCATCGAGAACCTGAACAAAAAGATGGAGGACGGCTTCCTGGATGTGTGGACC
TACAACGCTGAGCTCCTGGTGTGATGGAGAACGAGCGGACCCCTGGACTTCCACGACTCCAACGTCAA
GAACCTGTACGACAAAGTGCGCCTCCAGCTGCGGGACAACGCCAAGGAGCTCGGGAATGGCTGCTTCG
AGTTCTACCACAAGTGCAGACAACGAGTGTATGGAGTCCGTGCGCAATGGCACCTACGACTATCCCCAG
TACTCCGAAGAGGCCCGCCTGAAGCGCGAAGAGATCTCCGGGGTGAAGTTGGAGTCCATTGGCATCTA
CCAGATCCTGAGCATCTACTCCACCGTGGCTTCCTCCCTCGCCCTCGCCATTATGGTGGCTGGCCTGT
CCCTGTGGATGTGCTCCAACGGCTCCCTGCAATGTGCTAATCTAGAGTCGACCTGGGCGGCCGCTTC
 GAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACTAGAAATGCAGTGAAAAAATGC
 TTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAA
 CAACAACAATTGCATTCAATTTATGTTTCAGGTTTACGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGT
 AAAACCTCTACAAATGTGGTAAAAATCGATAAGTATCCGGGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACC
 GATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGC
 GCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTTCTT
 CGCTTTCTTCCCTTTCTCGCCACGTTTCGCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCC
 CTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTACGGCACCTCGACCCCCAAAAAATTTGATTAGGGTGATGGTTCA
 CGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAG
 TGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGA
 TTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAC
 AAAATATTAACGCTTACAATTTCTGTATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACAC
 CGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCC

AACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCG
 TCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCAGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTC
 GTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTT
 TCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCA
 TGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTT
 CGTGTCGCCCTTATTTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCCTCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGT
 GAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCG
 GTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTA
 TGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCA
 GAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAT
 TATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGA
 CCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACC
 GGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGT
 TGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAG
 GCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATC
 TGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTA
 TCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATA
 GGTGCCTCACTGATTAAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTT
 AAAACTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCC
 CTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGAT
 CCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGT
 GCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATA
 CTGTTCTTCTAGTGATAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTC
 GCTCTGCTAATCCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTC
 AAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCT
 TGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCC
 GAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCT
 TCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGAT
 TTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTC
 CTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTCTCACATGGCTCGACAGATCT

Fig. 6

TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCAT
 TGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGACCGCCATGT
 TGGCATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT
 GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCAT
 TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTG
 GAGTATTTACGGTAAACTGCCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTAT
 TGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTTCCTA
 CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAAT
 GGGCGTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
 GTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGG
 GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAGATCACTAGA
 AGCTTTATTGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGTGCTTCTGACACAACAGTCTC
 GAACTTAAGCTGCAGAAGTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTT
 AAGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATT
 GGTCTTACTGACATCCACTTTGCCCTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCAGTTCAATTACAGCTCTTA
 AGGCTAGAGTACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCGCCACC**ATGAACCCCAACCAGAAGATCATCA**
CCATTGGCAGCATCTGCATGGTGACCGGGATCGTTAGCCTGATGCTGCAGATCGGCAACATGATCAGC
ATCTGGGTGTCCACAGCATCCATACCGGCAACCAGCACCAGTCCGAGCCCATCTCCAACACCAACCT
GCTGACCGAGAAAGCTGTGCGCTCCGTGAAGCTGGCTGGCAACTCCTCCCTGTGTCTATCAATGGGT
GGGCTGTGTACTCCAAGGACAACCTCCATTTCGCATCGGCAGCAAAGGGGATGTCTTCGTGATCCGCGAG
CCTTTTCATCTCCTGTAGCCACCTCGAATGCCGGACCTTCTTCCTGACACAAGGAGCCCTGCTGAACGA
CAAGCACTCCAACGGCACCGTGAAGGACCGCTCTCCCCACCGCACCTGATGTCTGCCCGCTCGGCG
AAGCCCCTAGCCCCACAACCTCCCGTTTCGAGTCCGTGCGCTGGAGCGCTCTGCCTGTGATGATGGG
ACCTCTTGGCTGACCATTGGCATCTCCGGCCCTGATAATGGAGCAGTGGCTGTGCTGAAGTACAACGG
CATCATCACCGATACCATTAAAGTCCTGGCGCAACAACATCCTCCGACCCAGGAGTCCGAGTGTGCCT
GTGTCAATGGCTCGTGCTTTACCGTGATGACCGATGGGCCAAGCAATGGACAAGCCTCCACAAGATC
TTCAAGATGGAAAAGGGCAAGGTGGTGAAGTCCGTGAGTTGGACGCCCCAATTACCACTACGAGGA
GTGCAGCTGTTACCCTGACGCTGGGGAGATCACCTGTGTGTGCAGGGACAACCTGGCACGGGAGCAACA
GGCCTTGGGTCTCCTTCAACCAGAACTTGGAGTACCAGATCGGCTACATCTGTCCGGGGTGTTCGGG
GATAATCCCAGGCCTAACGATGGCACCGGGTCTGTGGCCCTGTGAGCTCCAACGGCGCAGGCGGGGT
CAAGGGCTTCTCGTTCAAATATGGCAATGGCGTGTGGATCGGGCGCACCAAGTCCACAACTCCCGGT
CCGGCTTCGAGATGATCTGGGACCCCAATGGATGGACCGAGACAGACAGCTCCTTCTCCGTCAAGCAG
GACATTGTGGCTATCACCGACTGGAGCGGGTACAGCGGCAGCTTCGTGCAGCACCCGAGCTCACAGG
CCTCGACTGCATTCCGCCCTGCTTTTGGGTGGAAGTATCCGGGGACGGCCTAAGGAGAGCACAATCT
GGACCTCCGGCTCCAGCATCTCCTTCTGCGGCGTGAAGTCCGACACAGTGGGGTGGTCTGGCCTGAC
GGAGCTGAAGTGGCCTTCACCATTGACAAGTAATCTAGAGTGCACCTGGGCGGCCGCTTCGAGCAGAC

ATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTG
 TGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACA
 ATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAACCTC
 TACAAATGTGGTAAAATCGATAAGTATCCGGGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGGCCCGCACCGATCGCCC
 TTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGG
 TGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCT
 TCCCTTCCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGG
 TTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGG
 GCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCT
 TGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCG
 ATTTCCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAATAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATT
 AACGCTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATG
 GTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCG
 CTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGG
 AGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCATACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACG
 CCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAA
 ATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAA
 TAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCG
 CCTTATTCCTTTTTTTCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAA
 AAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATC
 CTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAAGGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGC
 GGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACT
 TGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGT
 GCTGCCATAACCATGAGTGATAAAGTTCGCGGCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGA
 GCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAGTTCGCTTGGGAACCGGAGCTGA
 ATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAA
 CTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAA
 AGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCG
 GTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTT
 ATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTC
 ACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTC
 ATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGT
 GAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTT
 TCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATC
 AAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTT
 CTAGTGATAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCT
 AATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGAT
 AGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGA

ACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAG
AAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGG
GAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGA
TGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTT
TTGCTGGCCTTTTGCTCACATGGCTCGACAGATCT