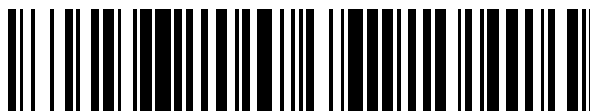


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 708**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2011 PCT/NL2011/050234**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2011 WO11126370**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2011 E 11715069 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2555795**

54 Título: **Proteínas de la gripe multiméricas recombinantes**

30 Prioridad:

09.04.2010 EP 10159552

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

04.11.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT UTRECHT HOLDING B.V. (100.0%)
Yalelaan 40
3584 CM Utrecht, NL**

72 Inventor/es:

**ROTTIER, PETRUS, JOSEPHUS, MARIE;
BOSCH, BEREND, JAN y
DE HAAN, CORNELIS, ALEXANDER, MARIA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 588 708 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

Proteínas de la gripe multiméricas recombinantes

- 5 La invención se refiere al campo de la virología, más especialmente la invención se refiere al campo de vacunas contra el virus de la gripe.

La gripe es una enfermedad infecciosa que está causada por tres tipos de virus de la gripe, los tipos A, B y C, que pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Los virus de la gripe son virus de ARN que consisten en siete segmentos de ARN monocatenario negativo que codifican nueve proteínas (gripe C), u ocho segmentos de ARN monocatenario negativo que codifican once proteínas (gripe A y B) (Chen y Deng, 2009). Se cree que las aves son el huésped natural para todos los virus de la gripe A, pero muchos subtipos también pueden infectar a mamíferos, incluyendo seres humanos. Los síntomas de la gripe incluyen fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, dolores musculares y dolor de garganta, síntomas comparables con el resfriado común. Sin embargo, la gripe puede causar POSIBLES complicaciones letales, tales como neumonía, y muerte en grupos de alto riesgo tales como niños pequeños, ancianos, e individuos inmunológicamente comprometidos o crónicamente enfermos. En el pasado, las pandemias de gripe, tales como la pandemia de gripe española de 1918/1919 (subtipo H1N1) y la gripe de Hong Kong de 1968/1969 (subtipo H3N2), han sido responsables de la muerte de millones de personas (Khanna et al., 2008).

20 Las proteínas de la superficie del virus de la gripe, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), son la base para subtipos de grupo serológicamente diferentes. Actualmente, se han identificados 16 serotipos de HA (H1-H16) y 9 de NA (N1-N9), que se usan para clasificar los virus de la gripe (por ejemplo H3N2). La deriva antigénica, debida a una o más mutaciones que causan una o varias sustituciones de aminoácidos, puede causar cambios antigénicos menores en HA y NA, dando como resultado el escape de la inmunidad de un huésped. Adicionalmente, un proceso denominado cambio antigénico da como resultado la formación de nuevos subtipos de virus (reagrupado) a través de la combinación de HA y NA de diferentes subtipos de virus de la gripe. Estas alteraciones en HA y/o NA pueden ser, en parte, un resultado de la presión de selección (Chen y Deng, 2009).

30 La HA está presente en la membrana viral. Debe ser escindida por proteasas del huésped para dar dos polipéptidos, HA1 y HA2, para ser infecciosa. Después de la exposición, el extremo N recién expuesto del polipéptido HA2 actúa a continuación para mediar la fusión de la membrana viral con la de la célula huésped, lo que permite al virus infectar la célula huésped (Skehel y Wiley, 2000). La HA es un homotrímero compuesto por tres regiones estructuralmente distintas, una cabeza globular que consiste en láminas beta antiparalelas que contienen el sitio de unión al receptor y el sitio de escisión de HA1/HA2, un tallo alfa-helicoidal, en superhélice, tricanetario, y una base globular que consiste en láminas beta antiparalelas. En la figura 1, se muestra una representación esquemática de un virus de la gripe. Cada monómero consiste en un polipéptido de HA con las regiones HA1 y HA2 enlazadas por puentes disulfuro (Skehel y Wiley, 2000; Stevens et al., 2006).

40 La NA cataliza la hidrólisis de residuos de ácido siálico terminales de glucoproteínas de la célula huésped, impidiendo de este modo la unión de HA a estas proteínas. La NA facilita de este modo la liberación del virus desde una célula y, por lo tanto, la diseminación del virus. La NA es un homotetrámero, anclado a la membrana viral por su extremo N. En la figura 1, se muestra una representación esquemática de un virus de la gripe. Cada monómero está compuesto por seis láminas beta topológicamente idénticas dispuestas en una formación de hélice, que forman la cabeza de la proteína tetramérica que está fijada a una región del tallo. La actividad enzimática está ubicada en cada monómero (Colman 1994).

50 Las infecciones por virus de la gripe son las más prevalentes en invierno y cada año se desarrollan vacunas estacionales contra la gripe. Estas vacunas contienen dos virus de la gripe A (H1N1 y H3N2) y un virus de la gripe B (Khanna et al., 2008). Es necesario desarrollar nuevas composiciones cada año para proteger contra las cepas circulantes predichas. Incluso aunque pueden tener elevada homología, una vacuna específica puede no proteger contra diferentes cepas del mismo subtipo de gripe A. Además de las vacunas contra la gripe humana estacional, existen varias vacunas contra la gripe para el tratamiento de animales, tales como vacunas contra la infección por gripe H5N1 y H9N2 aviar en aves de corral y la infección por gripe H1N1 y H3N2 en cerdos. Las vacunas contra la gripe disponibles actualmente son virus de la gripe atenuados vivos o inactivados que se producen generalmente cultivando el virus en huevos de gallina embrionados. Existen varias desventajas de este método de producción incluyendo las instalaciones de biocontención a menudo de alto nivel requeridas para gestionar virus de la gripe, la incapacidad de obtener altos rendimientos de virus de la gripe en huevos de gallina embrionados, la elevada especificidad para un número muy limitado de subtipos de gripe A, y la incapacidad de usar vacunas en individuos (principalmente niños) con alergias al huevo (Lipatov et al., 2004).

60 Se han realizado una serie de intentos de desarrollar vacunas basadas en proteínas recombinantes derivadas de HA o NA. Sin embargo, todas estas vacunas tienen limitaciones con respecto a la eficiencia y la eficacia del tratamiento. Wei et al. (J Virol. 2008) describen la vacunación de ratones con proteínas HA de H5N1 recombinantes. Los plásmidos para la expresión de las proteínas HA de H5N1 recombinantes contienen secuencias de ácido nucleico que codifican un dominio de trimerización y un marcador de His, que son ambos eliminados después de la purificación de las proteínas. Para ser eficaz, los ratones tenían que ser inmunizados más de una semana (semana

0 y 3) con cantidades relativamente altas (20 µg) de proteína. En el documento de Song et al. (PLoS One. 2008) y el documento WO 2007/103322 se describe la inmunización de ratones con dos dosis de una composición que comprende la cabeza globular de HA fusionada al ligando de TLR5 flagelina. Adicionalmente, en el documento Song et al. (PLoS One. 2008) se inmunizan conejos con dos dosis de 5 o 15 µg de HA fusionada a flagelina. En el documento de Saelens et al. (Eur J Biochem. 1999) se usan tres dosis de una composición que comprende HA recombinante expresada en *P. pastoris* y adyuvante Ribi, una emulsión de aceite en agua, para inmunizar ratones, y el documento WO 95/18861 describe el uso de tres dosis de una composición que comprende neuraminidasa para inmunizar ratones. Kong et al. (Proc Natl Acad Sci EE. UU. 2006) necesitan tres dosis para inmunizar ratones con ADN plasmídico que expresa una hemaglutinina del virus de la gripe, tal como también se describe en los documentos WO 2007/100584, WO 2008/112017 y WO 2009/092038.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar composiciones inmunógenas mejoradas para desencadenar una respuesta inmunitaria protectora contra un virus de la gripe. La invención proporciona, por lo tanto, una composición inmunogénica que comprende al menos un ectodominio multimérico recombinante de una proteína de virus de la gripe o parte del mismo fusionado a un marcador de afinidad por estreptavidina, y un diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que dicho ectodominio multimérico recombinante de una proteína de virus de la gripe o parte del mismo se selecciona entre el grupo que consiste en

- un ectodominio de hemaglutinina de gripe trimérico recombinante o parte del mismo y
- un ectodominio de neuraminidasa de gripe tetramérico recombinante o parte del mismo.

Una “composición inmunogénica” se define en el presente documento como una composición que es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria cuando se administra a un individuo. La respuesta inmunitaria desencadenada puede ser humoral, celular o una combinación de las mismas e incluye, aunque sin limitarse a, la producción de anticuerpos, células B, y células T. Una respuesta inmunitaria, tal como se usa en el presente documento, está preferentemente dirigida especialmente a uno o más inmunógenos de una composición de acuerdo con la invención.

Una composición inmunogénica de la presente invención puede administrarse a un individuo mediante cualquier técnica conocida en la técnica incluyendo, aunque sin limitarse a, administración por inyección intramuscular (IM), intradérmica (ID), subcutánea (SC), intracraneal (IC), intraperitoneal (IP) o intravenosa (IV), transdérmica, oral, intranasal o rectal, y combinaciones de las mismas. Además, la administración de una composición inmunogénica de acuerdo con la invención puede realizarse individualmente, tal como mediante inyección o administración oral o nasal, o colectivamente, tal como suplementando agua potable o pulverizando sobre animales o en el aire por encima de animales, por ejemplo animales de granja. En una realización preferida, se usa una composición inmunogénica de acuerdo con la invención para desencadenar una respuesta inmunitaria. Se prefiere que la composición inmunogénica se use como una vacuna.

Un “individuo” se define en el presente documento como un ser humano o un animal, preferentemente un animal que puede ser infectado por el virus de la gripe, tal como aves, incluyendo aunque sin limitarse a aves de corral. Los individuos incluyen aunque sin limitarse a gallinas, patos, gansos, pavos, cisnes, emús, pintadas y faisanes, seres humanos, cerdos, hurones, focas, conejos, gatos, perros y caballos. En una realización preferida de la invención, un individuo es un mamífero, tal como un ser humano, un cerdo o un caballo, o un ave. En una realización de la invención, dicho mamífero es un ser humano.

Un “ectodominio multimérico” se define en el presente documento como una parte extracelular de una proteína de la superficie, proteína de la superficie que está compuesta por al menos dos subunidades (unidas de forma no covalente). Dicha proteína de la superficie puede ser cualquier proteína de la superficie de un virus de la gripe. Usando un ectodominio multimérico de una proteína de la superficie de un virus de la gripe o parte del mismo, se obtiene y/o se preserva la correcta estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de dicha proteína de la superficie de virus de la gripe. Una “proteína de la gripe” se define en el presente documento como cualquier proteína codificada por el genoma viral de la gripe.

“Un diluyente farmacéuticamente aceptable”, tal como se usa en el presente documento, se define como cualquier solución, sustancia o combinación de las mismas que no tiene ninguna actividad biológicamente o de otro modo no deseada, lo que significa que puede administrarse a un individuo junto con otros componentes de una composición inmunológica sin causar una reacción adversa sustancial.

En toda la solicitud, un ectodominio multimérico recombinante de una proteína de la gripe o parte del mismo fusionado a un marcador de afinidad por estreptavidina también se denomina además como un ectodominio multimérico recombinante o parte del mismo de acuerdo con la invención.

Tal como se usa en el presente documento un “virus de la gripe” abarca el tipo A de virus de la gripe, el tipo B de virus de la gripe y el tipo C de virus de la gripe y todos los subtipos de virus de la gripe. “Tipo de gripe”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a tipo A, tipo B o tipo C de gripe. “Cepa de gripe”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a diferentes virus de la gripe A, por ejemplo H1N1, H1N2, H1N7, H2N2, H3N2,

H3N8, H4N8, H5N1, H5N2, H5N9, H6N2, H6N5, H7N2, H7N3, H7N7, H8N4, H9N2, H10N7, H11N6, H12N5 y H13N6. "Hemaglutinina" o "HA", tal como se usan en el presente documento, se refieren a una proteína hemaglutinina de virus de la gripe y puede ser de cualquier tipo de gripe, A, B o C, y cualquier serotipo, por ejemplo H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16, incluyendo subtipos que pertenecen al mismo serotipo pero con pequeñas diferencias como resultado de, por ejemplo, deriva antigénica. "Neuraminidasa" o "NA", tal como se usan en el presente documento, se refieren a una proteína neuraminidasa de virus de la gripe y puede ser de cualquier tipo de gripe, A, B o C, y cualquier serotipo, por ejemplo, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9, incluyendo subtipos que pertenecen al mismo serotipo pero con pequeñas diferencias como resultado de, por ejemplo, deriva antigénica. "Parte del mismo", tal como se usa en el presente documento, se define como cualquier parte de un ectodominio multimérico recombinante de una proteína de virus de la gripe que es más pequeña que un ectodominio multimérico completo de una proteína de virus de la gripe, pero tiene una actividad inmunogénica similar.

Por ejemplo, una parte de una HA multimérica recombinante de acuerdo con la invención comprende una HA2, o una parte de una HA2 que comprende un epítipo altamente conservado próximo a la subunidad HA1 de HA (Ekiert et al., 2009), o un ectodominio de HA que carece del dominio de cabeza globular. Preferentemente, dicho epítipo de una HA2, parte de una HA2 o ectodominio de HA que carece del dominio de cabeza globular comprende los aminoácidos 1-68 de HA fusionados a los aminoácidos 293-524 de HA (numeraciones de aminoácidos de acuerdo con la numeración de HA de la cepa de gripe X31, n.º de entrada de EMBL-EBI P03438). Dado que dicho epítipo de HA está altamente conservado en diferentes tipos, subtipos y cepas del virus de la gripe, se proporciona una amplia protección contra diferentes tipos, subtipos o cepas de virus de la gripe si dicha parte se usa en una composición inmunogénica de acuerdo con la invención.

En una realización preferida, se proporciona un uso de la composición inmunogénica de acuerdo con la invención para la preparación de un agente profiláctico para desencadenar una respuesta inmunitaria contra un virus de la gripe. También se proporciona una composición inmunogénica de acuerdo con la invención para uso como una vacuna.

En el presente documento, una "marca de afinidad por estreptavidina" o "Strep-tag" se define como un marcador que se une a estreptavidina o a un derivado de la misma, tal como Strep-Tactin, que comprende al menos un péptido que consiste en nueve aminoácidos: Ala-Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEC ID N.º: 1), o al menos un péptido que consiste en ocho aminoácidos (también denominado Strep-tag II): Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEC ID N.º: 2), en el que Trp es triptófano, Ser es serina, His es histidina, Pro es prolina, Gln es glutamina, Phe es fenilalanina, Glu es glutamina, Lys es lisina, Ala es alanina, Arg es arginina y Gly es glicina. En una realización preferida, un marcador de afinidad por estreptavidina comprende dos o más de dichos péptidos, que consisten, cada uno, en ocho o nueve aminoácidos, más preferentemente tres de dichos péptidos. En una realización, un marcador de afinidad por estreptavidina comprende más de tres de dichos péptidos. Una Strep-tag se usa, por ejemplo, para fines de aislamiento y/o purificación. El marcador se une a estreptavidina o un derivado de la misma, por ejemplo inmovilizada en una columna. La elución de una proteína fusionada a una Strep-tag de la columna puede realizarse usando biotina o un derivado u homólogo de la misma, tal como destio-biotina. El marcador de afinidad por estreptavidina puede colocarse en el extremo C o N de la proteína de interés. Un "derivado", tal como se usa en el presente documento, se define como cualquier variante de estreptavidina que tiene la capacidad de que se le una un marcador de afinidad por estreptavidina, y puede usarse, por lo tanto, para aislar o purificar una proteína que contiene un marcador de afinidad por estreptavidina. Un derivado preferido de estreptavidina es Strep-Tactin.

La elución de las proteínas recombinantes unidas puede realizarse en condiciones moderadas mediante competencia con biotina o un derivado adecuado. Por condiciones moderadas, se entiende que la purificación puede realizarse en condiciones fisiológicas, tales como soluciones acuosas, temperatura ambiente, pH neutro o ligeramente básico, y presión normal.

De acuerdo con la invención, un ectodominio multimérico recombinante de una proteína de la gripe o parte del mismo se selecciona entre el grupo que consiste en un ectodominio de hemaglutinina de gripe trimérico recombinante o parte del mismo y un ectodominio de neuraminidasa de gripe tetramérico recombinante o parte del mismo.

En algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos de un ectodominio multimérico recombinante o parte del mismo de acuerdo con la invención se altera tal como mediante sustituciones, deleciones y/o adiciones de aminoácidos que proporcionan proteínas funcionalmente equivalentes a un ectodominio multimérico recombinante o parte del mismo de acuerdo con la invención. Las proteínas funcionalmente equivalentes pueden identificarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo por su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria contra el virus de la gripe en un individuo, o en un ensayo in vitro, en el que se determina la unión a anticuerpos. Un ectodominio multimérico recombinante alterado se proporciona en una composición inmunogénica de acuerdo con la invención por ejemplo, dado que puede producirse a un nivel más elevado, en comparación con un ectodominio multimérico parental no alterado.

Ectodominios multiméricos recombinantes o partes de los mismos de acuerdo con la invención se prefieren respecto a ectodominios monoméricos o partes de los mismos de proteínas del virus de la gripe, dado que dichos ectodominios multiméricos darán como resultado un desencadenamiento más eficaz de una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, se necesita una menor dosis y un número reducido de administraciones de una composición

5 inmunogénica que comprende dicho ectodominio multimérico recombinante de acuerdo con la invención para desencadenar una respuesta inmunitaria suficiente, en comparación con composiciones inmunógenas que comprenden un ectodominio monomérico de una proteína de virus de la gripe.

Una composición inmunogénica de acuerdo con la invención puede comprender un ectodominio de hemaglutinina de gripe trimérico recombinante o parte del mismo o un ectodominio de neuraminidasa de gripe tetramérico recombinante o parte del mismo. Dicha composición inmunogénica es particularmente adecuada para desencadenar una respuesta inmunitaria en un individuo contra un subtipo o cepa de virus de la gripe, o más de un subtipo o cepa de virus de la gripe relacionados. En algunas realizaciones sin embargo, una composición inmunogénica de acuerdo con la invención comprende una combinación de uno o más ectodominios de hemaglutinina triméricos o partes de

15 los mismos, y/o uno o más ectodominios de neuraminidasa tetraméricos o partes de los mismos.

Por lo tanto, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 ectodominios de hemaglutinina triméricos o partes de los mismos pueden combinarse, tal como H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y/o H16, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 ectodominios de neuraminidasa tetraméricos o partes de los mismos pueden combinarse, tal como N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 y/o N9. Adicionalmente, una composición inmunogénica de acuerdo con la invención puede comprender una combinación de uno o más ectodominios de hemaglutinina triméricos o partes de los mismos y uno o más ectodominios de neuraminidasa tetraméricos o partes de los mismos de diferentes subtipos de gripe. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 ectodominios de hemaglutinina triméricos o partes de los mismos y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 ectodominios de neuraminidasa tetraméricos o partes de los mismos pueden combinarse, tales como

25 H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 y/o N9. Quedará claro para un experto en la materia que la expresión "uno o más ectodominios" abarca uno o más ectodominios de uno o más subtipos de virus de la gripe, tales como por ejemplo virus de la gripe A y virus de la gripe B. Por lo tanto, una composición inmunogénica de acuerdo con la invención puede ser una composición multivalente con la que puede conseguirse una protección mejorada contra una infección por virus de la gripe, en comparación con una composición inmunogénica que comprende un ectodominio de hemaglutinina de gripe trimérico recombinante o parte del mismo o un ectodominio de neuraminidasa de gripe tetramérico recombinante o parte del mismo. Adicionalmente, o como alternativa, con una composición multivalente puede conseguirse una protección más amplia contra más de un tipo de virus de la gripe, o subtipos o cepas de virus de la gripe. Además, una composición inmunogénica de acuerdo con la invención puede ser menos sensible a alteraciones antigénicas que las vacunas con virus de gripe inactivados o atenuados vivos tradicionales.

Otras ventajas de composiciones inmunógenas de acuerdo con la presente invención son, por ejemplo, la posibilidad de producir los ectodominios multiméricos recombinantes o partes de los mismos en grandes cantidades en cultivo celular, y a costes relativamente bajos, dado que no son necesarias instalaciones de biocontención de alto nivel para la producción de composiciones inmunógenas de acuerdo con la invención.

En contraste con intentos anteriores de producir vacunas basadas en proteínas del virus de la gripe recombinantes, solamente son necesarias cantidades muy bajas de un ectodominio multimérico recombinante o parte del mismo de una proteína de virus de la gripe o parte del mismo fusionado a un marcador de afinidad por estreptavidina de acuerdo con la invención para desencadenar una respuesta inmunitaria en un individuo. Tal como se muestra con más detalle en los ejemplos, cantidades de tan solo 3,75 µg de proteínas recombinantes en hurones, 5 µg de proteína recombinante en cerdos y 0,4 µg de proteína recombinante en gallinas son suficientes para desencadenar una respuesta inmunitaria protectora en estos animales respectivos tras la provocación con virus de la gripe.

50 Composiciones inmunógenas de acuerdo con la invención pueden administrarse en una única dosis o en múltiples dosis. Sin embargo, al contrario que otras vacunas basadas en proteínas de la gripe recombinantes, la protección contra una infección por virus de la gripe se consigue después de una administración de una composición inmunogénica de acuerdo con la invención. Por lo tanto, las composiciones inmunógenas de acuerdo con la presente invención son más eficaces que otras composiciones inmunógenas basadas en proteínas de la gripe recombinantes conocidas en la técnica.

No es probable que una Strep-tag influya en la función, estructura, plegamiento, secreción de la proteína y tienen una baja capacidad inmunógena. Además, la elución de una proteína que contiene una Strep-tag se consigue en condiciones moderadas. Sin estar limitados por la teoría, se cree que una combinación de al menos un ectodominio multimérico recombinante de acuerdo con la invención y el uso de un marcador de afinidad por estreptavidina da como resultado las ventajas de la presente invención respecto a una composición inmunogénica que comprende proteínas de la gripe conocidas en la técnica, posiblemente debido a las condiciones moderadas que pueden emplearse durante las purificaciones de proteínas y, por lo tanto, la buena conservación de la antigenicidad de las proteínas y el desencadenamiento más eficaz de una respuesta inmunitaria.

65

En algunas realizaciones de la invención, se usa un dominio de trimerización para proporcionar un ectodominio de hemaglutinina de gripe recombinante trimérico o parte del mismo. La expresión “dominio de trimerización”, tal como se usa en el presente documento, se define como un dominio que media en la formación de un trímero a partir de tres proteínas monoméricas o partes de las mismas. Los dominios de trimerización incluyen, aunque sin limitarse a, una secuencia de trimerización de fibrina del bacteriófago T4 y un dominio de trimerización artificial (GCN4-pII) basado en la proteína en superhélice GCN4 de levadura. En una realización preferida, la trimerización de un ectodominio de hemaglutinina de gripe recombinante o parte del mismo se proporciona mediante un dominio de trimerización basado en GNC4. Dicho dominio de trimerización basado en GNC4 preferentemente comprende la secuencia de aminoácidos: MKQIEDKIEEIESKQKKIENEIARIKK (SEC ID N.º: 3).

En algunas realizaciones de la invención, se usa un dominio de tetramerización para proporcionar un ectodominio de neuraminidasa de gripe recombinante tetramérico o parte del mismo. La expresión “dominio de tetramerización”, tal como se usa en el presente documento, se define como un dominio que media en la formación de un tetrámero a partir de cuatro proteínas monoméricas o partes de las mismas. Los dominios de tetramerización adecuados incluyen, aunque sin limitarse a, el dominio de tetramerización de fosfoproteína de virus Sendai y un dominio de tetramerización (GCN4-pLI) obtenido mediante mutación a partir del dominio de dimerización GCN4 de levadura. En una realización preferida, la tetramerización de un ectodominio de neuraminidasa de gripe recombinante o parte del mismo se proporciona mediante un dominio de tetramerización basado en GCN4. Un dominio de tetramerización basado en GCN4 preferentemente comprende la secuencia de aminoácidos: MKQIEDKLEELISKLYHIENELARIKKLLGE (SEC ID N.º: 4).

En algunas realizaciones, una composición inmunogénica de acuerdo con la invención comprende un adyuvante y/o un vehículo u otro excipiente conocido en la técnica. “Un adyuvante” se define en el presente documento como una sustancia añadida a una composición inmunológica para mejorar la respuesta inmunitaria de un individuo a un antígeno particular a nivel celular o humoral. Los adyuvantes adecuados incluyen, aunque sin limitarse a, sales de aluminio y de calcio tales como fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, sulfato de aluminio y potasio (alumbre) y fosfato de calcio, adyuvantes orgánicos tales como escualeno, adyuvantes basados en aceites tales como adyuvante completo e incompleto de Freund, RIBI Adjuvant System® (RAS®), Stimune (Specol)®, TiterMax®, Montanidas, MF-59, AS03, QS21, adyuvante 65, saponina, MDP, y Syntex Adjuvant Formulation (SAF)®, monofosforil lípido A, adyuvante Gerbu®, complejos inmunoestimuladores (ISCOM), citoquinas tales como Interferón-gamma, secuencias de ácido nucleico inmunoestimuladoras tales como oligonucleótidos CpG, liposomas, partículas similares a virus, tensioactivos tales como hexadecilamina, polianiones tales como sulfato de pirano y dextrano. Un adyuvante preferido es Stimune (Specol). Adyuvantes preferidos adicionales para uso en seres humanos son fosfato o hidróxido de aluminio, fosfato de calcio, ISCOM, AS03 o MF59.

Un adyuvante preferido es ISCOM. La tecnología ISCOM presenta varias ventajas respecto a otros adyuvantes. Los ISCOM estimulan respuestas inmunitarias tanto humorales como mediadas por células. Los ISCOM son un adyuvante altamente eficiente, permitiendo la reducción adicional de las cantidades de un ectodominio multimérico recombinante o parte del mismo de acuerdo con la invención. Un ISCOM preferido es ISCOM Matrix-M. Sin quedar ligado a la teoría, es posible que el uso de ISCOM en un método o composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención pueda mejorar incluso las ventajas de la presente invención respecto a una composición inmunogénica que comprende proteínas de la gripe conocida en la técnica, tal como una dosis inferior y un número reducido de administraciones de una composición inmunogénica de acuerdo con la invención.

Tal como se usa en el presente documento “un vehículo” o “una matriz de soporte” se define como una molécula tal como un péptido, polipéptido, proteína, complejo de proteínas, o compuesto químico que es capaz de asociarse con cualquier componente de composiciones inmunógenas tal como se definen en el presente documento con el fin de transporte de dicho componente, presentación al sistema inmunitario, y/o mejora de la capacidad inmunógena de dicha composición inmunogénica. Los vehículos o matrices de soporte adecuados incluyen, aunque sin limitarse a, una matriz de soporte biológica tal como un virus, una bacteria, una partícula similar a un virus y un remanente bacteriano tal como un esqueleto de la pared bacteriana, una matriz de soporte química tal como una matriz de unidades de estreptavidinas o derivados de la misma enlazadas químicamente, un enlazador multivalente bioquímico, un toxoide de difteria o tétanos, hemocianina de lapa californiana (KLH), albumina de suero tal como BSA, hemocianina, albumina, toxina de difteria mutante no tóxica CRM197, complejo de proteínas de la membrana externa (OMPC) de *Neisseria meningitidis*, la subunidad B de *Escherichia coli* termolábil, una partícula similar a un virus ensamblada a partir de proteína de la envuelta recombinante del bacteriófago Qb y perlas de celulosa.

La presente invención proporciona, además, un vector que comprende una casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia señal, una secuencia de ácido nucleico que codifica un ectodominio recombinante de una proteína de la gripe o parte del mismo, una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de trimerización o tetramerización, y una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de afinidad por estreptavidina.

Un vector de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para la expresión y producción de un ectodominio multimérico recombinante o parte del mismo de acuerdo con la invención. Por lo tanto, en una realización preferida, se proporciona un uso de un vector de acuerdo con la invención para la preparación de una

composición inmunogénica de acuerdo con la invención para desencadenar una respuesta inmunitaria contra un virus de la gripe. También se proporciona un vector de acuerdo con la invención para uso como una vacuna.

El término “vector”, tal como se usa en el presente documento, se define como una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido, bacteriófago o virus animal, capaz de introducir una secuencia de ácido nucleico heteróloga en una célula huésped. Un vector de acuerdo con la invención permite la expresión o producción de una proteína o parte de la misma codificada por la secuencia de ácido nucleico heteróloga en una célula huésped. Los vectores adecuados en un método de acuerdo con la invención incluyen, aunque sin limitarse a, pCD5 (Pouyani y Seed, 1995) y pCAGGS (Niwa et al., 1991). Una “célula huésped” es una célula que ha sido transformada, o es capaz de transformación, mediante una molécula de ácido nucleico tal como un vector. El término “transformación” se define en el presente documento como la introducción de un ácido nucleico extraño en una célula receptora. La transformación de una célula receptora puede dar como resultado la expresión transitoria de una proteína recombinante por dicha célula, lo que significa que la proteína recombinante es expresada solamente durante un periodo de tiempo definido. Como alternativa, la transformación de una célula receptora puede dar como resultado expresión estable, lo que significa que el ácido nucleico se introduce en el genoma de la célula y, de este modo, es transmitido a las siguientes generaciones de células. Adicionalmente, puede conseguirse la expresión inducible de una proteína recombinante. Un sistema de expresión inducible requiere la presencia o ausencia de una molécula que permita la expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés. Los ejemplos de sistemas de expresión inducibles incluyen, aunque sin limitarse a, sistemas de expresión Tet-On y Tet-Off, sistema de expresión génica inducible por hormonas tal como un sistema de expresión génica inducible por ecdisona, un sistema de expresión génica inducible por arabinosa, y un sistema de expresión inducible por *Drosophila* que usa un vector pMT/BiP (Invitrogen) que comprende un promotor de metalotioneína inducible.

Una “secuencia señal” se define en el presente documento como un péptido señal que dirige el transporte de una proteína o parte de la misma al retículo endoplasmático de una célula eucariota - el sitio de entrada de la ruta secretora. Una secuencia señal puede estar ubicada N-terminal o C-terminal de la proteína o parte de la misma. Los péptidos señal pueden eliminarse por escisión después de la inserción de la proteína en el retículo endoplasmático. Por ejemplo, en una realización, un vector pMT/BiP para expresión de proteína recombinante en células de *Drosophila* comprende una secuencia señal BiP. En otra realización, un vector pCD5 para expresión de proteína recombinante en células de mamífero comprende la secuencia señal: MPMGSLQLATLYLLGMLVA (SEC ID N.º: 5).

Una casete de expresión preferentemente comprende un promotor/potenciador que permite el inicio de la transcripción de secuencias de ácido nucleico contenidas además dentro de la casete de expresión. Ejemplos de promotores incluyen, aunque sin limitarse a, promotores RAmv3D y CaMV para expresión en células vegetales, promotores de polihedrina, p10, IE-0, PCNA, OpIE2, OpIE1 y Actina 5c para expresión en células de insecto, y promotor de beta-actina, promotor de inmunoglobina, promotor de ARN 5S, o promotores derivados de virus tales como promotores de citomegalovirus (CMV), virus del sarcoma de Rous (RSV), y virus de Simio 40 (SV40) para expresión en células de mamífero. Un vector preferido es proporcionado por el vector de expresión pCD5 para expresión de proteína recombinante en células de mamífero que comprenden un promotor de CMV. Un vector preferido adicional se proporciona mediante un vector de expresión pCAGGS para expresión de proteína recombinante en células de mamífero que comprenden un promotor de potenciador de CMV / beta-actina de gallina (CAG).

Una casete de expresión de acuerdo con la invención que está concebida para la expresión de un ectodominio de hemaglutinina de gripe trimérico o parte del mismo preferentemente comprende de 5' a 3': una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia señal; una secuencia de ácido nucleico que codifica un ectodominio recombinante de hemaglutinina de gripe o parte del mismo; una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de trimerización, preferentemente una secuencia de trimerización basada en GCN4, y una secuencia de ácido nucleico que codifica el marcador de afinidad por estreptavidina. Un vector de acuerdo con la invención que está concebido para la expresión de un ectodominio de neuraminidasa de gripe tetramérico o parte del mismo preferentemente comprende de 5' a 3': una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia señal; una secuencia de ácido nucleico que codifica el marcador de afinidad por estreptavidina; una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de tetramerización, preferentemente una secuencia de tetramerización basada en GCN4, y; una secuencia de ácido nucleico que codifica un ectodominio recombinante de hemaglutinina de gripe o parte del mismo.

Un ectodominio multimérico recombinante o parte del mismo de acuerdo con la invención es expresado, por ejemplo, en una célula procariota, o en una célula eucariota, tal como una célula vegetal, una célula de levadura, una célula de mamífero o una célula de insecto. Adicionalmente, un ectodominio multimérico recombinante o parte del mismo de acuerdo con la invención puede expresarse en plantas. Las células procariotas y eucariotas son bien conocidas en la técnica. Una célula procariota es por ejemplo *E. coli*. Los ejemplos de plantas y/o células vegetales incluyen, aunque sin limitarse a, (células de) maíz, (células de) arroz, (células de) lenteja de agua, (células de, tales como células BY-2 o NT-1) tabaco, y (células de) patata. Son ejemplos de células de levadura *Saccharomyces* y *Pichia*. Los ejemplos de células de insecto incluyen, aunque sin limitarse a, células de *Spodoptera frugiperda*, tales como células Tn5, SF-9 y SF-21, y células de *Drosophila*, tales como células Schneider 2 (S2) de *Drosophila*. Los ejemplos de células de mamífero que son adecuadas para expresar un ectodominio multimérico recombinante o

parte del mismo de acuerdo con la invención incluyen, aunque sin limitarse a, células de riñón de mono verde africano (Vero), células de riñón de cría de hámster (tales como BHK-21), células de retina humana (por ejemplo células PerC6), células de riñón embrionario humano (tales como células HEK293), células de riñón canino Madin Darby (MDCK), fibroblastos embrionarios de gallina (CEF), células renales de embrión de gallina (células CEK), células madre embrionarias derivadas de blastodermos (por ejemplo EB14), fibroblastos embrionarios de ratón (tales como células 3T3), células de ovario de hámster chino (CHO), mielomas de ratón (tales como NS0 y SP2/0), células musculares de codorniz (QM5), y derivados de estos tipos de células. En una realización preferida, se usan células HEK293T de mamífero o células de insecto S2 para la producción de un ectodominio multimérico recombinante o parte del mismo de acuerdo con la invención.

Se proporciona, mediante la invención, un método para la preparación de una composición inmunogénica de acuerdo con la invención, que comprende proporcionar un vector de acuerdo con la invención, transformar una célula huésped con dicho vector, cultivar dicha célula huésped en un medio de cultivo, permitiendo de este modo la expresión del ectodominio multimérico recombinante de una proteína de la gripe o parte del mismo fusionado a un marcador de afinidad por estreptavidina, y aislar dicho ectodominio multimérico recombinante de una proteína de la gripe o parte de la misma fusionada a un marcador de afinidad por estreptavidina.

Cuando se usa un método de acuerdo con la invención para expresión de un ectodominio multimérico recombinante o parte del mismo de acuerdo con la invención en una célula huésped, dicho ectodominio multimérico o parte del mismo se secreta preferentemente al medio de cultivo y puede aislarse a partir de dicho medio de cultivo. El aislamiento de dicho ectodominio multimérico o parte del mismo se realiza, por ejemplo, centrifugando o filtrando el medio de cultivo para eliminar células y remanentes celulares, y purificación usando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo métodos de electroforesis en gel o cromatografía, tales como cromatografía por afinidad o cromatografía de líquidos de alta resolución. En una realización preferida, un ectodominio multimérico recombinante o parte del mismo de acuerdo con la invención se purifica usando el marcador de afinidad por estreptavidina fusionada, por ejemplo usando columnas de purificación con estreptavidina o Strep-Tactin Sepharose (IBA Alemania) y un tampón de elución para desplazar la proteína Strep-tag de la columna que comprende biotina o un derivado u homólogo de la misma.

En algunas realizaciones, un vector de acuerdo con la invención se deriva de un virus animal tal como, aunque sin limitarse a, virus vaccinia (incluyendo derivados atenuados tales como el virus Vaccinia modificado de Ankara, MVA), el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), adenovirus o retrovirus. Se prefiere que un virus animal que se usó como vector de acuerdo con la invención esté atenuado. Cualquiera de estos vectores es particularmente adecuado para expresión de un ectodominio multimérico recombinante o parte del mismo de acuerdo con la invención en un huésped en el que se pretende desencadenar una respuesta inmunógena. Una ventaja del uso de un virus animal tal como NDV es que puede cultivarse de forma eficiente en huevos de gallina embrionados a bajos costes y en cantidades suficientemente elevadas. En una realización preferida, después de la propagación del virus animal en huevos de gallina embrionados, el virus aislado se usa posteriormente para infectar células eucariotas. Las células infectadas se usan a continuación para la producción de un ectodominio multimérico recombinante o parte del mismo de acuerdo con la invención. Los ejemplos de células que son adecuadas para expresar un ectodominio multimérico recombinante o parte del mismo de acuerdo con la invención son células de mamífero, tal como se ha descrito anteriormente. En otra realización preferida, después, por ejemplo, de la propagación del virus animal en huevos de gallina embrionados, el virus aislado se usa para infectar directamente células de un huésped en las que una respuesta inmunógena se va a desencadenar. Una ventaja de infectar un huésped en el que se va a generar una respuesta inmunógena con un vector de acuerdo con la invención es que la administración se lleva a cabo de manera muy eficiente, por ejemplo pulverizando sobre animales o en el aire por encima de animales. La invención comprende además, por lo tanto, una composición inmunogénica que comprende el vector de acuerdo con la invención, y un diluyente farmacéuticamente aceptable.

Un vector de acuerdo con la invención para uso en una composición inmunogénica de acuerdo con la invención preferentemente comprende una casete de expresión que comprende un promotor que es adecuado para inicio de la transcripción en células del huésped pretendido. Los ejemplos de promotores adecuados para expresión de al menos un ectodominio multimérico recombinante o parte del mismo de acuerdo con la invención en huéspedes aviares incluyen, aunque sin limitarse a, promotor de beta-actina aviar o un promotor pol I de ARN de gallina. Los ejemplos de promotores adecuados para expresión de al menos un ectodominio multimérico recombinante o parte del mismo de acuerdo con la invención en huéspedes mamíferos incluyen, aunque sin limitarse a, promotor de beta-actina, promotor de inmunoglobulina, promotor de ARN 5S, o promotores derivados de virus tales como promotores de citomegalovirus (CMV), virus del sarcoma de Rous (RSV) y virus de simio 40 (SV40) de huéspedes mamíferos.

En algunas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico que codifica un ectodominio recombinante o parte del mismo de acuerdo con la invención se altera tal como mediante sustituciones, deleciones y/o adiciones de ácidos nucleicos que permiten la expresión de la funcionalidad de proteínas equivalente a un ectodominio multimérico recombinante o parte del mismo de acuerdo con la invención. Las proteínas funcionalmente equivalentes pueden identificarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo mediante su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria contra el virus de la gripe en un individuo, o en un ensayo in vitro en el que se determina la unión a anticuerpos.

En algunas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico que codifica un ectodominio de hemaglutinina de gripe trimérico o parte del mismo, y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica una neuraminidasa de gripe tetramérica o parte de la misma se inserta en un vector. En otra realización, secuencias de ácido nucleico que codifican más de un ectodominio de hemaglutinina de gripe trimérico o parte del mismo, y/o neuraminidasa de gripe tetramérica o parte de la misma o combinaciones de los mismos se insertan en un vector. En otra realización más, una composición inmunogénica de acuerdo con la invención comprende vectores diferentes en cada uno de los cuales se inserta una secuencia de ácido nucleico que codifica un ectodominio de hemaglutinina de gripe trimérico o parte del mismo, y/o una neuraminidasa de gripe tetramérica o parte de la misma.

Por lo tanto, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 secuencias de ácido nucleico que codifican un ectodominio de hemaglutinina trimérico o parte del mismo puede combinarse en un vector, tal como secuencias de ácido nucleico que codifican H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y/o H16. Como alternativa, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 secuencias de ácido nucleico que codifican un ectodominio de neuraminidasa tetramérico o parte del mismo pueden combinarse en un vector, tales como secuencias de ácido nucleico que codifican N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 y/o N9. Adicionalmente, una composición inmunogénica de acuerdo con la invención puede comprender una combinación de una o más secuencias de ácido nucleico que codifican un ectodominio de hemaglutinina trimérico o parte del mismo y una o más secuencias de ácido nucleico que codifican un ectodominio de neuraminidasa tetramérico o parte del mismo de diferentes subtipos de gripe. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 secuencias de ácido nucleico que codifican ectodominios de hemaglutinina triméricos o partes de los mismos y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 secuencias de ácido nucleico que codifican ectodominios de neuraminidasa tetraméricos o partes de los mismos pueden combinarse, tales como H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 y/o N9. Quedará claro para un experto en la materia que la expresión "uno o más ectodominios" abarca uno o más ectodominios de uno o más subtipos de virus de la gripe, tales como por ejemplo el virus de la gripe A y el virus de la gripe B. De esta manera, una composición inmunogénica de acuerdo con la invención puede comprender una composición multivalente con la que se consigue una protección más amplia contra más de un tipo de virus de la gripe, o subtipos o cepas de virus de la gripe. Además, dicha composición inmunogénica puede ser menos sensible a alteraciones antigénicas que las vacunas de virus de la gripe inactivados o atenuados vivos tradicionales.

Además, se proporciona mediante la invención un método para desencadenar una respuesta inmunitaria contra un virus de la gripe en un individuo que comprende administrar a dicho individuo una composición inmunogénica de acuerdo con la invención.

La invención se explica adicionalmente en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que simplemente sirven para clarificar la invención.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Representación esquemática de un virus de la gripe.

Figura 2. Expresión, purificación y actividad biológica de proteínas H5 triméricas solubles y recombinantes. (A) Representación esquemática de las casetas de expresión de H5 usadas. La secuencia codificante del ectodominio de H5 (H5) se clonó en marco con secuencias de ADN que codifican un péptido señal (SP), el motivo de trimerización de cremallera de isoleucina de GCN4 (GCN4) y la Strep-tagII (ST) bajo el control de un promotor de CMV. (B) La expresión y secreción de H5 en los medios de cultivo se analizó mediante SDS-PAGE seguida por transferencia de Western. La proteína recombinante se detectó usando un anticuerpo de ratón anti-Strep-tag. (C) Análisis de proteínas H5 purificadas recombinantes mediante filtración en gel. Se muestran los perfiles de elución de la proteína H5 usando una columna Superdex200GL 10-300. La elución de un control de catalasa de 232 kDa se indica mediante la línea de puntos. (D) Trimeros de H5 solubles recombinantes se complejaron con un anticuerpo de ratón conjugado a HRP dirigido contra la Strep-tag antes de su aplicación en un ensayo de unión a fetuina. La unión a HA también se evaluó después del tratamiento de fetuina con neuraminidasa derivada de *Vibrio cholerae* (fetuina + VCNA).

Figura 3. Vacunación con hemaglutinina soluble (sHA) en gallinas. Un grupo de 10 gallinas SPF se inmunizó dos veces con 10 µg de sHA (el d0 y el d21). Como control de provocación, un grupo de gallinas se trató de forma simulada (PBS). Tres semanas después de la 2ª vacunación, todas las aves fueron provocadas con 10⁵ TCID₅₀ de H5N1 A/Vietnam/1203/04 y se monitorizaron diariamente en busca de signos clínicos hasta el día 14 p.i. A) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier, que indica el porcentaje de mortalidad cada día para cada grupo. B) Se recogieron muestras de sangre 3 semanas después de la primera inmunización (d21), 3 semanas después de la segunda inmunización (d42) y 2 semanas después de la provocación (d56). Se representan gráficamente los valores cuantitativos de anticuerpo HI en suero para cada ave. Las barras representan medias geométricas para cada grupo. La línea de puntos indica el nivel de anticuerpo más bajo correlacionado con protección en este experimento.

Figura 4. Vacunación con sHA en gallinas. Siete grupos de 10 gallinas WLH se inmunizaron i.m. con 10, 2 o 0,4 µg de sHA una o dos veces con un intervalo de 3 semanas. Como control de la provocación, un grupo se trató de

forma simulada (PBS). Cuatro semanas después de la vacunación, todas las gallinas se provocaron con 10^5 TCID₅₀ de A/Vietnam/1203/04 y a continuación se monitorizaron diariamente en busca de signos clínicos durante 14 días. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier que indica el porcentaje de mortalidad cada día para cada grupo que fue vacunado una (A) o dos veces (B).

Figura 5. Expresión y análisis de proteínas HA (sHA) y NA (sNA) multiméricas solubles purificadas de virus de la gripe 2009 A(H1N1). A) Representación esquemática de las subunidades de sHA y sNA expresadas de forma recombinante. sHA: el ectodominio de HA (aminoácidos 17-522) se expresa con una secuencia señal CD5 N-terminal y un dominio GCN4 trimérico C-terminal (GCN4-pII) y *Strep-tag* (ST), respectivamente. sNA: el dominio de la cabeza de NA (aminoácidos 75-469) se expresa con una secuencia señal CD5 N-terminal, un OneSTrEP (OS) y un dominio GCN4 tetramérico (GCN4-pLI). (B) SDS-PAGE reductora teñida con azul de Coomassie de proteínas sHA y sNA purificadas por afinidad. (C) Cromatografía por filtración en gel de proteínas sHA y sNA purificadas en columna Superdex 200 16/600 y Superdex 200 10/300, respectivamente. Las líneas discontinuas indican migración de patrones de calibración (ferritina, 440 kDa; catalasa, 232 kDa). La masa molecular aparente de los picos principales es 288 kDa para sHA y 291 kDa para sNA correlacionando con un estado oligomérico trimérico y tetramérico de sHA y sNA, respectivamente.

Figura 6. Inducción de anticuerpos para virus de la gripe 2009 A(H1N1) después de la vacunación en hurones. (A) Valores cuantitativos de inhibición de hemaglutinina (HI), (B) valores cuantitativos de inhibición de neuraminidasa (NI) y (C) valores cuantitativos de neutralización de virus (VN) de sueros de hurones que recibieron una inmunización el día 0 y el día 21 con: 3,75 µg de HA+3,75 µg de NA, 3,75 µg de HA con adyuvante (Iscoms Matrix M; [IMM]), 3,75 µg de NA+IMM, 3,75 µg de HA+3,75 µg de NA+IMM, PBS o IMM, según se indica. Se presentan las medias geométricas de los valores cuantitativos; las barras de error indican SD. Se indican las diferencias estadísticamente significativas: *, $P < 0,05$.

Figura 7. Peso del animal y patología pulmonar de hurones inoculados con virus de la gripe 2009 A(H1N1). Seis grupos de seis hurones cada uno se inmunizaron dos veces con: 3,75 µg de HA+3,75 µg de NA, 3,75 µg de HA con adyuvante (Iscoms Matrix M; [IMM]), 3,75 µg de NA+ IMM, 3,75 µg de HA+3,75 µg de NA+ IMM, PBS o IMM según se indica. A los animales se les inoculó por vía intranasal el día 56 con 10^6 TCID₅₀ de virus. (A) La pérdida de peso de los animales inoculados se indica como un porcentaje de peso corporal antes de la infección (100 %). (B) El peso del pulmón como un porcentaje de peso corporal, como un indicador de la consolidación pulmonar. (C) Los pulmones se observaron macroscópicamente y se puntuaron para el porcentaje del área pulmonar que presentaba lesiones necróticas. Se presentan las medias geométricas de los valores cuantitativos; las barras de error indican SD. Las diferencias estadísticamente significativas se indican: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Figura 8. Diseminación de virus de la gripe 2009 A(H1N1) en los pulmones, la nariz y la garganta de hurones inoculados. (A) Valores cuantitativos de virus en el pulmón el día 4 postinfección con virus de la gripe 2009 A(H1N1) en hurones inmunizados con 3,75 µg de HA+3,75 µg de NA, 3,75 µg de HA con adyuvante (Iscoms Matrix M; [IMM]), 3,75 µg de NA+ IMM, 3,75 µg de HA+3,75 µg de NA+ IMM PBS o IMM según se indica. (B y C) Diseminación del virus desde la nariz y la garganta de los animales inoculados. Se recogieron frotis el día 4 después de la inoculación. Los valores cuantitativos de virus se determinaron por medio de valoración cuantitativa a punto final en células MDCK. Se dan las medias geométricas de los valores cuantitativos; las barras de error indican desviación estándar. Se indican las diferencias estadísticamente significativas: ***, $P < 0,001$.

Figura 9. Inducción de anticuerpos neutralización cruzada después de la vacunación con sHA y sNA de virus de la gripe 2009 A(H1N1) en hurones. (A) Sueros de hurones que recibieron una doble inmunización de sHA o sHA+sNA con adyuvante (Iscoms Matrix M; [IMM]) se ensayaron en un ensayo de inhibición de hemaglutinina (HI) para anticuerpos contra HI hacia diferentes aislados de virus de la gripe incluyendo virus de la gripe H1N1 A/Swine/shope/1/56, A/Italy/1443/76, A/NL/386/86, A/Iowa/15/30, A/NL/25/80, A/NewYersey/8/76, A/PR/8/34 y IVR/148. Se presentan las medias geométricas de los valores cuantitativos; las barras de error indican SD. (B) Sueros de hurones que recibieron una inmunización única o doble de sNA o sHA+sNA con adyuvante se reunieron y se ensayaron en un ensayo de inhibición de neuraminidasa (NI) para anticuerpos de NI contra NA del virus de la gripe A/Kentucky/UR06-0258/2007(H1N1) y virus de la gripe A/turkey/Turkey/1/2005(H5N1). La NA de A/California/04/2009(H1N1) se incluyó como un control positivo. Sueros de control positivo específicos de virus de la gripe A/NL/602/09(H1N1) o A/turkey/Turkey/1/2005(H5N1) se obtuvieron de un hurón infectado con estos virus. Se presentan los valores cuantitativos promedio de dos elementos repetitivos; las barras de error indican SD.

Figura 10. A. Ectodominio de hemaglutinina (HA) (aminoácidos 17-522) del virus de la gripe A/California/04/2009(H1N1) (SEC ID N.º: 18). B. Dominio de cabeza de neuraminidasa (NA) (aminoácidos 75-469) del virus de la gripe A/California/04/2009(H1N1) (SEC ID N.º: 19).

Figura 11. Generación del virus vector rNDV-HA y expresión de HA y sH5³. A) Representación esquemática de la construcción pFL-HertsΔPBC que codifica la proteína HA de gripe. Se introdujeron sitios de restricción de XbaI

y Pmel mediante mutagénesis dirigida para permitir la inserción de un enlazador que contenía señales de fin-inicio de la transcripción de NDV. Los genes que codifican el gen H5 HA sin modificar o la proteína sH5³ soluble, esta última consistiendo en el ectodominio H5 HA fusionado a la secuencia de trimerización GCN4, se insertaron, cada uno, cadena abajo de la secuencia del enlazador. B) Expresión de HA en monocapas de células QM5. Las células se infectaron de forma simulada se infectaron con la cepa de Herts de NDV de tipo silvestre (indicada como wt NDV), rNDV-H5 HA o rNDV-sH5³ (indicados como NDV-H5 y NDV-sH5³, respectivamente) y se tiñeron para proteína HA y F usando anticuerpos específicos. C) Producción y secreción de sH5³ por células infectadas por rNDV-sH5³. Se infectaron células QM5 con rNDV-sH5³ en ausencia de tripsina a una MOI de 3 y el sobrenadante se recogió a los 2 días p.i. La proteína sH5³ se purificó del sobrenadante usando perlas de Strep-Tactin Sepharose. El producto de purificación se sometió a electroforesis SDS-PAGE y las proteínas se tiñeron con reactivo de tinción azul. La proteína sH5³ expresada en células HEK 293S y una serie de diluciones en BSA se realizaron en paralelo. D) El análisis Blue native PAGE del producto de expresión sH5³ recuperado de células QM5 infectadas por rNDV-sH5³. Se indica la posición en el gel de la forma trimérica y monomérica de la proteína HA observadas después del calentamiento de la muestra antes de la electroforesis.

Figura 12. Protección después de la vacuna con NDV-H5³ de gallinas. A. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier que indican la supervivencia (%) de gallinas vacunados por vía intramuscular (i.m.). B. Índice clínico calculado tomando como base los signos clínicos (tal como se describe en materiales y métodos) observado después de la provocación.

Figura 13. Respuesta serológica después de la vacunación con NDV-H5³ de gallinas. Valores cuantitativos de anticuerpo de inhibición de hemaglutinación (HI) contra gripe (A) y cepa Herts de NDV (B) medidas en muestras de suero recogidas el día 21 postvacunación por vía i.m. Los valores cuantitativos se expresan como el recíproco de la dilución en suero más elevada que muestra HI. La línea de puntos indica el límite de detección más bajo. A los valores cuantitativos por debajo del límite de detección se le asignó un valor de 2 o 4. Cada círculo representa una medición de HI por ave para la detección de anticuerpos de HI contra gripe aviar (AI) y dos mediciones por ave en el caso de la detección de anticuerpo para HI de NDV. Las líneas horizontales indican las medias geométricas de los valores cuantitativos por grupo.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Genes y vectores de expresión

Basándose en la numeración de H3, se sintetizó un clon de ADNc que codifica residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos 18 a 523 de la HA de A/VietNam/1203/2004 (H5N1) (N.º de entrada al Genbank ABW90137.1) usando codones preferidos humanos mediante GenScript USA Inc. El ADNc que codifica el ectodominio de HA se clonó en el vector de expresión pCD5 para expresión eficiente en células de mamífero (Zeng et al., 2008). El vector pCD5 había sido modificado de modo que el ADNc que codifica HA se clonó en marco con secuencias de ADN que codifican una secuencia señal, un motivo de trimerización de cremallera de isoleucina GCN4: ELIKRMKQIEDKIEIESKQKKIENEIARIKKIKLVPRGSLE (SEC ID N.º: 6) (Pancera et al., 2005), y la Strep-tagII (WSHPQFEK; SEC ID N.º: 2; IBA, Alemania).

Expresión y purificación de proteínas. El vector de expresión pCD5 que contenía la secuencia que codifica el ectodominio de HA se transfectó en células HEK293S GnTI(-) (Reeves et al., 1999) usando polietilenimina (PEI) en una proporción 1:5 (µg de PEI: µg de ADN). A las 6 h post-transfección, la mezcla de transfección se sustituyó por medio de expresión 293 SFM II (Invitrogen), suplementado con bicarbonato sódico (3,7 g/litro), glucosa (2,0 g/litro), Primatone RL-UF (3,0 g/litro, Kerry Bio-Science, Zwijndrecht, Países Bajos), penicilina (100 unidades/ml), estreptomycin (100 µg/ml), glutaMAX (Gibco), y DMSO al 1,5 %. Los sobrenadantes de cultivo tisular se recogieron 5-6 días post-transfección. La expresión y la secreción de la proteína HA se confirmaron mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico (SDS)-poliacrilamida (PAGE) seguida por transferencia de Western usando un anticuerpo anti-Strep-tag de ratón (IBA, Alemania). Las proteínas HA secretadas se purificaron usando perlas de Strep-Tactin Sepharose de acuerdo con las instrucciones del fabricante (IBA, Alemania). La concentración de proteína purificada se determinó usando un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Isogen Life Sciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Caracterización biológica de HA recombinante. El estado de oligomerización de la proteína HA se determinó analizando el perfil de elución usando una columna Superdex200GL 10-300 (U-Protein Express). La funcionalidad del trimero de HA soluble (sHA³) se evaluó usando un ensayo en fase sólida de fetuina (Lambre et al., 1991). Se usó 1 µg/ml de fetuina por pocillo para revestir placas Nunc Maxisorp de 96 pocillos. Cuando se indica en la leyenda de la figura la fetuina se trató con neuraminidasa derivada de *Vibrio cholerae* (VCNA) seguida por etapas de lavado exhaustivas. sHA³ se pre-complejó con anticuerpo anti-Strep-tag enlazado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (proporción molar 2:1) durante 30 minutos a 0 °C antes de la incubación de diluciones limitantes en las placas

revestidas con fetuina (60 min, temperatura ambiente [TA]). La unión a HA se detectó posteriormente usando sustrato de tetrametilbencidina (BioFX) en un lector de ELISA (EL-808 [BioTEK]), leyendo la DO a 450 nm.

Experimentos de vacunación-provocación en gallinas

Se usaron gallinas SPF White Leghorn (Lohmann) de 6 semanas de edad. Las aves se alojaron en una sala climatizada en codificas de Bsl-3. En el primer experimento, un grupo de 10 gallinas se inmunizó dos veces al día (el día 0 y el 21) mediante inyección i.m. (0,5 ml) de 10 µg de sHA³ adjuvado con Stimune (ID-Lelystad, Lelystad, Países Bajos). Como control de provocación, un grupo de 10 gallinas recibieron un volumen igual de PBS en Stimune (vacunadas de forma simulada). Tres semanas después de la vacunación, las aves fueron provocadas mediante infección con 10⁵ TCID₅₀ de virus A/Vietnam/1194/04 (0,1 ml por vía intranasal, i.n. y 0,1 ml por vía intratraqueal, i.t., ID de UniProt Taxonomy: 284217) y se monitorizaron durante un periodo de 14 días en busca de signos de enfermedad. Se recogieron muestras de sangre a las 3 semanas después de cada inmunización (el d21 y el d42) y el día 14 postinfección (p.i.). Se tomaron frotis de tráquea y cloaca de cada gallina el día 2, 4 y 7 p.i.

En el siguiente experimento, se usó un total de 70 gallinas ponedoras de un día de edad (White Leghorn) adquiridas de un criador local. Las gallinas se vacunaron contra NDV (virus de la enfermedad de Newcastle) e IBV (virus de bronquitis infecciosa) a la edad de un día de acuerdo con la rutina de la granja. A la edad de 6 semanas, las aves fueron transportadas a la instalación de nivel de Bioseguridad (Bsl-) 3 y se asignaron a 7 grupos experimentales de 10 aves cada uno. Seis grupos se inmunizaron mediante una única inyección intramuscular de 10, 2 o 0,4 µg de antígeno de sHA³ el día 21 o dos veces (el día 0 y el 21) con las mismas dosis. Como control de provocación, un grupo de 10 aves se vacunó de forma simulada (el día 0 y el 21) con PBS en Stimune. Cuatro semanas después de la vacunación (día 49), las gallinas fueron provocadas como anteriormente y se observaron diariamente en busca de signos clínicos durante 14 días. Se recogieron muestras de sangre antes de la vacunación, después de la primera (día 21) y segunda (día 49) vacunación y el día 14 p.i. Se recogieron muestras de frotis de tráquea y cloaca los mismos días tal como se ha descrito anteriormente.

Ensayo de detección de virus

Los frotis de tráquea y cloaca se almacenaron en medio caldo de triptosa frío. El medio se clarificó mediante centrifugado a baja velocidad y el sobrenadante se recogió, se dividió en alícuotas y se almacenó a -70 °C. Tras congelación-descongelación, frotis de tráquea y cloaca muestreados a partir de la misma ave el mismo día se agruparon, el ARN se extrajo y la presencia de ARN viral se ensayó usando ensayo de RT-PCR cuantitativa (Taq ManTM PCR) dirigido contra el gen M1, que codifica una proteína de la matriz del virus de la gripe. En primer lugar, se sintetizó ADNc usando el cebador 5'-CACTGGGCACGGTGAGC-3' (SEC ID N.º: 7), a continuación, parte del gen M1 se amplificó ejecutando 45 ciclos de PCR en Light Cycler usando el cebador 5'-CTTCTAACCGAGGTGCGAAACGTA-3' (SEC ID N.º: 8) como cebador inverso en presencia de la sonda fluorescente de TaqMan 5'-6FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-X-ph (SEC ID N.º: 9). Muestras de control negativo y positivo se ensayaron en paralelo. El límite de detección inferior se determinó que era aproximadamente 500 TCID₅₀. Algunas muestras dieron resultados inconcluyentes, lo que significa que dieron solamente una señal muy débil (fluorescencia < 0,07) después de >31 ciclos.

Ensayo de inhibición de hemaglutinación

Sueros inmunes inactivados por calor de muestras de sangre de gallina se ensayaron para actividad HI con glóbulos rojos de gallina al 1 % y 4 HAU (unidades hemaglutinantes) de A/Vietnam/1194/04 de acuerdo con métodos convencionales. La formación del botón rojo se puntuó como indicio de hemaglutinación. Los valores cuantitativos de anticuerpo se expresaron como la recíproca de la dilución en suero más alta que mostraba HI.

Resultados

Expresión, purificación y caracterización de los trómeros de H5.

Para expresar un ectodominio de HA trimérico, soluble (sHA³) en células de mamífero, la secuencia que codifica el ectodominio H5 se clonó en primer lugar en el vector de expresión apropiado. En el vector pCD5 usado, la secuencia de HA estaba precedida por una secuencia que codifica un péptido señal, para permitir secreción eficiente de la proteína recombinante, y seguida por las secuencias que codifican el motivo de trimerización de cremallera de isoleucina GCN4 (Pancera et al., 2005) y la Strep-tagII (figura 2A). La expresión del ectodominio de HA se consiguió mediante transfección transitoria del plásmido de expresión en células HEK. La expresión y secreción de la proteína HA se verificó sometiendo a sobrenadantes del cultivo celular a electroforesis en gel seguida por transferencia de Western usando un anticuerpo dirigido contra Strep-tag II (figura 2B). Los resultados muestran que la proteína HA recombinante podría detectarse fácilmente en el sobrenadante de cultivo celular después de la transfección de las células con el plásmido de expresión, pero no después de la transfección simulada. La proteína HA secretada se purificó en un protocolo de una sola etapa usando perlas de Strep-Tactin Sepharose. Los rendimientos de proteína variaban entre 0,4-1 mg de proteína recombinante por 100 ml de medio de cultivo celular. Después de la purificación de la proteína H5 a partir de los sobrenadantes de cultivo celular, el estado oligomérico de la proteína H5 se analizó

mediante cromatografía en columna de filtración en gel Superdex200 (figura 2C). La masa de la proteína HA se eluía con la velocidad de un oligómero, presumiblemente un trímero, mientras que solamente una fracción menor se descubrió como agregados en el volumen de vacíos. La naturaleza trimérica del oligómero H5 se confirmó usando electroforesis en gel Blue-native. La actividad biológica de la proteína H5 purificada se estudió usando un ensayo de unión en fase sólida con la glucoproteína sanguínea sialidada fetuina. La unión de HA se midió por medio de HRP conjugada al anticuerpo anti-Strep-tag II, tal como se detalla en la sección Materiales y métodos. La preparación de H5 demostró una unión dependiente de la concentración a fetuina. Esta unión era dependiente del ácido siálico, dado que no se observó ninguna unión cuando la fetuina se había tratado con VCNA (figura 2D). En conclusión, H5 trimérica, soluble, biológicamente activa se produjo de forma eficiente en células de mamífero y se purificó fácilmente.

Eficacia de la vacuna de sHA³ contra una infección por H5N1 letal en gallinas

Para evaluar la eficacia protectora de sHA³ en gallinas, diez gallinas se vacunaron dos veces (el día 0 y el 21) por vía intramuscular (i.m.) con 10 µg de sHA³ adyuvada con Stimune y se provocaron 3 semanas más tarde mediante inoculación intranasal (i.n.) / intratraqueal (i.t.) de una dosis letal de virus H5N1 A/Vietnam/1194/04. Además, 10 aves fueron vacunadas de forma simulada para servir como controles de provocación. Tal como se muestra en la figura 3, la vacunación con 10 µg de sHA³ fue capaz de generar protección completa. Ninguna de las gallinas vacunadas murió o mostró síntomas indicativos de enfermedad relacionada con la gripe, mientras que todas las gallinas vacunadas de forma simulada fallecieron en el plazo de 2 días. El análisis serológico de muestras de sangre mostraba que todas las gallinas vacunadas de forma simulada tenían un valor cuantitativo por debajo del límite de detección. Los valores cuantitativos de anticuerpo de HI se incrementaron hasta un máximo de 1024 después de un refuerzo con sHA³. El valor cuantitativo de HI más bajo observado después del refuerzo fue de 64, que era aparentemente suficiente para proteger al animal contra la provocación letal. Curiosamente, el 50 % de las aves desarrollaron valores cuantitativos de anticuerpo HI iguales a 64 o mayores ya tres semanas después de la primera vacunación. Estos resultados incitaron a los inventores a estimar la dosis mínima de sHA³ requerida para otorgar protección y a examinar si una única dosis con sHA³ también podría ser protectora.

En el segundo experimento de inmunización-provocación, las gallinas se vacunaron con 10, 2 o 0,4 µg de sHA³ dos veces o mediante una única inyección y se provocaron cuatro semanas más tarde mediante inyección de una dosis letal de A/Vietnam/1194/04 tal como se ha descrito anteriormente. Una vacunación de refuerzo con una dosis de 0,4 µg de sHA³ fue suficiente para proteger al 90 % de las gallinas contra la mortalidad, mientras que todas las gallinas sobrevivieron cuando se administró una vacunación de refuerzo de 2 o 10 µg (figura 4B). Además, los resultados muestran que una única vacunación con sHA³ es suficiente para proteger a las gallinas contra una infección letal; solamente una gallina murió cuando se administró una dosis de 2 µg, mientras que una dosis de 10 µg fue protectora para todas las gallinas. Incluso una única dosis de 0,4 µg seguía siendo capaz de proteger al 60 % de las gallinas contra la muerte. Todas las gallinas que recibieron la vacuna simulada (PBS) murieron en el plazo de 2 días.

También se analizó si la vacunación con sHA³ disminuía o impedía la diseminación del virus. Con este fin, se tomaron frotis de tráquea y cloaca de las gallinas vacunadas y provocadas a partir del experimento mostrado en la figura 4 a día 2, 4 y 7 p.i. Los frotis de tráquea y cloaca muestreados de la misma gallina el mismo día se agruparon y la presencia de ADN viral en los frotis agrupados se analizó usando un ensayo de RT PCR cuantitativa que detectaba el gen M1. Los resultados se muestran en la tabla 1. De las gallinas que recibieron una vacunación de refuerzo con el antígeno de HA, solamente 2 aves, ambas de las cuales habían recibido la cantidad más baja de antígeno, dieron positivo en el ensayo. La diseminación de virus no pudo observarse en ninguna de las otras aves, aunque 3 frotis dieron resultados inconcluyentes. Además, cuando las gallinas recibieron solamente una vacunación, parecía que la mayoría de las aves no diseminaban ningún virus. Ninguna de las aves diseminó el virus el día 4 y el 7 postinfección después de la vacunación con 10 µg de sHA³. Los resultados muestran que la ausencia de diseminación de virus se correlacionaba con que las aves estuvieran protegidas contra una provocación letal con HPAI H5N1.

Tabla 1. Detección de virus en muestras de frotis de tráquea y cloaca agrupadas recogidas de gallinas vacunadas

Detección de virus en muestras de frotis recogidas de los grupos de vacunación el día indicado p.i.																			
Vacunación 1x										Vacunación x2									
10					0,4					2					0,4				
Gallina #	D2	D4	D7	D2	D4	D7	D2	D4	D7	D2	D4	D7	D2	D4	D7	D2	D4	D7	D2
1	-	-	-	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	±	±	±	-	-	-	-	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	+
4	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
6	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
8	±	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-	+
9	-	-	-	-	±	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
10	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	±	-	-	-	-	+

+ = positivo ; ± = inconcluyente ; - = negativo

Ejemplo 2

Materiales y métodos

5 Virus de la gripe A

El virus de la gripe A/Netherlands/602/2009 se aisló del primer caso de una infección por 2009-A/H1N1 confirmada en laboratorio en los Países Bajos mediante inoculación de huevos de gallina enbrionados de 11 días de edad (Munster et al, 2009). Estirpes virales de virus de la gripe A/Netherlands/602/2009 (H1N1) se prepararon infectando
10 células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) confluentes. Después de que los cambios citopatológicos estaban completos, los sobrenadantes de cultivo se aclararon mediante centrifugado a baja velocidad y se almacenaron a -70 °C. Los valores cuantitativos de virus infecciosos se determinaron en células MDCK tal como se ha descrito previamente (Rimmelzwaan et al., 1998). Todos los experimentos con estos virus se realizaron en condición de nivel de bioseguridad (BSL)-3.

15 Preparación de antígenos de HA y NA

Genes optimizados de codón humano que codifican el ectodominio de hemaglutinina (HA) (aminoácidos 17-522, figura 10A) y el dominio de cabeza de neuraminidasa (NA) (aminoácidos 75-469, figura 10B) del virus de la gripe
20 A/California/04/2009 (H1N1, ID de UniProt Taxonomy: 641501) se sintetizaron (GenScript) y se clonaron en un derivado del plásmido de expresión S1-Ig (Li et al., 2003) para expresión en células HEK293T. El gen de HA estaba flanqueado por una secuencia señal CD5 N-terminal, una secuencia de trimerización GCN4 artificial C-terminal (GCN4-pII) (Harbury et al., 1993) seguida por una *Strep-tag* para purificación por afinidad (IBA GmbH). El dominio de cabeza de NA estaba flanqueado por una secuencia señal CD5 N-terminal, una doble secuencia de *Strep-tag* (One-STREP) (IBA GmbH) y un dominio de tetramerización GCN4 artificial (GCN4-pLI) (Harbury et al., 1993), respectivamente.

25 Expresión y purificación de proteínas

Células HEK293T se transfectaron con los vectores de expresión pCD5 que contenían las secuencias codificantes de HA y NA usando polietilenimina (PEI) en una proporción de 1:5 (µg de ADN: µg de PEI). A las 6 h post-transfección, el medio de transfección se substituyó por medio de expresión 293 SFM II (Invitrogen), suplementado con bicarbonato sódico (3,7 g/litro), glucosa (2,0 g/litro), Primatone™ RL-UF (3,0 g/litro, Kerry Bio-Science, Zwijndrecht, Países Bajos), penicilina (100 unidades/ml), estreptomina (100 µg/ml), glutaMAX (Gibco), y DMSO al
35 1,5 %. Los sobrenadantes de cultivo tisular se recogieron 5-6 días post-transfección y los ectodominios de HA y NA se purificaron del medio de cultivo usando cromatografía por afinidad a *Strep-Tactin* (IBA GmbH). La expresión y purificación de proteínas HA y NA se confirmó mediante transferencia de Western usando un conjugado de *Strep-Tactin*-HRP (IBA GmbH) (no se muestran los datos) y análisis de SDS-PAGE. La oligomerización de las proteínas se determinó mediante cromatografía por filtración en gel y análisis blue-Native-PAGE.

40 Hurones

Hurones hembra exogámicos adultos jóvenes sanos (*Mustela putorius fur*, de entre 6 y 12 meses de edad) fueron suministrados por Schimmel, Uddel, Países Bajos. Los hurones fueron cribados para la presencia de anticuerpos
45 contra virus de la gripe A/H1N1 y A/H3N2 circulantes y el virus de la gripe 2009 A(H1N1) de origen porcino [virus de la gripe 2009A(H1N1)] mediante ensayo de inhibición de hemaglutinación. Los hurones que dieron negativo en el ensayo para estos virus se usaron en este experimento. Un comité de ética animal independiente aprobó el protocolo experimental antes del comienzo de los experimentos.

50 Inmunizaciones e infecciones

Treinta y seis hurones seronegativos se dividieron en seis grupos de 6 hurones y se vacunaron dos veces con las siguientes formulaciones: 3,75 µg de HA trimérica + 3,75 µg de NA tetramérica en PBS (grupo 1); 3,75 µg de HA trimérica en Iscom Matrix-M (Isconova, Uppsala, Suecia; grupo 2); 3,75 µg de NA tetramérica en Iscom Matrix-M
55 (grupo 3); 3,75 µg de HA trimérica + 3,75 µg de NA tetramérica en Iscom Matrix-M (grupo 4); PBS (grupo 5); Iscom Matrix-M (grupo 6). Las vacunaciones se realizaron con un intervalo de 20 días bajo anestesia con quetamina en los músculos cuádriceps de la pata trasera en un volumen total de 1 ml. Los hurones se alojaron en grupos y recibieron alimento y agua *ad-libitum*. A los 32 días después de la última vacunación, los animales se anestesiaron con quetamina/medetomidina (invertida con atipamezol), se pesaron y posteriormente se provocaron por vía intracraneal con 1×10^6 TCID₅₀ de gripe A/ NL/602/09 (H1N1) en un volumen de 3 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de la inyección, los hurones se monitorizaron tres veces al día para el desarrollo de signos clínicos. Antes de la infección y dos y cuatro días después de la infección, se recogieron frotis de hocico y garganta de cada hurón mientras los hurones estaban anestesiados con quetamina. Cuatro días después de la infección, los animales se pesaron y posteriormente se sacrificaron mediante exanguinación mientras estaban bajo anestesia con
65 quetamina y medetomidina. Se realizaron necropsias de acuerdo con procedimientos convencionales.

Serología

Se recogieron muestras de suero antes de la vacunación, el día de la segunda vacunación (día 20) y el día de la provocación (día 52). Los sueros se almacenaron a -20 °C hasta el uso. Se ensayaron los sueros para la presencia de anticuerpos anti-HA usando un ensayo de inhibición de hemaglutinación (ensayo HI) con eritrocitos de pavo al 1 % y para la presencia de anticuerpos neutralizantes de virus usando un microensayo de neutralización de virus (ensayo VN) tal como se ha descrito previamente (Frank et al., 1980 y Palmer et al., 1975). Los sueros se ensayaron para la presencia de anticuerpos reactivos con gripe A/NL/602/09 (nH1N1). Para este fin, se produjeron virus de genética inversa. Los valores cuantitativos obtenidos con estos virus fueron comparables con aquellos contra las cepas de tipo silvestre (no se muestran los datos). Suero de control positivo específico para gripe A/NL/602/09 (H1N1) se obtuvo de un hurón infectado con este virus (Munster et al., 2009). También se ensayaron sueros para la presencia de anticuerpos que inhiben neuraminidasa (NI) usando un ensayo basado en fetuina (Lambre et al., 1991). En resumen, placas Nunc MaxiSorp de 96 pocillos se revistieron durante una noche a 4 °C con 100 µl de 5 µg/ml de fetuina. Volúmenes de sesenta µl de muestras de suero diluidas sucesivamente se incubaron con un volumen igual de sobrenadante de cultivo celular S2 que contenía NA (diluido 40x en PBS-Ca/Mg [0,901 mM/0,493 mM], incubado durante 30 minutos a 37 °C y a continuación se añadieron 100 µl de la mezcla a las placas revestidas de fetuina. Después de una hora de incubación a 37 °C, las placas se lavaron y la actividad de neuraminidasa se midió posteriormente usando una aglutinina de cacahuete marcada con peroxidasa (Sigma, Zwijndrecht, Países Bajos) (2,5 µg/ml). Las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron, después de lo cual se añadieron 100 µl de sustrato de peroxidasa (TMB) a cada pocillo. Después de 5 minutos, la reacción se interrumpió mediante la adición de 100 µl de ácido fosfórico 0,3 M y los valores de DO se midieron a 450 nm usando un lector de ELISA (EL-808 [BioTEK]).

Valores cuantitativos de virus en pulmones y en frotis de garganta y hocico

Muestras de todos los lóbulos del pulmón derecho y del lóbulo accesorio de hurones infectados se recogieron y se ultracongelaron en hielo seco con etanol y se almacenaron a -70 °C hasta procesamiento adicional. Las muestras de pulmón se pesaron y posteriormente se homogeneizaron con un FastPrep-24 (MP Biomedicals, Eindhoven, Países Bajos) en solución salina equilibrada de Hank que contenía lactoalbúmina al 0,5 %, glicerol al 10 %, 200 U/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomycin, 100 U/ml de sulfato de polimixina B, 250 µg/ml de gentamicina, y 50 U/ml de nistatina (ICN Pharmaceuticals, Zoetermeer, Países Bajos) y se centrifugaron brevemente. Después de la recogida de frotis de hocico y garganta, los frotis se almacenaron a -70 °C en el mismo medio que se usó para homogeneizar muestras de pulmón. Diluciones sucesivas a 10 veces por cuadruplicado de muestras de garganta, hocico y pulmón se usaron para infectar células MDCK tal como se ha descrito previamente (Rimmelzwaan et al., 1998). La actividad de HA de los sobrenadantes de cultivo recogidos 5 días postinoculación se usó como indicador de infección. Los valores cuantitativos se calcularon de acuerdo con el método de Spearman-Kärber y se expresaron como log TCID₅₀ por gramo para tejido pulmonar o por ml para frotis (Karber, 1931).

Análisis estadístico

La significación entre grupos de animales se analizó mediante ANOVA y test de Tukey posterior a la ANOVA. Las diferencias se consideraron significativas a P<0,05.

Resultados

Respuestas de anticuerpo inducidas por inmunización con HA y NA solubles

Versiónes solubles multiméricas del ectodominio de HA (sHA; aminoácidos 7-522) y el dominio de cabeza de neuraminidasa (sNA; aminoácidos 75-469) del virus de la gripe pandémico 2009 A(H1N1), expresadas en células HEK293T de mamífero y purificadas a partir del sobrenadante celular (figura 5), se ensayaron para la capacidad de inducir protección contra provocación con virus homotípico. Los hurones se inmunizaron el día 0 y 20 con sHA y sNA (sHA+sNA), sHA adyuvado con Iscom Matrix M (IMM; sHA-IMM), sNA-IMM o sHA+sNA-IMM y antígenos inducidos contra las proteínas HA y NA mediante las inmunizaciones se midieron en los sueros recogidos el día de la provocación (día 52). Los animales vacunados con sHA-IMM presentaban elevados las medias geométricas de los valores cuantitativos (GMT) de inhibición de hemaglutinación (HI) contra el virus homólogo (figura 6A). Los valores cuantitativos de HI fueron significativamente más altos en animales inmunizados con sHA+sNA-IMM. Sin adyuvante (sHA+sNA) y en los dos grupos de control (IMM o PBS) ningún valor cuantitativo de HI fue medible. Además la valoración cuantitativa de la inhibición de neuraminidasa (NI) reveló la inducción dependiente de adyuvante de anticuerpos para NA (figura 6B). Sin embargo, en este caso no se observó ninguna mejora significativa de estos valores cuantitativos debido a la coadministración de HA. Coherente con los valores cuantitativos de HI observados, los valores cuantitativos de neutralización de virus (VN) se descubrieron en los animales vacunados tanto con sHA-IMM como con sHA+sNA-IMM (figura 6C). También es este caso, la coadministración de antígeno de sNA en los animales vacunados con sHA+sNA-IMM dio como resultado un incremento del valor cuantitativo de VN, que pasó de 1:202 a 1:468 en los grupos de sHA-IMM y sHA+sNA-IMM, respectivamente. Se detectaron valores cuantitativos de NI bajos en los sueros después de la primera inmunización (día 20; no se muestran los datos).

Protección contra signos clínicos después de la infección con virus de la gripe 2009 A(H1N1)

Los hurones vacunados se provocaron por vía intratraqueal con 10^6 TCID₅₀ de virus 2009 A(H1N1) 5 semanas después del refuerzo. No se observaron signos claros de enfermedad durante el periodo de inmunización o después de la inoculación de provocación con virus de la gripe 2009 A(H1N1). Sin embargo, la pérdida de peso corporal se volvió obvia después de la inoculación en los grupos de control de PBS e IMM así como en el grupo de vacuna sHA+sNA sin adyuvante (figura 7A). Curiosamente, también los animales inmunizados con antígeno de sHA-IMM mostraban pérdidas de peso similares mientras dichos efectos estuvieron ausentes después de la vacunación con las formulaciones que contienen sNA (grupos sNA-IMM y sHA+sNA-IMM). Los pesos pulmonares de los hurones determinados *post mortem* mostraban una tendencia correspondiente de animales vacunados con sNA con adyuvante que presentaban el menor incremento relacionado con la enfermedad debido a consolidación pulmonar (figura 7B).

Los cambios histopatológicos se ubicaron en lesiones multifocales a coalescentes con más del 50 % de los pulmones afectados en los hurones de control no protegidos inoculados con PBS o adyuvante solamente (IMM) (figura 7C). Las lesiones se caracterizaron mediante infiltrados linfocíticos periobronquiales inflamatorios marcados y ocasionalmente fluido proteico. Hubo necrosis en el epitelio bronquiolar dando como resultado restos celulares en la luz. Todos estos cambios histopatológicos estaban ubicados en lesiones multifocales a coalescentes con más del 50 % del pulmón afectado. Se observó una clara reducción de los cambios histopatológicos en animales vacunados con sNA adyuvada (grupo de sNA-IMM o sHA+sNA-IMM). Los hurones que se inmunizaron con sHA-IMM estuvieron parcialmente protegidos del desarrollo de patología que muestra ~20 % del área pulmonar que está siendo afectada.

Protección de vacuna contra replicación de virus

Para medir el efecto de vacunación con bajas dosis de 3,75 µg de HA trimérica y/o NA tetramérica sobre la gravedad de la infección inducida por la inoculación de provocación con virus de la gripe 2009 A(H1N1), los valores cuantitativos de virus se determinaron en pulmones, garganta y hocico el día 4 después de la inoculación. El virus se replicaba de forma eficiente en los pulmones de hurones de control (figura 8A; grupos de PBS e IMM) y en los animales inmunizados con la combinación no adyuvada de sHA y sNA (grupo de sHA+sNA-IMM), con valores cuantitativos virales medios de aproximadamente 10^7 - 10^8 . Estas cargas virales se redujeron significativamente (~5 unidades log₁₀) en los animales inmunizados con la proteína sHA con adyuvante (grupo de sHA-IMM) y en animales coinmunizados con proteína sHA y sNA con adyuvante (grupo de sHA+sNA-IMM). Las cargas virales medias se redujeron en aproximadamente 2 log₁₀ en animales inmunizados con antígeno de sNA adyuvado.

Se observaron cargas virales elevadas en el hocico en ambos animales de control (grupos de PBS e IMM) después de la inoculación con virus de la gripe 2009 A(H1N1). Las cargas virales en el hocico se redujeron considerablemente en los animales inmunizados con sHA o sNA con adyuvante o la combinación sHA+sNA sin adyuvante. Los animales inmunizados con la combinación de antígenos de sHA y sNA con adyuvante presentaban la reducción más elevada y significativa de valores cuantitativos virales en el hocico (figura 8B). Diferencias en cargas virales de garganta de los grupos vacunados en comparación con grupos de control no fueron significativas con la excepción de los animales vacunados con la combinación de sHA y sNA adyuvada. Estos hurones no presentaban valores cuantitativos virales detectables en la garganta.

Respuestas de anticuerpos de neutralización cruzada inducidas por inmunización con HA y NA solubles

Los sueros de hurones recogidos antes de la provocación con virus se ensayaron para anticuerpos de neutralización cruzada usando ensayos de HI y NI contra otras cepas de gripe H1N1 diferentes. Anticuerpos de neutralización cruzada que inhibían la hemaglutinación contra virus de la gripe A/NL/386/86, A/NL/25/80 y A/NewJersey/8/76 H1N1 estaban presentes en los sueros de animales inmunizados con sHA-IMM y sHA+sNA-IMM (figura 9A). La inclusión de sNA en la vacuna que contenía sHA dio como resultado un incremento uniforme de la actividad de inhibición de la hemaglutinación hacia cepas heterotípicas, similar al visto para la cepa homóloga. El nivel relativo de anticuerpos para HI cruzados por animal correspondía al de anticuerpos para HI contra la HA homóloga. No se detectó actividad de neutralización cruzada en suero para virus H1N1 de la gripe A/Swine/shope/1/56, A/Italy/1443/76, A/Iowa/15/30, A/PR/8/34 y IVR/148. La actividad de inhibición de neuraminidasa contra la sNA de virus de la gripe A/Kentucky/UR06-0258/2007(H1N1) humano y A/turkey/Turkey/1/2005(H5N1) aviar se descubrió en los sueros agrupados de animales inmunizados con sNA-IMM y sHA+sNA-IMM (figura 9B).

Ejemplo 3**Materiales y métodos**Células y virus

Células de músculo de codorniz (QM5) (Antin & Ordahl, 1991) se cultivaron en medio completo QT35 (Life Technology) y células VERO (ATCC CCL-81) se cultivaron en Medio Eagle modificado por Dulbecco (Invitrogen). Los medios se suplementaron con suero fetal bovino al 5 % y anticuerpos. Virus de la viruela aviar recombinante fpEFLT7 (Britton et al., 1996; designado en el presente documento FPV-T7), que proporciona expresión estable de ARN polimerasa de bacteriófago T7 en células tanto aviares como de mamífero, se propagó en células hepáticas

embrionarias de gallina primarias. El virus de la gripe A/Vietnam/1194/04 H5N1 (suministrado amablemente por el Dr. Alan Hay del *WHO Influenza Centre* en el *National Institute for Medical Research*, Londres) se propagó en huevos de gallina libres de patógeno específico (SPF) embrionados de 9 días para producir una estirpe de virus.

5 Construcción de ADNc de virus de enfermedad de (NDV) de longitud completa

ADNc de longitud completa de cepa Herts de NDV, pFL-Herts (de Leeuw et al. 2005), con los sitios de restricción únicos *Ascl* y *Fsel* flanqueando el gen F, se usó como la cadena principal para la inserción del gen H5 HA entre los genes P y M. Con este fin, los sitios de restricción únicos *XbaI* y *PmeI* se crearon en la región intergénica P-M mediante mutagénesis dirigida. Posteriormente, un enlazador sintético: GCTCTAGA
10 TAAGAAAAAATACGGGTAGAA GTTTAAACGGCGCGCCGG (SEC ID N.º: 10), que codifica las secuencias de una caja de terminación-inicio de NDV (negrita) se insertó entre el sitio de *XbaI* y *PmeI* (subrayado) de la construcción de longitud completa.

15 Para modificar el sitio de escisión polibásico de la proteína F0 en el motivo monobásico (GRQGR↓L; creando FΔPBC), el gen F de Herts se amplificó a partir de pFL-Herts^{AF} usando los pares de cebadores pAscl(Herts) (5' TTGGCGCGCCCCAGGTGCAAGATGGGC 3'; SEC ID N.º: 11) junto con N043 (5' TTTACTAGTTTACGAAAAGTATTGGATTGTGCCCC 3'; SEC ID N.º: 12), y N044 (5' GGAGGGAGACAGGGACGCCTTAGGTGCCATTATCG 3'; SEC ID N.º: 13) junto con pFsel(Herts) (5' CCCGATTGAGGGCCGGCCTCCCC 3' SEC ID N.º: 14). Para fusionar ambos fragmentos de PCR, se realizó una
20 segunda PCR usando los cebadores pAscl(Herts) y pFsel(Herts). El producto de PCR resultante se restringió con *Ascl* y *Fsel* y se insertó entre el sitio *Ascl* y el *Fsel* de pFL-Herts creando pFL-HertsΔPBC.

Se extrajo ARN viral de virus H5N1 A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG14) usando un kit High Pure Viral RNA kit (Roche).
25 A partir del ARN viral extraído, se generó ADNc usando Superscript II (Invitrogen) y el cebador CAI085 (5' AGCAAAAGCAGG 3'; SEC ID N.º: 15) emparejando la región no codificante de cada segmento. Posteriormente, el gen de HA se amplificó por PCR usando el cebador pMT036 (AGCTTTGTTTAAAC A
ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTTTGC; SEC ID N.º: 16; sitio *PmeI* subrayado) y pMT038
(CCGGCGCGCCGTTTAAAC TTAATGCAAATTCTGCATTGTAAC; SEC ID N.º: 17; sitio *PmeI* subrayado). El ADNc
30 de HA se subclonó en el plásmido pGEM-Teasy (Promega). Este vector se digirió con *PmeI* y el gen HA se clonó en pFL-HertsΔPBC generando pFL-HertsAPBC-H5.

Para crear pFL-HertsΔPBC-H5³, se usó el vector de expresión pCD5-sH5³ (Cornelissen et al. 2010). En este vector, la secuencia H5 estaba precedida por una secuencia que codifica un péptido señal y seguida por secuencias que
35 codifican el Motivo de trimerización de cremallera de isoleucina GCN4 (Harbury et al. 1993) y la Strep-tag II. El vector se digirió con *PmeI* y el inserto liberado se ligó con el pFL-HertsΔPBC digerido con *PmeI*. El vector pCD5 había sido generado de modo que un sitio de restricción de *PmeI* estaba presente cadena arriba de la secuencia del péptido señal y cadena abajo de la Strep-tag, y el tamaño del genoma seguía cumpliendo "la regla del seis" (de Leeuw et al. 1999) después de la inserción del digesto con *PmeI*.

40 Todos los plásmidos se generaron de acuerdo con procedimientos convencionales (Sambrook et al., 1989). El análisis de secuencia de regiones modificadas en todas las construcciones generadas mediante PCR se realizó para verificar que no se habían introducido cambios involuntarios.

45 Recuperación de NDV recombinante

Se generó NDV recombinante mediante genética inversa usando el sistema de ARN polimerasa FPV-T7 tal como se ha descrito (Peeters et al., 1999). En resumen, células VERO cultivadas hasta subconfluencia en placas de 6 pocillos se infectaron con FPV-T7 y se transfectaron con la construcción de longitud completa y los plásmidos
50 ayudantes que expresan NP, P y L. El sobrenadante se recogió después de 6 días de incubación a 37 °C, se clarificó mediante centrifugación a baja velocidad y se filtró a través de un filtro de 0,2 μm. El filtrado se usó para infectar cultivos de células VERO frescos. Después de incubación durante 3 días en medio que contenía alantoideo al 5 %, el sobrenadante se recogió y se inoculó (0,2 ml) en la cavidad alantoidea de huevos de gallina SPF embrionados de 9 a 11 días para amplificar el virus. Después de 3 días, se recogió el alantoideo, se clarificó y se
55 dividió en alícuotas. El virus recuperado de pFL-Herts ΔPBC-H5³ se designó rNDV-H5³ y el virus recuperado de pFL-Herts ΔPBC-H5 se designó rNDV-HA. Los valores cuantitativos de virus (TCID₅₀ ml⁻¹) de las fracciones recogidas se determinaron en células QM5 mediante el método de dilución de punto final y se calcularon de acuerdo con Reed y Münch (Reed y Munch, 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg 27: 493-497).

60 Inmunotinción intracelular

La expresión de la proteína HA mediante NDV recombinante en células QM5 se analizó mediante inmunotinción intracelular tal como se ha descrito (Wensvoort et al., 1986). Para esto, las células se permeabilizaron, se fijaron con paraformaldehído al 3 % y se incubaron con anticuerpo monoclonal (mAb) 15A6 anti-H5 (1:1000; Santa Cruz). El
65 mAb anti-F 8E12A8C3 (1:5000; CVI, Lelystad) se usó para la detección de proteína F de NDV. Un conjugado HRPO

de conejo anti ratón (1:2000; IBA Alemania) se usó como anticuerpo secundario. Las monocapas de células infectadas de forma simulada servían como controles negativos.

Producción y purificación de sH5³

Células QM5 cultivadas al 90 % de confluencia en matraces T75 se infectaron con rNDV-sH5³ a una MOI de 3. Después de 72 h de incubación a 37 °C, el sobrenadante se recogió (10 ml) y se clarificó mediante centrifugado a baja velocidad (10 min a 2500 rpm). El pH de la fracción recogida se ajustó a 7,8 y se añadió avidina hasta una concentración final de 3 µg/ml. Después de 4 h, proteína sH5³ recombinante se purificó usando perlas de Strep-tactin Sepharose según lo descrito por el fabricante (IBA, Alemania). El producto de purificación (15 µl) se sometió a electroforesis SDS-PAGE (Bis-Tris al 12 %) usando tampón de corrida MOPS (Invitrogen) y las proteínas se tiñeron con reactivo de tinción Azul (Thermo Scientific). La concentración de proteína sH5³ se determinó con un espectrofotómetro de nano-gotas y también se estimó en gel usando una serie de albúmina de suero bovino (BSA) de cantidades conocidas como referencia.

Índice de patogenicidad intracerebral

El ensayo de patogenicidad en gallina de la Office International des Epizooties (OIE) estandarizado se llevó a cabo en condiciones de BSL3 y después de la aprobación por el Comité de ética animal. A diez gallinas SPF de un día de edad se les inoculó por vía intracerebral 0,1 ml de una dilución 1/10 del virus NDV-HertsAPBC cultivado en huevo y se observaron en signos clínicos cada día durante un periodo de 10 días. Las aves recibieron una puntuación de 0 si parecían normales, 1 si estaban enfermas, 2 en caso de dolencia grave y 3 se habían muerto. El índice de patogenicidad intracerebral (ICPI) se calculó como la puntuación media por ave por observación, tal como se describe en la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea 92/66/CEE (1992). Un índice de 3,0 significa que todas las aves murieron en el plazo de 24 horas.

Vacunación de gallinas y provocación con virus homólogo

El estudio animal se llevó a cabo en condiciones BSL3 y después de la aprobación por el Comité de ética animal. Gallinas SPF White Leghorn (Charles River Laboratories, Alemania), de 6 semanas de edad, se usaron en este estudio. Diez gallinas por grupo se vacunaron mediante la vía intramuscular (i.m.; 0,5 ml) con 10⁷ TCID₅₀ de virus de vacuna.

Además, un grupo de 10 gallinas se vacunó i.m. con 5 µg de proteína sH5³(NDV) recombinante adyuvada con Stimune (Prionics, Lelystad). Otro grupo de 10 gallinas recibió un volumen igual de PBS en Stimune (i.m.) para servir como control vacunado de forma simulada. Tres semanas después de la vacunación, todas las aves se provocaron mediante inoculación intranasal (0,1 ml) e intratraqueal (0,1 ml) de en total 10⁵ TCID₅₀ de virus H5N1 A/Vietnam/1194/04. Las gallinas se monitorizaron durante los siguientes 10 días para signos de enfermedad y mortalidad. Recibieron una puntuación de 0 si parecían normales, 1 si estaban enfermas, 2 en caso de dolencia grave y 3 si fueron sacrificadas o murieron, fueron inspeccionadas dos veces al día mientras se puntuó dolencia grave. Las aves que eran reticentes a moverse en respuesta a la manipulación o fueron incapaces de alcanzar el alimento y el cubo de agua fueron sacrificadas. El índice clínico se calculó tal como se ha descrito anteriormente para el ICPI. Se recogieron muestras de sangre a las 3 semanas después de la inmunización.

Detección de anticuerpos para HI

Sueros inmunes inactivados con calor preparados a partir de muestras de sangre de gallina se diluyeron sucesivamente en medio de cultivo celular en etapas de dos veces. Las muestras se ensayaron para actividad de inhibición de hemaglutinación (HI) usando glóbulos rojos de gallina al 1 % y 4 unidades hemaglutinantes (HAU) de H5N1 A/Vietnam/1194/04. Para la determinación de anticuerpos para HI específicos de NDV, se usaron 8 HAU de virus Herts/33. La formación de un botón rojo se puntuó como indicio de hemaglutinación. Los valores cuantitativos de anticuerpos se expresaron como la recíproca de la dilución en suero más elevada que muestra HI.

Resultados

Virulencia del virus HertsΔPBC

El sitio de escisión de la proteína F0 es el determinante principal de virulencia de NDV (de Leeuw et al, 2005). En cepas de NDV velógenas, tales como Herts/33, el sitio de escisión normalmente tiene un motivo de aminoácidos polibásicos, que puede ser escindido por proteasas intracelulares que permiten que el virus crezca en múltiples órganos. Para generar virus atenuados, el sitio de escisión polibásico (PBC) del gen F0 de pFL-Herts se modificó a un motivo de escisión monobásico. Para confirmar la naturaleza atenuada del virus recuperado de esta construcción, su patogenicidad se ensayó in vivo. Con este fin, diez gallinas recibieron 0,1 ml de virus mediante inyección intracerebral. El cálculo de las puntuaciones clínicas después de 10 días de observación reveló un ICPI de 0,04, demostrando que la modificación del PBC había convertido, de hecho, los virus a un patotipo lentógeno.

Propagación de rNDV-sH5³ y expresión de proteína sH5³

El virus rNDV-sH5³ pudo recuperarse fácilmente tras la transfección de pFL-HertsΔPBC-H5³ en células VERO y cultivarse a valores cuantitativos elevados en huevos de gallina embrionados y en la línea celular QM5. El alantoideo de huevos infectados produjo un valor cuantitativo de 8,5 y el sobrenadante de células QM5, un valor cuantitativo de 7,5 log TCID₅₀ ml⁻¹. El virus de vacuna rNDV-HA cultivado en huevos tenía un valor cuantitativo de 7,5 log TCID₅₀ ml⁻¹.

Para confirmar la expresión de HA, células QM5 cultivadas en placas de 6 pocillos se infectaron con virus de vacuna rNDV-sH5³ cultivados en huevos o se infectaron de forma simulada. Como controles para la expresión de proteínas, las células se infectaron con *wt* NDV (Herts) o rNDV-HA. A los 2 días p.i. (postinfección), las monocapas se sometieron a inmunotinción usando mAbs específicos de F y HA. Tal como se muestra en la figura 11B, la monocapa teñida positiva para proteína F después de la infección con virus recombinante *wt* NDV o NDV quimérico, pero no después de la infección simulada (figura 11B). Las monocapas de células infectadas con NDV-H5 y NDV-sH5³, pero no con *wt* NDV, teñían positivas para HA. Estos resultados demuestran que la proteína HA fue expresada por NDV-sH5³. La infección con NDV-sH5³ dio un patrón de tinción claro pero menos intenso y más difuso en comparación con el observado en células infectadas por NDV-HA, presumiblemente debido a que la proteína sH5³ no se acumula en las células sino que es secretada.

Producción y purificación de proteína sH5³ expresada en NDV

La proteína sH5³ se purificó a partir del sobrenadante de células QM5 infectadas con NDV-sH5³ usando perlas de Strep-Tactin. El producto de purificación se analizó mediante SDS-PAGE seguido por tinción Azul. Tal como muestra la figura 11C, la sH5³(NDV) aparecía como una banda de ~70 kDa, que migraba algo más lenta que la proteína sH5³ producida por HEK 293S. Basándose en una serie de cantidades conocidas de BSA que se hicieron correr en el mismo gel, el rendimiento de proteína sH5³ purificada se estimó en 0,6-0,7 mg por 100 ml. La naturaleza trimérica del oligómero H5 se confirmó usando electroforesis en gel Blue-native (figura 11D).

Vacuna de gallinas con NDV-sH5³ o proteína sH5³

Para examinar la capacidad inmunógena de sH5³ (NDV) y el potencia del NDV-sH5³ como una vacuna viva, diez gallinas se vacunaron por vía intramuscular (i.m.). Para examinar la eficacia protectora de la proteína sH5³ producida en células QM5 infectadas por NDV-sH5³, un grupo de diez gallinas se vacunó i.m. con proteína adyuvada con Stimune. Otras 10 aves se vacunaron de forma simulada para servir como controles de provocación. Tres semanas después de la vacunación, todas las gallinas se estimularon con una dosis letal del virus H5N1 homólogo. Tal como se esperaba tomando como base el ICPI, ninguna de las gallinas mostraba signos clínicos tras la vacunación.

El porcentaje de gallinas que sobreviven a la infección y las puntuaciones clínicas por grupo observadas después de la provocación se muestran en la figura. 12A. La inmunización intramuscular con NDV-sH5³ o proteína sH5³ otorgaba protección completa. Todas las gallinas vacunadas sobrevivieron y ninguna mostró síntomas indicativos de enfermedad relacionada con la gripe, mientras que todas las gallinas vacunadas de forma simulada fallecieron en el plazo de 2 días.

Se recogieron muestras de sangre 3 semanas después de la inmunización y se ensayaron para la presencia de anticuerpos para HI dirigidos contra NDV y virus de la gripe. El ensayo de HI reveló que la vacunación i.m. era capaz de generar una respuesta inmunitaria. Los valores cuantitativos de anticuerpos para HI detectados después de la vacunación i.m. con NDV-sH5³ o proteína sH5³ alcanzaban niveles entre 12 y 256 (figura 13A), comparables a los detectados en gallinas vacunadas con NDV-HA, que eran aparentemente suficientes para proteger a todos los animales contra la infección letal. No eran detectables anticuerpos para HI en gallinas vacunadas de forma simulada.

Todas las gallinas que se vacunaron con rNDV-H5³ mostraban una respuesta inmunitaria a NDV, mientras que las gallinas que recibieron una inyección i.m. de sH5³ desarrollaron solamente valores cuantitativos de anticuerpos para HI de gripe, como se esperaba. Los valores cuantitativos de anticuerpo para HI de NDV de los grupos vacunados con NDV-sH5³ alcanzaron el mismo nivel que los valores cuantitativos de los grupos vacunados con NDV-HA (figura 13B). Esto sugiere que NDV-HA y NDV-sH5³ se replicaban igualmente bien en las gallinas. La protección otorgada contra NDV no ha sido evaluada, pero los valores cuantitativos para HI de NDV son suficientemente elevados para suponer que la vacunación también proporciona protección contra NDV.

Referencias

- Antin, P. B. y Ordahl, C. P. (1991). Isolation and characterization of an avian myogenic cell line. *Dev Biol* 143, 111-121.
- Britton, P., Green, P., Kottier, S., Mawditt, K. L., Penzes, Z., Cavanagh, D. & Skinner, M. A. (1996). Expression of bacteriophage T7 RNA polymerase in avian and mammalian cells by a recombinant fowlpox virus. *J Gen Virol* 77, 963-970.
- Bukreyev, A., Skiadopoulos, M. H., Murphy, B. R. & Collins, P. L. (2006). Nonsegmented negative-strand viruses

as vaccine vectors. *J Virol* 80, 10293-10306.

Chen J, Deng YM. Influenza virus antigenic variation, host antibody production and new approach to control epidemics. *Virol J.* 13 de marzo de 2009; 6: 30.

Colman PM. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors. *Protein Sci.* 1994; 3(10): 1687-96.

Cornelissen, L. A. H. M., de Vries, R. P., de Boer-Luijtz, E. A., Rigter, A., Rottier, P. J. M. y de Haan, C. A. M. (2010). A Single Immunization with Soluble Recombinant Trimeric Hemagglutinin Protects Chickens against Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1. *PLoS ONE* 5, e10645. doi: 10.1371.

De Leeuw O, Peeters B. (1999) Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J Gen Virol.* 80 (Pt 1): 131-6.

De Leeuw, O. S., Koch, G., Hartog, L., Ravenshorst, N. & Peeters, B. P. H. (2005). Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the hemagglutinin-neuraminidase protein. *J Gen Virol* 86, 1759-1769.

DiNapoli, J. M., Kotelkin, A., Yang, L., Elankumaran, S., Murphy, B. R., Samal, S. K., Collins, P. L. y Bukreyev, A. (2007). Newcastle disease virus, a host range-restricted virus, as a vaccine vector for intranasal immunization against emerging pathogens. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 104, 9788-9793.

Ducatez MF, Webster RG, Webby RJ. Animal influenza epidemiology. *Vaccine.* 12 de septiembre de 2008; 26 Supl 4: D67-9.

Ekiert DC, Bhabha G, Elsliger MA, Friesen RH, Jongeneelen M, Throsby M, Goudsmit J, Wilson IA. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science.* 2009; 324(5924): 246-51.

Frank, A. L., J. Puck, B. J. Hughes, and T. R. Cate. 1980. Microneutralization test for influenza A and B and parainfluenza 1 and 2 viruses that uses continuous cell lines and fresh serum enhancement. *J Clin Microbiol* 12: 426-32.

Gocnik M, Fislová T, Mucha V, Sládková T, Russ G, Kostolansky F, Varecková E. Antibodies induced by the HA2 glycopolyptide of influenza virus haemagglutinin improve recovery from influenza A virus infection. *J Gen Virol.* Abril de 2008; 89(Pt 4): 958-67.

Harbury, P. B., T. Zhang, P. S. Kim, y T. Alber. 1993. A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science* 262: 1401-7.

Karber, G. 1931. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche *Exp. Pathol. Pharmakol.* 162: 480-483.

Khanna M, Kumar P, Choudhary K, Kumar B, Vijayan VK. Emerging influenza virus: a global threat. *J Biosci.* Noviembre de 2008; 33(4): 475-82.

Kong WP, Hood C, Yang ZY, Wei CJ, Xu L, Garcia-Sastre A, Tumpey TM, Nabel GJ. Protective immunity to lethal challenge of the 1918 pandemic influenza virus by vaccination. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 24 de octubre de 2006; 103(43): 15987-91.

Lambre, C. R., H. Terzidis, A. Greffard, y R. G. Webster. 1991. An enzyme-linked lectin assay for sialidase. *Clin Chim Acta* 198: 183-93.

Li, W., M. J. Moore, N. Vasilieva, J. Sui, S. K. Wong, M. A. Berne, M. Somasundaran, J. L. Sullivan, K. Luzuriaga, T. C. Greenough, H. Choe, y M. Farzan. 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426: 450-4.

Lipatov AS, Govorkova EA, Webby RJ, Ozaki H, Peiris M, Guan Y, Poon L, Webster RG. Influenza: emergence and control. *J Virol.* Septiembre de 2004; 78(17): 8951-9.

Munster, V. J., E. de Wit, J. M. van den Brand, S. Herfst, E. J. Schrauwen, T. M. Bestebroer, D. van de Vijver, C. A. Boucher, M. Koopmans, G. F. Rimmelzwaan, T. Kuiken, A. D. Osterhaus, y R. A. Fouchier. 2009. Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus in ferrets. *Science* 325: 481-3.

Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* 1991; 108(2): 193-9.

Palmer D, D. W., Coleman M, Schild G. 1975. Haemagglutination inhibition test. , Atlanta: US Department of Health, Education and Welfare.

Pancera M, Lebowitz J, Schon A, Zhu P, Freire E, Kwong PD, Roux KH, Sodroski J, Wyatt R. Soluble mimetics of human immunodeficiency virus type 1 viral spikes produced by replacement of the native trimerization domain with a heterologous trimerization motif: characterization and ligand binding analysis. *J Virol.* Agosto de 2005; 79(15): 9954-69.

Peeters, B. P. H., de Leeuw, O. S., Koch, G. y Gielkens, A. L. (1999). Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J Virol* 73, 5001-5009.

Pouyani T, Seed B. PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell.* 1995; 83(2): 333-43.

Reeves PJ, Hwa J, Khorana HG. Structure and function in rhodopsin: kinetic studies of retinal binding to purified opsin mutants in defined phospholipid-detergent mixtures serve as probes of the retinal binding pocket. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 2 de marzo de 1999; 96(5):1927-31.

Rimmelzwaan, G. F., M. Baars, E. C. Claas, y A. D. Osterhaus. 1998. Comparison of RNA hybridization, hemagglutination assay, titration of infectious virus and immunofluorescence as methods for monitoring influenza virus replication in vitro. *J Virol Methods* 74: 57-66.

Saelens X, Vanlandschoot P, Martinet W, Maras M, Neirynck S, Contreras R, Fiers W, Jou WM. Protection of mice against a lethal influenza virus challenge after immunization with yeast-derived secreted influenza virus

- hemagglutinin. *Eur J Biochem.* Febrero de 1999; 260(1): 166-75.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- 5 Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem.* 2000; 69: 531-69.
- Song L, Nakaar V, Kavita U, Price A, Huleatt J, Tang J, Jacobs A, Liu G, Huang Y, Desai P, Maksymiuk G, Takahashi V, Umlauf S, Reiserova L, Bell R, Li H, Zhang Y, McDonald WF, Powell TJ, Tussey L. Efficacious recombinant influenza vaccines produced by high yield bacterial expression: a solution to global pandemic and seasonal needs. *PLoS One.* 21 de mayo de 2008; 3(5): e2257.
- 10 Song L, Zhang Y, Yun NE, Poussard AL, Smith JN, Smith JK, Borisevich V, Linde JJ, Zacks MA, Li H, Kavita U, Reiserova L, Liu X, Dumuren K, Balasubramanian B, Weaver B, Parent J, Umlauf S, Liu G, Huleatt J, Tussey L, Paessler S. Superior efficacy of a recombinant flagellin:H5N1 HA globular head vaccine is determined by the placement of the globular head within flagellin. *Vaccine.* 25 de septiembre de 2009; 27(42): 5875-84.
- 15 Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC, Wilson IA. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science.* 2006; 312(5772): 404-10
- Wei CJ, Xu L, Kong WP, Shi W, Canis K, Stevens J, Yang ZY, Dell A, Haslam SM, Wilson IA, Nabel GJ. Comparative efficacy of neutralizing antibodies elicited by recombinant hemagglutinin proteins from avian H5N1 influenza virus. *J Virol.* Julio de 2008; 82(13): 6200-8.
- 20 Wensvoort, G., Terpstra, C., Boonstra, J., Bloemraad, M. y Van Zaane, D. (1986). Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Vet Microbiol* 12, 101-108.
- Zeng Q, Langereis MA, van Vliet AL, Huizinga EG, de Groot RJ. Structure of coronavirus hemagglutinin-esterase offers insight into corona and influenza virus evolution. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 1 de julio de 2008; 105(26): 9065-9.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende al menos un ectodominio multimérico recombinante de una proteína del virus de la gripe o parte del mismo, que tiene una actividad inmunogénica similar, fusionado a un
5 marcador de afinidad por estreptavidina, y un diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que dicho ectodominio multimérico recombinante de una proteína del virus de la gripe o parte del mismo se selecciona entre el grupo que consiste en un ectodominio de hemaglutinina de la gripe trimérico recombinante o parte del mismo y un ectodominio de neuraminidasa de la gripe tetramérico recombinante o parte del mismo.
- 10 2. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, mediante la cual la trimerización del ectodominio de hemaglutinina de la gripe recombinante o parte del mismo que tiene una actividad inmunogénica similar, se proporciona mediante un dominio de trimerización basado en GCN4.
- 15 3. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, mediante la cual la tetramerización del ectodominio de neuraminidasa de la gripe recombinante o parte del mismo que tiene una actividad inmunogénica similar, se proporciona mediante un dominio de tetramerización basado en GCN4.
4. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende
20 además un vehículo y/o un adyuvante.
5. Un vector que comprende una casete de expresión, que comprende:
a) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia señal;
b) una secuencia de ácido nucleico que codifica un ectodominio recombinante de una proteína del virus de la
25 gripe o parte del mismo;
c) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de trimerización o de tetramerización, y;
d) una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de afinidad por estreptavidina.
6. Una composición inmunogénica que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 5 y un diluyente
30 farmacéuticamente aceptable.
7. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicho vector es un vector viral, tal como un vector derivado del virus de la enfermedad de Newcastle.
- 35 8. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 6 y 7, para uso como vacuna.
9. Uso del vector de acuerdo con la reivindicación 5, para la preparación de una composición inmunogénica para desencadenar una respuesta inmunitaria contra un virus de la gripe.
40
10. Un método para la preparación de una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 6 y 7, que comprende:
a) proporcionar el vector de acuerdo con la reivindicación 5;
45 b) transformar una célula huésped con dicho vector de expresión;
c) cultivar dicha célula huésped en un medio de cultivo, permitiendo de este modo la expresión del ectodominio multimérico recombinante de una proteína del virus de la gripe o parte del mismo que tiene una actividad inmunogénica similar, fusionado a un marcador de afinidad por estreptavidina;
50 d) aislar dicho ectodominio multimérico recombinante de una proteína del virus de la gripe o parte del mismo que tiene una actividad inmunogénica similar, fusionado a un marcador de afinidad por estreptavidina, preparando de este modo una composición inmunogénica.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho ectodominio multimérico recombinante de una
55 proteína del virus de la gripe o parte del mismo que tiene una actividad inmunogénica similar, fusionado a un marcador de afinidad por estreptavidina, se aísla usando dicho marcador de afinidad por estreptavidina.
12. Uso de una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 6 y 7, para la preparación de un agente profiláctico para desencadenar una respuesta inmunitaria contra un virus de la gripe.

Figura 1

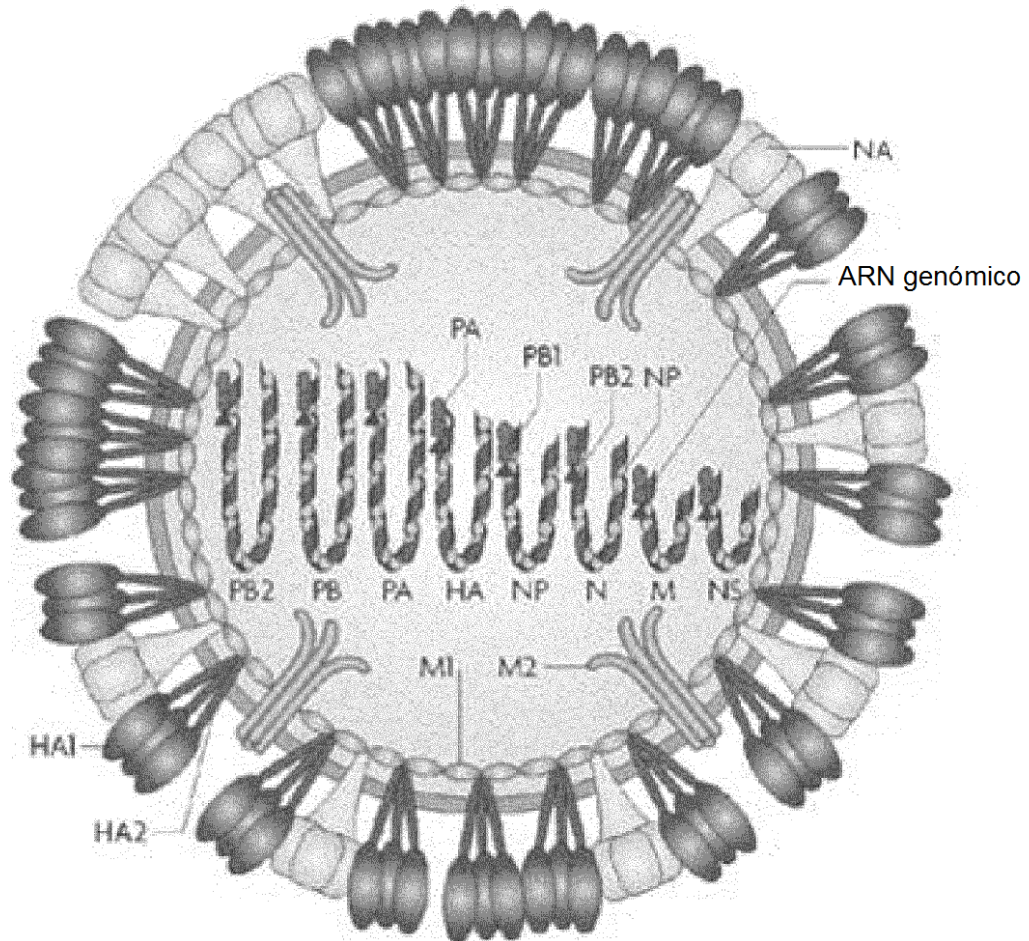


Figura 2

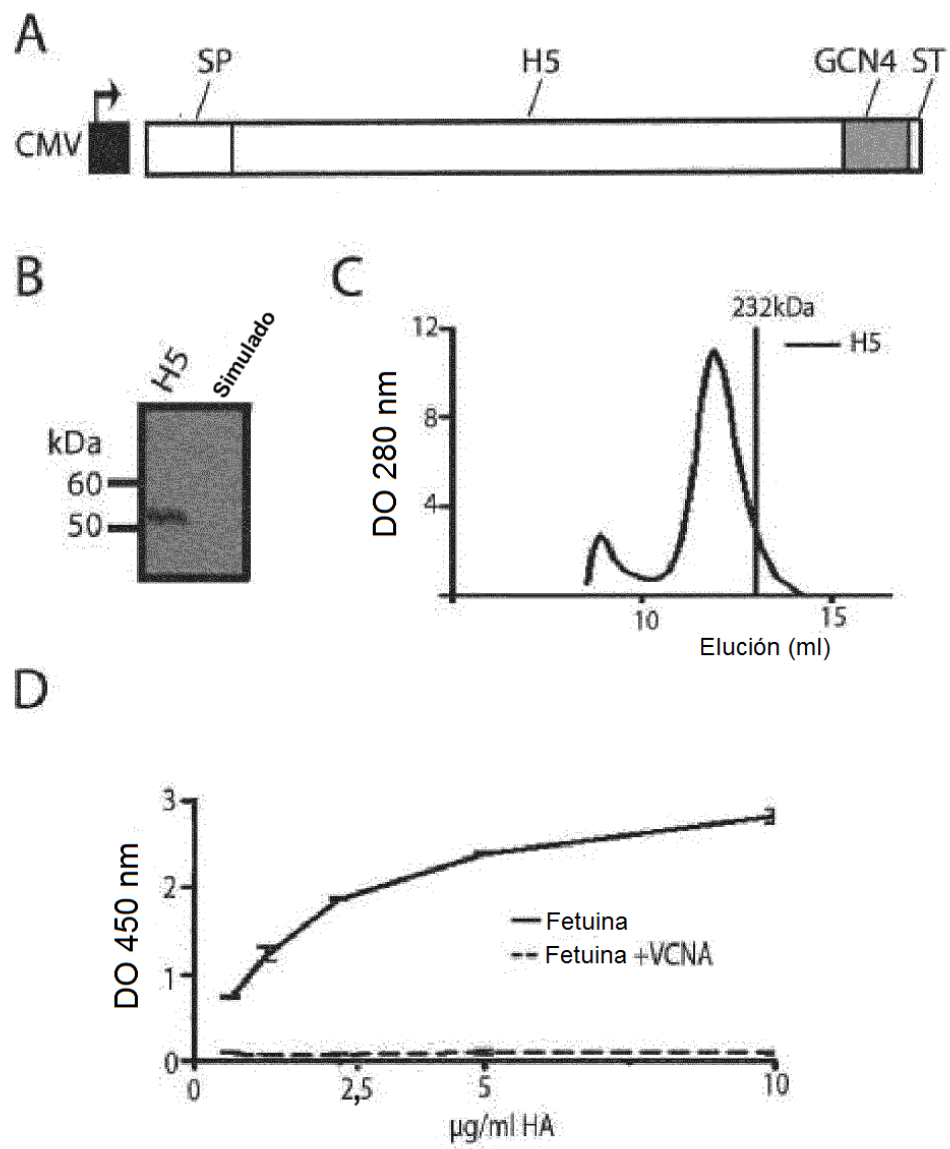


Figura 3

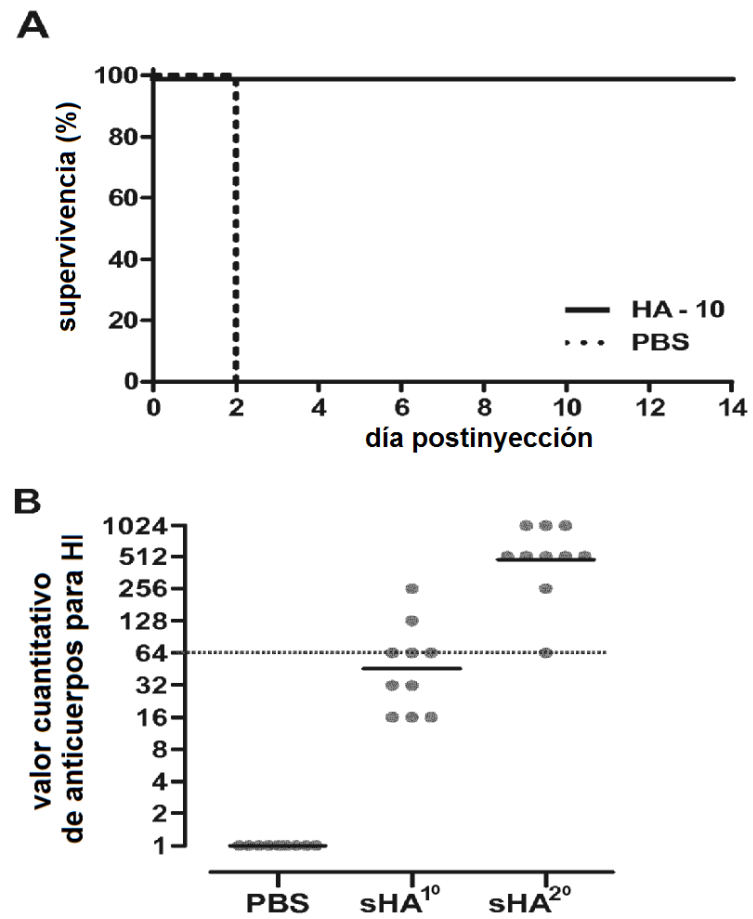


Figura 4

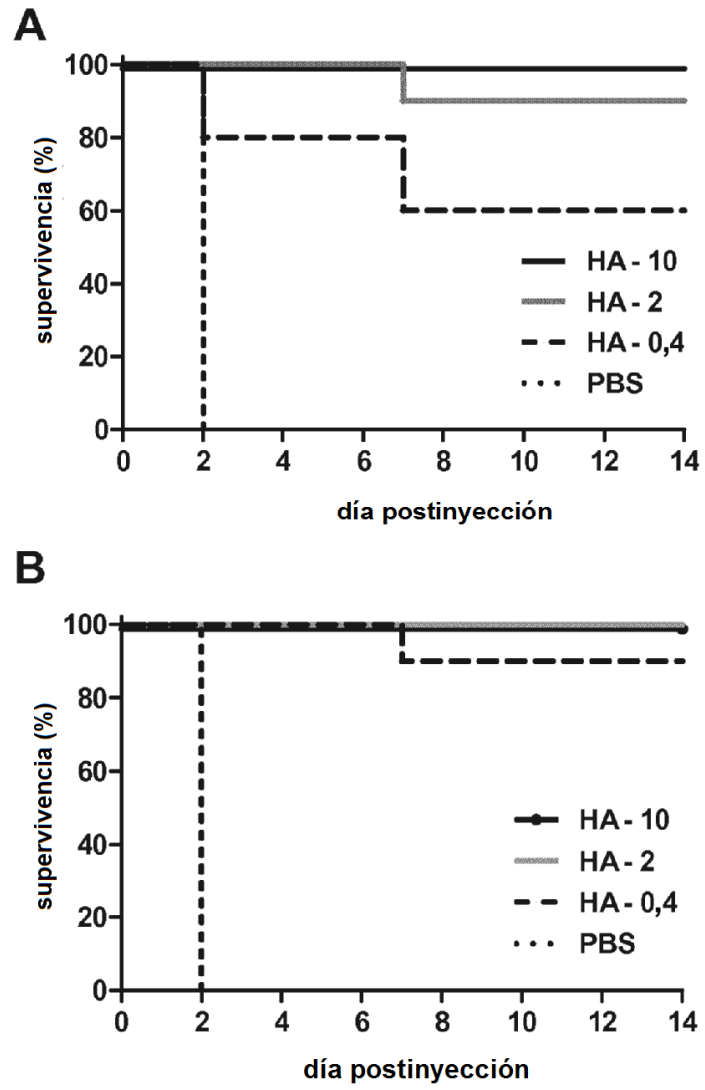
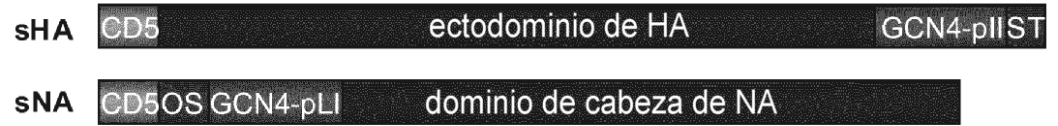
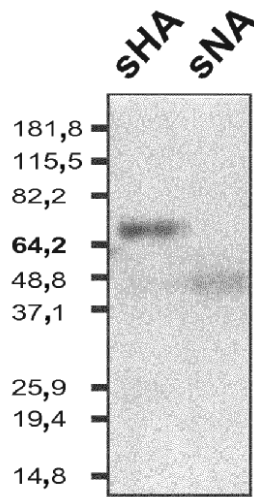


Figura 5

A



B



C

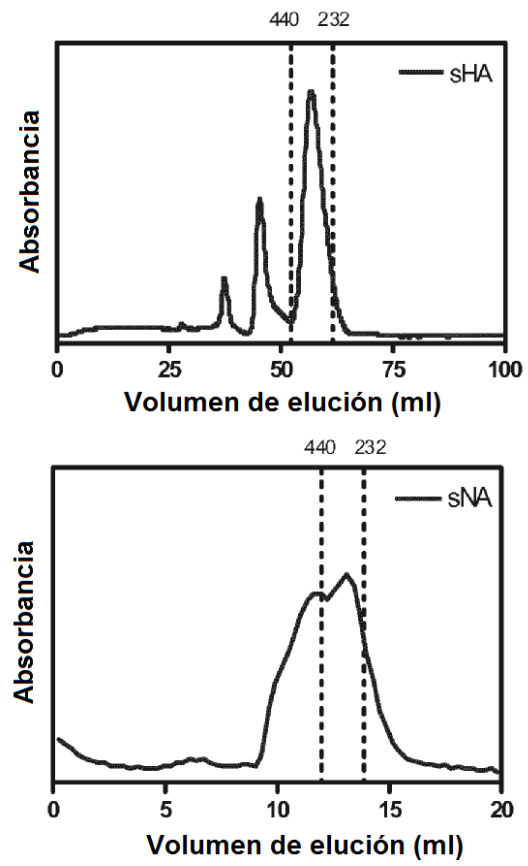
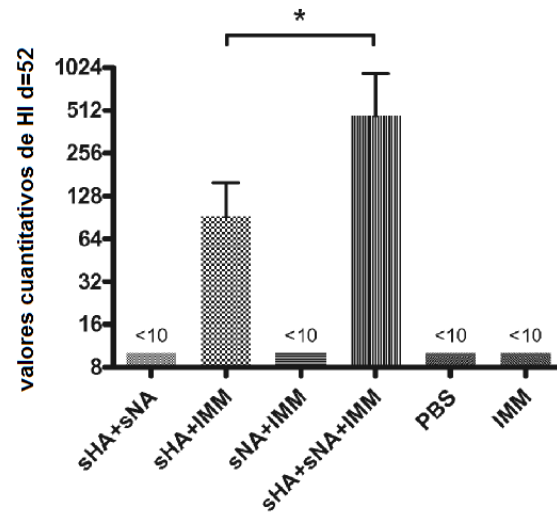
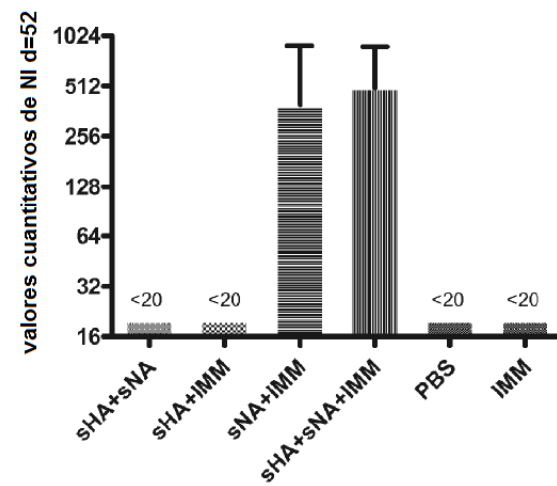


Figura 6

A.



B.



C.

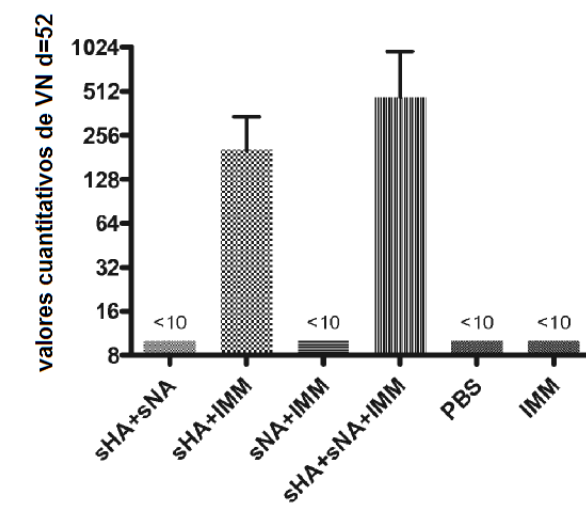


Figura 7

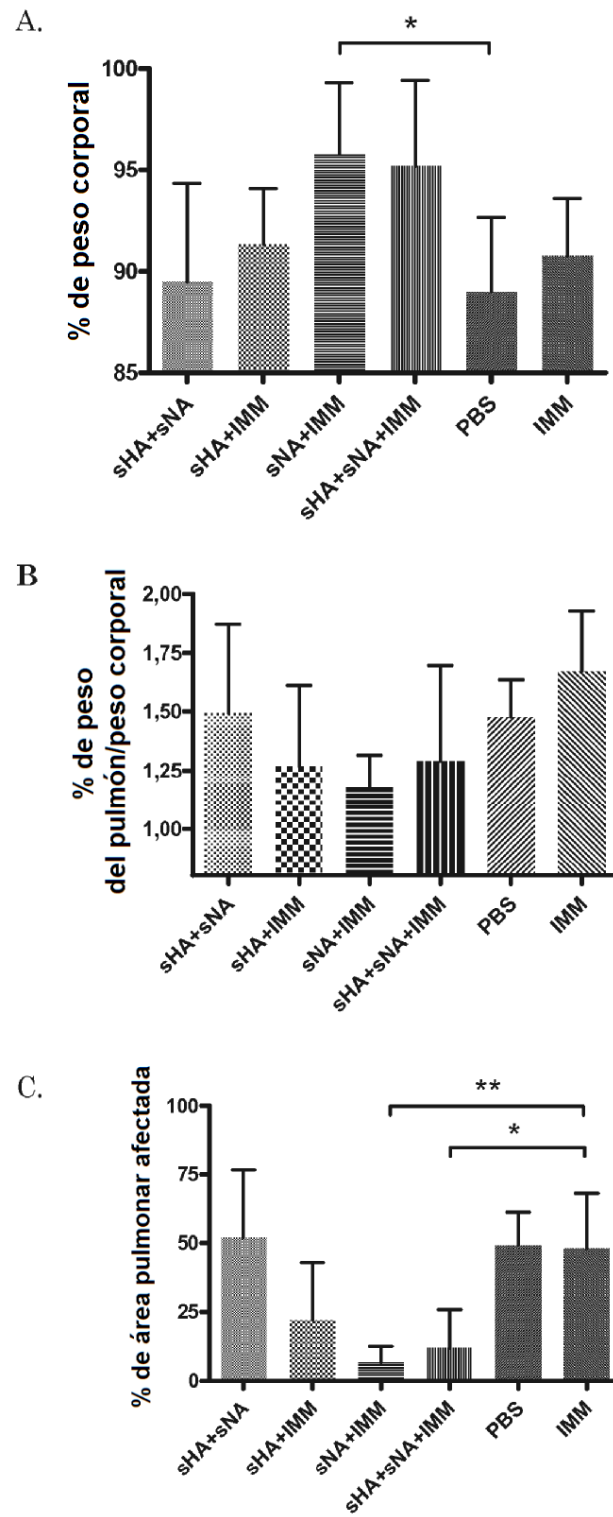


Figura 8

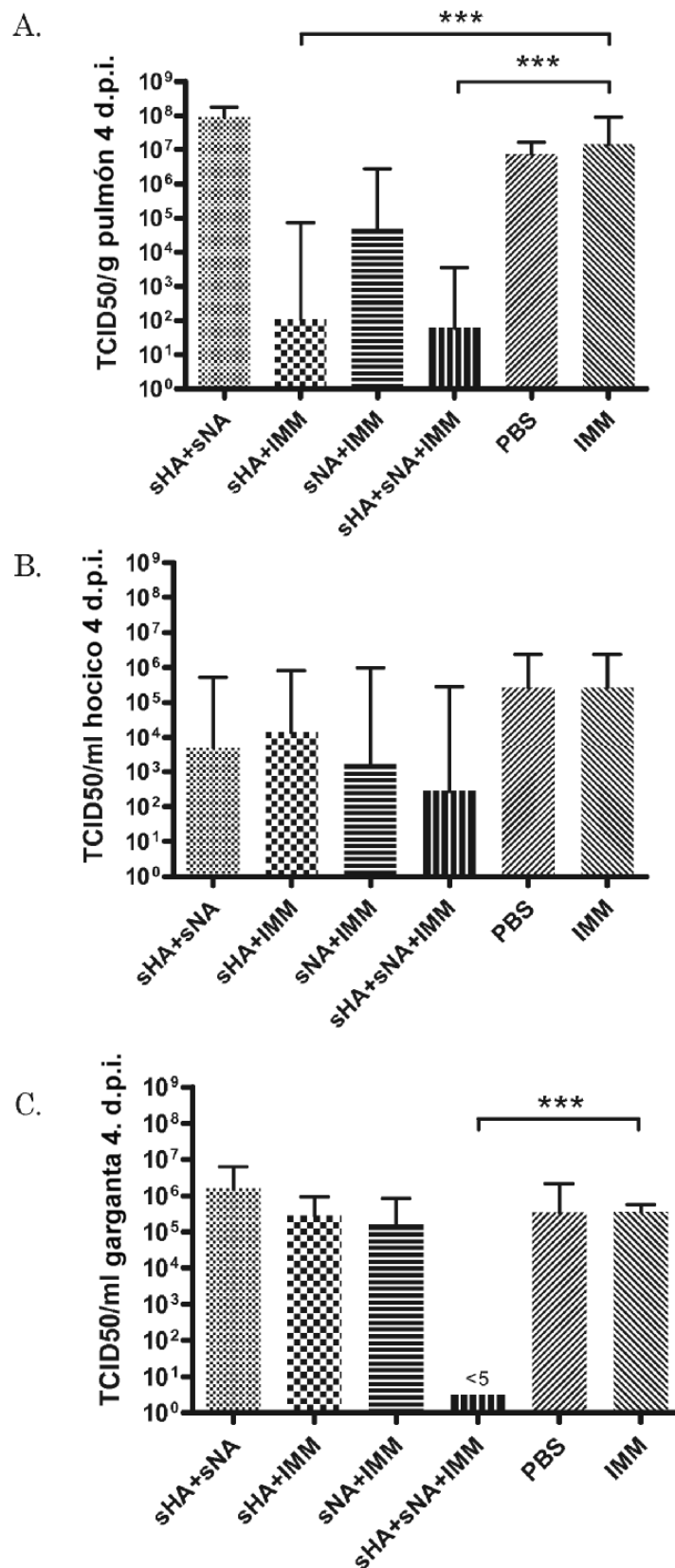


Figura 9

A

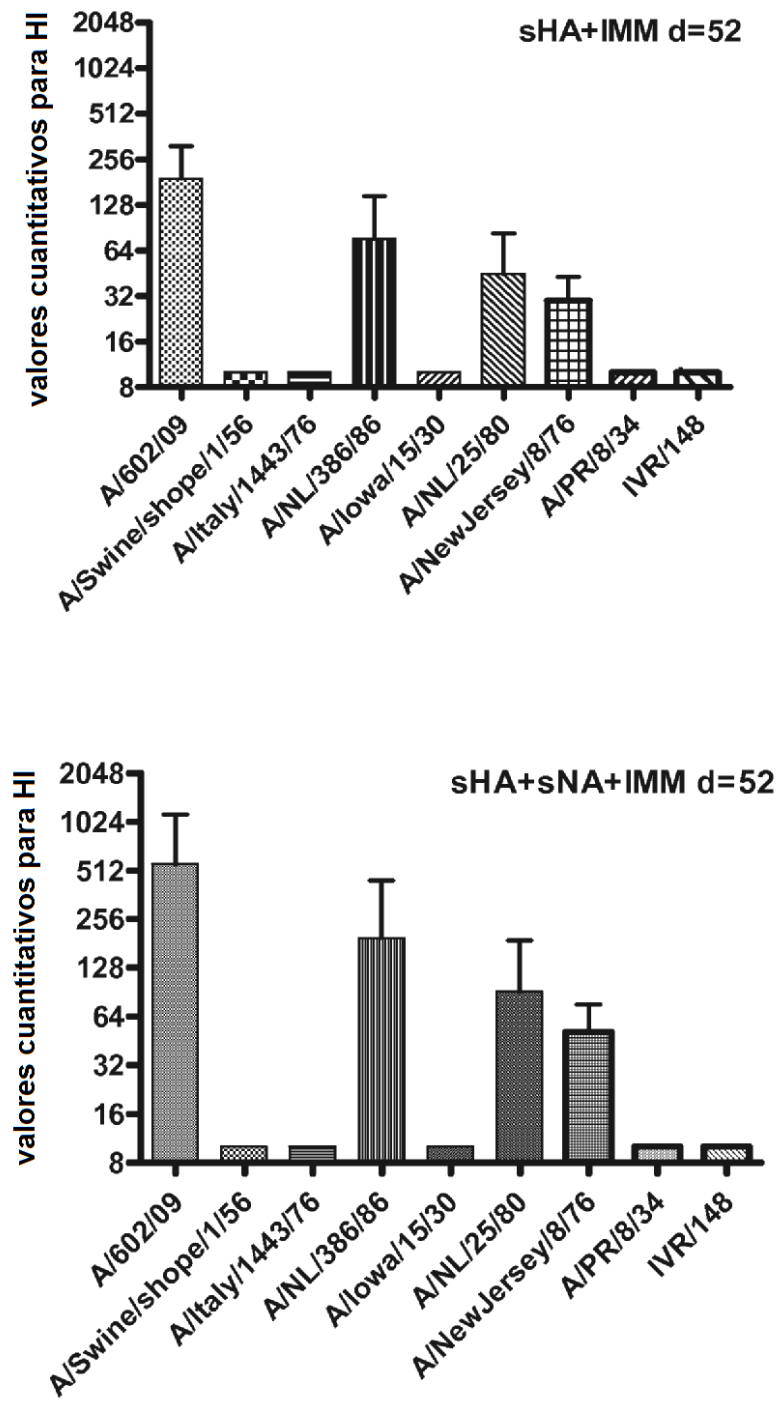


Figura 9 (continuación)

B

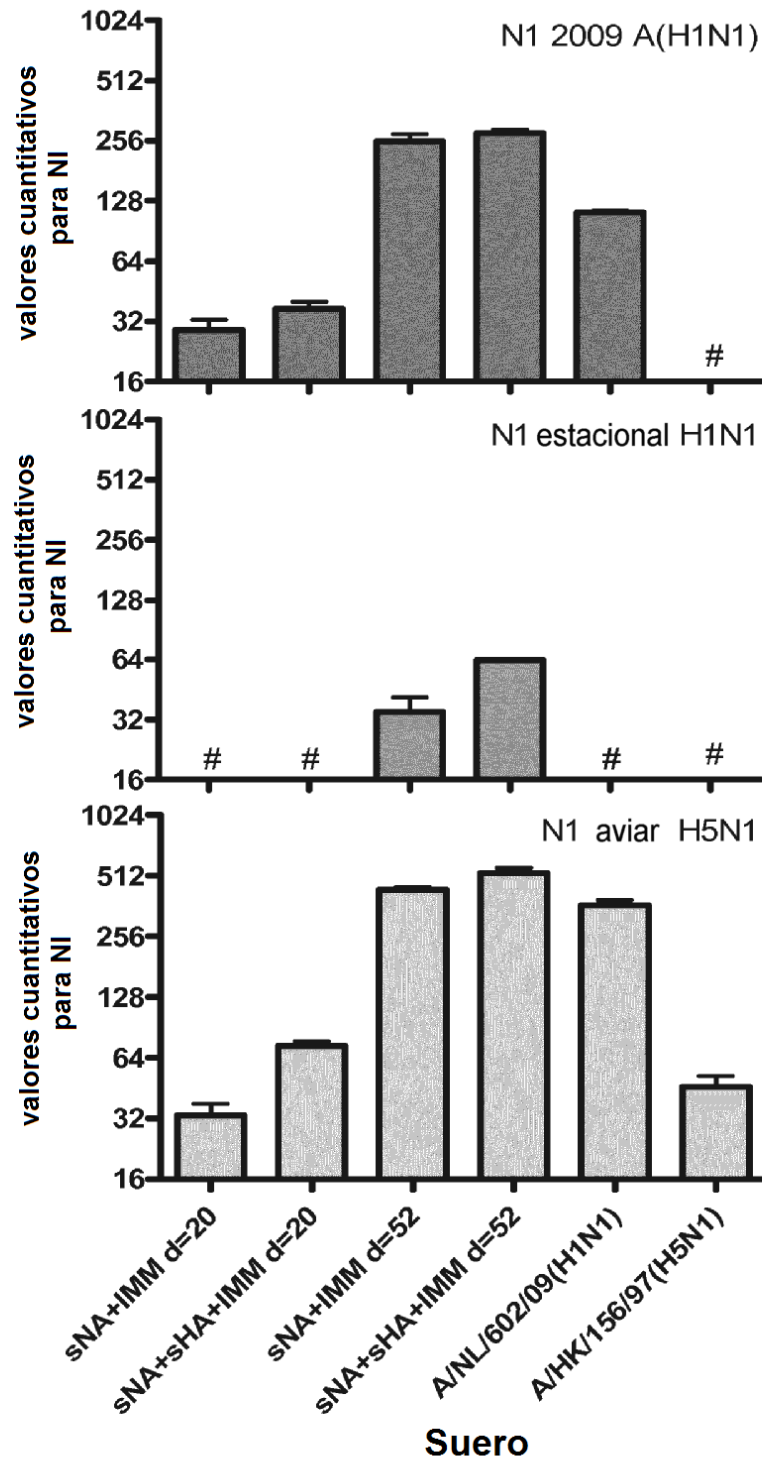


Figura 10

A

Ectodominio de hemaglutinina (HA) (aminoácidos 17-522) del virus de la gripe
A/California/04/2009(H1N1)

MPMGSLQPLATLYLLGMLVASVLADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVN
LLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDN
GTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKS
FYKNLIWLVKKGNSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADTY
VFGSSRYSKKFKPEIAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYA
FAMERNAGSGIIISDTPVHDCN'TTCQTPKGAIN'TSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTK
LRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLK
STQNAIDEIT'NKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTY
NAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTC
MESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLELIKRMKQIEDKIEEIESKQKKIENE
IARIKKIKLVPRGSLEWSHPQFEK

B

Dominio de cabeza de neuraminidasa (aminoácidos 75-469) del virus de la gripe
A/California/04/2009(H1N1)

MPMGSLQPLATLYLLGMLVASVLAWSHHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHHPQFEKRS
MKQIEDKLEEILSKLYHIENELARIKKLLGEGSAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVSGW
AIYSKDNSVRIGSKGDVVFVIREPFISCSPLECR'TFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSP
YRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDNGAVAVLKYNG
IITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTVMTDGPSNGQASYKIFRIEKGKIVKSV
EMNAPNYHYEECSYCPDSSEITCVCRDNWHGSNRPWVSFNQNLLEYQIGYICSGIF
GDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGF'SFKYGN'GVWIGRTKSISSRNGFEMIWDP
NGWTGTDNNFSIKQDIVGINEWSGYS'GSFVQHP'ELTGLDCIRPCFWVELIRGRPKE
NTIWTSGSSISFCGVNSD'TVGWSWPDGAELPFTIDK

Figura 11

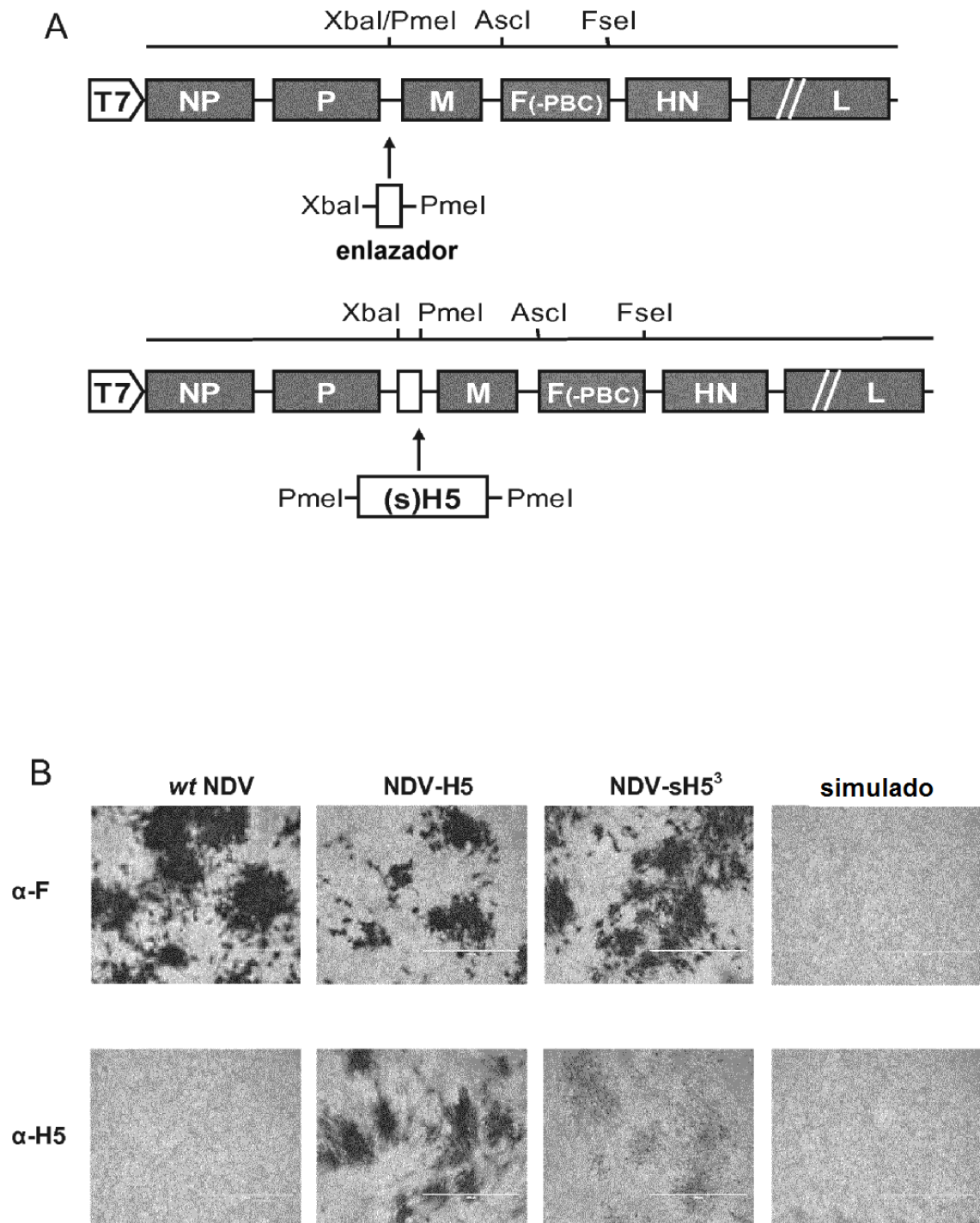
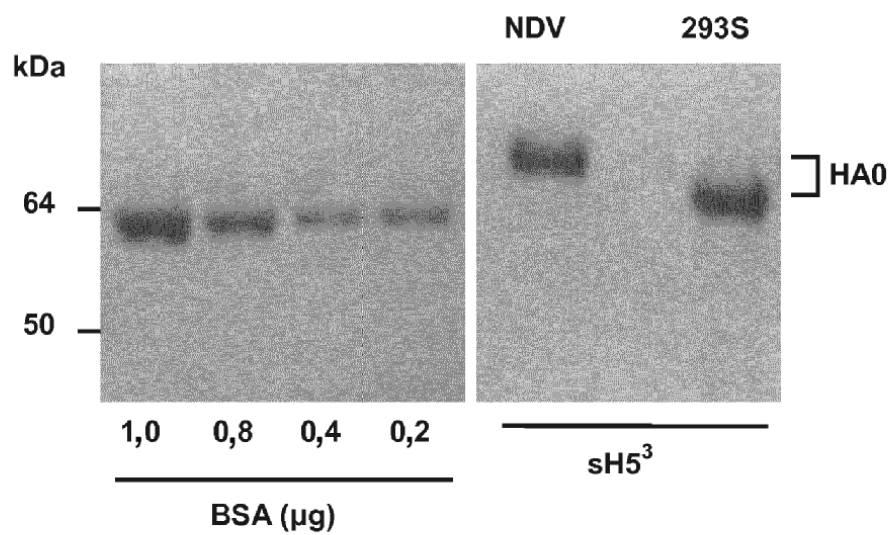


Figura 11 (continuación)

C



D

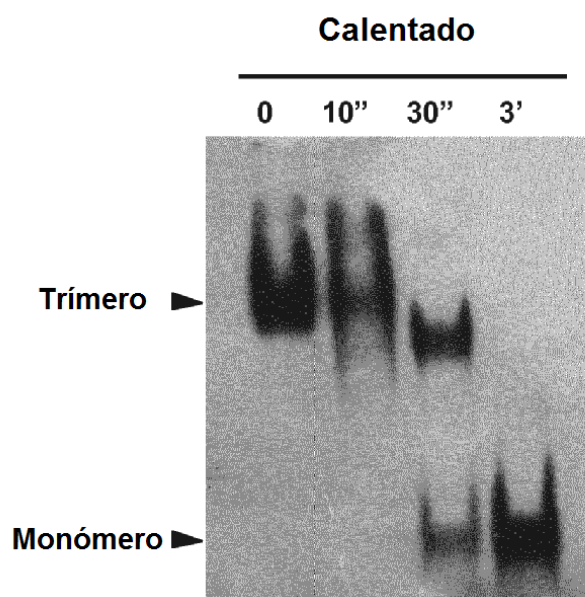
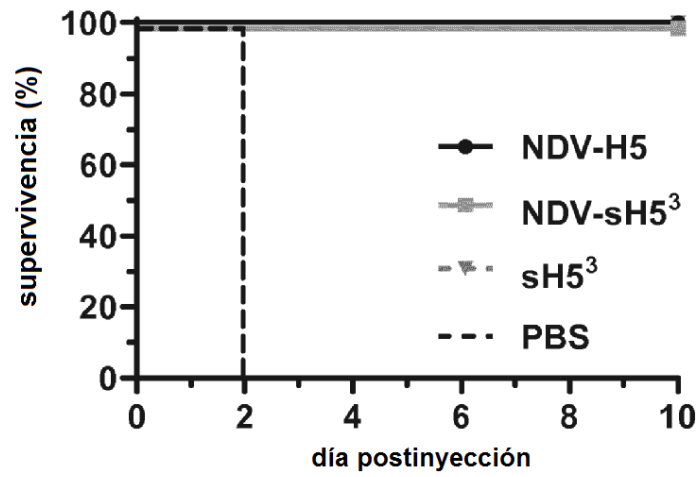


Figura 12

A



B

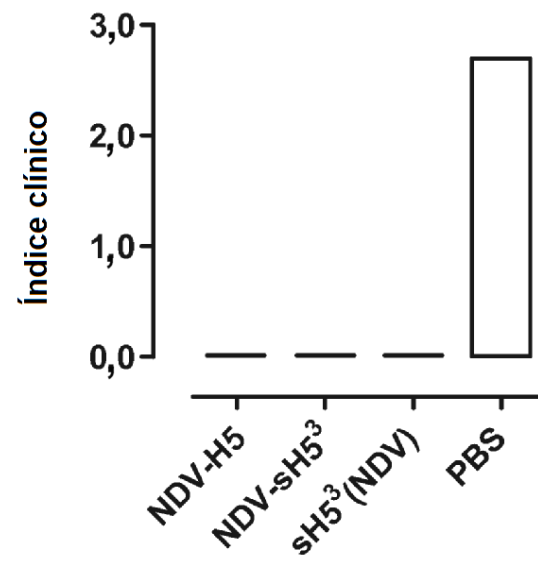
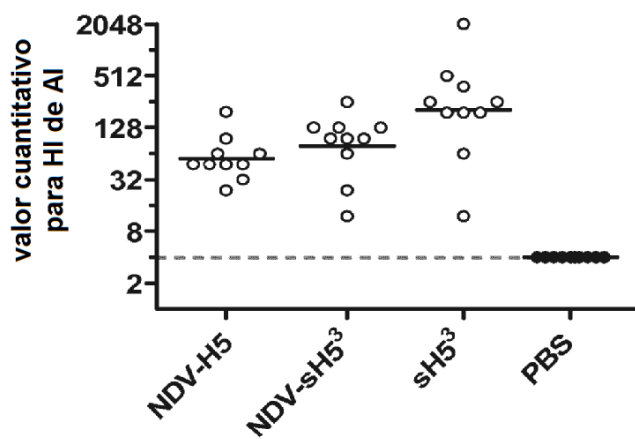


Figura 13

A



B

