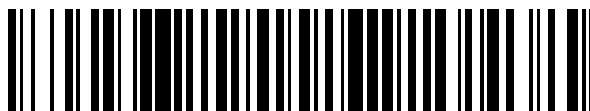


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 248**

51 Int. Cl.:

A61P 31/16

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.01.2013 PCT/US2013/022962**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13112720**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2013 E 13741216 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2806891**

54 Título: **Vacunas basadas en el virus paragripal 5**

30 Prioridad:

24.01.2012 US 201261590070 P
24.01.2012 US 201261590056 P
16.08.2012 US 201261683810 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH
FOUNDATION, INC. (100.0%)**
Boyd Graduate Studies Research Center
Athens, GA 30602-7411, US

72 Inventor/es:

HE, BIAO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 728 248 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

Vacunas basadas en el virus paragripal 5

5 Antecedentes

Las vacunas contra la gripe inactivadas han estado disponibles desde la década de los 40 del siglo pasado y tienen una eficacia del 60 al 80 % contra cepas de virus gripales emparejadas, pero son menos eficaces contra las variantes de deriva antigénicas, siendo ineficaces contra diferentes subtipos. Por lo tanto, la vacunación anual es necesaria para prevenir infecciones por nuevas cepas o subtipos. Las vacunas actuales contra la gripe estacional consisten en dos virus de la gripe A (H1N1 y H3N2) y uno o dos virus de la gripe B. Por otra parte, la cobertura de vacunación y la producción siguen siendo problemas a nivel mundial. Las actuales vacunas de virus de la gripe autorizadas se producen en huevos de gallina, requiriendo la disponibilidad de millones de huevos y un tiempo significativo entre la identificación de cepas vacunales y la disponibilidad de vacunas. Además, esta estrategia de vacunación no proporciona protección contra cepas, brotes o pandemias inesperados. Se necesitan nuevas estrategias de vacunación para la prevención y el control de la infección por el virus de la gripe.

Sumario de la invención

20 La presente invención incluye un vector de expresión vírico como se define en la reivindicación 1 adjunta. En la presente descripción, también se desvelan vectores de expresión víricos que no están dentro del alcance de la invención, en los que

25 la secuencia de nucleótidos heteróloga se inserta más cerca de la secuencia líder que entre el gen de la hemaglutinina-neuroaminidasa (HN) y el gen de la proteína ARN polimerasa grande (L) del gen PIV5; o
la secuencia de nucleótidos heteróloga se inserta entre el gen de la proteína hidrófoba pequeña (SH) y el gen de la hemaglutinina-neuroaminidasa (HN) del genoma de PIV5; o
la secuencia de nucleótidos heteróloga se inserta entre el gen F y el gen SH del genoma de PIV5; o la secuencia
30 de nucleótidos heteróloga se inserta entre el gen VP y el gen de la proteína de la matriz (M) del genoma de PIV5;
o
la secuencia de nucleótidos heteróloga se inserta entre el gen M y el gen F del genoma de PIV5; o

en algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos heteróloga se inserta entre el gen de la proteína de la nucleocápside (NP) y el gen V/P del genoma de PIV5; o

35 en algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos heteróloga se inserta entre la secuencia líder y el gen de la proteína de la nucleocápside (NP) del genoma de PIV5. También se desvelan vectores de expresión víricos que no están dentro del alcance de la invención, en los que una parte del gen F o HN de PIV5 se ha reemplazado por la secuencia de nucleótidos heteróloga; o

40 la secuencia de nucleótidos heteróloga reemplaza la secuencia de nucleótidos del gen SH; o
la secuencia de nucleótidos heteróloga se inserta dentro de la secuencia de nucleótidos del gen SH, dentro de la secuencia de nucleótidos del gen NP, dentro de la secuencia de nucleótidos del gen V/P, dentro de la secuencia de nucleótidos del gen M, dentro de la secuencia de nucleótidos del gen F, dentro de la secuencia de nucleótidos del gen HN y/o dentro de la secuencia de nucleótidos del gen L.

En algunas realizaciones, el genoma de PIV5 incluye además una o más mutaciones. En algunas realizaciones, una mutación incluye una mutación del gen V/P, una mutación del extremo N compartido de las proteínas V y P, una mutación de los restos 26, 32, 33, 50, 102 y/o 157 del extremo N compartido de las proteínas V y P, una mutación que carece del extremo C de la proteína V, una mutación que carece de la proteína hidrófoba pequeña (SH), una mutación de la proteína de fusión (F), una mutación de la fosfoproteína (P), una mutación de la proteína ARN polimerasa grande (L), una mutación que tiene incorporados restos del virus paragripal canino, una mutación que induce apoptosis o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, una mutación incluye PIV5VΔC, PIV5ΔSH, PIV5-P-S308G o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el genoma de PIV5 incluye además una o más mutaciones.

55 En algunas realizaciones, el polipéptido heterólogo se deriva del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus paragripal 1, virus paragripal 2, virus paragripal 3, virus paragripal 4, virus sincitial respiratorio humano, virus sincitial respiratorio bovino, metapneumovirus humano, gripe aviar, gripe canina, metapneumovirus aviar, virus Nipah, virus Hcndra, virus de la rabia, virus del Ébola, circovirus porcino, virus porcino del síndrome reproductivo y respiratorio, virus de la gripe porcina, virus de la enfermedad de New Castle, virus de las paperas, virus del sarampión, virus del moquillo canino, virus de leucemia felina; calicivirus humano, calicivirus veterinario, norovirus humano, norovirus veterinario, virus de la peste bovina, *Tuberculosis micobacteriana* y/o un virus gripal emergente en seres humanos o animales. En algunas realizaciones, el polipéptido heterólogo se obtiene de una bacteria o un parásito.

65 La divulgación también abarca vectores de expresión víricos que no están dentro del alcance de la invención, en los que el polipéptido heterólogo incluye una neuraminidasa gripal (NA), una proteína de la nucleocápside de la gripe

(NP), M1, M2, PA, PB1, PB2, PB1-F2, NS1 o NS2. En algunas realizaciones, en las que la gripe incluye el virus de la gripe A, la gripe B o la gripe C.

De acuerdo con la invención, el polipéptido heterólogo incluye una hemaglutinina (HA) de la cepa del virus de la gripe A de los subtipos H1 a H18. En algunas realizaciones, el polipéptido heterólogo incluye una hemaglutinina (HA) de la cepa H5N1, H3N2 o H1N1 del virus de la gripe A. En las realizaciones excluidas del alcance de la invención, el polipéptido heterólogo incluye una neuraminidasa gripal (NA) de la gripe de tipo A, subtipo N1 a N10. En algunas realizaciones, la NP, M1, M2, PA, PB1, PB2, PB1-F2, NS1 o NS2 es de la cepa H1 a H17 del virus de la gripe A y la NA es de la cepa N1 a N10 del virus de la gripe A.

La presente invención incluye un vector de expresión vírico como se define en la reivindicación 1, que tiene dos o más secuencias de nucleótidos heterólogas que expresan un polipéptido heterólogo.

La presente invención incluye una partícula vírica que incluye un vector de expresión vírico como se define en la reivindicación 1.

La presente invención incluye una composición del vector de expresión vírico o partícula vírica como se describe en el presente documento.

La presente invención incluye un método de expresión *in vitro* de un polipéptido heterólogo en una célula, incluyendo el método la puesta en contacto o la infección de la célula con un vector de expresión vírico, partícula vírica o composición como se describe en el presente documento.

La administración de un vector de expresión vírico, partícula vírica o composición como se describe en el presente documento al sujeto induce una respuesta inmunitaria que puede incluir una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular.

La presente invención incluye un vector de expresión vírico, una partícula vírica o una composición como se describe en el presente documento para el tratamiento o la prevención de la infección por gripe.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, el vector de expresión vírico, la partícula vírica o la composición se administran por vía intranasal, intramuscular, tópica, oral o *in ovo*.

El término "y/o" significa uno o todos los elementos enumerados o una combinación de dos cualquiera o más de los elementos enumerados.

Los términos "preferente" y "preferentemente" se refieren a realizaciones de la invención que pueden proporcionar ciertos beneficios, en ciertas circunstancias. Sin embargo, también pueden ser preferentes otras realizaciones, en las mismas circunstancias u otras. Además, la mención de una o más realizaciones preferentes no implica que otras realizaciones no sean útiles y no pretende excluir otras realizaciones del alcance de la invención.

Los términos "comprende" y variaciones de los mismos no tienen un significado limitante cuando estos términos aparecen en la descripción y en las reivindicaciones.

Salvo que se especifique de otro modo, "un/uno", "una" "el", "la", y "al menos uno/a" se usan indistintamente y significan uno/a o más de uno/a.

También en el presente documento, las menciones de los intervalos numéricos con puntos finales incluyen todos los números subsumidos dentro de ese intervalo (por ejemplo, de 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5, etc.).

Para cualquier método desvelado en el presente documento que incluya etapas diferenciadas, las etapas se pueden realizar en cualquier orden factible. Asimismo, según sea apropiado, Cualquier combinación de dos o más etapas puede llevarse a cabo simultáneamente.

A menos que se indique otra cosa, se comprende que todos los números que expresan cantidades de componentes, pesos moleculares y otros que se usan en la memoria descriptiva y reivindicaciones están previstos como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener mediante la presente invención. Como mínimo, y no en un intento de limitar la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos indicados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo habituales.

A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros que exponen el amplio alcance de la invención sean aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se indican de la forma más precisa

posible. Todos los valores numéricos, sin embargo, contienen de forma inherente un intervalo que es necesariamente el resultado de la desviación típica que se encuentra en sus respectivas mediciones de ensayo.

El sumario anterior de la presente invención no está destinado a describir cada realización divulgada o cada implementación de la presente invención. La descripción siguiente ilustra más particularmente realizaciones ilustrativas. En varios lugares a lo largo de la solicitud, se proporciona orientación a través de listas de ejemplos, ejemplos que pueden usarse en diversas combinaciones. En cada caso, la lista citada sirve solamente como grupo representativo y no debe interpretarse como una lista exclusiva.

A lo largo del presente documento, todos los encabezamientos son para la comodidad del lector y no deben usarse para limitar el significado del texto que sigue al encabezamiento, a menos que así se especifique.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la estructura del genoma de PIV5. El genoma de PIV5 contiene siete unidades de transcripción conocidas y transcribe ocho ARNm víricos conocidos. Ambos ARNm de V y P se originan a partir del mismo gen V/P mediante un proceso de edición del ARN denominado transcripción con pseudo-molde. El ARNm de V se transcribe fielmente del gen V/P, mientras que el ARNm de P surge de la inserción de dos restos de G sin molde en un sitio específico debido a la producción de bandas de sombra de la ARN polimerasa durante la transcripción del ARNm de V. Las secuencias líder y remolque son importantes para la síntesis de ARN vírico y las iniciaciones de la transcripción. Para los virus de ARN de cadena negativa, la transcripción solo se inicia en la secuencia líder y el gen más cercano a la secuencia líder es el que más se transcribe.

Las Figuras 2A-2D muestran PIV5-H5 protegido contra la exposición letal al H5N1. La Figura 2A es un esquema de ZL48, que tiene H5 insertado entre HN y L (también conocido como PIV5-H5HL). La Fig. 2B muestra la pérdida de peso tras la exposición a H5N1. Se inocularon ratones (n = 10/grupo) con 10⁶ ufp de PIV5, ZL48, ZL46 y la cepa A/VN/03/04 de la gripe inactivada (HPAI H5N1). ZL46 tiene una inserción de H5 entre el gen SH y el gen HN. A los 21 días de la inoculación, Los ratones fueron infectados con una dosis letal de H5N1. Se registraron los pesos de los ratones y se presentó la pérdida de peso. La Figura 2C muestra la tasa de supervivencia. La Fig. 2D muestra los títulos víricos en los pulmones tras la exposición. A los cuatro días después de la exposición con H5N1, Se extrajeron los pulmones de los ratones infectados y se determinaron los títulos de H5N1 en los pulmones.

Las Figuras 3A-3C muestran que PIV5-N1 (H5N1) está protegido contra la exposición letal a H5N1. La Fig. 3A muestra esquemas de PIV5 que expresa NA de H5N1 o H1N1. La Fig. 3B muestra la pérdida de peso tras la exposición a H5N1. Se inocularon ratones (n = 10/grupo) con 10⁶ ufp de PIV5, rPIV5-N1 (H5N1), rPIV5-N1 (H1N1) y virus de la gripe recombinante que expresa HA y NA de H5N1 (rgA/VN-PR8). A los 21 días de la inoculación, Los ratones fueron infectados con una dosis letal de H5N1. Se registraron los pesos de los ratones y se presentó la pérdida de peso. La Figura 3C muestra la tasa de supervivencia.

Las Figuras 4A-4C muestran que PIV5-NP (H5N1) está protegido contra la exposición letal al virus de la gripe. La Fig. 4A muestra esquemas de PIV5 que expresan NP de H5N1. El PIV5-NP-P-S308G tiene una mutación en el resto S308 de la proteína P. PIV5 Δ SH-NP tiene una eliminación de la proteína SH. La Fig. 4B muestra la pérdida de peso tras la exposición letal a H1N1. Se inocularon ratones (n = 10/grupo) con 10⁵ ufp de PIV5, rPIV5-NP (H5N1) o la cepa del virus de la gripe X31. A los 21 días de la inoculación, los ratones se infectaron con una dosis letal de H1N1 (DICT₅₀ de 100). Se registraron los pesos de los ratones y se presentó la pérdida de peso. La Figura 4C muestra la tasa de supervivencia.

La Figura 5 presenta esquemas de PIV5-H5HL y PIV5-H5LN. H5 puede insertarse entre HN y L para dar lugar a PIV5-H5HL o entre la secuencia líder y NP para dar lugar a PIV5-H5LN. Se muestra un diagrama más detallado de la inserción de H5. Se indican las secuencias de inicio del gen (GS), región intergénica (I) y final del gen (GE), que son importantes para el inicio y la finalización de la síntesis de ARNm vírico.

La Figura 6A-6C muestra los niveles de expresión de HA de la inmunidad afectada por H5N1/PIV5H5. La Fig. 6A muestra esquemas de PIV5 que expresan HA de H5N1. Se indica el sitio de inserción de H5. La Fig. 6B muestra títulos de anticuerpos de ELISA de ratones vacunados. Se inocularon los ratones con 1.000 ufp de virus (es decir, 1/1.000 de la dosis usada en la Fig. 2). A los 21 días de la inoculación, Los ratones se sangraron, y se midieron los títulos contra el virus de la gripe usando ELISA. La Fig. 6C muestra títulos de anticuerpos neutralizantes de ratones vacunados. Las muestras de la Fig. 6B se usaron en un ensayo de titulación de anticuerpos neutralizantes.

La Figura 7A y 7B muestran que PIV5 mutante que expresa NP tenía mejor protección. La Fig. 7A muestra la pérdida de peso tras la exposición letal a H1N1. Se inocularon ratones (n = 10/grupo) con 10⁵ ufp de PIV5, rPIV5-NP, PIV5-NP (S308G), PIV5 Δ SH-NP o la cepa X31 del virus de la gripe. PBS, se incluyó un tampón salino como control. A los 21 días de la inoculación, los ratones se infectaron con una dosis letal de H1N1 (DICT₅₀ de 1.000) (10 veces de la dosis de la Fig. 4). Se registraron los pesos de los ratones y se presentó la pérdida de peso. La Fig. 7B muestra la tasa de supervivencia. PIV5-NP (Delta SH) es igual que PIV5 Δ SH-NP. Las Figuras 8A y 8B muestran que el PIV5 mutante que expresa H5 tuvo impacto en los títulos de anticuerpos. La Fig. 8A muestra esquemas de PIV5 mutantes que expresan H5. ZL48 es PIV5-H5, ZL128 es PIV5 Δ SH-H5, ZL127 es PIV5V Δ C-H5 y ZL154 es PIV5V Δ C Δ SH-H5; La Fig. 8B muestra la inmunidad generada por PIV5 mutante que expresa H5. Se inocularon los ratones (n = 10/grupo) con 1.000 ufp de PIV5, rPIV5-H5, PIV5 Δ SH-H5 o PIV5V Δ C-H5 (clon 1 y 3). A los 21 días de la inoculación, se sangraron los ratones, y se midieron los títulos de IgG anti-H5 con ELISA.

La Figura 9 muestra un esquema para la producción de un vector PIV5 mejorado, un PIV5 quimérico que expresa proteínas víricas de la vacuna diana prevista que reemplazan a las proteínas PIV5.

La Figura 10A-10C muestra las vacunas candidatas contra el VIH basadas en PIV5. La Fig. 10A muestra esquemas de PIV5 que expresan Env o Gag del VIH. La Fig. 10B muestra la expresión de Env en células infectadas con PIV5-Env. Se infectaron células HeLa con PIV5-Env. Se usaron lisados celulares en transferencia Western. La Fig. 10C muestra la expresión de Gag en células infectadas con PIV5-Gag. Se infectaron células HeLa con PIV5-Gag. En la transferencia Western, se usaron lisados celulares.

Las Figuras 11A y 11B muestran títulos de anticuerpos anti-PIV5 en perros sin exposición a PIV5. Ocho perros no tratados previamente con PIV5 fueron inmunizados con una dosis de 8×10^7 ufp de los virus PIV5 o rPIV5-H3 por vía intranasal. Los perros fueron divididos en dos grupos: perros infectados con PIV5 y perros infectados con rPIV5-H3. Se recogieron muestras de sangre a los 0 y 21 días de la infección para el ELISA (Fig. 11A) y el ensayo de anticuerpos de neutralización del virus (nAb) (Fig. 11B). Las columnas grises indican que el título de nAb contra PIV5 es inferior a 10, el límite de detección en este ensayo. Las columnas negras indican que el título de nAb es igual o superior a 10.

Las Figuras 12A y 12B muestran la replicación de PIV5 en perros sin exposición a PIV5. Se recogieron frotis nasales de perros 3 y 5 días después de la infección y se colocaron en un vial que contenía 0,5 ml de DMEM con FBS al 2 %. La Fig. 12A muestra la detección del virus con RT-PCR. La Fig. 12B muestra la detección del virus con el ensayo de placa. Las muestras de hisopo se examinaron mediante ensayo de placa en células BHK21. En el ensayo, se usaron dos réplicas por cada muestra de hisopo diluida en serie ($1:10^0$ a $1:10^2$).

La Figura 13 muestra las respuestas inmunitarias en los perros sin tratamiento previo con PIV5 inoculados con rPIV5-H3. Las muestras de sangre de los perros se recogieron a los 0 y 21 días de la infección. Se mezclaron 4 HAU del virus de la gripe A (A/Udorn/72, subtipo H3N2) con sueros de perro diluidos en serie en placas de fondo redondo de 96 pocillos. El título de inhibición de la hemaglutinación (HAI) se calificó como el recíproco del antisero de dilución más alto que inhibe la hemaglutinación por completo. La gráfica muestra el valor medio de los pocillos duplicados para cada perro. Se indica el límite de detección del título de HAI (10).

Las Figuras 14A y 14B muestran los títulos de anticuerpos anti-PIV5 en los perros vacunados con PIV5. Ocho perros que habían sido vacunados con PIV5 vivo fueron inmunizados con una dosis de 8×10^7 ufp de virus rPIV5-H3 en 1 ml de PBS por vía intranasal. Los perros fueron divididos en dos grupos: dos perros recibieron PBS; los seis perros restantes recibieron rPIV5-H3. Las muestras de sangre se recogieron a los 0 y 21 días de la infección para ELISA (Fig. 14A) y el ensayo de anticuerpos de neutralización vírica (Fig. 14B). Los datos se presentaron como el valor medio de los pocillos duplicados. En el ensayo de anticuerpos de neutralización, la columna blanca indica que el título de nAb contra PIV5 es igual o superior a 10.

Las Figuras 15A y 15B muestran la replicación de PIV5 en perros vacunados previamente con PIV5. Se recogieron hisopos nasales de los perros a los 3 y 5 días después de la infección. Las detecciones de virus se realizaron de la misma manera que en la Fig. 12. La Fig. 15A muestra los resultados de la RT-PCR y la Fig. 15B muestra los resultados del ensayo de placa.

La Figura 16 muestra las respuestas inmunitarias en los perros vacunados con PIV5 inoculados con rPIV5-H3. Las muestras de sangre de los perros se recogieron a los 0 y 21 días después de la infección. Los títulos anti-PIV5 y anti-HAI se determinaron usando el mismo enfoque que en la Fig. 13. Las Figuras 17A y 17B muestran anticuerpos contra PIV5 en seres humanos. Se obtuvieron 45 muestras de suero humano de individuos sanos de 18-50 años. La Fig. 17A es una comparación de los niveles de anticuerpos anti-PIV5 y anti-MuV. El ELISA se realizó en placas recubiertas con PIV5 purificado o MuV purificado con sueros diluidos en serie. Se mostraron los valores de DO_{450} del ensayo ELISA específicos de los virus PIV5 o del virus de las paperas a una dilución de 320 veces para cada muestra de suero humano. La Fig. 17B muestra los títulos de anticuerpos neutralizantes contra PIV5 en sueros humanos. Los datos para los títulos de anticuerpos fueron el valor medio de los pocillos duplicados, y se presentaron para cada muestra humana. La columna blanca indica que el título de nAb contra PIV5 es inferior a 10, el límite de detección. La columna negra indica que el título de nAb es igual o superior a 10.

Las Figuras 18A y 18B presentan información de PIV5 recombinante que expresa H5. La Fig. 18A es un esquema de PIV5 recombinante que expresa HA de H5N1. Se elimina el sitio de escisión que contiene restos de aminoácidos polibásicos, y se muestran las secuencias. La Fig. 18B muestra los títulos de PIV5 recombinante que expresan las reservas de HA de H5N1. Los virus purificados en placa se cultivaron en células MDBK y se titularon en células BHK. NSPQRERRRKKRGLFG es la SEQ ID NO: 1 y NSPQGLFG es la SEQ ID NO: 2).

Las Figuras 19A-19C muestran la generación y el análisis de PIV5 recombinante que expresa HA de H5N1 entre HN y L del genoma de PIV5. La Fig. 19A es la confirmación de la expresión de HA de H5N1 usando inmunotransferencia. Las células MDBK se infectaron con ZL48 y se lisaron 24 h después de la infección. Los lisados se realizaron en gel de SDS-PAGE y se inmunotransfirieron con HA anti-H5N1. La Fig. 19B es la confirmación de la expresión de HA de H5N1 usando inmunofluorescencia (IF). Las células MDBK se infectaron con ZL48 y se tiñeron con HA anti-H5N1. Los anticuerpos usados para la IF se mostraron en el lado izquierdo del panel. La Fig. 19C muestra la velocidad de crecimiento de rPIV5-H5. Las células MDBK se infectaron con PIV5 o ZL48 a una MdI de 0,1. Los medios fueron recogidos en intervalos de 24 horas. Los títulos víricos en los medios se determinaron usando un ensayo de placa.

Las Figuras 20A-20D muestran respuestas inmunitarias en ratones inoculados con rPIV5-H5. Los ratones se infectaron con PIV5 o ZL48 a una dosis de 10^6 ufp por vía intranasal. La Fig. 20A muestra los títulos de ELISA de anti-HA. Los ratones fueron infectados con 10^6 ufp de ZL48 o PIV5. 21 días después de la infección, los ratones fueron sangrados. Los títulos anti-HA se determinaron usando ELISA. La Fig. 20B muestra el aumento de los títulos anti-HA. Los ratones de la Fig. 20A se reforzaron a los 28 días después de la infección y se sangraron a los 35 días después de la infección. Los títulos anti-HA se midieron usando ELISA. La Fig. 20C muestra los títulos de neutralización. Los títulos de nAb en sueros de ratones vacunados con PIV5 o ZL48 contra H5N1 se determinaron

como se describe en el apartado de Materiales y métodos. La Fig. 20D muestra las respuestas mediadas por células. Linfocitos productores de IFN- γ (grupos de $n = 3$ ratones por grupo) en los ganglios linfáticos mediastínicos el día 12 después de la vacunación, según lo determinado por el análisis ELISpot. Los datos se presentan como la media $\pm$ ETM.

Las Figuras 21A y 21B muestran la eficacia de la exposición de rPIV5-H5 frente a rgVN-PR8 (H5N1) en ratones. Los ratones fueron inoculados con PBS, PIV5 o ZL48 ($n = 10$ por grupo) a una dosis de 10^6 ufp por ratón. 21 días después de la infección, los ratones fueron expuestos a rgVN-PR8 (H5N1) a una dosis DICT50 de 1.000. Se extrajeron los pulmones a los 4 días de la exposición. Se determinaron los títulos de rgPR8H5N1 en los pulmones de los ratones usando un ensayo de placa.

Las Figuras 22A-22C muestran la eficacia de rPIV5-H5 frente a la exposición a HPAI H5N1 en ratones. Los ratones fueron inoculados con PBS, PIV5 o ZL48 ($n = 15$ por grupo) a una dosis de 10^6 ufp por ratón. 21 días después de la infección, los ratones fueron expuestos a HPAI H5N1 a una dosis DL50 de 10. La Fig. 22A muestra los pesos de los ratones expuestos a H5N1. Los pesos se controlaron diariamente después de la exposición durante 15 días. El peso se representa como la media del porcentaje del peso original (el día de la exposición). La Fig. 22B muestra la tasa de supervivencia. La Fig. 22C muestra la velocidad de crecimiento de los virus recombinantes en células de ratones ($N = 5$) se sacrificaron 4 días después de la exposición a H5N1. Los títulos se determinaron usando un ensayo de placa en células MDCK.

Las Figuras 23A y 23B son un análisis de PIV5 recombinante que expresa HA de H5N1. La Fig. 23A es un análisis de la expresión de HA de H5N1 en células infectadas con PIV5 recombinante que expresa HA de H5N1. Las células se infectaron con ZL46, ZL47 y ZL48, así como con PIV5 a una Mdl de 1. Los niveles de expresión de HA de H5N1 en células infectadas se determinaron mediante citometría de flujo como se describe en el apartado de Materiales y métodos. La Fig. 23B muestra la velocidad de crecimiento de los virus recombinantes en células de cultivo tisular. Las células se infectaron con virus a una Mdl de 0,1. Los medios de las células infectadas se recogieron en intervalos de 24 horas y se usaron para el ensayo de placa para determinar los títulos de los virus.

La Figura 24 muestra el crecimiento de los virus recombinantes *in vivo*. Los ratones ($n = 5$) se infectaron con virus a una dosis de 10^6 ufp por vía intranasal. 4 días después de la infección, se extrajeron los pulmones y se usaron para el ensayo de placa para determinar los títulos de los virus.

Las Figuras 25A-25D muestran la eficacia de PIV5 recombinante que expresa HA de H5N1 contra la exposición a HPAI H5N1. Los ratones se infectaron con PIV5 o ZL48 a una dosis de 10^3 , 10^4 o 10^5 ufp por vía intranasal. A los 24 días después de la infección, Los ratones fueron expuestos a una DL₅₀ de 10 de H5N1. Los pesos de los ratones fueron controlados diariamente. La Fig. 25A es un análisis de supervivencia de rango logarítmico de ratones expuestos a una DL₅₀ de 10 de A/Vietnam/1203/04. Pesos relativos de ratones vacunados con 10^3 ufp (Fig. 25B), 10^4 ufp (Fig. 25C) o 10^5 ufp (Fig. 25D) y expuestos a una DL₅₀ de 10 de HPAI H5N1. Los ratones vacunados con rgVN-PR8 recibieron 2.000 ufp de virus.

La Figura 26A-26C muestra la generación de PIV5 recombinante que expresa la proteína RV-G (rPIV5-RV-G). Fig. 26A es un esquema de rPIV5-RV-G. NP, nucleoproteína, P, fosfoproteína, V, Proteína V; M, Proteína matricial; SH, proteína hidrófoba pequeña; F, proteína de fusión; HN, Proteína hemaglutinina-neuraminidasa; L, ARN polimerasa dependiente del ARN. Las secuencias líder y remolque son importantes para la replicación del ARN de PIV5. La Fig. 26B muestra la detección de la expresión de RV-G usando IFA. Se identificó la expresión de RV-G en células MDBK infectadas con rPIV5-RV-G mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA) usando anticuerpo anti-RV-G de ratón, mientras que las células infectadas con PIV5 se usaron como control negativo. La Fig. 26C muestra la detección de la expresión de RV-G usando WB. La expresión de RV-G se examinó en células MDBK infectadas con rPIV5-RV-G mediante transferencia Western (WB) usando un anticuerpo anti-RV-G de ratón con las células infectadas con PIV5 como control negativo. La Figura 27A y 27B es una comparación de la cinética de crecimiento de PIV5 y rPIV5-RV-G en células. La Fig. 27A es un ensayo de crecimiento de múltiples ciclos. Se realizaron curvas de crecimiento de múltiples ciclos de PIV5 y rPIV5-RV-G en células MDBK a una Mdl de 0,01. Se recogieron alícuotas de sobrenadante de cultivo celular en intervalos de 24 h hasta 120 h después de la infección. La Fig. 27B es un ensayo de crecimiento de un solo ciclo. Se realizaron curvas de crecimiento de un solo ciclo de PIV5 y rPIV5-RV-G en células MDBK a una Mdl de 5. Se recogieron alícuotas de sobrenadante de cultivo celular en intervalos de 12 h hasta 60 h después de la infección. Se determinaron los títulos víricos del sobrenadante mediante un ensayo de placa en células BHK21. Los valores representan la media de los resultados de dos experimentos independientes, y las barras de error muestran la desviaciones típica.

La Figura 28 muestra la incorporación de RV-G en el virión de rPIV5-RV-G. Se purificaron las partículas víricas a través de gradientes de sacarosa del 10 % al 80 % (peso/vol). Las proteínas víricas se analizaron usando SDS-PAGE al 10 % y se sometieron a un análisis de transferencia Western con anticuerpo de ratón contra RV-G. Se indica la posición de la proteína RV-G.

Las Figuras 29A y 29B muestran la eficacia de la inmunización de sensibilización-refuerzo de rPIV5-RV-G frente a la exposición a la rabia en ratones. Se inmunizaron grupos de ratones ($n = 10$, cada grupo) por vía intranasal con el virus rPIV5-RV-G diluido 10 veces (10^3 ufp a 10^6 ufp). Los ratones de control se inocularon con 10^6 ufp de PIV5 o con PBS. A las tres semanas de la vacunación de sensibilización, los animales fueron reforzados con la misma cantidad de vacunas. Una semana después del refuerzo, todos los ratones fueron expuestos a una DL₅₀ de 50 de la cepa CVS-24 por vía i.c. La Fig. 29A es una prueba de VNA. Se recogieron muestras de suero antes de la exposición y se usaron para medir los títulos de VNA contra el virus de la rabia mediante la prueba rápida de inhibición del foco fluorescente (RFFIT). En resumen, se compararon los títulos de VNA de los sueros con un patrón conocido, que contenía una concentración conocida de unidad internacional (UI) por milímetro de solución. Los títulos de VNA de inoculaciones de entre 10^6 ufp y 10^5 ufp, 10^5 ufp y 10^4 ufp son estadísticamente significativas

(los valores de p son de 0,0001 y 0,0004 respectivamente, que se calculan usando la prueba t de Student); Los títulos de VNA de entre 10^4 ufp y 10^3 ufp no son estadísticamente diferentes (el valor de P es de 0,06). La Fig. 29B muestra las tasas de supervivencia. Los animales infectados se observaron diariamente durante 22 días para detectar signos clínicos de rabia, y se representaron las tasas de supervivencia.

Las Figuras 30A y 30B muestran la eficacia de una inmunización de una dosis de rPIV5-RV-G frente a la exposición a la rabia en ratones. Se inmunizaron grupos de ratones ($n = 10$, cada grupo) por vía intranasal con el virus rPIV5-RV-G diluido 10 veces (de 10^5 ufp a 10^7 ufp) o se vacunaron por vía intramuscular con el virus rPIV5-RV-G (de 10^6 ufp a 10^8 ufp). Los ratones de control se inocularon con 10^6 ufp de PIV5. Tres semanas después, todos los ratones de cada grupo fueron expuestos a una DL_{50} de 50 de la cepa CVS-24 por vía i.c. La Fig. 30A es una prueba de VNA. Se recogieron muestras de suero antes de la exposición y se usaron para medir el título de VNA contra el virus de la rabia mediante RFFIT. Los títulos de VNA entre 10^7 y 10^6 ufp por vía intranasal (IN), de 10^7 ufp y 10^6 ufp por vía intramuscular (IM) son estadísticamente significativos (los valores de p son de 0,018 y 0,008 respectivamente). Los títulos de VNA entre 10^6 y 10^5 ufp por vía intranasal (IN), entre 10^7 y 10^8 ufp IM no son estadísticamente diferentes (los valores de p son 0,11 y 0,402 respectivamente). La Fig. 30B muestra las tasas de supervivencia. Se observaron los animales infectados diariamente durante 22 días para detectar signos clínicos de rabia.

Las Figuras 31A y 31B muestran la eficacia de la inmunización oral de exposición a la rabia contra rPIV5-RV-G en ratones. Se inmunizaron grupos de ratones ($n = 10$, cada grupo) por vía intranasal con una dosis de 10^6 ufp de rPIV5-RV-G, o se vacunaron con 10^8 ufp del virus rPIV5-RV-G por vía intramuscular u oral. Como control positivo, se inmunizó un grupo de ratones por vía intramuscular con 1×10^7 ufp de la cepa de vacuna contra la rabia LBNSE. Los ratones de control se inocularon con 10^6 ufp de PIV5 o con PBS. Tres semanas después, todos los ratones de cada grupo fueron expuestos a una DL_{50} de 50 de la cepa CVS-24 por vía i.c. La Fig. 31A es una prueba de VNA. Se recogieron muestras de suero antes de la exposición y se usaron para medir el título de VNA contra el virus de la rabia mediante RFFIT. Los títulos de VNA entre IN (10^6 ufp) e IM (10^8 ufp) no son estadísticamente diferentes (el valor de p es de 0,66, calculado usando la prueba t de Student). Los títulos de VNA entre la vía oral y IN o IM son estadísticamente significativos (los valores de p son de 0,03 y 0,003 respectivamente). La Fig. 31B muestra las tasas de supervivencia. Se observaron los animales infectados diariamente durante 22 días para detectar signos clínicos de rabia.

La Figura 32 muestra los títulos de anticuerpos antigripales de pollos inoculados con PIV5-H5 a través la vía *in ovo*. Se vacunaron embriones de SPF de 18 días de vida *in ovo* usando 100 μ l de PIV5-H5 (los títulos se muestran debajo de cada grupo). Se sangraron los pollos el día 14 y 28 después de la eclosión (de). Los títulos de inhibición de la hemaglutinación (HI) se determinaron siguiendo las recomendaciones de la OIE. El eje Y es de títulos HI en $\log_2$. En las columnas, se muestran las titulaciones medias de 12 pollos (10 pollos para los controles) y las desviaciones típicas apropiadas. El título de HI de cada pollo de contacto no vacunado y mezclado se encuentra por sobre la columna correspondiente.

La Figura 33 muestra esquemas de PIV5 recombinante que expresa HA de H5N1. PIV5-H5 (ZL48) tiene inserción de H5 entre los genes HN y L de PIV5. PIV5 Δ SH-H5 carece del gen SH. PIV5 Δ C-H5 carece del extremo C conservado de la proteína V. Se han obtenido dos aislamientos diferentes de este virus y se analizarán. La eliminación de SH y la eliminación del extremo C conservado se han combinado para crear PIV5 Δ C Δ SH-H5. La eliminación de SH o de Δ C causa atenuación en ratones.

Las Figuras 34A-34D muestran que PIV5-H5 incorpora HA en el virión y expresa H5 durante la infección. La Figura 34A es un esquema que muestra el genoma de ZL48 y ZL48. que indica la ubicación de la inserción del gen H5HA. En la Fig. 34B, se infectaron células MDBK con PIV5, ZL48 o ZL46 ($Mdl = 0,1$) durante 72 horas, y se recogieron los sobrenadantes y se compararon con sobrenadantes purificados separados en gel de SDS-PAGE y se tomaron imágenes mediante tinción con azul de Coomassie. En la Fig. 34C, se infectaron células MDBK con PIV5, se lisaron ZL48 o ZL46 ($Mdl = 5$) 24 horas después, se separaron en gel SDS-PAGE, se transfirieron a PVDF y se transfirieron con un anticuerpo monoclonal específico para las proteínas V/P de PIV5 y suero hiperinmunizante de ratones infectados con rgA/VN-PR8 a dcltct HA. Tamaños de arco en kDa. En la Fig. 34D, las células Vero se infectaron con PIV5 o ZL46, o se infectaron de forma simulada. A las 24 h después de la infección, las células se fijaron y se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-H5 y anti-V/P. Se tomaron micrografías inmunofluorescentes con 20 aumentos (barra, 200 μ m).

Las Figuras 35A-35E muestran que la inmunización con PIV5-H5 vivo induce respuestas inmunitarias específicas de la HA. Se inmunizaron ratones BALB/c ($n = 5$ por grupo) con PIV5 por vía IN, ZL46 por vía IN o IM, ZL46 inactivado IM (iZL46) o A/VN/1203/04 inactivado (iA/VN/1203/04) IM. Los ratones se sangraron los días 7, 14 y 21 después de la inmunización. El suero se combinó para su análisis. En la Fig. 35A, se midieron los títulos de anticuerpos específicos de HA (H5) en muestras de suero usando un ELISA específico de IgG (H&L). La línea de puntos representa el límite de detección. La Fig. 35B muestra los títulos de anticuerpos neutralizantes de A/VN-PR8 en suero después de la inmunización. Los ratones fueron inmunizados IN o IM con PIV5, ZL46, o una dosis subletal de rgA/VN-PR8, y se realizaron lavados nasales (Fig. 35C) y lavados alveolares bronquiales (BAL) (Fig. 35D) en los días 14 o 21 después de la infección. Las muestras se agruparon para el análisis mediante ELISA de IgG específico de HA. La Fig. 35E muestra los linfocitos productores de IFN- γ (grupos de $n = 3$ ratones por grupo) en los ganglios linfáticos mediastínicos el día 12 después de la vacunación según lo determinado por el análisis ELISpot. Los datos se presentan como la media $\pm$ ETM.

Las Figuras 36A-36C muestran que la inmunización con PIV5-H5 vivo protege contra la exposición a HPAI. Los ratones BALB/c fueron inmunizados IN o IM con PIV5, rPIV5-H5 (ZL46), rPIV5-H5 (iZL46) inactivado IM, una dosis subletal de rgA/VN-PR8 por vía intranasal o rgA/VN-PR8 IM. Veintiocho días después de la infección, los ratones

fueron desafiados por vía intranasal con un DL₅₀ de 10 de A/VN/1203/04. En la Fig. 36A, se controlaron los pesos de los ratones y se presentaron como el porcentaje medio $\pm$ ETM de sus pesos corporales antes de la exposición (n = 8). La Figura 36 muestra el porcentaje de ratones que sobreviven después de la exposición. La Fig. 36C muestra el título del virus de exposición en los pulmones el día 3 posterior a la exposición (n = 5 por grupo), medido según la DICT₅₀ en células MDCK. Los datos se presentan como la DICT₅₀ con transformación logarítmica media/ml de homogeneizado pulmonar $\pm$ ETM. El límite de detección fue de DICT₅₀ de 100/ ml.

Las Figuras 37A-37C muestran que el refuerzo con PIV5-H5 potencia las respuestas de anticuerpos específicas de HA. Se inmunizaron ratones BALB/c (n = 5 por grupo) con PIV5 por vía IN, ZL46 por vía IN o IM, ZL46 inactivado por vía intramuscular (iZL46) o A/VN/1203/04 inactivado por vía intramuscular (iA/VN/1203/04). Los ratones se sangraron los días 7, 14 y 21 después de la inmunización. En el día 28 después de la inmunización, Los ratones se reforzaron como antes y el suero se recogió los días 7 y 14 después del refuerzo. El suero se combinó para su análisis. En la Fig. 37A, se midieron los títulos de anticuerpos específicos de HA (H5) en muestras de suero usando un ELISA específico de IgG. La línea de puntos representa el límite de detección. La Fig. 37B muestra los títulos de anticuerpos neutralizantes de rgA/VN-PR8 en suero tras la inmunización. Se expusieron los ratones a rgA/VN-PR8 y se midieron los títulos víricos en los pulmones el día 3 después de la exposición (n = 5 por grupo), según lo medido por la DICT₅₀ en células MDCK. Los datos se presentan como la DICT₅₀ con transformación logarítmica media/ml de homogeneizado pulmonar $\pm$ ETM. El límite de detección fue de DICT₅₀ de 100/ ml. En la Fig. 38C, se expusieron los ratones a rgA/VN-PR8, y se midieron los títulos víricos en los pulmones el día 3 después de la exposición (n = 5 por grupo) según la DICT₅₀).

La Figura 38 es un esquema de los virus PIV5-NP. El genoma de PIV5 contiene siete genes en el orden de 3'-NP-V/PMF-SH-HN-L-5 'con regiones líder y remolque ubicadas en los extremos del genoma. Se insertó el gen H5N1-NP en el genoma de PIV5 en las uniones genéticas indicadas.

Las Figuras 39A y 39B muestran el crecimiento de PIV5 y PIV5-NP-HN/I *in vitro* e *in vivo*. La Fig. 39A muestra curvas de crecimiento de múltiples etapas de PIV5 y PIV5-NP-HN/I en células de cultivo tisular. Las células MDBK se infectaron con PIV5 o PIV5-NP-HN/I a una Mdl de 0,1 y los medios se recogieron en intervalos de 24 h. Los títulos víricos se determinaron mediante un ensayo de placa en células BHK. En la Fig. 39B, los ratones fueron vacunados con 10⁵ ufp de PIV5 o PIV5-NP-HN/I por vía intranasal. Los ratones fueron sacrificados el día 3 después de la vacunación para determinar los títulos víricos pulmonares.

La Figura 40 muestra los niveles de anticuerpos NP en ratones inducidos por PIV5-NP-HN/I. Los ratones fueron vacunados con 10⁶ ufp de PIV5, PIV5-NP-HN/I o 10⁵ ufp de X31 por vía intranasal. El día 21 después de la vacunación, se recogieron muestras de sangre y se prepararon sueros. El ELISA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (KPL, Inc) usando H5N1-NP purificado.

La Figura 41 muestra la respuesta de los linfocitos T en ratones inducida por PIV5-NP-HN/I. Los ratones fueron vacunados con PBS, 10⁷ ufp de PIV5, PIV5-NP-HN/I o DL₅₀ de 0,1 de PR8 por vía intranasal (n = 5 por grupo). El día 21 después de la vacunación, se sacrificaron los ratones y se recogieron los bazos. Se volvieron a estimular los esplenocitos con Flu-NP, GP P2 del Ébola como control negativo o PMA/ionomicina como control positivo. Los resultados se presentan como el número medio de células secretoras de citocinas por 10⁶ esplenocitos.

Las Figuras 42A-42C muestran la protección de PIV5-NP-14N/I contra la exposición a H1N1. Los ratones fueron vacunados con PBS, 10⁶ ufp de PIV5, PIV5-NP-HN/I o 10⁵ ufp de X31 por vía intranasal (n = 10 por grupo). El día 21 después de la vacunación, se expusieron los ratones a DL₅₀ de 10 de A/PR/8/34 (H1N1). La pérdida de peso (Fig. 42A) y la supervivencia (Fig. 42B) se controlaron diariamente durante los 14 días siguientes a la exposición. La pérdida de peso se presenta como el porcentaje medio del peso original (el día de la exposición). La Fig. 42C muestra los títulos en los pulmones de ratones expuestos a H1N1. Los ratones (n = 5) se sacrificaron 3 días después de la exposición. Los títulos se determinaron usando el ensayo de DICT₅₀ con células MDCK.

Las Figuras 43A y 43B muestran la protección de PIV5-NP-HN/I contra la exposición a HPAI H5N1. Los ratones fueron vacunados con PBS, 10⁷ ufp de PIV5 o PIV5-NP-HN/I (n = 10 por grupo). El día 21 después de la vacunación, los ratones se expusieron a una DL₅₀ de 10 de HPAI de H5N1. La pérdida de peso (Fig. 43A) y la supervivencia (Fig. 43B) se controlaron durante los 16 días posteriores a la exposición al virus de la gripe.

Las Figuras 44A-44C muestran un análisis de PIV5 recombinante que expresa NP. La Fig. 44A muestra curvas de crecimiento de múltiples etapas de los virus PIV5 y PIV5-NP. Las células MDBK se infectaron con virus PIV5 o PIV5-NP a una Mdl de 0,1 y los medios se recogieron en intervalos de 24 horas. Los títulos de virus se determinaron mediante un ensayo de placa usando células BHK. La Fig. 44B muestra los niveles de expresión de H5N1-NP en células infectadas con el virus PIV5-NP. Las células MDBK se infectaron con virus PIV5 o PIV5-NP a una Mdl de 5. Las proporciones de MFI de H5 NP con respecto a PIV5-VP se examinaron mediante citometría de flujo. La Fig. 44C muestra el crecimiento de los virus PIV5 y PIV5-NP *in vivo*. Los ratones se vacunaron con 10⁵ ufp de virus PIV5 o PIV5-NP por vía intranasal. Los ratones fueron sacrificados el día 3 después de la vacunación para determinar los títulos víricos pulmonares.

La Figura 45 muestra que el virus PIV5-NP genera respuestas de linfocitos T. Los ratones fueron vacunados con PBS, 10⁷ ufp de los virus PIV5 o PIV5-NP, o DL₅₀ de 0,1 de PR8 por vía intranasal (n = 5 por grupo). El día 21 después de la vacunación, se sacrificaron los ratones y se recogieron los bazos. Se volvieron a estimular los esplenocitos con Flu-NP, Ébola GP P2 o PMA/ionomicina. Los resultados se presentan como el número medio de células secretoras de citocinas por 10⁶ esplenocitos.

Las Figuras 46A y 46B muestran la protección de los virus PIV5-NP contra la exposición a HPAI H5N1. Los ratones fueron vacunados con PBS, 10⁷ ufp de los virus PIV5 o PIV5-NP, o 2.000 ufp de rgA/VN-PR8 por vía intranasal (n = 10 por grupo). El día 21 después de la vacunación, los ratones se expusieron a una DL₅₀ de 20 de HPAI de H5N1. La pérdida de peso (Fig. 46A) y la supervivencia (Fig. 46B) se controlaron durante los 14 días posteriores a

la exposición al virus de la gripe. La pérdida de peso se representa como el porcentaje medio del peso original (el día de la exposición).

Las Figuras 47A y 47B muestran esquemas de PIV5 recombinante que expresan antígenos H5N1. En la Fig. 47A, el sitio de inserción predeterminado dentro del genoma de PIV5 es la unión entre los genes HN y L. Para la inserción que no está entre el gen HN y L, La unión de genes se añade al final del virus recombinante. Por ejemplo, La inserción de H5 entre el gen SH y HN es rPIV5-H5-SH-HN. Los genes insertados estaban flanqueados con el inicio del gen, el fin de gen y secuencias de unión de PIV5 que son necesarias para la transcripción. En la Figura 47B, El sitio de inserción predeterminado dentro del genoma de PIV5 es la unión entre el gen SH y el gen HN. Para probar los efectos de la mutación P-S308A en la vacuna, Los genes se insertarán en la unión entre los genes HN y L para tener el menor impacto en la expresión de genes víricos.

La Figura 48 muestra esquemas de antígenos del virus de la rabia que expresan PIV5 recombinante que se generarán. Si bien el sitio de inserción predeterminado para los estudios iniciales dentro del genoma de PIV5 es la unión entre los genes HN y L, También se usarán sitios de inserción adicionales.

Las Figuras 49A-49H muestran esquemas de varias construcciones de antígenos OPIV5. La Figura 49A muestra esquemas de PIV5 que expresan los antígenos F y G del VSR. La Figura 49B muestra esquemas de PIV5 que expresan antígenos F y G del virus Nipah. La Figura 49C muestra esquemas de PIV5 que expresan los antígenos 85A, 85B y ESAT6 de *Micobacterias Tuberculosis*. La Fig. 49D muestra esquemas de PIV5 que expresan antígenos del PRRSV. La Fig. 49E muestra esquemas de PIV5 que expresan antígenos del circovirus porcino (PCV2). La Fig. 49F muestra esquemas de PIV5 que expresan el antígeno Ts de *T. cruzi*. La Fig. 49G muestra esquemas de PIV5 que expresan antígenos de Norovirus. La Fig. 49H muestra esquemas de PIV5 que expresan los antígenos Env del VIH (gp160, gp140 o gp120 y Gag).

Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

El alcance de la invención está definido únicamente por las reivindicaciones adjuntas. El virus paragripal 5 (PIV5), un virus de ARN de cadena negativa, es miembro del género *Rubulavirus* de la familia *Paramyxoviridae* que incluye muchos patógenos humanos y animales importantes tales como el virus de las paperas, virus paragripal humano de tipo 2 y tipo 4, virus de la enfermedad de Newcastle; virus de Sendai, HPIV3, virus del sarampión, virus del moquillo canino, virus de la peste bovina y virus sincitial respiratorio. El PIV5 se conocía antes como el Virus-5 de simio (SV5). Aunque el PIV5 es un virus que infecta a muchos animales y a los seres humanos, no se han asociado síntomas ni enfermedades conocidas en seres humanos con el PIV5. A diferencia de la mayoría de los paramyxovirus, el PIV5 infecta células normales con poco efecto citopático. Como un virus de ARN de cadena negativa, el genoma de PIV5 es muy estable. Como el PIV5 no tiene una fase de ADN en su ciclo de vida y se replica únicamente en el citoplasma, el PIV5 no puede integrarse en el genoma del hospedador. Por lo tanto, el uso de PIV5 como vector evita posibles consecuencias involuntarias de modificaciones genéticas de los ADN de las células hospedadoras. El PIV5 puede crecer hasta altos títulos en las células, incluyendo las células Vero que han sido aprobadas para la producción de vacunas por la OMS y la FDA. Por lo tanto, el PIV5 presenta muchas ventajas como vector vacunal.

La presente descripción proporciona construcciones de PIV5 e identifica mutaciones dentro del genoma de PIV5 que mejoran la eficacia de PIV5 como un vector de expresión vírico, incluyendo los usos como un vector vacunal mejorado. Un vector vacunal de la presente invención puede basarse en cualquiera de una variedad de cepas de tipo silvestre, mutantes o recombinantes (rPIV5). Las cepas de tipo silvestre incluyen, aunque sin limitación, las cepas del PIV5 W3A, WR (Número ATCC® VR-288™), la cepa 78-238 del virus paragripal canino (número ATC VR-1573) (Evermann *et al.*, 1980, *J Am Vet Med Assoc*; 177:1132-1134; y Evermann *et al.* 1981, *Arch Virol*; 68: 165-172), cepa D008 del virus paragripal canino (número ATC VR-399) (Binn *et al.*, 1967, *Proc Soc Exp Biol Med*; 126:140-145), MIL, DEN, LN, MEL, criptovirus, CPI+, CPI-, H221, 78524, T1 y SER. Véase, por ejemplo, Chatziandreou *et al.*, 2004, *J Gen Virol*; 85(Pt 10):3007-16; Choppin, 1964, *Virology*; 23:224-233; y Baumgartner *et al.*, 1987, *Intervirology*; 27:218-223. Además, se pueden usar cepas del PIV5 usadas en vacunas comerciales contra la tos de las perreras, tales como, por ejemplo, vacunas de BI, FD, Merck y Merial.

Se puede construir un vector vacunal de PIV5 usando cualquiera de una variedad de métodos, incluyendo, pero sin limitación, El sistema de genética inversa descrito con más detalle en He *et al.* (*Virology*; 237(2):249-60, 1997). La Fig. 1 muestra la estructura del genoma de PIV5. PIV5 codifica ocho proteínas víricas. La proteína nucleocápside (NP), la fosfoproteína (P) y la proteína grande de la ARN polimerasa (L) son importantes para la transcripción y la replicación del genoma del ARN vírico. La proteína V desempeña un papel importante en la patogénesis vírica, así como en la síntesis del ARN vírico. La proteína de fusión (F), una glicoproteína, media la fusión de célula a célula y de virus a célula de una manera independiente del pH que es esencial para la entrada del virus en las células. Se determinaron las estructuras de la proteína F y se identificaron restos de aminoácidos fundamentales para una fusión eficaz. La hemaglutinina-neuraminidasa (HN), otra glicoproteína vírica, también participa en la entrada y liberación del virus desde las células hospedadoras. La proteína de la matriz (M) desempeña un papel importante en el ensamblaje y la gemación del virus. La proteína hidrófoba (SH) es una proteína de membrana integral hidrófoba de 44 restos y está orientada en membranas con su extremo N en el citoplasma. Para revisiones de la biología molecular de los paramyxovirus, véase, por ejemplo, Whelan *et al.*, 2004, *Curr Top Microbiol Immunol*; 283:61-119; y Lamb y Parks, (2006). "Paramyxoviridae: the viruses and their replication". En *Fields Virology*, 5ª edición, pág. 1449-1496. Editado por D. M. Knipe y P. M. Howley. Filadelfia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. Una vacuna vírica de PIV5 de la presente invención también puede tener una mutación, alteración o eliminación en una o más de estas ocho proteínas.

El PIV5 puede infectar a seres humanos (Hsiung *et al.*, 1965, *J Immunol.*, 94: 67-73), pero no se ha asociado con ninguna enfermedad conocida. El PIV5 infecta ratones y hámsters, pero no causa ningún síntoma en los animales. El PIV5 puede cultivarse en células y liberarse a los medios a un título de hasta 1×10^8 ufp/ml, indicando su potencial como vector de administración de genes seguro y una posible forma rentable para la producción en masa del virus. Todas las pruebas hasta la fecha indican que el PIV5 no es un virus de simio. No hay evidencia convincente de que el PIV5 cause enfermedades en los seres humanos, a pesar de la especulación completamente infundada de la década de los 70 del siglo pasado de que el PIV5 podría estar asociado con una serie de enfermedades que incluyen la esclerosis múltiple (EM), panencefalitis esclerosante subaguda (SSPE), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), pénfigo, aterosclerosis enfermedad de Paget, hepatitis y resfriado común. Estudios posteriores han descartado que el PIV5 sea el agente etiológico para cualquiera de estas enfermedades. El virus pasó a denominarse virus paragripal 5 (PIV5) en 2009.

El PIV5, un virus de ARN monocatenario no segmentado negativo (NNSV), es un buen vector vírico candidato para el desarrollo de vacunas, porque no tiene una fase de ADN en su ciclo de vida y, por lo tanto, se evitan las posibles consecuencias no deseadas de las modificaciones genéticas del ADN de la célula hospedadora mediante la recombinación o la inserción. En comparación con los virus de ARN de cadena positiva, la estructura del genoma del PIV5 es estable. Se ha generado un PIV5 recombinante que expresa la proteína de fluorescencia verde (GFP), y el gen GFP se mantuvo durante más de 10 generaciones. Por lo tanto, el PIV5 es más adecuado como vector vacunal que los virus de ARN de cadena positiva, ya que los genomas de los virus de ARN de cadena positiva se recombinan y, a menudo, eliminan rápidamente los genes foráneos insertados. Asimismo, el PIV5 infecta una gran variedad de tipos de células, incluyendo las células humanas primarias, así como las estirpes celulares humanas establecidas. Dada la posibilidad de reactividad cruzada del antígeno PIV5 con anticuerpos contra el HPIV2 y el virus de las paperas, puede ser problemático usar el PIV5 como vector vacunal. Sin embargo, dado que, en los ratones, los anticuerpos neutralizantes contra el PIV5 no previenen la infección por PIV5 (Young *et al.*, 1990, *J Virol*; 64 (11): 5403-11), es poco probable que el anticuerpo de reacción cruzada contra el PIV5 en los seres humanos prevenga la infección por PIV5. El Ejemplo 2 es la primera demostración de que el vector basado en el PIV5 puede ser eficaz en perros, incluyendo perros con títulos circulantes de anticuerpos anti-PIV5.

De acuerdo con la invención, la secuencia de nucleótidos heteróloga puede insertarse entre el gen de la proteína hidrófoba pequeña (SH) y el gen de la hemaglutinina-neuroaminidasa (HN) del genoma de PIV5.

La presente invención incluye construcciones de vacunas de PIV5 con una secuencia de nucleótidos heteróloga insertada en una ubicación como se muestra en cualquiera de las figuras y ejemplos incluidos en el presente documento.

Se puede insertar una secuencia de nucleótidos heteróloga para reemplazar todo o parte de un gen PIV5 dentro del genoma de PIV5. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos heteróloga puede reemplazar el gen F, HN o SH del genoma de PIV5. En algunas realizaciones, una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica, por ejemplo, HA o NA de la gripe puede reemplazar un gen PIV5. En algunas realizaciones, el gen HA o NA de la gripe puede reemplazar una porción del gen F o HN del PIV5.

Se puede insertar una secuencia de nucleótidos heteróloga dentro de un gen PIV5, dando lugar a la expresión de un polipéptido quimérico. Por ejemplo, se puede insertar la secuencia de nucleótidos heteróloga dentro de la secuencia de nucleótidos del gen SH, dentro de la secuencia de nucleótidos del gen NP, dentro de la secuencia de nucleótidos del gen V/P, dentro de la secuencia de nucleótidos del gen M, dentro de la secuencia de nucleótidos del gen F, dentro de la secuencia de nucleótidos del gen HN y/o dentro de la secuencia de nucleótidos del gen L de un genoma de PIV5.

El PIV5 puede infectar células de manera productiva con poco efecto citopático (CPE) en muchos tipos de células. En algunos tipos de células, la infección por PIV5 causa la formación de sincitios, es decir, la fusión de muchas células juntas, lo que provoca la muerte celular. Una mutación puede incluir una o más mutaciones que potencien la formación de sincitios (véase, por ejemplo, Paterson *et al.*, 2000, *Virology*; 270:17-30).

La infección por PIV5 no induce la apoptosis (He *et al.*, 2001, *J Virol*; 75:4068-4079. Sin embargo, el PIV5 recombinante que carece de SH (rPIV5 ΔSH) induce apoptosis en células L929 a través de una vía apoptótica extrínseca mediada por el factor de necrosis tumoral (TNF)-γ (He *et al.*, 2001, *J Virol*; 75:4068-4079; He *et al.*, 1998, *Virology*; 250:30-40; y Lin *et al.*, 2003, *J Virol*; 77: 3371-3383).

La proteína V de PIV5 desempeña un papel fundamental en el bloqueo de la apoptosis inducida por el virus. El PIV5 recombinante que carece del extremo C rico en cisteína conservado (rPIV5V ΔC) de la proteína V induce la apoptosis en una variedad de células a través de una vía apoptótica intrínseca, probablemente iniciada a través del estrés en el retículo endoplásmico (RE) (Sun *et al.*, 2004, *J Virol*; 78: 5068-5078). El PIV5 recombinante mutante con mutaciones en el extremo N de los productos del gen V/P, tales como rPIV5-CPI-, también inducen la apoptosis (Wansley y Parks, 2002, *J Virol*; 76: 10109-10121). Una mutación incluye, pero sin limitación, rPIV5 ΔSH, rPIV5-CPI-, rPIV5VΔC y combinaciones de las mismas.

Una mutación incluye, pero sin limitación, una mutación del gen V/P, una mutación del extremo N compartido de las proteínas V y P, una mutación de los restos 26, 32, 33, 50, 102 y/o 157 del extremo N compartido de las proteínas V y P, una mutación que carece del extremo C de la proteína V, una mutación que carece de la proteína hidrófoba pequeña (SH), una mutación de la proteína de fusión (F), una mutación de la fosfoproteína (P), una mutación de la proteína ARN polimerasa grande (L), una mutación que incorpora restos del virus paragripal canino y/o una mutación que potencia la formación sincitial.

Una mutación puede incluir, pero sin limitación, rPIV5-V/P-CPI-, rPIV5-CPI-, rPIV5-CPI+, rPIV5V Δ C, rPIV-Rev, rPIV5-RL, rPIV5-P-SI57A, rPIV5-P-S308A, rPIV5-L-A1981D y rPIV5-F-S443P, rPIV5-MDA7, rPIV5 Δ SH-CPI-, rPIV5 Δ SH-Rev, y combinaciones de los mismos.

Una vacuna de PIV5 de la presente invención incluye una construcción de PIV5 recombinante que incluye una o más de las mutaciones descritas en el presente documento, incluyendo una o más de las construcciones descritas en las figuras y los ejemplos que se incluyen en el presente documento.

Un vector de expresión vírico de PIV5 de la presente invención incluye una secuencia de nucleótidos heteróloga que incluye hemaglutinina gripal (HA).

De acuerdo con la invención, el polipéptido heterólogo es de un virus de la gripe, incluyendo, pero sin limitación, gripe A, gripe B o gripe C. La gripe es un virus de ARN segmentado, de sentido negativo, de la familia *Orthomyxoviridae*. Se clasifica en subtipos basados en las principales glicoproteínas de superficie antigénica, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Hasta la fecha, hay 17 subtipos diferentes de HA y 9 subtipos diferentes de NA, conteniendo todos ellos segmentos de origen aviar. La gripe tiene la capacidad de recombinarse, mediante lo que los segmentos génicos se intercambian creando un nuevo virus de la gripe para el que la población no ha recibido tratamiento inmunológico previo. Un polipéptido heterólogo puede ser una hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), proteína de la nucleocápside (NP), M1, M2, PA, PB1, PB2, NS1 o NS2 de un virus de la gripe. HA, NA, NP, M1, M2, PA, PB1, PB2, NS1 o NS2 puede ser, por ejemplo, de la cepa del virus de la gripe A H5N1, H3N2 o H1N1.

HA puede ser de, por ejemplo, la gripe A de subtipo H1, gripe A de subtipo H2, gripe A de subtipo H3, gripe A de subtipo H4, gripe A de subtipo H5, gripe A de subtipo H6, gripe A de subtipo H7, gripe A de subtipo H8, gripe A de subtipo H9, gripe A de subtipo H10, gripe A de subtipo H11, gripe A de subtipo H12, gripe A de subtipo H13, gripe A de subtipo H14, gripe A de subtipo H15 o gripe A de subtipo H16. HA puede ser, por ejemplo, de la cepa del virus de la gripe A H5N1, H3N2 o H1N1. En algunos aspectos, el polipéptido HA puede incluir una mutación para prevenir la escisión.

NA puede ser de por ejemplo, la gripe A de subtipo N1, la gripe A de subtipo N2, la gripe A de subtipo N3, la gripe A de subtipo N4, la gripe A de subtipo N5, la gripe A de subtipo N6, la gripe A de subtipo N7, gripe A de subtipo N8 o gripe A de subtipo N9. NA puede ser, por ejemplo, de la cepa del virus de la gripe A H5N1, H3N2 o H1N1.

Un vector de expresión vírico de PIV5, como se describe en el presente documento, puede demostrar una mayor eficacia del vector vacunal.

Un vector de expresión vírico de PIV5 puede incluir una o más mutaciones, incluyendo, pero sin limitación, cualquiera de las descritas en el presente documento. En algunos aspectos, una combinación de dos o más (dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más) mutaciones pueden ser ventajosas y pueden demostrar una actividad mejorada.

Anteriormente, para probar la viabilidad de usar PIV5 como un vector vacunal vivo, se insertó el gen de hemaglutinina (HA) de la cepa A/Udm/72 (H3N2) del virus de la gripe A en el genoma de PIV5 como un gen adicional entre el gen de la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y el gen de la polimerasa grande (L). Se recuperó el PIV5 recombinante que contenía el gen HA de Udm (rPIV5-H3) y se replicó de manera similar al PIV5 de tipo silvestre, tanto *in vitro* como *in vivo*. La proteína HA expresada por las células infectadas con rPIV5-H3 se incorporó en los viriones y la adición del gen HA no aumentó la virulencia del virus en ratones. Se examinó la eficacia de rPIV5-H3 como una vacuna viva, y una inoculación de una sola dosis proporciona una inmunidad amplia y considerable contra la infección por el virus de la gripe A (Tompkins *et al.*, 2007, *Virology*; 362(1):139-50).

Thompkins *et al.*, *Virology*, vol. 362, 23 de enero de 2007 (2007-1-23) páginas 139-150, Desvela una construcción de PIV5 en la que se inserta el gen de la hemaglutinina de la gripe (HA) entre los genes HN y L de PIV5. En consecuencia, la presente invención no incluye la construcción vírica de PIV5 de Tompkins *et al.* 2007, *Virology*; 362 (1):139-50. Por ejemplo, en algunos aspectos, la presente invención no incluye una construcción de vector vírico de PIV5 que expresa el gen de la hemaglutinina (HA) de la cepa A/Udm/72 (H3N2) del virus de la gripe A. Por ejemplo, en algunos aspectos, la presente invención no incluye una construcción de vector vírico de PIV5 que expresa el gen de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe A H3N2. Por ejemplo, en algunos aspectos, la presente invención no incluye una construcción de vector vírico de PIV5 que expresa el gen de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe A. Por ejemplo, en algunos aspectos, la presente invención no incluye rPIV5-HA. Por ejemplo, en algunos aspectos, la presente invención no incluye una construcción de vector vírico de PIV5 que expresa el gen de hemaglutinina (HA) de la cepa A/Udm/72 (H3N2) del virus de la gripe A insertado en el genoma de PIV5 como un gen adicional entre el gen

de la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y el gen de la polimerasa grande (L). Por ejemplo, en algunos aspectos, la presente invención no incluye una construcción de vector vírico de PIV5 que expresa el gen de la hemaglutinina (HA) de la cepa H3N2 del virus de la gripe A insertado en el genoma de PIV5 como un gen adicional entre el gen de la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y el gen de la polimerasa grande (L). Por ejemplo, en algunos aspectos, la presente invención no incluye una construcción de vector vírico de PIV5 que expresa un gen de la hemaglutinina (HA) de la gripe A insertado en el genoma de PIV5 como un gen adicional entre el gen de la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y el gen de la polimerasa grande (L). Por ejemplo, en algunos aspectos, la presente invención no incluye una construcción de vector vírico de PIV5 que expresa un polipéptido insertado en el genoma de PIV5 como un gen adicional entre el gen de la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y el gen de la polimerasa grande (L). Por ejemplo, en algunos aspectos, la presente invención no incluye métodos para fabricar o usar una o más de las construcciones de vector vírico de PIV5 descritas en el presente párrafo.

Además, en algunos aspectos, la presente invención no incluye una construcción de vector vírico de PIV5 que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). En algunos aspectos, la presente invención no incluye una construcción de vector vírico de PIV5 que expresa un marcador detectable.

Si bien se ha demostrado previamente que el PIV5 que expresa HA del virus de la gripe proporciona inmunidad, la presente invención demuestra inesperadamente que un vector vírico basado en PIV5 da lugar a la generación de niveles protectores de inmunidad con la expresión de las proteínas NA y NP de la gripe. La HA es muy inmunogénica, y muchos vectores son capaces de generar inmunidad anti-HA. Sin embargo, a partir de una demostración de que un vector de expresión dado genera la expresión e inmunidad hacia HA, no se puede suponer que el mismo vector será útil para expresar y generar una respuesta inmunitaria a otras proteínas, tales como, por ejemplo, NA o NP del virus de la gripe. Esto se demuestra mediante el trabajo tanto con los vectores del virus adenovírico (AdV) como de la enfermedad de New Castle (NDV). Aunque ambos vectores pueden expresar HA para la generación de inmunidad, no generan inmunidad cuando se usan para expresar NA o NP. Que los vectores víricos de PIV5, como se describe en el presente documento dieran lugar a la generación de inmunidad protectora es algo nuevo e inesperado.

En algunos aspectos, un vector de expresión vírico de la presente invención es multivalente, expresando polipéptidos heterólogos de más de una fuente, por ejemplo, de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más fuentes.

También se incluyen en la presente invención viriones y partículas víricas infecciosas que incluyen un genoma de PIV5 que incluye una o más secuencias de nucleótidos heterólogas que expresan un polipéptido heterólogo según lo definido en la reivindicación 1.

También se incluyen en la presente invención las composiciones que incluyen una o más de las construcciones víricas o viriones, como se describe en el presente documento. Dicha composición puede incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como de costumbre, un vehículo farmacéuticamente aceptable se refiere a una o más cargas, diluyentes o sustancias de encapsulación sólidos o líquidos compatibles que son adecuados para la administración a un ser humano u otro animal vertebrado. Dicho vehículo puede estar libre de pirógenos. La presente invención también incluye métodos para fabricar y usar los vectores víricos y las composiciones que se describen en el presente documento.

Las composiciones de la presente divulgación pueden formularse en preparados farmacéuticos en una variedad de formas adaptadas a la vía de administración escogida. Un experto entenderá que la composición variará dependiendo del modo de administración y de la unidad de dosificación.

Los agentes de la presente invención se pueden administrar de una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitación, la administración intravenosa, tópica, oral, intranasal, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular e intratumoral. En algunos aspectos, los agentes de la presente invención pueden formularse para la liberación controlada o sostenida.

Como se muestra en los ejemplos incluidos en el presente documento, la inmunización intramuscular o intranasal con PIV5-H5 induce respuestas inmunitarias específicas de HA. Una ventaja de la inmunización intranasal es la posibilidad de inducir una respuesta inmunitaria de la mucosa. A diferencia del virus de la gripe, que, en general, se replica en las células epiteliales de las vías respiratorias o intestinales, PIV5 tiene el potencial de un tropismo celular más amplio. Esta característica lo convierte en un candidato atractivo para su uso como vacuna intramuscular viva. La inmunización intramuscular con PIV5-H5 induce fuertes respuestas de anticuerpos séricos neutralizantes y específicas de HA, en comparación con la inmunización intranasal. Por otra parte, proporciona una oportunidad para combinar esta vacuna con otras vacunas inyectables, así como una formulación de vacuna inyectable, que puede ser atractiva para aplicaciones agrícolas.

También se incluyen en la presente invención métodos para crear y usar vectores de expresión víricos de PIV5, incluyendo, pero sin limitación, cualquiera de los descritos en el presente documento.

Por ejemplo, la presente invención incluye métodos de expresión *in vitro* de un polipéptido heterólogo en una célula mediante contacto o infección de la célula con un vector de expresión vírico, partícula vírica o composición como se describe en el presente documento. La administración de un vector de expresión vírico de la invención a un sujeto

induce una respuesta inmunitaria en el sujeto. La respuesta inmunitaria puede incluir una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular. La respuesta inmunitaria puede mejorar una respuesta inmunitaria innata y/o adaptativa.

- 5 Por ejemplo, La presente invención incluye un vector de expresión vírico, una partícula vírica o una composición según lo descrito en el presente documento para el sujeto según lo definido en la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento o en la prevención de la infección por gripe.

10 Con la presente invención, se puede usar cualquiera de una variedad de modos de administración. Por ejemplo, la administración puede ser intravenosa, tópica, oral, intranasal, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, *in ovo* materna y similares. En algunos aspectos, La administración es en una superficie de la mucosa. Una vacuna puede administrarse mediante técnicas de administración masiva, tales como colocar la vacuna en agua potable o pulverizar el entorno de los animales. Cuando se administra por inyección, la composición inmunogénica o vacuna puede administrarse por vía parenteral. La administración parenteral incluye, por ejemplo, la administración por vía
15 intravenosa, subcutánea, intramuscular o inyección intraperitoneal.

El agente de la presente divulgación se puede administrar de una vez o puede dividirse en una serie de múltiples dosis para su administración en intervalos de tiempo. Por ejemplo, los agentes de la invención pueden administrarse repetidamente, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más veces, o se pueden administrar a través de infusión
20 continua. Se entiende que la dosis concreta y la duración del tratamiento son en función de la enfermedad que se esté tratando, y pueden determinarse de manera empírica usando protocolos de ensayo conocidos o mediante extrapolación a partir de datos de ensayos *in vivo* o *in vitro*. Cabe destacar que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar dependiendo de la gravedad de la afección que se vaya a aliviar. Además, hay que entender que, para cualquier sujeto concreto, las pautas posológicas específicas deben ajustarse con la etapa del
25 tiempo según las necesidades del individuo y del criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones y que cualquier intervalo de concentración expuesto en el presente documento es solo ilustrativo y no pretende limitar el alcance o la práctica de las composiciones reivindicadas.

En algunas realizaciones terapéuticas, una "cantidad eficaz" de un agente es una cantidad que da lugar a una
30 reducción de al menos un parámetro patológico. Por lo tanto, por ejemplo, en algunos aspectos de la presente divulgación, una cantidad eficaz es una cantidad que es eficaz para lograr una reducción de al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente el 20 % o al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 35 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 45 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos
35 aproximadamente un 55 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente el 90 % o al menos aproximadamente el 95 %, en comparación con la reducción esperada en el parámetro en un individuo no tratado con el agente.

40 En algunos aspectos, cualquiera de las construcciones y de los métodos basados en PIV5 descritos en la solicitud PCT PCT/US2013/022898, "PIV5 as an Oncolytic Agent," inventor Biao He, presentada el jueves 24 de enero de 2013.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" representa un organismo, incluyendo, por ejemplo, un mamífero. Un mamífero incluye, pero sin limitación, un ser humano, un primate no humano y otros vertebrados no
45 humanos. Un sujeto puede ser un "individuo" "paciente", u "hospedador". Los vertebrados no humanos incluyen animales de ganado (tales como, pero sin limitación, una vaca, un caballo, una cabra y un cerdo), una mascota doméstica o animal de compañía, tales como, pero sin limitación, un perro o un gato, y animales de laboratorio. Los sujetos no humanos también incluyen primates no humanos, así como roedores, tales como, pero sin limitación, una rata o un ratón. Los sujetos no humanos también incluyen, sin limitación, aves de corral, caballos, vacas, cerdos,
50 cabras, perros, gatos, cobayas, hámsteres, visones y conejos.

En alguna realización, una vacuna de PIV5 de la presente invención puede administrarse a aves de corral, y aunque las vacunas de acuerdo con la presente invención se pueden usar eficazmente en pollos, otras aves de corral, tales como, por ejemplo, pavos, gallina de Guinea, patos y perdices pueden ser inoculadas con éxito. Los pollos incluyen,
55 aunque sin limitación, gallinas gallos, pollos de engorde, pollos para asar, reproductores. descendencia de las gallinas reproductoras y ponedoras. La vacuna de la presente invención se puede administrar a aves de corral antes o después de la eclosión. Las aves de corral pueden recibir una vacuna a una variedad de edades. Por ejemplo, los pollos de engorde pueden ser vacunados *in ovo* con un día de vida, *in ovo*, o a las 2-3 semanas de vida. Se pueden vacunar las existencias de aves ponedoras y reproductoras, por ejemplo, aproximadamente a las 6-12 semanas de vida y reforzarse aproximadamente a las 16-20 semanas de vida. Dichas existencias de aves ponedoras y reproductoras puede vacunarse a las aproximadamente 6, a las aproximadamente 7, a las aproximadamente 8, a las aproximadamente 9, a las aproximadamente 10, a las aproximadamente 11 o a las aproximadamente 12 semanas de vida. Dichas existencias de aves ponedoras y reproductoras pueden recibir dosis de refuerzo a las aproximadamente 16, a las aproximadamente 17, a las aproximadamente 18, a las aproximadamente 19 o a las aproximadamente
65 20 semanas de vida. Con dicha vacuna PIV5, la vacuna puede expresar uno o más inmunógenos derivados de un patógeno infeccioso para las aves de corral. Dichos inmunógenos pueden derivarse de por ejemplo, el virus de la

enfermedad de Marek (MDV), el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), el virus del síndrome de caída de la postura (EDS), el virus de la rinotraqueitis del pavo (TRTV), el poxvirus o el reovirus.

5 Como se usa en el presente documento "*in vitro*" es en cultivo celular e "*in vivo*" es dentro del cuerpo de un sujeto. Como se usa en el presente documento, "aislado" se refiere al material que se ha retirado de su entorno natural (por ejemplo, del entorno natural si se produce de forma natural), producido mediante técnicas recombinantes, o sintetizado química o enzimáticamente, y por lo tanto, que está alterado "por la mano del ser humano" con respecto a su estado natural.

10 El término "y/o" significa uno o todos los elementos enumerados o una combinación de dos cualquiera o más de los elementos enumerados.

15 Los términos "preferente" y "preferentemente" se refieren a realizaciones de la invención que pueden proporcionar ciertos beneficios, en ciertas circunstancias. Sin embargo, también pueden ser preferentes otras realizaciones, en las mismas circunstancias u otras. Además, la mención de una o más realizaciones preferentes no implica que otras realizaciones no sean útiles y no pretende excluir otras realizaciones del alcance de la invención.

20 Los términos "comprende" y variaciones de los mismos no tienen un significado limitante cuando estos términos aparecen en la descripción y en las reivindicaciones.

Salvo que se especifique de otro modo, "un/uno", "una" "el", "la", y "al menos uno/a" se usan indistintamente y significan uno/a o más de uno/a.

25 A menos que se indique otra cosa, se comprende que todos los números que expresan cantidades de componentes, pesos moleculares y otros que se usan en la memoria descriptiva y reivindicaciones están previstos como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener mediante la presente invención. Como mínimo, y no en un intento de limitar la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos indicados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo habituales.

35 A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros que exponen el amplio alcance de la invención sean aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se indican de la forma más precisa posible. Todos los valores numéricos, sin embargo, contienen de forma inherente un intervalo que es necesariamente el resultado de la desviación típica que se encuentra en sus respectivas mediciones de ensayo.

40 Para cualquier método desvelado en el presente documento que incluya etapas diferenciadas, las etapas se pueden realizar en cualquier orden factible. Asimismo, según sea apropiado, Cualquier combinación de dos o más etapas puede llevarse a cabo simultáneamente.

45 La descripción ilustra realizaciones ilustrativas. En varios lugares a lo largo de la solicitud, se proporciona orientación a través de listas de ejemplos, ejemplos que pueden usarse en diversas combinaciones. En cada caso, la lista citada sirve solamente como grupo representativo y no debe interpretarse como una lista exclusiva.

Todos los encabezamientos son para la comodidad del lector y no deben usarse para limitar el significado del texto que sigue al encabezado. a menos que así se especifique.

50

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Virus paragripal (PIV5) como vector vacunal

Para comprobar si PIV5 que expresa HA del virus de la gripe puede proteger de la exposición a H5N1, una cepa de la gripe aviar altamente patógena letal H5N1 (HPAI) y la cepa más virulenta del virus de la gripe, se generó un PIV5 recombinante que expresaba HA de H5N1 (PIV5-H5) y se probó la eficacia del virus en animales. Como se muestra en las Fig. 2A-2D, la inoculación de una sola dosis de PIV5-H5 protegió de la exposición letal a H5N1, lo que demuestra que PIV5 es un excelente vector para el desarrollo de vacunas.

La NA del virus de la gripe es una diana potencialmente valiosa para el desarrollo de vacunas. Sin embargo, los esfuerzos por expresar NA como un antígeno no han tenido éxito. En el caso de las enfermedades de New Castle (NDV) que expresan NA, el virus recombinante no proporcionó ninguna protección (Nayak *et al.*, 2010, *J Virol*; 84(5):2408-20). Para probar si PIV5 es un mejor vector vacunal, se generaron un PIV5 recombinante que expresaba NA de H5N1, rPIV5-N1(H5N1) y un PIV5 recombinante que expresaba NA de H1N1 pandémico, rPIV5-N1(H1N1). Como se muestra en las Fig. 3A-3C, El PIV5 recombinante que expresaba NA proporciona inmunidad esterilizante contra la exposición letal a HPAI H5N1. Curiosamente, incluso rPIV5-N1(H1N1) proporcionó inmunidad parcial contra la exposición a H5N1. Esta es la primera vez que una vacuna basada en un vector vírico que expresa NA proporciona inmunidad contra la exposición a H5N1. Este vector basado en PIV5 es el mejor hasta la fecha para proporcionar inmunidad contra la exposición al virus de la gripe entre cualquier otro vector vírico.

Hacia un virus de la gripe universal. La proteína NP del virus de la gripe está muy bien conservada entre todas las cepas del virus de la gripe, y se cree que es una excelente diana para el desarrollo de una vacuna contra el virus de la gripe de amplia protección. Sin embargo, los esfuerzos por desarrollar una vacuna basada en NP no han tenido éxito. El virus Vaccinia (VV) que expresa NP no protege contra la exposición al virus de la gripe (Lawson *et al.*, 1994, *J Virol*; 68(6):3505-11). Para examinar si PIV5 puede ser un buen vector para expresar NP, se generó un PIV5 recombinante que expresaba el gen NP de H5N1 (PIV5-NP). Increíblemente, PIV5-NP proporcionó protección contra la exposición a H1N1, así como a H5N1, demostrando que la vacuna de NP basada en PIV5 puede proteger de una exposición heterotípica al virus de la gripe (Fig. 4A-4C). Se sabe que la respuesta inmunitaria celular basada en NP (respuestas inmunitarias basadas en los linfocitos T) es protectora, mientras que la respuesta inmunitaria humoral (respuesta inmunitaria basada en anticuerpos) es suficiente para la inmunidad mediada por HA (Graham y Braciale, 1997, *J. Exp. Med.*, 186 (12):2063-8; Crawford *et al.*, 1999, *Vaccine*; 17 (18):2265-74; y Kong *et al.* 2006, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 103(43):15987-91). El hecho de que la vacuna basada en PIV5 proporcionara protección probablemente a través de la respuesta inmunitaria celular es algo nuevo e inesperado. Además, debido a la protección otorgada por la expresión de NP a través de PIV5, es posible generar una vacuna contra el virus de la gripe universal basada en PIV5 y NP.

Inserción de genes foráneos más cerca de la secuencia líder para aumentar la eficacia de la vacuna. Los virus de ARN de cadena negativa, tales como PIV5, inician la transcripción desde la secuencia líder del extremo 3', y los niveles de transcripción de los genes víricos se ven afectados por sus distancias a la secuencia líder. Por ejemplo, el gen NP de PIV5, que es el más cercano a la secuencia líder, es el que se transcribe más abundantemente, mientras que el gen L, que se encuentra el más alejado de la secuencia líder, se transcribe menos (Fig. 5). Se han insertado genes foráneos entre el gen HN y el gen L, la unión génica más distal de la secuencia líder, la secuencia promotora de facto, porque se trata de la unión con el menor potencial para interrumpir la replicación vírica (He *et al.*, 1997, *Virology*; 237:249-260; Tompkins *et al.* 2007, *Virology*; 362 (1):139-50; y Sun *et al.* 2011, *J Med Chem*; 54 (5):1126-39. La vacuna candidata se potenciará al aumentar el nivel de expresión de los antígenos. Para aumentar el nivel de expresión del antígeno, tal como el gen HA del virus H5N1 (H5), se insertó el gen H5 inmediatamente cadena abajo de la secuencia líder y cadena arriba del gen NP (PIV5-H5LN) (Fig. 5). Desafortunadamente, a diferencia de otros paramixovirus tales como el VSR, la inserción de un gen foráneo entre la secuencia líder y el gen NP no generó un virus viable. Se ha generado un PIV5-H5HL (también conocido como ZL48). Este virus recombinante protegió de la exposición letal a H5N1 (HPAI) de la gripe aviar altamente patógena (véase Fig. 2). Se han probado otras uniones genéticas, y se determinó que la unión entre V/P y M, y la unión entre SH y HN son adecuadas para la inserción de genes foráneos. Los niveles de expresión de un gen foráneo son más altos cuando el gen H5 está más cerca de la secuencia líder. Lo que es más importante, el PIV5 recombinante con H5 más cerca de la secuencia líder fue mejor en la generación de inmunidad contra el antígeno deseable (Fig. 6A-6C).

Virus PIV5 mutantes como vectores vacunales. La apoptosis desempeña un papel importante en la presentación de antígenos. Las células apoptóticas son una fuente de antígenos para las APC profesionales, tales como las células dendríticas. Se cree que la vía apoptótica activada por la infección por virus también puede desempeñar un papel en la presentación de antígenos, y que las diferentes vías apoptóticas pueden afectar a la presentación de los antígenos de manera diferente. La infección por PIV5 de tipo silvestre no induce la muerte celular. Sin embargo, se ha demostrado que los virus PIV5 mutantes que carecen de un gen hidrófobo pequeño (SH) (PIV5 Δ SH) o de la región conservada de la proteína V (PIV5V Δ C) inducen la apoptosis en las células infectadas a través de diferentes vías apoptóticas (Sun *et al.*, 2004, *J Virol*; 78 (10):5068-78; y Lin *et al.*, 2003, *J Virol*; 77(6):3371-83). También se ha

informado que las mutaciones en el gen V/P de PIV5 inducen la apoptosis, así como expresiones de citocinas (Sun *et al.*, 2009, *PLoS Pathog*; 5(7):e1000525). Es probable que los virus PIV5 mutantes que inducen la apoptosis, así como las citocinas, sean mejores vectores para presentar antígenos foráneos tales como las proteínas H5N1 que el PIV5 de tipo silvestre. Se han generado PIV5 recombinantes mutantes que expresan antígenos foráneos, tales como H5 y NP de H5N1, y algunas de las mutaciones produjeron una mejor protección, mientras que algunas mutaciones dieron lugar a una menor protección para algunos antígenos. Entre rPIV5-NP, rPIV5ΔSH-NP y rPIV5-P-S308G-NP (que contiene una mutación puntual en el resto S308 a G de la proteína P), rPIV5-P-S308G-NP tuvo la mejor protección (Fig. 7A y 7B). Aunque rPIV5ΔSH-NP tuvo la misma tasa de supervivencia que rPIV5-NP tras la exposición letal al virus de la gripe, los ratones de rPIV5ΔSH-NP perdieron un poco más de peso y parecían estar más enfermos que los ratones inmunizados con rPIV5-NP. Por lo tanto, la eliminación del gen SH de PIV5 no pareció potenciar la inmunidad contra NP, e incluso pudo ser un poco perjudicial. Curiosamente, con rPIV5-H5, rPIV5ΔSH-H5 y rPIV5VΔC-H5-1 y rPIV5VΔC-H5-3, la eliminación de SH no tuvo impacto en la inmunogenicidad, cuyas mutaciones en el gen V/P parecieron tener inmunogenicidad afectada negativamente (Fig. 8A y 8B). Dado que la inmunidad celular es necesaria para la inmunidad mediada por NP, y la inmunidad humoral suele ser eficaz en la inmunidad mediada por HA, es probable que la eliminación de SH afecte negativamente a la inmunidad celular y que las mutaciones del gen V/P puedan afectar a la inmunidad humoral.

PIV5 quimérico como vacuna. Para reducir la interferencia causada por la inmunidad generada por PIV5 en una vacuna basada en PIV5, es deseable reducir la inmunidad del hospedador dirigida a PIV5. Las proteínas PIV5 se reemplazarán por proteínas de las dianas vacunales previstas. Por ejemplo, F y HN de PIV5 se reemplazarán por HA y NA del virus de la gripe (Fig. 9). Esto generará un PIV5 quimérico viable que expresará antígenos de la diana vacunal para minimizar los efectos de la inmunidad generada por las proteínas PIV5.

Vacunas candidatas adicionales en desarrollo. Como se muestra en este ejemplo, PIV5 es un excelente vector vacunal para muchos patógenos (tanto víricos como bacterianos). Se están desarrollando vacunas candidatas adicionales, incluyendo, pero sin limitación, vacunas para seres humanos, tales como, por ejemplo, PIV5-VIH, PIV5-PIV2 (virus paragripal 2), PIV5-VSR (virus sincitial respiratorio), PIV5-virus de Nipah (para seres humanos y cerdos) y PIV5-virus del Ébola, y vacunas para animales, tales como, por ejemplo, PIV5-virus de la rabia (para animales), PIV5-PCV (Circovirus porcino), PIV5-PRRSV (virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino) y PIV5-virus de la gripe porcina. Por ejemplo, se han generado y probado en células de cultivo tisular vacunas contra el VIH basadas en PIV5, como se muestra en las Fig. 10A-10C.

Ejemplo 2

Evaluación de una vacuna basada en el virus paragripal 5 en un hospedador con inmunidad preexistente contra el virus paragripal 5

Una pregunta fundamental con respecto al uso de PIV5 como vector es si la exposición previa a PIV5 evitaría el uso de las vacunas basadas en PIV5. En este ejemplo, se examinó la inmunogenicidad de un PIV5 recombinante que expresaba hemaglutinina (HA) del virus de la gripe A de subtipo 3 (rPIV5-H3) en perros que fueron inmunizados contra el PIV5. Se encontró que la vacunación de los perros que contenían anticuerpos neutralizantes contra PIV5 con rPIV5-H3 generó inmunidad contra el virus de la gripe A, lo que indica que la vacuna basada en PIV5 es inmunogénica en perros con exposición previa. Además, se examinó la exposición a PIV5 en poblaciones humanas. El anticuerpo neutralizante (nAb) contra el PIV5 se ha detectado en 13 de las 45 muestras de suero humano (aproximadamente el 29 por ciento). Los títulos de nAb en seres humanos fueron más bajos que en los perros vacunados, lo que sugiere que es improbable que los nAb en los seres humanos eviten que PIV5 sea un vector eficaz en seres humanos.

Se cree que PIV5 puede contribuir a la tos de las perreras en perros (Binn *et al.*, 1967, *Proc Soc Exp Biol Med*; 126:140-145; Rosenberg *et al.*, 1971, *Am J Epidemiol*; 94:147-165; Cornwell *et al.* 1976, *Vet Rec*; 98:301-302; McCandlish *et al.*, 1978, *Vet Rec*; 102:293-301; y Azetaka y Konishi, 1988, *Nippon Juigaku Zasshi*; 50: 851-858). A pesar de que la infección de perros con PIV5 no dio lugar a la tos de las perreras (Chladek *et al.*, 1981, *Am J Vet Res*; 42:266-270; y Kontor *et al.* 1981, *Am J Vet Res*; 42: 1694-1698), las vacunas contra la tos de las perreras que contenían PIV5 vivo atenuado se han usado en perros durante 30 años. Los perros se vacunan por vía intranasal, y los perros suelen estornudar durante la vacunación, exponiendo a los veterinarios, así como a los propietarios. El uso generalizado de las vacunas contra la tos de las perreras que contienen PIV5 vivo sugiere que PIV5 puede ser una vacuna segura para los seres humanos. Una inoculación de una sola dosis de PIV5 recombinante que expresa hemaglutinina (HA) de subtipo 3 (H3) protegió contra la exposición al virus de la gripe en ratones (Tompkins *et al.*, 2007, *Virology*; 362: 139-150 y una sola dosis de vacunación tan baja como de 1.000 unidades formadoras de placa (ufp) de un PIV5 recombinante que expresaba HA de H5N1 protegió de la exposición letal al virus de la gripe aviar altamente patógeno H5N1 en ratones (véase el Ejemplo 3 y Li *et al.* 2012, *J Virol*; 87(1):354-62).

Una pregunta fundamental con respecto al uso de PIV5 como vector es si la exposición previa a PIV5 evitaría el uso de la vacuna basada en PIV5. Este ejemplo examinó la eficacia de un PIV5 recombinante que expresaba HA (PIV5-HA) del virus de la gripe en perros que fueron inmunizados contra PIV5. Además, este ejemplo examinó la exposición de PIV5 en seres humanos.

Materiales y métodos

Virus y células. Se cultivaron células MDBK, BHK21 y Vero en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10 % y 100 UI/ml de penicilina-100 µg/ml de estreptomycin. Se construyó el virus rPIV5-H3 como se ha descrito anteriormente (Tompkins *et al.*, 2007, *Virology*; 362: 139-150), que contiene el gen de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe A (A/Udorn/72, subtipo H3N2). Se cultivaron los virus PIV5 en células MDBK durante de 4 a 5 días usando DMEM que contenía FBS al 2 %, y se examinaron los títulos víricos mediante un ensayo de placa en células BHK21 como se ha informado anteriormente (He *et al.*, 1997, *Virology*; 237: 249-260). En resumen, se infectaron las células BHK21 en placas de 6 pocillos con virus diluido en serie (1:10¹ a 1:10⁷). Tras 2 horas (h), se retiró la mezcla de inoculación y se reemplazó por 4 ml de DMEM que contenía FBS al 2 %, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y agarosa de bajo punto de fusión al 1 %. Las placas se contaron de 4 a 6 días después de la infección (ddi). Se establecieron dos réplicas para cada punto de tiempo para el cálculo del título. El virus de las paperas, la cepa de la vacuna de Jeryl Lynn (JL), se cultivó en células Vero y se cosechó a los 4 a 7 ddi. Se midió el título de virus en las células Vero mediante el ensayo de placa como se ha descrito anteriormente (Xu *et al.*, 2011, *Virology*; 417: 126-136). Se cultivó el virus de la gripe A/Udorn/72 en huevos (Paterson y Lamb, 1993, "The molecular biology of influenza viruses and paramyxoviruses". En: Davidson A., Elliott R. M., editores. *Molecular Virology: A Practical Approach*. Oxford: IRL Oxford University Press. pág. 35-73).

Para purificar el virus PIV5 y el virus de las paperas para el ensayo ELISA, se sedimentaron los virus del sobrenadante aclarado en un rotor de ultracentrifugación de tipo F40L-8X100 de Thermo Scientific a 37.000 rpm durante 1 h. Luego, se volvieron a suspender los sedimentos en tampón TNE (Tris 10 mM [pH 7,4], NaCl 100 mM, EDTA 1 mM) y se cargaron en un gradiente de sacarosa del 10 % al 80 % y se centrifugaron en un rotor TH-641 durante 1 h a 37.000 rpm. Se recogieron las bandas de virus y se sedimentaron en un rotor F40L-8X100 durante 1 h a 37.000 rpm. Los virus purificados se volvieron a suspender en tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7,4).

Declaración ética sobre el uso de animales. Este estudio se llevó a cabo en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de los Experimentos con Animales de la Universidad de Georgia (Número de permiso: A2011 12-012-Y1-A3). Se hizo todo lo posible para minimizar el sufrimiento. Los perros usados en este estudio fueron alojados y cuidados de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (octava edición).

Infección de perros con PIV5 o rPIV5-H3. Los perros criados a propósito usados en este estudio fueron adquiridos en Covance Research Products (482 Franchs Store Road, Cumberland, VA). En el primer experimento, se dividió un total de ocho perros Beagle sin tratamiento previo de vacuna PIV5 de 3 meses de vida en dos grupos, de cuatro perros cada uno, infectados por vía intranasal con PIV5 o rPIV5-H3. Los perros fueron sedados, pero no anestesiados con Acepromazina (PromAce, Fort Dodge, IA) a una dosis de 0,05-0,1 mg/kg por vía intramuscular para la vacunación, y para la extracción de sangre e hisopos nasales según fue necesario. Las muestras de sangre se recogieron el día 0 (antes de la sangría) y el día 21 después de la infección. Los sueros se separaron de las muestras de sangre y se almacenaron a -20 °C. Los hisopos nasales se obtuvieron a los 3 y 5 días de la infección (ddi). En el segundo experimento, se separaron ocho perros Beagle vacunados con PIV5 de 5 meses de vida en un grupo de control de PBS (n = 2) y un grupo de rPIV5-H3 (n = 6) inmunizados por vía intranasal. Los perros se sangraron a los 0 y 21 días de la inmunización. Se obtuvieron hisopos nasales a los 3 y 5 días de la infección. Cada inmunización por vía intranasal implicaba la administración de 1 ml de PBS o rPIV5-H3 que contenía 8 x 10⁷ unidades formadoras de placas (ufp).

Detección de virus mediante RT-PCR. Para obtener hisopos nasales de perros, se insertó un aplicador de aluminio flexible con punta de poliéster (Puritan, Maine, EE. UU.) por las fosas nasales hasta que se notó resistencia en la nasofaringe, luego se giró 180 grados y se retiró. Se retiró el aplicador de hisopo y se colocó un hisopo absorbente en un vial que contenía 0,5 ml de DMEM con FBS al 2 %. Los viales se almacenaron a -70 °C. Las muestras se agitaron con formación de vórtice y se usó un volumen de 140 µl para la extracción de ARN total usando el mini kit de extracción de ARN vírico QIAamp (Qiagen, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La RT-PCR se realizó como se ha descrito anteriormente (Sun *et al.*, 2011, *J Virol*; 85: 8376-8385). En resumen, se amplificaron 11 µl de molde de ARN purificado en un volumen total de 30 µl en un volumen de reacción de 20 µl, usando la transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen) para generar el ADNc del virus. En la RT, se usaron cebadores aleatorios, mientras que, en la PCR, se usaron cebadores específicos de gen P/V-F1 y M-R1 hibridados al gen PIV5 P/V y M del ARN genómico. Los cebadores P/V-F1 fueron 5'-CCAGTGAGGCTCAGCTAATTGACCTC (SEQ ID NO: 3) y el cebador M-R1 fue 5'-GGTATTCCTCCGATCCTGTTCTAG (SEQ ID NO: 4). Se usaron 5 µl de los ADNc en 20 µl del volumen total de la RT para la PCR en un volumen de reacción de 50 µl. Se compararon los niveles relativos del genoma vírico con los niveles del genoma vírico del virus PIV5 con un título conocido.

ELISA. Se determinaron los títulos de anticuerpos específicos contra el virus PIV5 o el virus de las paperas mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). Primero se bloquearon placas de ELISA de noventa y seis pocillos (Thermo Scientific), recubiertas durante una noche con 100 µl/pocillo de 100 ng de proteínas de virus PIV5 completas purificadas en PBS (pH 7,4), con BSA al 0,5 % y leche en polvo desnatada al 0,5 % en solución de lavado (KPL) durante 1 h, y luego se lavaron tres veces con solución de lavado KPL. Se prepararon diluciones en serie de sueros de perros o seres humanos en un tampón de bloqueo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces y se incubaron durante 1 h con una dilución 1:2.000 de un anticuerpo secundario, IgG

anti-perro de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) o IgG anti-humana de cabra (KPL, Gaithersburg, MD). Las placas se lavaron tres veces y se revelaron con sustrato de peroxidasa para micropocillos de componente TMB 1 de SureBlue (KPL). Se detuvo el revelado mediante la adición de un volumen igual de HCl por vía intranasal, y se leyó la densidad óptica (DO) a 450 nm usando un lector de placas BioTek. Los títulos del criterio de valoración de ELISA se definieron como las diluciones en suero más altas a las que los valores medios de DO de los pocillos por duplicado eran > 2 veces superiores al valor medio de DO más 2 desviaciones típicas (DT) para los sueros.

Determinación de títulos de anticuerpos neutralizantes (nAb) contra PIV5. Los títulos de anticuerpos neutralizantes contra PIV5 se midieron en muestras de suero mediante un ensayo de neutralización de virus. Los sueros se diluyeron en serie en 50 µl de DMEM que contenía FBS al 2 %. Se añadió una DICT₅₀ de 200 del virus PIV5 a los sueros diluidos y se incubó durante 2 h a 37 °C. Se añadieron el suero y el virus a placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían un 90-100 % de células MDBK confluentes y se incubaron a 37 °C durante 3 días. Los pocillos individuales se examinaron mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA). Las células se fijaron con formaldehído al 3,7 % en PBS (pH 7,4) durante 10 min, y luego se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 % más FBS al 1 % en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Las células fijas se incubaron durante 1 h con anticuerpo primario (anticuerpo anti-NP de PIV5 de ratón a una dilución de 1:400) a 37 °C. Se usó anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con FITC (dilución de 1:400; KPL, Inc.) como el anticuerpo secundario. El título de anticuerpos neutralizantes fue la dilución de suero más alta que neutralizó por completo una DICT₅₀ de 200 del virus PIV5.

Ensayo de HAI. El ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HAI) se realizó de acuerdo con el Manual de la OMS sobre Diagnóstico y Vigilancia de la Gripe Animal (OMS (2002) Manual on Animal Diagnosis and Surveillance). En resumen, se lavaron glóbulos rojos de pollo (cRBC) y se volvieron a suspender hasta una concentración final del 0,5 % en PBS. El virus de la gripe A (A/Udorn/72, subtipo H3N2) se ajustó a 4 unidades de hemaglutinación (HAU) por 25 µl en PBS. En placas de fondo redondo de 96 pocillos, se diluyeron 25 µl de muestras de suero tratadas con RDE individuales en serie de manera doble. Después de preparar la dilución en serie de los sueros, se añadieron 25 µl (4 HAU) del virus diluido. La placa se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Luego se añadieron 50 µl de cRBC al 0,5 % a cada pocillo, se mezclaron suavemente y se incubaron a temperatura ambiente durante 30-45 minutos. Se anotó la hemaglutinación inclinando la placa en un ángulo de 45 grados. El título de HAI es el recíproco del antisuero de la última dilución que inhibe por completo la hemaglutinación.

Muestras de suero humano. Se obtuvieron muestras de sangre humana de 45 voluntarios aleatorios. Los participantes estaban sanos, no se encontraban en estado de gestación, 18-50 años de edad y con un peso superior a 50 kg (110 libras). Los voluntarios firmaron formularios de consentimiento informado. Los voluntarios eran anónimos. No se recogieron datos personales. El protocolo de sujetos humanos fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Georgia (UGA). Se extrajeron 10 ml de sangre venosa mediante venopunción en un tubo de 10 ml sin anticoagulante. Después de la coagulación, se centrifugaron las muestras de sangre a 400 g durante 5 min. Se filtraron los sobrenadantes libres de células a través de unidades de filtración de tamaño de poro de 0,22 µm y se usaron como suero. Las muestras de suero se almacenaron a -80 °C.

Análisis estadístico. En este estudio, se realizó el análisis de correlación de los anticuerpos para PIV5 y JL mediante el método de correlación de Pearson. Se escogieron las lecturas de la DO₄₅₀ a 1:320, porque las lecturas estaban en el intervalo lineal de la dilución de los sueros. El análisis se realizó con el uso de la función cor.test Del paquete estadístico R (Team RDC (2003), Proyecto R para computación estadística de la Universidad de Wisconsin, Madison, WI). La diferencia estadística significativa se consideró a un valor de *p* inferior a 0,05. El resultado indica que no hay una correlación significativa entre PIV5 y JL con *r* de Pearson igual a 0,06 (valor de *p* = 0,6941).

Resultados

Infección de perros "sin tratamiento previo" con PIV5 y rPIV5-H3. Si bien los ejemplos adicionales incluidos en el presente documento indican que rPIV5-H3 es eficaz para generar inmunidad en ratones contra el virus de la gripe, no está claro si el mismo virus puede ser eficaz para generar inmunidad en los perros. Por lo tanto, los perros se inocularon con rPIV5-H3 por vía intranasal, y se determinó la replicación del virus en los perros y se midieron las respuestas inmunitarias al virus. Los perros se vacunan de manera rutinaria con vacunas que contienen PIV5 vivo a una edad temprana (tan pronto como a las 3 semanas de vida). A través de un acuerdo con el vendedor de los animales, se obtuvieron 8 perros de 12 semanas de vida sin vacunación con el PIV5 vivo. Se determinaron los títulos de los anticuerpos PIV5 en estos perros mediante ELISA y un ensayo de neutralización. Todos los perros fueron positivos en PIV5 en el ELISA (Fig. 11A). Sin embargo, los títulos de anticuerpos de neutralización (nAb) fueron indetectables (Fig. 11B). Los perros (*n* = 4) se infectaron con PIV5 o rPIV5-H3 por vía intranasal. A los 3 y 5 días de la infección, se tomaron muestras de hisopos nasales de perros infectados y se analizó la existencia de virus. Si bien no se detectó ningún virus cuando se analizaron los hisopos usando el ensayo de placa (Fig. 12), los productos de la RT-PCR se detectaron en 7 de los 8 perros a los 3 días después de la infección (ddi) y se detectaron signos de RT-PCR muy débiles en 5 de los 8 perros a los 5 ddi, lo que sugiere la replicación limitada de PIV5 en las fosas nasales de los perros infectados 3 días después de la infección y que la infección se había eliminado 5 días después de la infección. Los perros fueron desangrados 21 días después de la infección. Se detectaron aumentos en los títulos de anti-PIV5 en todos los perros, lo que sugiere que los perros estaban infectados. La medición de los títulos de anti-HA usando el ensayo de HAI indicó que todos los perros inoculados con rPIV5-H3 se seroconvirtieron y tenían títulos de HAI de una

media de 42,5 (intervalo de 20 a 80) a las 3 semanas posteriores a la infección (Fig. 13). No se detectó HAI en los perros inoculados con PIV5.

Infección de perros con exposición a PIV5 con PIV5-HA. Para examinar si los perros con exposición previa a PIV5 todavía pueden ser vacunados con vacunas recombinantes basadas en PIV5, se obtuvieron perros que fueron vacunados contra PIV5 varias veces y tenían anticuerpos neutralizantes anti-PIV5 (Fig. 14). Los perros fueron infectados con rPIV5-H3 por vía intranasal. No se detectó ningún virus usando el ensayo de placa a los 3 y 5 ddi en las fosas nasales de los perros infectados. Uno de cada ocho perros dio positivo con la RT-PCR a 3 ddi (Fig. 15). Los perros se sangraron 3 semanas después de la infección. Los perros vacunados con rPIV5-H3 tenían títulos de HAI entre 40 y 80 (media de 77, 1 a 40 y de 5 a 80) (Fig. 16), lo que indica que la vacunación con rPIV5-H3 generó inmunidad contra el virus de la gripe (un aumento de 4 veces del título de HAI o un título de HAI de 40 se considera protector contra la infección por el virus de la gripe). Los títulos de nAb contra PIV5 también aumentaron en los perros infectados con rPIV5-H3, lo que confirma la infección de los perros con rPIV5-H3.

Exposición al PIV5 en seres humanos. Como se ha informado anteriormente, se han detectado anticuerpos anti-PIV5 en seres humanos (Goswami *et al.*, 1984, *J Gen Virol*; 65:1295-1303; y Goswami *et al.* 1987, *Nature*; 327: 244-247). Para determinar si el anti-PIV5 en seres humanos se debe a la reactividad cruzada del anticuerpo contra los paramixovirus estrechamente relacionados, se examinaron los títulos de anticuerpos contra el PIV5 y el virus de las paperas en sueros humanos. El virus de las paperas (MuV) está más estrechamente relacionado con el PIV5, ya que tienen la misma estructura del genoma. Dado que, en EE.UU., la exposición al virus de las paperas en los seres humanos es cercana al 100 por cien debido a la vacunación y a la infección natural, se esperaba la detección de anticuerpos contra el virus de las paperas en todas las muestras recogidas por los presentes inventores de individuos de 18 a 50 años de edad en EE. UU. Como era de esperar, el total de las 45 muestras dio positivo en el virus de las paperas (Fig. 17A). Curiosamente, todos los sueros dieron positivo en el antígeno PIV5 también en el ELISA (Fig. 17A). Si la reactividad hacia el antígeno PIV5 en los sueros humanos se debió a la reactividad cruzada del virus anti-paperas, los títulos de anti-PIV5 deben estar correlacionados con los títulos del virus anti-paperas. Sin embargo, el análisis estadístico indicó que no hay correlación entre los títulos de anti-MuV en suero y los títulos de anti-PIV5 en suero, lo que sugiere que la reactividad de los sueros humanos hacia PIV5 no se debe a la reactividad cruzada del virus de las paperas. Además, se examinaron los títulos de nAb contra PIV5 en sueros humanos, y se detectó nAb anti-PIV5 en 13 de las 45 muestras (aproximadamente el 29 por ciento) (Fig. 17B).

Discusión

Desde el descubrimiento de PIV5, han sido muchas las enfermedades en seres humanos asociadas al PIV5, siendo todas finalmente probadas como falsas. En retrospectiva, existen varias explicaciones posibles de por qué PIV5 puede haber estado vinculado a estas enfermedades. Una se basa en las condiciones usadas para el aislamiento del virus en los estudios en seres humanos, es decir, los laboratorios usaron estirpes celulares de mono que pueden infectarse de manera persistente con el PIV5, y estas células no suelen mostrar efectos citopáticos detectables (Hsiung, 1972, *Prog Med Virol*; 14:241-274; y Chatziandreou *et al.* 2004, *J Gen Virol*; 85: 3007-3016). Otra posibilidad es la reactividad cruzada del antígeno de PIV5 con los paramixovirus ubicuos, tal como el virus de las paperas, que están estrechamente relacionados con PIV5 y tienen una exposición de casi el 100 por cien en la población humana (Randall y Young, 1988, *J Gen Virol*; 69(Pt 8) 2051-2060; Tsurudome *et al.*, 1989, *Virology*; 171:38-48; y Komada *et al.* 1991, *Arch Virol*; 116: 277-283). Este ejemplo examinó la exposición de PIV5 en poblaciones humanas y encontró anticuerpos anti-PIV5 en sueros humanos. Curiosamente, no se detectó una correlación entre los títulos del virus anti-paperas y anti-PIV5, sugiriendo que los seres humanos positivos en PIV5, al menos algunos de ellos, podrían haber estado expuestos a PIV5. Aproximadamente el 29 % de las muestras de suero humano tenían anticuerpos neutralizantes contra PIV5. Algunos de los cuales no tenían anticuerpos robustos contra el virus de las paperas (Fig. 17), lo que sugiere que al menos algunos seres humanos han estado expuestos al PIV5 por separado del virus de las paperas. Es probable que el contacto cercano entre perros y seres humanos pueda ser un factor contribuyente en la exposición de los humanos al PIV5 de los perros. Los perros son vacunados por vía intranasal y suelen estornudar durante la vacunación, exponiendo a los veterinarios, así como a los propietarios. Además, se detectó PIV5 en perros sin tratamiento previo a los 3 días después de la infección usando RT-PCR, lo que sugiere que es posible que los perros vacunados puedan suprimir el virus después de la vacunación, dando lugar a seres humanos expuestos al virus. Esto coincide con el uso generalizado de vacunas contra la tos de las perreras que contienen PIV5 vivo y que aproximadamente el 40 % de la población de EE. UU. posee perros.

Es alentador que el anticuerpo PIV5 se detecte en un gran porcentaje de la población de EE. UU. sin causar enfermedad clínica, lo que sugiere que el PIV5 es seguro en las poblaciones humanas. Sin embargo, dado que un gran porcentaje de la población de EE. UU. puede haber estado expuesta a PIV5, se plantea la pregunta de si el PIV5 será un vector eficaz para el desarrollo de vacunas en seres humanos. El mismo problema de la exposición previa del vector ha creado un obstáculo importante para el uso de vectores basados en adenovirus para el desarrollo de vacunas. Este ejemplo encontró que el PIV5 recombinante que expresaba HA era inmunogénico en perros con inmunidad preexistente contra el PIV5. lo que indica que el vector vacunal basado en PIV5 puede superar la inmunidad preexistente. Los resultados coincidían con un informe previo de que, en ratones, los anticuerpos neutralizantes contra PIV5 no previenen la infección por PIV5 (Young *et al.*, 1990, *J Virol*; 64: 5403-5411). Todavía no se ha determinado la capacidad del perro para eliminar una infección por PIV5. En los ratones, se cree que las respuestas inmunitarias

mediadas por células desempeñan un papel fundamental en la eliminación de la infección por PIV5 (Young *et al.*, 1990, *J Virol*; 64: 5403-5411). Dado que el PIV5 tiene replicación autolimitada en los perros, es probable que la inmunidad mediada por células también desempeñe un papel fundamental en la eliminación de la infección. Debido a que se requiere tiempo para que la inmunidad mediada por células responda y sea eficaz, este período de tiempo ofrece una ventana de oportunidad para que la vacuna viva basada en PIV5 se replique y genere una respuesta inmunitaria consistente. Esto coincide con las observaciones de que PIV5 infecta todo tipo de células, incluyendo las células primarias (Arimilli *et al.*, 2006, *J Virol*; 80:3416-3427; Tompkins *et al.* 2007, *Virology*; 362:139-150; y Zhang *et al.* 2011, *Virology*; 421: 67-77).

Los títulos de nAb contra PIV5 en los perros vacunados fueron más altos que en los perros "sin tratamiento previo", y fueron tan altos como de 300 (Fig. 14B). Todos los perros con nAb contra PIV5 se seroconvirtieron después de una sola dosis de inoculación por vía intranasal de rPIV5-H3, y los títulos del anticuerpo anti-H3 no tuvieron correlación con los títulos de nAb contra PIV5. lo que confirma además que los nAb de PIV5 no tienen valor predictivo para determinar las respuestas inmunitarias a una vacuna basada en PIV5 en perros. El título más alto de nAb contra PIV5 en seres humanos es de 60, inferior a los títulos de nAb contra PIV5 en los perros. Por lo tanto, el anticuerpo neutralizante contra PIV5 en seres humanos probablemente no evitará que las vacunas candidatas basadas en PIV5 generen inmunidad protectora.

Se han producido brotes del subtipo H3 del virus de la gripe canina A en poblaciones caninas (Crawford *et al.*, 2005, *Science*; 310:482-485; Daly *et al.* 2008, *Emerg Infect Dis*; 14:461-464; y Li *et al.*, 2010, *Infect Genet Evol*; 10: 1286-1288). El hecho de que los perros seroconvertidos con rPIV5-H3 y la inmunidad generada que se considera protectora sugiere que un PIV5 recombinante que expresa H3 puede ser una vacuna eficaz contra el virus de la gripe canina. Además, estos resultados sugieren que PIV5 puede ser un vector nuevo para expresar otros antígenos para el desarrollo de vacunas para perros, otros animales y seres humanos.

Además, se han infectado cerdos con PIV5. Mientras que el PIV5 se detectó en los hisopos nasales a los 5 días después de la infección (ddi), el PIV5 no se detectó en órganos ni tejidos internos a los 35 ddi, lo que sugiere que PIV5 no estableció infección persistente en cerdos.

Este ejemplo se ha publicado como Chen *et al.*, "Evaluating a Parainfluenza Virus 5-Based Vaccine in a Host with Pre-Existing Immunity against Parainfluenza Virus 5", *PLoS One*; 2012;7(11):e50144, doi: 10.1371/journal.pone.0050144, Epub 20 de noviembre de 2012.

Ejemplo 3

Virus de paragripal 5 recombinante que expresa HA de ratones protegidos contra el virus de la gripe A H5N1 contra la exposición a la gripe aviar altamente patógena letal H5N1

Una vacuna segura y eficaz es la mejor manera de prevenir los brotes del virus de la gripe aviar altamente patógeno (IAAP) H5N1 a gran escala en la población humana. Actualmente, la vacuna contra el H5N1 aprobada por la FDA tiene serias limitaciones. Se necesita urgentemente una vacuna contra H5N1 más eficaz. Como se muestra en el presente documento, una sola dosis de un PIV5 recombinante vivo que expresa un gen HA de H5N1 (rPIV5-H5) del subtipo H5N1 proporcionó inmunidad de esterilización contra la dosis letal de la infección por HPAI H5N1 en ratones. Además, con el examen del efecto de la inserción de HA de H5N1 en diferentes ubicaciones dentro del genoma de PIV5 sobre la eficacia de la vacuna basada en PIV5, se demostró que la inserción de HA de H5N1 entre la secuencia líder, el promotor de facto de PIV5 y el primer gen vírico, NP, no condujo a un virus viable. La inserción de HA de H5N1 entre NP y el siguiente gen V/P condujo a un virus que tenía un crecimiento defectuoso. La inserción de HA de H5N1 en la unión entre el gen SH y el gen HN ofreció la mejor inmunidad contra la exposición a HPAI H5N1: bastó con una dosis tan baja como de 1.000 unidades formadoras de placa (ufp) para proteger contra la exposición letal de HPAI H5N1 en ratones. Por lo tanto, el PIV5 recombinante que expresa HA de H5N1 tiene un gran potencial como vacuna contra HPAI H5N1. Este ejemplo probó la eficacia de los virus PIV5 recombinantes con transgenes HA insertados por orden en sitios proximales a la secuencia líder. Por otra parte, se usó el PIV5 para expresar HA del virus de la gripe aviar (HPAI) altamente patógeno H5N1, y se probó su eficacia como vacunas candidatas en un modelo de ratón establecido de exposición letal a HPAI.

Materiales y métodos

Células. Se mantuvieron cultivos en monocapa de células BSR T7 en DMEM que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10 %, caldo de fosfato de triptosa (TPB) al 10 % y 400 µg/ml de G418. Se mantuvieron cultivos monocapa de células Vero, células MDBK, células MDCK y células BHK en DMEM que contenía FBS al 10 %, 100 U /ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Todas las células fueron incubadas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las células infectadas con virus se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 2 %. Se realizaron ensayos de placa de PIV5 con células BHK y se realizaron ensayos de placa del virus de la gripe con células MDCK.

Virus de la gripe. Los virus de la gripe A usados incluyen VN/H5N1-PR8/CDC-RG (H5N1; rgVN-PR8 proporcionado por el Dr. Ruben Donis, CDC, Atlanta, GA) y A/Vietnam/1203/04 (H5N1; proporcionado por Richard Webby, Hospital de

investigación infantil St. Jude, Memphis, TN). Se propagó A/VN-PR8 en la cavidad alantoica de huevos de gallina embrionarios a 37 °C durante 48-72 horas. Richard Webby, del Hospital de Investigación Infantil St. Jude (Memphis, TN), proporcionó A-Vietnam/1203/04 inactivado con β -propiolactona (BPL). Se propagó A/Vietnam/1203/04 en la cavidad alantoica de huevos de gallina embrionarios a 37 °C durante 24 horas. Todos los virus se dividieron en

5 alícuotas y se almacenaron a -80 °C. Todos los experimentos en los que se usaron virus de la gripe aviar altamente patógenos, vivos, fueron revisados y aprobados por el programa institucional de bioseguridad en la Universidad de Georgia, y se realizaron en el nivel 3 de bioseguridad, de potenciación de la contención, siguiendo las pautas para el uso de Agentes Selectos aprobadas por el CDC.

10 Ratones. Se usaron ratones BALB/c hembra de 6 a 8 semanas de vida (Charles River Labs, Frederick, MD) para todos los estudios. Las inmunizaciones de ratón y los estudios con virus BSL2 se realizaron en instalaciones mejoradas para BSL2 en aisladores con filtro HEPA. Las infecciones por HPAI en ratones se realizaron en instalaciones mejoradas para BSL3 en aisladores con filtro HEPA, siguiendo las pautas aprobadas por el programa institucional de bioseguridad en la Universidad de Georgia y para el uso de Agentes Selectos aprobados por el CDC. Todos los estudios en animales

15 se realizaron bajo protocolos revisados y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Georgia.

Construcción de plásmidos recombinantes. Para generar el plásmido ZL48 (rPIV5-H5-HN/I), se reemplazó la secuencia de codificación de GFP del plásmido BH311 que contiene el genoma de longitud completa de PIV5 y una inserción del

20 gen EGFP extra entre el gen HN y el gen L por un gen HA de H5N1. Para generar los plásmidos ZL46 (rPIV5-H5-SH/HN), ZL209 (rPIV5-H5-NP/VP), ZL215 (rPIV5-H5-Le/NP), se usó el plásmido BH276 que contenía el genoma de longitud completa de PIV5 como vector. Para generar el plásmido ZL47 (rPIV5-H5-VP/M), se usó el plásmido pSV5-M-NS que contiene el genoma de longitud completa de PIV5 como vector. El plásmido que contiene el gen HA de H5N1 sin sitio de escisión se usó como molde de ADN para la amplificación por PCR usando pares de cebadores

25 oligonucleotídicos apropiados.

Rescate y secuencia del PIV5 recombinante. El rescate de PIV5 recombinante infeccioso se realizó como se ha descrito anteriormente (He *et al.*, 1997, *Virology*; 237: 249-260). En resumen, los plásmidos, pZL48 que codifica el genoma de longitud completa de PIV5 con inserción del gen HA entre los genes HN y L, pZL46 que codifica el genoma de longitud completa de PIV5 con inserción del gen HA entre el gen SH y el gen HN, pZL47 que codifica el genoma de longitud completa de PIV5 con inserción del gen HA entre los genes V/P y M, pZL209 que codifica el genoma de longitud completa de PIV5 con la inserción del gen HA entre NP y el gen V/P, o pZL215 que codifica el genoma de longitud completa de PIV5 con la inserción del gen HA entre el líder y el gen NP, y tres plásmidos auxiliares pPIV5-NP, pPIV5-P y pPIV5-L que codifican las proteínas NP, P y L, se cotransfectaron en células BSR T7 a una confluencia

30 del 95 % en placas de 6 cm con Plus y Lipofectamina (Invitrogen). Las cantidades de plásmidos usadas fueron las siguientes: 5 μ g de pZL48/ZL46/ZL47/ZL209/ZL215, 1 μ g de pPIV5-N, 0,3 μ g de pPIV5-P y 1,5 μ g de pPIV5-L. Tras una incubación de 3 h, se reemplazaron los medios de transfección por DMEM que contenía FBS al 10 % y TPB al 10 %. Después de 72 h de incubación a 37 °C, se recogieron los medios y se sedimentaron los restos celulares mediante centrifugación a baja velocidad (3.000 rpm, 10 min). Se usaron ensayos de placa para obtener un único clon

40 de virus recombinantes. Se secuenció el genoma de longitud completa del clon único purificado en placa de los virus ZL48, ZL46, ZL47 y ZL209 como se ha descrito anteriormente (Sun *et al.*, 2009, *PLoS Pathog*; 5:c1000525; y Sun *et al.*, 2011, *J Virol*; 85: 8376-8385). Se purificaron los ARN totales de los medios de células Vero infectadas con el virus ZL48, ZL46 ZL47 y ZL209 usando el kit de extracción de ARN vírico (Qiagen Inc, Valencia, CA). Los ADNc se prepararon usando hexámeros aleatorios y luego se amplificaron partes alícuotas del ADNc en reacciones de PCR

45 usando pares de cebadores oligonucleotídicos apropiados.

Crecimiento de PIV5 recombinante *in vitro* e *in vivo*. Se infectaron células MDBK en placas de 6 pocillos con PIV5, ZL48, ZL46 o ZL47 a una Mdl de 0,1. Las células se lavaron luego con PBS y se mantuvieron en DMEM-FBS al 2 %. Los medios fueron recogidos a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la infección. Los títulos de los virus se

50 determinaron mediante ensayo de placa en células BHK.

Para comparar el crecimiento de los virus en ratones, Se infectaron ratones BALB/c de tipo silvestre de 6 semanas de vida con 10^6 ufp de PIV5, ZL48, ZL46 o ZL47 en volumen de 100:1 por vía intranasal. Los ratones se sacrificaron 4 días después de la infección y se extrajeron los pulmones para determinar los títulos víricos.

55

Detección de la expresión de proteínas. Se realizó la inmunotransferencia en células MDBK en placas de 6 pocillos que se infectaron con PIV5 y ZL48 a una Mdl de 5. A las 24 hdi, las células se lisaron con tampón de extracto de células completas (WCEB) (Tris-HCl 50 mM [pH 8], NaCl 280 mM, NP-40 al 0,5 %, EDTA 0,2 mM, EGTA 2 mM y glicerol al 10 %). Se procesaron los lisados en gel de SDS-PAGE y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos anti-HA de H5N1 y anti-PIV5.

60

Se llevó a cabo la inmunofluorescencia de la expresión de HA de H5N1 en células MDBK en placas de 24 pocillos que se infectaron con PIV5 y ZL48 a una Mdl de 0,1. A los 2 ddi, se lavaron las células con PBS y luego se fijaron en formaldehído al 0,5 %. Las células se permeabilizaron en solución de PBS-saponina al 0,1 %, se incubaron durante 30 minutos con anti-PIV5-VP o anti-HA de H5N1 policlona a una dilución de 1:200, a continuación, se añadió anticuerpo anti-ratón de cabra marcado con FITC a las células. Las células se incubaron durante 30 minutos, y se examinaron y fotografiaron usando un microscopio de fluorescencia Nikon FXA.

65

Se compararon los niveles de expresión de HA de H5N1 en las células infectadas por virus usando células MDBK en placas de 6 pocillos que se habían infectado de forma simulada o con PIV5, ZL48, ZL46 o ZL47 a una Mdl de 1. Las células se recogieron a las 24 hdi y se fijaron con formaldehído al 0,5 % durante una hora. Las células fijadas se sedimentaron por centrifugación y luego se volvieron a suspender en 500 µl de solución que contenía suero bovino fetal (FBS)-DMEM (50:50). Las células se permeabilizaron en etanol al 70 % durante la noche. Las células se lavaron una vez con PBS y luego se incubaron con anticuerpo anti-HA de H5N1 de ratón en PBS/BSA al 1 % (1:200) durante 1 h a 4 °C. Las células se tiñeron con el anticuerpo anti-ratón marcado con ficocitrina (1:200) durante 1 h a 4 °C a oscuras, y luego se lavaron una vez con PBS/BSA al 1 %. Se midió la intensidad de la fluorescencia usando un citómetro de flujo.

ELISA. Se midieron los títulos de anticuerpos en suero específicos de HA (HA de H5N1) usando un ELISA de IgG. Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos Immulon 2 HB (ThermoLabSystems) con 2 µg/ml de proteína HA de H5N1 recombinante y se incubaron a 4 °C durante la noche. A continuación, se lavaron las placas con solución de lavado KPL (KPL, Inc) y se bloquearon los pocillos con 200 µl de solución de lavado KPL con leche en polvo desnatada al 5 % y BSA al 0,5 % (tampón de bloqueo) durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron diluciones en serie de muestras de suero (en tampón de bloqueo), y se transfirieron a la placa recubierta y se incubaron durante 1 h. Para detectar los anticuerpos séricos unidos, se añadieron 100 µl de una IgG anti-ratón de cabra marcada con fosfatasa alcalina de dilución 1:1000 (KPL, Inc) en un tampón de bloqueo por pocillo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se revelaron añadiendo 100 µl de sustrato de fosfatasa pNPP (KPL, Inc) por pocillo, y se dejó que se desarrollara la reacción a temperatura ambiente. Se midió la densidad óptica (DO) a 405 nm en un lector de placas Bio-Tek Powerwave XS. Se determinó que el título de IgG era la dilución de suero más baja con una DO superior a la media de suero sin tratamiento previo más 2 desviaciones típicas por encima de la DO media.

Infección de ratones con PIV5. Para la vacunación con PIV5 y rPIV5-H5, se administraron 10⁶ ufp de PIV5, rPIV5-ZL46 o rPIV5-ZL48 en 50 µl de PBS por vía intranasal a ratones anestesiados con 2,2,2-tribromoetanol en alcohol *terc*-amílico (Avertin; Aldrich Chemical Co). Para la infección con rgVN-PR8 subletal, se administraron 2.000 ufp de virus en 50 µl de PBS como se describe para la vacunación con PIV5. Para la vacunación con A/VN/1203/04 inactivado en PBL, se inyectaron luego 256 unidades de hemaglutinación (HAU)/ml en 50 µl de PBS en cada uno de los músculos del muslo caudal. Se extrajo sangre el día 21 después de la inmunización. En caso de administrarse vacuna de refuerzo, este proceso se repitió el día 28 después de la sensibilización. Los ratones fueron controlados diariamente y, para algunos experimentos, se registraron los pesos corporales cada dos días.

Medición del título de anticuerpos neutralizantes. Se midieron los títulos de los anticuerpos neutralizantes de la gripe en suero mediante un ensayo de microneutralización con un criterio de valoración de ELISA. Se diluyó el suero inactivado por calor en serie en DMEM con BSA al 1 %, antibiótico/antimicótico y 1 µg/ml de tripsina TPCK. A continuación, se incubó el suero diluido a DICT50 de 1.000 de rg A/VN-PR8 o rg A/Anhui-PR8 durante dos horas a 37 °C. Luego se añadieron células MDCK y se incubaron a 37 °C durante 18-24 horas. Al final de la incubación, se fijaron los pocillos con metanol y acetona enfriados en hielo (80:20 respectivamente) y se realizó un ELISA como se ha descrito anteriormente. Se determinó que el título de neutralización es la dilución en suero más baja capaz de neutralizar una DICT50 de 1.000 de rgA/VN-PR8 o rgA/Anhui-PR8, según lo determinado por una lectura de DO dos veces por encima de la DO de fondo.

Respuestas celulares. Se realizó un ELISpot para detectar las respuestas de los linfocitos T en linfocitos hacia A/VN/1203/04 inactivado como se describe (Tompkins *et al.*, 2007, *Emerg Infect Dis*; 13: 426-435). Las células se volvieron a estimular con A/VN/1203/04 inactivado (el equivalente de 10 HAU por pocillo), GP P2 EYLFEVDNL del Ébola como un péptido irrelevante (1 µg/ml) y PMA/ionomicina (25 ng/ml; 1,25 ng/ml respectivamente) en 50 µl de medio tumoral completo (CTM). Las manchas se contaron usando un lector ViruSpot de AID (Cell Technology, Inc).

Infección de ratones con virus de la gripe A. Los ratones BALB/c fueron vacunados primero con PIV5 de tipo silvestre, rPIV5-ZL46, rPIV5-ZL48 por vía intranasal, o A/VN/1203/04 inactivado por vía intramuscular como se ha descrito anteriormente. 21 días después de la vacunación, los ratones se sangraron para el análisis del suero a través de la vena de la cola. El día 24 después de la vacunación, los ratones fueron anestesiados e recibieron mediante inoculación por vía intranasal una DL₅₀ de 10 DE A/Vietnam/1203/04 diluido en 50 µl de PBS. Luego, se controlaron los ratones diariamente para determinar la morbilidad y la mortalidad, midiéndose los pesos corporales cada dos días. En el día 3 después de la exposición, los grupos de ratones se sacrificaron y se extrajeron los pulmones en 1,0 ml de PBS y se homogeneizaron. Se homogeneizó el homogeneizado por centrifugación. A continuación, se usó un ensayo de DICT₅₀ para determinar los títulos víricos en el homogeneizado aclarado como se describe (Soboleski *et al.*, 2011, *PLoS One*; 6:e21937).

Resultados

Generación y análisis de PIV5 recombinante que expresa HA de H5N1 (rPIV5-H5) *in vitro* Para probar si el PIV5 recombinante que expresa HA de H5N1 puede proteger a los ratones contra la exposición letal a HPAI H5N1, se insertó el gen HA de un HPAI H5N1 sin el sitio de escisión polibásico (Horimoto y Kawaoka, 1994, *J Virol*; 68:2130-3128; y Suguitan *et al.* 2012, *J Virol*; 86: 2706-2714) en un plásmido que contenía el genoma de ADNc de longitud completa de PIV5 en la unión entre los genes HN y L de PIV5 (ZL48) (Fig. 18A). Se recuperó el virus infeccioso ZL48

(rPIV5-H5) transfectando el plásmido a células BSR T7 junto con los plásmidos codificantes de NP, P y L como se ha descrito anteriormente (Sun *et al.*, 2011, *J Viral*; 85: 8376-8385). El virus recuperado se purificó en placa y se cultivó en células Vero. El genoma de longitud completa del virus purificado en placa se secuenció usando la secuenciación RT-PCR directa. Una gran cantidad de virus creció en las células MDBK. El título del virus fue de 10^8 ufp/ml (Fig. 18B).

5 La expresión de HA de H5N1 a partir de células infectadas con ZL48 se confirmó mediante inmunotransferencia (Fig. 19A) e inmunofluorescencia (Fig. 19B). ZL48 creció de manera similar a PIV5 de tipo silvestre, como se muestra en una curva de crecimiento de Mdl baja (Fig. 19C).

10 Inmunogenicidad de rPIV5-H5 en ratones. Para determinar si ZL48 podría generar inmunidad específica de HA *in vivo*, se infectaron ratones por vía intranasal con una sola dosis de 10^6 ufp de ZL48 o PIV5 de tipo silvestre, y se compararon las respuestas inmunitarias con las de los ratones infectados con una construcción de vacuna de genética inversa de H5N1 (rgVN-PR8) o inmunizados con virus H5N1 inactivados (iA VN). Los ratones se sangraron 21 días después de la inoculación/inmunización. Se determinaron los niveles de IgG anti-HA en suero usando ELISA (Fig. 20A y 20B). La infección de ZL48 generó niveles comparables y equilibrados de IgG 1 e IgG2a para el virión de H5N1 inactivado y el

15 H5N1 recombinante que contenía genes internos de PR8 y HA y NA de H5N1. Los títulos de anticuerpos neutralizantes (nAb) de los sueros de ratones infectados con ZL48 fueron bajos (Fig. 20C). Sin embargo, un refuerzo a los 21 ddi mejoró los niveles de nAb en suero a un nivel que se considera protector. Las respuestas celulares se examinaron usando el ensayo Elispot. Los ratones infectados con ZL48 generaron respuestas celulares (Fig. 20D). Si bien la respuesta de Th1 (linfocitos T productoras de IFN γ) fue limitada en comparación con los ratones infectados con el virus

20 H5N1 de genética inversa, estos ratones tuvieron respuestas a todo el virus de la gripe, incluyendo a los antígenos inmunodominantes contenidos en células internas y proteínas no estructurales (Vitiello *et al.*, 1996, *J Immunol.*, 157: 5555-5562), en comparación con ZL48, que solo tenían HA de la gripe, y los linfocitos fueron reestimulados con virus completos.

25 Eficacia de rPIV5-H5 frente a la exposición al virus de la gripe H5N1 recombinante en ratones. Debido al coste y al título de nAb relativamente bajo, primero se examinó la eficacia de ZL48 contra el virus homotípico en ratones usando un virus de la gripe recombinante. rgVN-PR8 (H5N1), que contiene todos los genes internos de PR8 y HA y NA de HPAI H5N1 (con el sitio de escisión polibásico dentro de HA eliminado). Este virus es menos virulento en ratones que el HPAI H5N1 de tipo silvestre en ratones, y se puede usar en la biocontención de BSL2. Los ratones fueron

30 inmunizados con una sola dosis de 10^6 ufp de ZL48 o PIV5 de tipo silvestre por vía intranasal. Un grupo separado de ratones recibió el virus H5N1 inactivado (iA VN) como control positivo. Los ratones se expusieron a una DICT₅₀ de 1.000 de rgA-PR8 (H5N1) a los 21 días posteriores a la inmunización. Debido a que rgVN-PR8 (H5N1) no causa mortalidad en ratones, se examinó la eficacia de la inmunización con ZL48 usando títulos del virus de exposición en los pulmones de los ratones. No se detectó virus rgVN-PR8 (H5N1) en los pulmones de ratones inmunizados con ZL48

35 4 días después de la exposición (Fig. 21A y 21B), lo que sugiere que ZL48 fue eficaz para prevenir la infección por H5N1.

Eficacia de rPIV5-H5 contra la exposición a HPAI H5N1 en ratones. Se examinó la eficacia de ZL48 contra el HPAI H5N1 en ratones con la cepa A/Vietnam/1203/2004 (Govorkova *et al.*, 2005, *J Viral*; 79: 2191-2198). Los ratones fueron

40 inmunizados con una sola dosis de 10^6 ufp de ZL48 por vía intranasal. Los ratones se expusieron a H5N1 21 días después de la inmunización. Los ratones inmunizados con PIV5 perdieron un peso sustancial y el 90 por ciento de ellos murió a los 10 días de la prueba, muriendo todos ellos a los 14 días de la exposición (Fig. 225B). Por el contrario, todos los ratones inmunizados con ZL48 sobrevivieron a la exposición y no se observó pérdida de peso (Fig. 22A) durante el tiempo del experimento. Además, no se detectó virus de exposición en los pulmones de los ratones

45 inmunizados con ZL48 (Fig. 22C), lo que indica que ZL48 es eficaz en la prevención de la infección por H5N1 en ratones.

Generación de PIV5 recombinante que expresa HA de H5N1 (rPIV5-H5) en diferentes ubicaciones dentro del genoma de PIV5 y análisis *in vitro* e *in vivo*. La distancia a la secuencia líder, el único promotor de facto para PIV5, es inversamente proporcional a los niveles de expresión génica. La unión de genes entre los genes HN y L en la que se

50 insertó HA de H5N1 en ZL48 es la más distante a la secuencia líder en PIV5 (Fig. 18A). El traslado de HA de H5N1 de la unión de genes HN-L más cerca de la secuencia líder aumentará el nivel de expresión génica de la proteína HA de H5N1. Con el razonamiento de que el aumento del nivel de expresión de HA de H5N1 aumentaría la eficacia de la vacuna, se insertó el gen HA de H5N1 entre la secuencia líder y el gen NP. Desafortunadamente, aunque se generó un plásmido con una inserción entre la secuencia líder y el gen NP, el plásmido no pudo generar un virus infeccioso viable (Fig. 18), lo que sugiere que la inserción es perjudicial para el ciclo de vida del virus. El gen HA de H5N1 se

55 insertó en la siguiente unión de genes, la unión de los genes NP y V/P (ZL209). Mientras que se obtuvieron virus recombinantes del plásmido ZL209, los virus no crecieron bien en las células de cultivo de tejidos. Además, los virus contenían mutaciones en los otros sitios (véase, por ejemplo, Fig. 18B). El gen HA de H5N1 se insertó en la siguiente

60 unión de genes, que es la unión del gen V/P y M (ZL47, Fig. 18), así como en la unión de SH y HN (ZL46, Fig. 18). ZL46 y ZL48 crecieron de manera similar a PIV5 de tipo silvestre, mientras que ZL47 tuvo una ligera reducción en el título (Fig. 23A). El nivel de expresión de HA de H5N1 fue más alto en las células infectadas con ZL46, mientras que, en las células infectadas con ZL47, el nivel de HA de H5N1 fue similar al de las células infectadas con ZL48 (Fig. 23B). Se compararon las capacidades de estos virus para replicarse en ratones mediante la determinación de títulos de los

65 virus en los pulmones de ratones infectados. Los títulos de PIV5 y ZL46 fueron similares a los 4 días después de la infección (Fig. 24). Los títulos en los pulmones de los ratones infectados con ZL48 y ZL47 fueron más bajos que los

de los ratones infectados con PIV5 o ZL46. Como media, ZL47 fue el más bajo (Fig. 24) (sin embargo, la diferencia entre ZL47 y ZL48 no es estadísticamente significativa).

Determinación de la eficacia de PIV5H5 recombinante que expresa HA de H5N1 contra la exposición a HPAI H5N1 en ratones. Como todas las vacunas de PIV5 recombinantes que expresan HA de H5N1 proporcionaron una protección completa contra la exposición de H5N1 en ratones después de la inoculación de una sola dosis alta (10^6 ufp), se realizó un estudio de dosis-respuesta para determinar si la ubicación del gen HA de H5N1 en el genoma de PIV5 modificaba la eficacia de la vacuna. Los ratones se infectaron con ZL46, 47 y 48 a una dosis de 10^3 , 10^4 o 10^5 ufp por vía intranasal. Los ratones se sangraron a los 21 días de la infección y se analizaron los sueros.

Todos los ratones inoculados con 10^4 ufp y por encima de ZL46, ZL47 o ZL48 sobrevivieron a la exposición letal a H5N1. Sin embargo, la baja dosis de inmunización reveló resultados distintos. Mil (10^3) ufp de ZL46 protegieron al 100 % de los ratones contra una exposición letal a HPAI H5N1, mientras que ZL48 protegió al 70 % de los animales inmunizados, y ZL47 solo protegió al 30 % de los ratones (Fig. 258A), lo que sugiere que la inserción del gen HA de H5N1 entre SH y HN permitió la sensibilización más potente de las respuestas inmunitarias protectoras. Examinando la pérdida de peso, se observó una tendencia similar. A un inóculo de 10^3 , los ratones inmunizados con ZL47 tuvieron la mayor pérdida de peso, mientras que ZL46 tuvo la menor pérdida de peso (Fig. 25B). A un inóculo de 10^4 los de ZL48 y ZL46 estaban protegidos de manera similar contra la pérdida de peso, mientras que los ratones inmunizados con ZL47 aún perdieron el 10-15 % de su peso inicial (Fig. 25C). A dosis de inmunización de 10^5 y superiores, todos los ratones estaban igualmente protegidos contra la pérdida de peso debida a la infección por HPAI (Fig. 25D).

Discusión

En este ejemplo, se probó PIV5 recombinante que expresa HA de H5N1 contra la exposición con el virus de la gripe más virulento en ratones, HPAI H5N1. Esta vacuna recombinante fue eficaz en la protección de los ratones contra la exposición a HPAI H5N1, incluso a dosis muy bajas, lo que indica que PIV5 es un vector viable para el desarrollo de la vacuna contra H5N1. Actualmente, la única vacuna aprobada por la FDA contra el H5N1 tiene serias limitaciones, particularmente porque debe administrarse dos veces y requiere concentraciones sustancialmente más altas de la vacuna para lograr un nivel moderado de eficacia en comparación con las vacunas contra la gripe convencionales. Las vacunas convencionales que usan el HA y NA de los virus H5N1 han sido escasamente inmunogénicas, y tienen problemas de seguridad y producción (revisado en Stephenson *et al.*, 2004, *Lancet Infect Dis*; 4:499-509). Una vacuna contra H5N1 basada en PIV5 tiene ventajas frente a la actual vacuna contra H5N1 aprobada por la FDA debido a que una vacuna contra H5N1 basada en PIV5 tal como ZL46 puede generar inmunidad protectora con una sola dosis baja (10^3 ufp por ratón), mientras que la vacuna se puede cultivar a 10^8 ufp/ml en células de cultivo de tejidos, sin huevos especiales libres de patógenos, y la producción de la vacuna no representa un riesgo para la salud de los trabajadores. Además, Debido a la naturaleza rentable de la vacuna contra H5N1 basada en PIV5, es posible usarla en vehículos de animales de H5N1 tales como los pollos.

Los paramixovirus tales como PIV5 solo inician la transcripción en la secuencia líder. Por lo tanto, la distancia a la secuencia líder es inversamente proporcional a los niveles del gen vírico. La unión de genes entre los genes HN y L es la secuencia más distante a la líder en PIV5. Se ha usado a menudo para insertar genes foráneos a fin de evitar cualquier posible efecto adverso de la inserción de genes foráneos (He *et al.*, 1997, *Virology*; 237:249-260; y Tompkins *et al.*, 2007, *Virology*; 362:139-150) (Fig. 18). El traslado de HA de H5N1 de la unión de genes HN-L más cerca de la secuencia líder debería aumentar el nivel de expresión génica. Es interesante que la inserción de un gen foráneo entre la secuencia líder y el gen NP no condujo a un virus viable, lo que sugiere que la inserción es perjudicial para el ciclo de vida del virus, y que la región entre la secuencia líder y el gen NP es fundamental para la replicación de PIV5. Aunque la inserción de HA de H5N1 entre NP y V/P generó un virus viable, el virus fue defectuoso en su crecimiento, y las mutaciones aumentaron en las otras regiones de los virus recuperados, lo que sugiere que la región es importante para la replicación del virus, también. Se ha informado anteriormente que la proporción de la expresión de NP con respecto a la expresión del gen V/P es fundamental para la replicación óptima del virus en el sistema de mini-genoma (Lin *et al.*, 2005, *Virology*; 338: 270-280). Es probable que la inserción de HA de H5N1 entre NP y V/P afectó a la proporción de NP con respecto a V/P, produciendo defectos en la replicación del virus. Este resultado es similar a la inserción de GFP entre N y P en VSV. Aunque ZL46, ZL47 y ZL48 proporcionaron una protección completa contra la exposición a H5N1 en ratones después de una sola dosis de inoculación tan baja como de 10^4 ufp por ratón, es sorprendente que la inserción de HA de H5N1 entre V/P y M no proporcionara una mejor protección que ZL48 (inserción entre HN y L) o ZL46 (inserción entre SH y HN). Es posible que la inserción entre V/P y M haya afectado negativamente a la replicación del virus recombinante *in vitro* (Fig. 23) e *in vivo* (Fig. 24), lo que da lugar a una vacuna candidata menos eficaz. En el ejemplo siguiente, se muestra que se necesita PIV5 recombinante vivo para una vacunación eficaz. Estos resultados indican que la aptitud del virus *in vivo* y del sitio de inserción dentro del genoma de PIV5 tiene un impacto importante en la eficacia de la vacuna candidata.

El anticuerpo neutralizante contra el virus de la gripe es el sello distintivo de la inmunidad protectora. Sin embargo, a una dosis más baja de inoculación con PIV5 recombinante que expresa HA de H5N1, apenas se detectaron niveles bajos de nAb, sin embargo, los ratones estaban completamente protegidos. Los resultados sugieren que las respuestas inmunitarias mediadas por células de una vacuna viva pueden contribuir a la protección contra la exposición al virus de la gripe altamente patógeno. Esto está respaldado por estudios que usan la proteína NP de la gripe como

antígeno vacunal (Epstein *et al.*, 2005, *Vaccine*; 23: 5404-5410). Es interesante que el refuerzo de ZL48 potenciara la inmunidad en los ratones, lo que sugiere que la inoculación de sensibilización no impidió la reinmunización o la infección de la vacuna basada en PIV5. Esto coincide con el informe previo de que, en ratones, los anticuerpos neutralizantes contra PIV5 no previenen la infección por PIV5 (Young *et al.*, 1990, *J Virol*; 64: 5403-5411). Aunque las personas han estado expuestas al PIV5, el PIV5 no está asociado con enfermedades humanas, lo que sugiere que PIV5 puede ser seguro para su uso en seres humanos.

Este ejemplo se ha publicado como Li *et al.*, "Recombinant Parainfluenza Virus 5 Expressing Hemagglutinin of Influenza A Virus H5N1 Protected Mice against Lethal Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1 Challenge", *J Virol*, enero de 2013; 87(1):354-62. doi: 10.1128/JVI.02321-12. Epub 17 de octubre de 2012.

Ejemplo 4

Vacuna contra la rabia basada en un virus paragripal 5 recombinante que expresa la glicoproteína del virus de la rabia

Se necesita una vacuna contra la rabia eficaz y rentable. En este ejemplo, se probó una vacuna contra la rabia transmitida por PIV5 en ratones. Se administró un PIV5 recombinante que codificaba la glicoproteína RABV (G) (rPIV5-RV-G) a los ratones mediante la inoculación por vía intranasal, intramuscular y oral. Se expusieron los ratones vacunados a la dosis letal del 50 % (DL₅₀) de exposición a la rabia intracerebral de CVS-24. Bastó con una sola dosis de 10⁶ ufp de rPIV5-RV-G para una protección del 100 % administrada por vía IN. Los ratones vacunados con una sola dosis de 10⁸ ufp de rPIV5-RV-G por vía intramuscular recibieron una protección muy potente (90 % -100 %). Curiosamente, los ratones vacunados por vía oral con una sola dosis de 10⁸ ufp de rPIV5-RV-G mostraron una tasa de supervivencia del 50 %, lo que es comparable a la tasa de supervivencia del 60 % de los ratones inoculados con una cepa de vacuna contra la rabia atenuada rLBNSE. Este es el primer informe de una vacuna candidata contra la rabia eficaz por vía oral en animales basada en PIV5 como vector, e indica que el rPIV5-RV-G es un excelente candidato para una nueva generación de vacunas recombinantes contra la rabia y que PIV5 es un posible vector para las vacunas orales.

Como una de las enfermedades zoonóticas, la infección por el virus de la rabia (RABV) conduce a la rabia en los animales de sangre caliente, incluyendo los seres humanos caracterizados por encefalitis aguda en la fase temprana, y muerte en la etapa posterior sin el tratamiento posterior a la exposición (Rupprecht *et al.*, 2006, *Expert Rev Anti Infect Ther*; 4: 1021-1038). La infección por el virus de la rabia (RABV) que no se trata conduce a la muerte. La vacuna y el tratamiento posterior a la exposición han sido eficaces para prevenir la infección por RABV. Sin embargo, debido al coste, la vacunación y el tratamiento de la rabia no se han usado ampliamente en los países en desarrollo. Se informa de aproximadamente 55.000 muertes humanas causadas por la rabia al año, y la mayoría de estos casos ocurren en países en desarrollo (véase, por ejemplo, Martinez, 2000, *Int J Infect Dis*; 4: 222-228). Los perros callejeros, los carnívoros silvestres y los murciélagos son los reservorios naturales de la RABV de campo, y estos vehículos rabiosos son un riesgo para la salud pública de los seres humanos a los animales domésticos. La incidencia de la rabia humana se atribuye en gran medida a la mordedura de perros callejeros en los países en desarrollo, donde la vacunación de animales es limitada, en especial, en las zonas rurales.

La vacunación es el método más eficaz de tratamiento antes de la exposición contra la infección por RABV, y se ha usado tanto en seres humanos como en reservorios de animales. Para el tratamiento posterior a la exposición, se utilizan inoculaciones múltiples de vacunas de cultivos celulares inactivados y la inyección de inmunoglobulina juntas para prevenir el desarrollo de la rabia. Sin embargo, la inmunización con la vacuna contra la rabia y el tratamiento con inmunoglobulina son relativamente costosos para las familias de las zonas rurales o remotas de los países en desarrollo (Knobel *et al.*, 2005, *Bull World Health Organ*; 83: 360-368). La vacunación de perros callejeros es también una posible estrategia rentable para prevenir la infección por la rabia. Por lo tanto, se necesita una vacuna eficaz y rentable. Para la vacunación de los perros callejeros, será ideal la vacunación sin aguja tal como la inmunización oral.

Actualmente, las vacunas contra la rabia muertas se preparan a partir de células de embrión de pollo, BHK o células Vero, y están disponibles para un uso en seres humanos y animales domésticos a través de la inyección intramuscular (vía intramuscular) (Wu *et al.*, 2011, *Expert Rev Vaccines*; 10: 1597-1608). Las vacunas contra la rabia antes de la exposición se administran de manera rutinaria mediante tres inyecciones sucesivas de vacunas inactivadas. Para la prevención de la rabia en animales domésticos y silvestres, se han desarrollado vacunas contra la rabia vivas atenuadas (vacunas contra la rabia vivas modificadas basadas en SAD y ERA) y vacunas contra la rabia recombinantes basadas en virus vaccinia que expresan G de RABV (V-RG) (Kieny *et al.*, 1984, *Nature*; 312:4; Meslin *et al.*, 1994, *Curr Top Microbial Immunol*; 187:26; y Wiktor *et al.*, 1984, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 81: 7194-7198). A pesar del hecho de que estas vacunas generaron una buena respuesta inmunitaria protectora en muchas especies, se observaron inmunidades protectoras deficientes en los perros y en las mofetas (Murray *et al.*, 2009, *J Am Vet Med Assoc*; 235:691-695; Rupprecht *et al.*, 2001, *N Engl J Med*; 345:5; y Tolson *et al.*, 1987, *Can J Vet Res*; 51: 363-366). El uso de RABV atenuados vivos también planteó problemas de seguridad acerca de la reversión al fenotipo patógeno debido a la mutación del genoma de ARN. de la virulencia residual causada por sobredosis de vacuna o del cambio de especies diana. Se informó que el virus vaccinia como vacuna causaba reacciones locales y sistémicas adversas en los seres humanos, y también se informó que la vacuna contra la rabia transmitida por el virus vaccinia (V-RG) también causó reacciones en los seres humanos (CDC, 2009, *MMWR* 58:4; y Rupprecht *et al.* 1990, *J Wildl Dis*; 26:

99-102). Aunque posteriormente se ha desarrollado un virus vaccinia modificado Ankara (MVA) que expresa RV G como un sustituto más seguro para la vacuna de V-RG ampliamente usada, la inmunización oral del MVA recombinante no logró inducir respuestas inmunitarias anamnésicas en perros ni en mapaches con exposición previa (Weyer *et al.*, 2009, *Vaccine*; 27: 7198-7201). Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar una vacuna eficaz y segura contra la rabia tanto para los animales como para los seres humanos. Para la vacunación de animales silvestres, se necesita una vacuna contra la rabia que pueda administrarse por vía oral.

RABV, un miembro del género *Lyssavirus* de la familia *Rhabdoviridae*, es un virus de ARN envuelto que posee un genoma monocatenario de sentido negativo con una estructura en forma de bala. El genoma de ARN codifica cinco genes estructurales con el siguiente orden: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de la matriz (M), glicoproteína (G) y la ARN polimerasa vírica (L) (9). Las proteínas N, P, L se combinan con el genoma del virus del ARN para formar la ribonucleoproteína (RNP). El G de RABV es el principal antígeno para los anticuerpos neutralizantes de virus (Cox *et al.*, 1977, *Infect Immun*; 16: 754-759).

El virus paragripal de tipo 5 (PIV5) es un virus de ARN de cadena negativa no segmentada con un genoma de aproximadamente 15 kilobases de tamaño y que pertenece a la familia de los paramixovirus. El PIV5 infecta a un amplio espectro de estirpes celulares sin efecto citopático significativo (CPE), que soporta el crecimiento de PIV5 en estirpes celulares continuas para obtener títulos altos, proporcionando un medio económico para la producción en masa. Existe la asociación de PIV5 con enfermedades humanas, no existe riesgo de integración del genoma del virus en el ADN del hospedador, y la estabilidad del genoma del virus de ARN de cadena negativa frente a los virus de ARN de sentido positivo sugiere que PIV5 es un buen vector vacunal y una herramienta de expresión de proteínas. Debido a que las vacunas contra la tos de las perreras que contienen PIV5 vivo se han usado en perros durante muchos años sin que haya aumentado la preocupación por la seguridad de los animales o los seres humanos, PIV5 que expresa G de RABV será una vacuna eficaz para los perros, y se puede incorporar fácilmente a los programas de vacunación existentes para perros. Este ejemplo muestra a PIV5 que expresa G de RABV como una nueva vacuna contra la rabia.

Materiales y métodos

Células. Se mantuvieron BHK21, células BSR-T7 y células BSR, una estirpe celular clonada derivada de células BHK21 (Sarmiento *et al.*, 2006, *Virus Res*; 121: 144-151), en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con un caldo de fosfato de triptosa al 10 %, suero bovino fetal (FBS) al 10 % y penicilina-estreptomycin al 1 %. Se cultivaron células MDBK en DMEM con FBS al 10 %. Se mantuvieron células de neuroblastoma de ratón (NA) en medio RPMI 1640 complementado con FBS al 10 %. Se añadió G418 al medio de las células BSR-T7 para obtener una concentración final de 400 µg/ml. Para la infección por el virus, se lavaron monocapas con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se inocularon con virus en DMEM más albúmina de suero bovino al 1 %. Las monocapas se lavaron con PBS y se incubaron con DMEM que contenía FBS al 2 % a 37 °C con CO₂ al 5 %.

Virus. El PIV5 de tipo silvestre se ha descrito anteriormente (He *et al.*, 1997, *Virology*; 237: 249-260). Para concentrar el PIV5, se cargó el sobrenadante que contenía el virus sobre sacarosa al 20 % y se sedimentó en un rotor de tipo F40L-8X100 ultracentrífugo Thermo scientific a 37.000 rpm durante 1 h. Luego, se volvieron a suspender los sedimentos en medio de DMEM con BSA al 1 % y se almacenaron a -70 °C. Se propagó la cepa del virus de la rabia CVS-24 adaptada al cerebro de ratón lactante (siendo CVS el patrón de virus de exposición) en ratones lactantes. La cepa de vacuna contra la rabia LBNSE se derivó de la cepa L16 que se informó anteriormente (Wen *et al.*, 2011, *J Viral*; 85: 1634-1644) y se cultivó en células BSR. El patrón del virus de exposición 11 (CVS-11) se propagó en células NA. El anticuerpo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) contra la proteína RV-N se adquirió en Fujirebio Diagnostics, Inc. (Malvern, PA).

Construcción del clon de virus infeccioso. El plásmido pBH311 del clon infeccioso PIV5 contiene el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) como un gen adicional entre los genes HN y L en el genoma de PIV5 y se expresa la GFP (He *et al.*, 1997, *Virology*; 237: 249-260).

El gen G de RABV de longitud completa (1.575 nucleótidos) se amplificó por PCR a partir de un plásmido que contenía el gen G de la cepa ERA de RABV. Las secuencias del cebador son las siguientes: RV-G1, 5' AACAAAGCGCGGCCGCGCCACCATGGTTCTCAGGCTCTCCTGTTTGAC (SEQ ID NO: 5); y RV-G2, 5' AACAAAGCGCGGCCGCTCACAGTCTGGTCTCACCCC CACTC (SEQ ID NO: 6). El fragmento de PCR se insertó en el vector de clon infeccioso PIV5 para generar un plásmido que contuviera G de RABV entre HN y L como un gen adicional, pPIV5-RV-G. La longitud del genoma de rPIV5-RV-G se mantuvo como múltiplo de seis.

Rescate del virus rPIV5-RV-G. Para rescatar el virus rPIV5-RV-G, se transfectaron el plásmido pPIV5-RV-G (3 µg), junto con los plásmidos pCAGGS-PIV5-L (1,5 µg), pCAGGS-PIV5-NP (1 µg) y pCAGGS-PIV5-P (200 ng), a células BSRT-7. A los 4 días después de la transfección, se recogió el sobrenadante que contenía rPIV5-RV-G y se purificó en placa en células BHK21. Se seleccionaron placas (en desarrollo de 4 a 7 días después de la infección [ddi]) y se amplificaron adicionalmente en células MDBK. El ARN se extrajo del sobrenadante usando un minikit de ARN vírico QIAmp, y la transcripción inversa (RT) se realizó con cebadores aleatorios. El producto de transcripción inversa se amplificó adicionalmente mediante PCR usando cebadores específicos que unen el extremo 3' de HN o el extremo 5' de L. Las secuencias del cebador son las siguientes: 311-10699-F1, 5' CAGATTGTCCCATTATCCGTCAGGTGAC

(SEQ ID NO: 7); y 311-11764-R1, 5' AGGTCGATCTCATTGGGAGGTTTCCAAG (SEQ ID NO: 8). Los productos de PCR fueron secuenciados.

Curva de crecimiento y ensayo de placa. Se infectaron las células MDBK en placas de 6 pocillos con PIV5 o rPIV5-RV-G a una Mdl de 0,01. Los sobrenadantes se recogieron a los 0, 1, 2, 3, 4 y 5 días después de la infección. Para la infección de una alta Mdl, se infectaron las células MDBK en placas de 6 pocillos con PIV5 o rPIV5-RV-G a una Mdl de 5, y los sobrenadantes se recogieron a las 0, 12, 24, 36, 48 y 60 h después de la infección. Se infectaron las células BHK21 en placas de 6 pocillos con las reservas de virus en dilución en serie (1:10 a 1:10⁶). Después de 2 h, se retiró la mezcla de inoculación y se reemplazó por 5 ml de DMEM que contenía FBS al 2 %, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y agarosa de bajo punto de fusión al 1 %. Las placas se contaron a los 5 a 6 días de la infección. Se usaron dos réplicas para cada punto de tiempo.

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Para detectar la expresión de G de RABV, se examinaron células MDBK infectadas con rPIV5-RV-G mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA) (Chen *et al.*, 2010, *Virology*; 398: 87-97). En resumen, se fijaron las células con formaldehído al 3,7 % en PBS (pH 7,4) durante 10 min, y luego se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 % más FBS al 1 % en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Las células fijas se incubaron durante 1 h con anticuerpo primario (anticuerpo anti-RABV-G, de ratón a una dilución de 1:200; Novus Biologs, Inc.) a 37 °C. Anti-ratón de cabra conjugado con FITC (dilución 1:200; KPL, Inc.) se usó como el anticuerpo secundario.

Transferencia Western. Las células MDBK infectadas con rPIV5-RV-G se lisaron con tampón de extracción de células completas (WCEB) (Tris-HCl 50 mM [pH 8], NaCl 280 mM, NP-40 al 0,5 %, EDTA 0,2 mM, EGTA 2 mM y glicerol al 10 %) (Timani *et al.*, 2008, *J Virol*; 82: 9123-9133). Se aclararon los lisados por centrifugación a 4.000 rpm durante 15 minutos y los sobrenadantes se mezclaron con el mismo volumen de tampón de carga 2 x SDS (Tris-HCl 100 mM [pH 6,8], glicerol al 20 %, SDS al 4 %, Ditiotritol 200 mM [DTT] y azul de bromofenol al 0,1 %), se calentó a 95 °C durante 5 min, y se resolvió mediante SDS-PAGE al 10 %. Las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) usando un sistema de transferencia en seco iBlot (Invitrogen). La membrana se incubó con anticuerpo anti-RABV-G de ratón (dilución 1:2000) o anticuerpo anti-PIV5-V/P de ratón (dilución 1:2000, usado para el control de la infección por el virus PIV5) (Sun *et al.*, 2011, *J Virol*; 85:10261-10268), seguido de la incubación con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) a una dilución de 1:2000. Tras el lavado, se incubó la membrana de PVDF con sustrato ECL Advance (GE Healthcare) y se exploró usando una Image Station 440 de Kodak.

Purificación del virus. Para determinar si G de RABV se incorpora a las partículas recombinantes de PIV5, se cargaron los virus del sobrenadante aclarado sobre sacarosa al 20 % y se sedimentaron en un rotor de ultracentrifugación de tipo Se mantuvieron F40L, 8x100 de Thermo Scientific a 37.000 rpm durante 1 h. Luego, se volvieron a suspender los sedimentos en tampón TNE (Tris 10 mM [pH 7,4], NaCl 100 mM, EDTA 1 mM) y se cargaron en un gradiente de sacarosa del 10 % al 80 % y se centrifugaron en un rotor TH-641 durante 1 h a 37.000 rpm. Se recogieron las bandas de virus y se sedimentaron en un rotor F40L-8x 100 durante 1 h a 37.000 rpm. Los virus purificados se volvieron a suspender en tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7,4). Se sometieron las proteínas de las partículas víricas purificadas a SDS-PAGE y análisis de transferencia Western.

Estudios en animales Se usaron ratones BALB/c hembra de seis a ocho semanas de vida en los estudios con animales. Todos los experimentos con animales se realizaron siguiendo protocolos aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales. Universidad de Georgia. La inmunización de los ratones se realiza por vía intranasal (IN), intramuscular (IM) u oral. Para la inmunización intranasal, se anestesiaron primero ratones BALB/c de seis semanas de vida inyectando por vía intraperitoneal Avertin (180-250 µl/kg) y luego se inocularon por vía intranasal dejando caer 100 µl de rPIV5-RV-G o PIV5 a diferentes dosis. Los ratones tratados con PBS sirvieron como controles. Tres semanas después, Los ratones fueron reforzados con la misma dosis de la primera inoculación en los dos experimentos de respuesta a la dosis. Los ratones también se inmunizaron por vía oral administrando partículas de rPIV5-RV-G, o se inyectaron por vía intramuscular con 100 µl de rPIV5-RV-G a diferentes dosis en el músculo del muslo de la pata trasera. Como control de la vacuna contra la rabia, se inmunizó un grupo de ratones por vía intramuscular con 1 x 10⁷ ufp de la cepa de vacuna contra la rabia LBNSE. Los ratones se sangraron desde la cola antes de la exposición para la evaluación escrológica.

La exposición de los ratones se llevó a cabo 3 semanas después de la inmunización para el experimento de una dosis o 1 semana después de un refuerzo para el experimento de dos dosis. Los ratones fueron infectados con dosis letales del 50 % (DL₅₀) de 50 intracerebrales de la cepa CVS-24 por vía IC. Los animales infectados se observaron diariamente durante 22 días para detectar síntomas de infección por el virus de la rabia.

Medición de anticuerpos de neutralización de la rabia. Se extrajo sangre de cada ratón en diferentes grupos para la medición de anticuerpos neutralizantes del virus (VNA) usando la prueba de inhibición rápida de foco fluorescente (RFFIT), que es la prueba estandarizada para la Organización Mundial de la Salud (OMS). En resumen, se prepararon 50 µl de diluciones con factor de dilución de cinco en portaobjetos Lab-Tek Chamber (Nalge Nunc International, Rochester, NY). Se añadió una FFD₅₀ (50 % de la dosis de focos fluorescentes) de 50 de CVS-11 a cada cámara y se incubó durante 90 min a 37 °C. Se añadieron células NA (10⁵ células) a cada cámara y los portaobjetos se incubaron

a 37 °C durante 20 h. Luego, las células se fijaron con acetona al 80 % enhiada con hielo y se tiñeron con anticuerpo anti-RV N conjugado con FITC durante 1 h a 37 °C. Se observaron veinte campos en cada cámara bajo un microscopio fluorescente, y se calcularon de criterio de valoración del 50 % de acuerdo con la fórmula de Reed-Meunch. Se compararon los valores con los del suero de referencia (obtenidos del Instituto Nacional de Patrones y Control Biológicos, Herts, RU), que contiene una concentración conocida (unidades internacionales, UI/ml) de VNA.

Resultados

Generación y análisis de PIV5 recombinante que expresa G de RABV. Se construyó una vacuna de rabia recombinante usando el vector PIV5 de la siguiente manera. Se insertó el gen de la glicoproteína de la cepa EAR de la rabia (RV-G) entre los genes HN y L de PIV5 (Fig. 26A). El gen RV-G del genoma de PIV5 estaba flanqueado con el inicio del gen (GS), secuencias intergénicas (I) y secuencias del final del gen (GE) de la región de unión de los genes NP y V/P, lo que dio lugar a un alto nivel de transcripción (He *et al.*, 1997, *Virology*; 237: 249-260). Se recuperó el virus y se confirmó el genoma mediante transcripción inversa (RT)-PCR y secuenciación.

Se detectó la expresión de la proteína RV-G en células infectadas con rPIV5-RV-G mediante un ensayo de inmunotinción indirecta (IFA). Las células infectadas con rPIV5-RV-G se tiñeron con un anticuerpo monoclonal de ratón contra G de RABV, mientras que las células infectadas con PIV5 no se tiñeron (Fig. 26B). La expresión de G de RABV en las células infectadas con rPIV5-RV-G se confirmó además mediante análisis de transferencia Western con anticuerpo monoclonal de ratón contra RV-G (Fig. 26C). El tamaño de G de RABV recombinante (~65 kDa) se espera como el del RABV nativa (Zhou *et al.*, 2006, *Mol Ther*; 14: 662-672).

Para determinar el efecto de la inserción del gen G de RABV en la replicación del virus, se determinaron las curvas de crecimiento en múltiples etapas y en una sola etapa de los virus PIV5 y rPIV5-RV-G. En el ensayo de la curva de crecimiento en múltiples etapas, las células MDBK se infectaron con 0,01 unidades formadoras de placa (ufp) por célula de (multiplicidad de infección, Mdi de 0,01) rPIV5 o rPIV5-RV-G y los sobrenadantes se recogieron a intervalos de 24 h a 120 h. En un ensayo de curva de crecimiento en una sola etapa, las células MDBK se infectaron con Mdi de 5 de rPIV5 o rPIV5-RV-G y los sobrenadantes se recogieron a intervalos de 12 h a 60 h. Los virus se cuantificaron mediante ensayo de placa en células BHK21. Como se muestra en las Fig. 27A y 27B, ambos virus tuvieron una cinética de crecimiento inicial similar, aunque la tasa de crecimiento para rPIV5-RV-G fue un poco menor que la del PIV5 de tipo silvestre entre 24 horas y 96 horas en el crecimiento en múltiples etapas y entre 12 horas y 48 horas en el crecimiento en una sola etapa. Ambos virus alcanzaron los títulos máximos similares aproximadamente 120 h después de la infección (di) en el crecimiento en varias etapas y 60 h en el crecimiento en una sola etapa. El resultado indicó que la introducción del gen G de RABV en el genoma de PIV5 como una unidad de expresión adicional no afectó significativamente al crecimiento del virus PIV5 *in vitro*.

Identificación de la incorporación de G de RABV a partículas de virus rPIV5-RV-G. Dado que G de RABV es una proteína de la envoltura, se examinó su incorporación a partículas de PIV5. El PIV5 y el rPIV5-RV-G se cultivaron en células MDBK y se purificaron, y los polipéptidos se analizaron mediante SDS-PAGE y transferencia Western. La SDS-PAGE separó los viriones purificados de PIV5 y rPIV5-RV-G en las principales proteínas estructurales de PIV5, incluyendo L, HN, NP, F, P y M (Fig. 28). El análisis de transferencia Western de virus purificados con anticuerpo específico de G de RABV detectó la presencia de la banda G de RABV en los viriones rPIV5-RV-G, mientras que no se encontró ninguna banda de G de RABV en los viriones PIV5 (Fig. 28). El resultado indicó que el G de RABV se incorpora a las partículas recombinantes de PIV5.

Eficacias de rPIV5-RV-G en ratones mediante inoculación intranasal. Para determinar si rPIV5-RV-G puede provocar suficiente inmunidad protectora contra una exposición potente a la rabia en un modelo de ratón, se realizó una pauta de inmunización de dos dosis. Debido a que las vacunas actuales que contienen PIV5 vivo se administran a los perros por vía IN, primero se probó la eficacia de rPIV5-RV-G usando la vacunación por vía IN. Cuatro grupos de ratones fueron vacunados con 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 ufp de rPIV5-RV-G. Un grupo de control recibió PBS por vía IN. Tres semanas después de la vacunación de sensibilización, todos los ratones recibieron un refuerzo con la misma cantidad de inóculo inicial. Una semana después, se recogieron los sueros y se usaron para los ensayos de VNA de la rabia. A partir de entonces, los ratones se expusieron a DL_{50} de 50 de la cepa CVS-24 de la rabia por vía IC. Los títulos de anticuerpo neutralizante de RABV (nAb) se determinaron siguiendo las pautas de la OMS. Como se muestra en las Fig. 29A y 29B, tanto la tasa de supervivencia como el nivel de nAb de RABV mostraron respuestas dependientes de la dosis. Los títulos medios de VNA y las tasas de supervivencia (VNA/Superviviente) para los grupos vacunados con 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 ufp de rPIV5-RV-G fueron de 0,53 UI/30 %, 1,52 Unidades Internacionales (UI)/77,8 %, 7,94 UI/100 %, 62,96 UI/100 %, en contraste con 0 UI/0 del grupo tratado con PBS. Se considera que 0,5 UI es el nivel mínimo de anticuerpo protector. La proporción de ratón individual con no menos de 0,5 UI en cada grupo se correlacionó fuertemente con la tasa de supervivencia, tal como en el grupo de 10^3 ufp de rPIV5-RV-G, tres de los diez ratones (30 %) con un nivel de anticuerpos protectores superior al mínimo, la tasa de supervivencia es del 30 %. Todos los ratones del grupo de PBS murieron en el transcurso de los 9 días posteriores a la exposición al RABV. El resultado mostró que el rPIV5-RV-G fue capaz de provocar respuestas inmunitarias protectoras contra la exposición a la rabia en ratones con un programa de inmunización de dos dosis. La pauta de dos dosis mínima eficaz de rPIV5-RV-G para una protección del 100 % es la de 10^5 ufp de rPIV5-RV-G.

Aunque el resultado de la prueba de pauta de dos dosis demostró el potencial inmunogénico de rPIV5-RV-G contra la exposición a la rabia, se examinó con más detalle si rPIV5-RV-G podía ser eficaz con una vacunación de una dosis en ratones. Tres grupos de ratones fueron vacunados con 10^5 , 10^6 o 10^7 ufp de rPIV5-RV-G. Un grupo de control recibió 10^7 ufp de PIV5 por vía IN. Tres semanas después de la inmunización, los ratones se expusieron a una DL_{50} de 50 de la cepa CVS-24 de la rabia por vía IC. Como se muestra en las Fig. 30A y 30B, los grupos de ratones inmunizados IN con 10^5 , 10^6 o 10^7 ufp de rPIV5-RV-G mostraron un aumento dependiente de la dosis en los títulos medios de VNA con tasas de supervivencia del 77,8 %. 100 % y 100 %. Por lo tanto, una sola dosis de 10^6 ufp de rPIV5-RV-G con vacunación IN fue la dosis mínima para una protección del 100 % contra la exposición al virus de la rabia.

Eficacias de rPIV5-RV-G en ratones mediante inoculación intramuscular. En algunas circunstancias, se puede preferir la vacunación IM. Por lo tanto, se examinó la eficacia de la inmunización IM. Al mismo tiempo que la inoculación IN, tres grupos de ratones recibieron mediante inyección 10^6 , 10^7 o 10^8 ufp de rPIV5-RV-G por vía IM. Tres semanas después de la inmunización, los ratones se expusieron a una DL_{50} de 50 de la cepa CVS-24 de la rabia por vía IC. Como se muestra en las Fig. 30A y 30B, Los grupos vacunados con 10^6 , 10^7 o 10^8 ufp por vía IM mostraron un aumento dependiente de la dosis en los títulos medios de VNA y mostraron tasas de supervivencia del 60 %, 70 % y 90 % respectivamente.

Eficacias de rPIV5-RV-G en ratones mediante inoculación oral. La vacunación eficaz por vía oral será fundamental para el éxito de la vacunación de animales silvestres. Para determinar la eficacia de la vacuna candidata mediante inmunización oral, se vacunaron tres grupos de ratones con 10^6 ufp de rPIV5-RV-G por vía IN, 10^8 ufp de rPIV5-RV-G por vía IM o 10^8 ufp de rPIV5-RV-G por vía oral. Dos grupos de control negativo recibieron inoculación con 10^6 ufp de PIV5 o PBS por vía IN. Además, un grupo de control de ratones fue vacunado con 10^7 ufp de la cepa rLBNSE, una vacuna atenuada contra la rabia por vía IM. Se recogieron los sueros para los ensayos de VNA del RV tres semanas después de la vacunación y los ratones se expusieron a una DL_{50} de 50 de la cepa CVS-24 de la rabia por vía IC. Como se muestra en la Fig. 31B, todos los ratones que reciben 10^6 ufp de rPIV5-RV-G por vía IN y 10^8 ufp de rPIV5-RV-G por vía IM sobrevivieron a la exposición. Los ratones vacunados por vía oral con 10^8 ufp de rPIV5-RV-G tuvieron una tasa de supervivencia del 50 %, mientras que sobrevivió el 60 % de los ratones vacunados con la cepa rLBNSE. Todos los ratones de los grupos de PIV5 o PBS murieron en el transcurso de los 9 días posteriores a la exposición. El nivel medio más alto de VNA se detectó en el grupo con 10^6 ufp de rPIV5-RV-G por vía IN (Fig. 31A). En general, como era de esperar, el nivel medio de VNA fue directamente proporcional a la tasa de supervivencia.

Discusión

Durante la última década, se han desarrollado varias vacunas candidatas recombinantes contra la rabia basadas en RABV atenuados vivos o virus recombinantes que expresaban G de RABV (tales como V-RG) como posibles alternativas a las vacunas actuales contra la rabia (Ge *et al.*, 2011, *J Virol*; 85:8241-8252; Li *et al.*, 2006, *Virology*; 356:147-154; Tordo *et al.*, 2008, *Dev Biol* (Basilea); 131:467-476; Weyer *et al.* 2007, *Vaccine*; 25:4213-4222; Weyer *et al.* 2009, *Vaccine*; 27:7198-7201; y Zhou *et al.* 2006, *Mol Ther*; 14: 662-672). Si bien algunas de las vacunas candidatas generaron inmunidad protectora cuando se administraron por vía IM, faltan datos sobre la eficacia de la inmunización oral con estos candidatos. De los reportados, la inmunización oral con adenovirus caninos portadores del gen G de la rabia no confirió protección contra la infección de la rabia en ratones (Li *et al.*, 2006, *Virology*; 356: 147-154). Como una alternativa más segura para V-RG, se generó la vacuna de MVA recombinante que expresa un gen de la glicoproteína del virus de la rabia, y se probó en ratones, y el resultado mostró que solo se observó protección en los ratones vacunados con dosis tan altas como 10^9 ufp por vía periférica (Weyer *et al.*, 2009, *Vaccine*; 27: 7198-7201).

Este ejemplo demuestra que la inserción del gen G de RABV entre los genes HN y L de PIV5 proporciona una vacuna eficaz a través de la inmunización oral, así como la inmunización por vía IN e IM. Esta es la primera demostración de la eficacia de la inmunización oral en ratones para la vacuna contra el virus de la rabia usando paramixovirus como vector vacunal, lo que indica que PIV5 se puede usar como un vector para el desarrollo de vacunas y que la administración oral es esencial.

Se probaron tres vías de inmunización en ratones. De estas, la inoculación IN dio las mejores respuestas inmunitarias y protección, demostrando que rPIV5-RV-G puede provocar una respuesta inmunitaria protectora contra la rabia. La inmunización contra la tos de las perreras se ha usado en muchos perros en EE. UU. Durante muchos años. El hecho de que PIV5-RV-G fue eficaz a través de la inmunización por vía IN sugiere que es posible incorporarlo en el programa de vacunación canina existente. La vía de inmunización IM fue más eficaz a dosis más altas. Es probable que cuanto mayor sea la dosis de PIV5-RV-G, más proteína G se inyectara en la inmunización por vía IM, ya que se detectó G en el virión PIV5-RV-G purificado. Sin embargo, como se muestra en los ejemplos anteriores, la inmunización altamente eficaz con la vacuna basada en PIV5 por vía IM requiere que el virus esté vivo, ya que la vacuna inactivada basada en PIV5 solo proporciona inmunidad parcial administrada por vía IM (véase el Ejemplo 7 y Mooney *et al.* 2013, *J Viral*; 87(1):363-71). Mientras que la inoculación de una sola dosis proporcionó inmunidad contra la exposición letal del virus de la rabia en ratones, un refuerzo aumentó aún más la eficacia de rPIV5-RV-G: La sensibilización-refuerzo con 10^5 ufp de rPIV5-RV-G proporcionó una protección del 100 % frente a la protección del 77 % que ofrece una dosis única de 10^5 ufp por vía IN de inoculación. Los títulos medios de VNA aumentaron de 2,76 UI en una dosis de 10^5 ufp a 7,94 UI

en la vacunación de dos dosis. Lo más notable, Los VNA aumentaron de 4,73 UI a 62,96 UI en ratones con una dosis a con dos dosis de 10^6 ufp de rPIV5-RV-G mediante inoculación por vía IN. La respuesta inmunitaria anamnésica fue provocada en ratones vacunados con rPIV5-RV-G, lo que sugiere que la exposición previa a PIV5 no impidió una respuesta inmunitaria potente al antígeno vectorizado por PIV5. Una de las preocupaciones sobre el uso de la vacuna de rPIV5-RV-G es si la inmunidad anti-PIV5 preexistente influirá negativamente en la eficacia de la vacuna vectorizada con PIV5.

Las potentes respuestas inmunitarias del refuerzo con la vacuna viva sugieren que la inmunidad preexistente al vector vírico no afectó a la eficacia de la vacuna basada en PIV5. Además, como se muestra en el Ejemplo 2, los perros con anticuerpos neutralizantes contra PIV5 generaron una respuesta inmunitaria protectora contra el virus de la gripe tras la inmunización con PIV5 que expresa HA del virus de la gripe A, demostrando que la vacuna basada en PIV5 es eficaz en perros con exposición previa (véase Ejemplo 2 y Chen *et al.*, 2012, *PloS One*; 7(11):e50144). El uso de vacunas contra la rabia, en especial, de las atenuadas vivas, en los perros recién nacidos es limitado debido al anticuerpo antirrábico materno, que puede durar hasta 6 meses. La vacuna contra la rabia basada en PIV5 ofrece una alternativa para vacunar eficazmente a los perros recién nacidos.

Mientras que la inmunización por vía IN proporcionó la mejor protección para rPIV5-RV-G, para vacunar perros callejeros o animales silvestres, la inmunización oral será el mejor enfoque. La vacuna oral tiene ventajas frente a las vacunas tradicionales, tal como su facilidad de uso, compatibilidad con campañas de inmunización en masa y capacidad para llegar a especies difíciles de alcanzar (Faber *et al.*, 2009, *Zoonoses Public Health*; 56: 262-269). La mitad de los ratones del presente estudio estaban protegidos con una dosis de vacunación. Esto es comparable con la vacuna actual contra la rabia viva. El mecanismo de protección de la vacunación oral es poco conocido. El título de VNA de los sueros de sangre periférica de ratones vacunados por vía oral indicó una respuesta inmunitaria sistémica. El intervalo de títulos de VNA de la inoculación oral estuvo entre 0,1 UI y 3,8 UI con un título medio de 1,5 UI. El PIV5 probablemente pudo administrar el antígeno por vía oral a las células de la mucosa, lo que dio lugar a respuestas inmunitarias específicas, incluyendo una respuesta sistémica al antígeno vectorizado por PIV5. Es posible aumentar aún más la eficacia de protección del inóculo oral mediante el uso de un programa de sensibilización-refuerzo. Además, la modificación del vector PIV5 puede aumentar la eficacia de la vacuna antirrábica vectorizada por PIV5. Como se muestra en el ejemplo anterior, el sitio de inserción del gen foráneo dentro de PIV5 afecta a la inmunogenicidad de la vacuna basada en PIV5 (véase también Li *et al.*, 2013, *J Virol*; 87(1):354-62). Por ejemplo, la inserción de HA de H5N1 entre SH y HN dentro de PIV5 da lugar a una vacuna candidata que genera una mejor inmunidad contra la exposición a H5N1 que una vacuna con la inserción de HA de H5N1 entre HN y L dentro de PIV5 en ratones. La eficacia de la vacuna basada en PIV5 puede mejorarse aún más para la inmunización oral insertando el gen G en diferentes lugares dentro del genoma de PIV5. Además, la expresión de antígenos adicionales del virus de la rabia puede aumentar la potencia de la vacuna basada en PIV5. Se ha informado anteriormente que la RNP contra la rabia puede ser protectora. Por ejemplo, la expresión de una de las proteínas de la rabia N, P o L junto con la proteína G usando PIV5 pueden mejorar la eficacia de la protección inmunológica.

Como se muestra en este ejemplo, una vacuna contra la rabia basada en PIV5 generó una potente respuesta inmunitaria que protegió de una exposición letal de la infección por el virus de la rabia, y demuestra el potencial del PIV5 como vacuna para la rabia para el control de la infección de la rabia en perros, así como su potencial como vector para otras enfermedades infecciosas en perros y otros animales, así como en seres humanos.

Este ejemplo también se ha publicado como Chen *et al.*, "A novel rabies vaccine based on a recombinant parainfluenza virus 5 expressing rabies virus glycoprotein", *J Viral*; 26 de dic de 2012 [Epub antes de la edición impresa], doi:10.1128/JVI.02886-12.

Ejemplo 5

Inmunogenicidad de la vacuna basada en PIV5 para la vacunación *in ovo*

Este ejemplo demuestra la eficacia de la vacuna basada en PIV5 como una posible vacuna para la inoculación *in ovo*. Como se muestra en la Tabla 1, la inyección *in ovo* de PIV5 que expresa HA de H5N1 (PIV5-H5, también conocido como ZL46; en la que se insertó H5 entre el gen SH y el gen HN dentro del genoma de PIV5) no afectó a la tasa de eclosión.

Tabla 1. Tasas de eclosión de embriones de 18 días inoculados con PIV5-H5. Se infectaron 54 embriones SPF de 18 días con varias dosis de PIV5-H5 como se indica o PBS (grupo c). Sin eclosionar

Grupo N.º	ufp/Emb.	Huevos/grupo	hoy	muerto	VIVO	% de eclosión	% de vivos
c.	0	54	12	0	42	77,78	77,78
4	1×10^1	54	11	0	43	79,63	79,63
3	$1,8 \times 10^2$	54	11	0	43	79,63	79,63

2	3 x 10 ⁴	54	18	0	38	66,67	66,67
1	3 x 10 ⁵	54	10	0	44	81,48	81,48

Entonces, se examinaron los títulos de anticuerpos contra el virus de la gripe en pollos a los 14 y 28 días después de la eclosión. Una dosis tan baja como de 10 unidades formadoras de placa (ufp) fue capaz de generar una fuerte inmunidad contra el virus de la gripe (Fig. 32). En resumen, se determinaron los títulos de anticuerpos antigripales de pollos inoculados con PIV5-H5 por vía *in ovo*. Se vacunaron embriones de SPF de 18 días de vida *in ovo* usando 100 µl de PIV5-H5 (los títulos se muestran debajo de cada grupo en la Fig. 32). La vacunación se realizó usando el autómata Inovoject (Pfizer Animal Health, anterior Embrex). Después de la eclosión, los pollos se mantuvieron en unidades Horsfall-Bauer con presión positiva. Para investigar si los pollos vacunados habían suprimido el virus, se añadieron tres compañeros de incubación sin tratamiento previo del grupo de control a cada grupo inoculado con el virus. Se sangraron los pollos el día 14 y 28 después de la eclosión (de). Los títulos de inhibición de la hemaglutinación (HI) se determinaron siguiendo las recomendaciones de la OIE.

También se detectaron anticuerpos antigripales en pollos sin tratamiento previo y mezclados, lo que sugiere la supresión de PIV5-H5 (ZL46). Si bien la supresión de la vacuna viva es potencialmente beneficiosa para generar inmunidad de rebaño, puede plantear un desafío a nivel de regulación. Por lo tanto, se probarán otras vacunas de H5 basadas en PIV5 *in ovo*, para identificar una vacuna basada en PIV5 que genere una inmunidad potente sin supresión.

Se han generado varias construcciones de PIV5 que están atenuadas y que expresan H5, y se probarán como se ha descrito anteriormente. Esto incluye, pero sin limitación, construcciones como las descritas en los ejemplos incluidos en el presente documento y mostradas en la Fig. 33. La Fig. 33 muestra esquemas de PIV5 recombinante que expresa HA de H5N1. El PIV5 es un paramixovirus con un genoma de ARN de sentido negativo. Codifica ocho proteínas víricas conocidas. Las secuencias líder y remolque son importantes para la replicación y transcripción del ARN del virus. Los resultados para PIV5-H5 (ZL46) se muestran en la Tabla 1 y la Fig. 32. PIV5-H5 (ZL48) tiene inserción de H5 entre los genes HN y L de PIV5. PIV5ΔSH-H5 carece del gen SH. PIV5VΔC-H5 carece del extremo C conservado de la proteína V. La eliminación de SH y la eliminación del extremo C conservado se han combinado para crear PIV5VΔCΔSH-H5. La eliminación de SH o de VΔC causa atenuación en ratones.

Como antes, se inocularán embriones de 18 días *in ovo* con virus a dosis diferentes (10.000, 1.000, 100 y 10 ufp/huevo). Se usarán 54 huevos por dilución. La inoculación de PBS se usará como control. Se compararán las tasas de eclosión de los huevos inoculados con virus e inoculados con PBS. Tras la eclosión, se tomarán 10 pollos de cada grupo y se mezclarán con 5 pollos del control negativo (inoculados con PBS). Para analizar dónde se suprime el virus, del tracto respiratorio o digestivo, se tomarán hisopos cloacales y orofaríngeos, y se determinará la presencia del virus mediante el aislamiento del virus usando células y/o mediante qRT-PCR. Se tomarán hisopos de cada pollo a los 2 días (d), 5 d, 7 d, 14 d de la eclosión y se comprobarán en busca de virus. 14 días y 28 días después de la incubación, se sangrarán los pollos y se determinarán los títulos de anti-HA mediante la prueba de HI.

Ejemplo 6

Vacunas para la salud animal

Desarrollo de la vacuna contra la gripe canina PIV5. Para desarrollar vacunas vectorizadas con PIV5-H3 para la gripe canina, se hará lo siguiente:

- determinar la secuencia de ADN para el gen H3 de la gripe canina;
- seleccionar elementos de control de la expresión;
- Sintetizar y clonar el gen HA en el sitio de inserción deseado del sistema del plásmido RG;
- confirmar la secuencia del gen HA y los elementos de control de la expresión;
- transfectar y rescatar virus recombinantes en estirpes celulares apropiadas;
- confirmar la expresión de la proteína HA del virus recombinante;
- preparar y almacenar reservas de virus recombinantes;
- purificar las placas de virus recombinantes;
- confirmar *in vitro* la estabilidad de la expresión de la proteína H3 y la secuencia de ADN, incluyendo secuencias promotoras y terminadoras en 5, 10 y 15 pasadas de virus purificados en placa;
- preparar una reserva de virus suficiente en las pasadas 10-12 para realizar al menos dos estudios en animales; y
- realizar estudios de animales POC en perros.

Desarrollo de vacunas para el moquillo canino a base de PIV5. Para desarrollar la vacuna vectorizada con PIV5-F + H para el virus del moquillo canino (CDV), se hará lo siguiente:

- determinar la secuencia de ADN para los genes F y H del CDV;
- seleccionar elementos de control de la expresión;
- clonar los genes F y H en el sitio de inserción deseado del sistema del plásmido RG;
- confirmar la secuencia del gen F y H, y los elementos de control de la expresión;

transfectar y rescatar virus recombinantes en la estirpe celular apropiada;
confirmar la expresión de la proteína F y H del virus recombinante;
preparar y almacenar reservas de virus recombinantes;
purificar las placas de virus recombinantes;

5 confirmar *in vitro* la estabilidad de la expresión de la proteína F y H y de la secuencia de ADN que incluye secuencias promotoras y terminadoras en 5, 10 y 15 pasadas del virus purificado en placa;
preparar una reserva de virus suficiente en las pasadas 10-12 para realizar al menos dos estudios en animales; y
realizar estudios de animales POC en perros.

10 Si ambos genes F + H no pueden incorporarse a un solo vector vacunal, las vacunas vectorizadas con PIV5-F y PIV5-H se sintetizarán por separado.

Planes de desarrollo de vacunas PIV5-FeLV. Para desarrollar vacunas vectorizadas con PIV5-gp70 para FeLV, se hará lo siguiente:

15 determinar la secuencia de ADN para la gp70 de FeLV;
seleccionar elementos de control de la expresión;
sintetizar y clonar el gen gp70 en el sitio de inserción deseado del sistema del plásmido RG;
confirmar la secuencia del gen gp70 y los elementos de control de la expresión;
20 transfectar y rescatar virus recombinantes en estirpes celulares apropiadas;
confirmar la expresión de la proteína gp70 del virus recombinante;
preparar y almacenar reservas de virus recombinantes;
purificar las placas de virus recombinantes;
confirmar *in vitro* la estabilidad de la expresión de la proteína gp70 y de las secuencias de ADN que incluye
25 secuencias promotoras y terminadoras en 5, 10 y 15 pasadas del virus purificado en placa;
preparar una reserva de virus suficiente en las pasadas 10-12 para realizar al menos dos estudios en animales; y
realizar estudios de animales POC en gatos.

Planes de desarrollo de vacunas para el calicivirus felino a base de PIV5. Para desarrollar vacunas vectorizadas con cápside de calicivirus a base de PIV5 para el calicivirus felino, se hará lo siguiente:

30 determinar la secuencia de ADN para el gen de la cápside del calicivirus felino;
seleccionar elementos de control de la expresión;
sintetizar y clonar el gen de la cápside en el sitio de inserción deseado del sistema del plásmido RG;
35 confirmar la secuencia del gen de la cápside y los elementos de control de la expresión;
transfectar y rescatar virus recombinantes en la estirpe celular apropiada;
confirmar la expresión de la proteína de la cápside del virus recombinante;
preparar y almacenar reservas de virus recombinantes;
purificar las placas de virus recombinantes;
40 confirmar *in vitro* la estabilidad de la expresión de la proteína de la cápside y de las secuencias de ADN que incluye secuencias promotoras y terminadoras en 5, 10 y 15 pasadas del virus purificado en placa;
preparar una reserva de virus suficiente en las pasadas 10-12 para realizar al menos dos estudios en animales; y
realizar estudios de animales POC en gatos.

45 Ejemplo 7

La vacuna de PIV5 recombinante que codifica la hemaglutinina gripal protege contra la infección por el virus de la gripe aviar altamente patógeno H5N1 cuando se administra por vía intranasal o intramuscular

50 Se necesitan nuevas metodologías de vacunación para prevenir la infección por el virus de la gripe. Algunos virus emergentes, tales como el virus de la gripe aviar altamente patógeno H5N1 (HPAI), no solo plantean amenazas de pandemia, sino también desafíos en el desarrollo y en la producción de vacunas. El virus paragripal 5 (PIV5) es un vector atractivo para el desarrollo de vacunas. Este ejemplo probó la eficacia de PIV5-H5, que codifica la HA del virus HPAI de H5N1, en diferentes esquemas de vacunación. Una sola inmunización intramuscular o intranasal con PIV5-
55 H5 vivo indujo rápidamente respuestas potentes de anticuerpos neutralizantes en suero y protegió contra la exposición a HPAI, aunque las respuestas de IgA en la mucosa generadas por la inmunización intranasal controlaron más eficazmente la replicación del virus en el pulmón. la vacuna de PIV5-H5 incorporó el HA de H5 en el virión y se probó la eficacia de un formato inactivado de la vacuna. Las respuestas de los anticuerpos séricos neutralizantes generadas con PIV5-H5 inactivado y la replicación controlada del virus H5N1, aunque similares a otras vacunas del antígeno H5,
60 requirieron una inmunización de refuerzo para generar las respuestas inmunitarias protectoras. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que las vacunas de PIV5-HA y las vacunas específicas para H5, en particular, se pueden utilizar en múltiples formatos y múltiples vías de administración. Esto podría evitar posibles contraindicaciones basadas en la administración intranasal sola y brindar oportunidades para aplicaciones más amplias, usando, a la vez, un solo vector vacunal.

65

Como se muestra en el Ejemplo 3, una vacuna de PIV5 que expresa la HA de un virus de la gripe H5N1 es eficaz para proteger contra la exposición a HPAI H5N1 (A/VN/1203/04) cuando se administra como una vacuna intranasal viva en ratones. Si bien la inmunización intranasal (IN) es atractiva, hay inconvenientes. Existen posibles contraindicaciones con respecto al uso del virus intranasal vivo como vacuna en poblaciones inmunocomprometidas. Una vacuna inyectable puede evitar este problema y brindar una oportunidad para la vacunación masiva en aplicaciones agrícolas. Este ejemplo compara la eficacia de las vacunas de rPIV5-H5 administradas por vías alternativas, y muestra que rPIV5-H5 protege contra la exposición a HPAI H5N1 cuando se administra no solo por vía intranasal, sino también por vía intramuscular. Por otra parte, la vacuna de PIV5-H5 inactivada fue eficaz para proteger contra la infección por H5N1, aunque requiere una inmunización de refuerzo.

Materiales y métodos

Virus de la gripe. Los virus de la gripe A usados incluyen VN H5N1-PR8/CDC-RG (H5N1; rgVN-PR8; proporcionado por el Dr. Ruben Donis, CDC, Atlanta, GA) y A/Vietnam/1203/04 (H5N1; proporcionado por Richard Webby, Hospital de investigación infantil St. Jude, Memphis, TN)). Se propagó A/VN-PR8 en la cavidad alantoica de huevos de gallina embrionarios a 37 °C durante 48-72 horas. Richard Webby, del Hospital de Investigación Infantil St. Jude (Memphis, TN), proporcionó A-Vietnam/1203/04 inactivado con β -propiolactona (BPL). Se propagó A/Vietnam/1203/04 en la cavidad alantoica de huevos de gallina embrionarios a 37 °C durante 24 horas. Todos los virus se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C. Todos los experimentos en los que se usaron virus de la gripe aviar altamente patógenos, vivos, fueron revisados y aprobados por el programa institucional de bioseguridad en la Universidad de Georgia, y se realizaron en el nivel 3 de bioseguridad, de potenciación de la contención, siguiendo las pautas para el uso de Agentes Selectos aprobadas por el CDC.

Ratones. Se usaron ratones BALB/c hembra de 6 a 8 semanas de vida (Charles River Labs, Frederick, MD) para todos los estudios. Las inmunizaciones de ratón y los estudios con virus BSL2 se realizaron en instalaciones mejoradas para BSL2 en aisladores con filtro HEPA. Las infecciones por HPAI en ratones se realizaron en instalaciones mejoradas para BSL3 en aisladores con filtro HEPA, siguiendo las pautas aprobadas por el programa institucional de bioseguridad en la Universidad de Georgia y para el uso de Agentes Selectos aprobados por el CDC. Todos los estudios en animales se realizaron según las pautas aprobadas por el Comité de cuidado y uso de animales de la Universidad de Georgia.

Células. Se cultivaron células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) en DMEM con FBS al 5 %, L-glutamina al 5 % y una solución de antibiótico/antimicótico (10.000 UI/ml de penicilina, 10.000 ug/ml de estreptomycin y 25 ug/ml de anfotericina B) (Cellgro Mediatech, Inc). Las células Vero se cultivaron en Medio Esencial Mínimo (MEM) (Thermo/Hyclone) con FBS al 10 % y antibiótico/antimicótico. Se cultivó riñón bovino Madin-Darby (MDBK) en DMEM con FBS al 5 %, L-glutamina al 5 % y una solución de antibiótico/antimicótico (10.000 UI/ml de penicilina, 10.000 ug/ml de estreptomycin y 25 ug/ml de anfotericina B) (Cellgro Mediatech, Inc). Todas las células fueron incubadas a 37 °C, CO₂ al 5 %.

Construcción de virus recombinantes. Se generó rPIV5-H5 (ZL46) como se describe en los ejemplos anteriores. En resumen, un plásmido de PIV5 recombinante que contenía el gen HA generado fue ZL46 (rPIV5-H5-SH/HN). Para generar el plásmido ZL46, se usó el plásmido BH276 que contenía el genoma de longitud completa de PIV5 como vector. Se añadieron el final del gen (GE), la región intergénica y la secuencia de inicio del gen (GS) entre el gen SH y el gen HN al cebador para detener la transcripción del gen HA y comenzar la transcripción del gen HN. Entonces, se amplificó el gen HA. Los virus fueron rescatados y secuenciados como se ha descrito anteriormente.

Se cultivaron reservas de virus PIV5 y rPIV5 en células MDBK (<p20) durante 5-7 días en DMEM que contenía FBS al 2 % hasta que se estabilizaron sus títulos de adsorción hematológica. Se recogieron y se aclararon los medios mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga de mesa Eppendorf (5810 R). Se añadió albúmina de suero bovino (BSA) al sobrenadante aclarado para llevar la solución total a BSA al 1 %. Se dividieron las reservas de virus en alícuotas y se congelaron rápidamente en hielo seco y se almacenaron a -80 °C. Los títulos víricos se determinaron luego mediante un ensayo de placa en células VERO.

Cuantificación de virus. Los títulos de PIV5 se determinaron mediante ensayo de placa en células VERO. Se incubaron células VERO con diluciones en serie de muestras de virus preparadas en DMEM con BSA al 1 % y antibiótico/antimicótico. Se retiró la muestra de virus y se cubrió con agarosa de bajo punto de fusión a 1:1 y DMEM con FBS al 2 % y antibiótico/antimicótico, y se incubó a 37 °C durante 5 a 6 días. Para detectar placas, se fijaron las monocapas luego con formalina tamponada al 10 % y se sometieron a inmunotinción. Las células se permeabilizaron con 1 x PBS con FBS al 2 %, azida sódica al 0,1 % y saponina al 0,5 % (tampón de permeabilización). Se detectó el PIV5 usando una dilución de 1:1.000 de anticuerpos específicos para la región compartida de las proteínas V y P de PIV5 (V/P) durante 1 h. Luego se añadió anticuerpo secundario de IgG de cabra anti-ratón (H&L) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Invitrogen) y se incubó durante 30 min. Para visualizar las placas, se añadió sustrato de peroxidasa TMB (preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante) (Vector Labs, Inc). Las placas se lavaron y se secaron, y se contaron las placas. Los títulos de la gripe se determinaron mediante ensayo de DICT₅₀ como el descrito anteriormente (Soboleski *et al.*, 2011, Plos One; 6: e21937) o mediante ensayo de placa en células MDCK. Las células MDCK se incubaron durante 2 horas a 37 °C con diluciones en serie de muestras de virus realizadas en MEM con 1 mg/ml de tripsina tratada con TPCK (Worthington Biochemical). Luego se retiraron las

muestras de virus diluidas y se cubrieron las monocapas con celulosa microcristalina Avicel al 1,2 % con 1 mg/ml de tripsina tratada con TPCK. Las placas se incubaron durante 72 horas, se retira la capa mediante lavado suave con PBS, se fija con metanol/acetona frío (40:60 %), se seca al aire, se someta a contratinción con cristal violeta, y se visualizan las placas.

Purificación y tinción con Coomassie de viriones de PIV5. Se inyectaron células MDBK en matraces T-150 con PIV5, ZL48 o ZL46 a una Mdl de 0,1. Los medios se recogieron a los 3 dpi y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 min para retirar los residuos celulares. Se recubrieron los medios aclarados con sacarosa al 20 % en tampón NTE (NaCl 0,1 M, Tris-HCl 0,01 M, EDTA 0,001 M a pH 7,4). Las muestras se centrifugaron a 40.000 rpm durante 1,5 h a 4 °C. Se volvieron a suspender los sedimentos en 0,5 ml de PBS y se mezclaron con 1,3 ml de sacarosa al 80 % en tampón NTE. Se añadieron 1,8 ml de sacarosa al 50 % en tampón NTE, luego se añadieron 0,6 ml de sacarosa al 10 % en tampón NTE para obtener una solución de sacarosa en gradiente. A continuación, se centrifugó la solución de sacarosa en gradiente a 45.000 rpm durante 3 h a 4 °C. Las bandas blancas formadas por viriones en la superficie de contacto entre el 50 % y el 10 % de sacarosa se recogieron y se sedimentaron mediante centrifugación a 40.000 rpm durante 1,5 h a 4 °C. Los sedimentos se volvieron a suspender en 0,5 ml de PBS. Los viriones de PIV5, ZL48, ZL46 o ZL47 se analizaron mediante gel de SDS-PAGE al 10 % y se tiñeron con azul de Coomassie.

Transferencia Western. Se infectaron células Vero con una Mdl de 5 ufp/célula de PIV5 o ZL46, o se infectaron de forma simulada. Las células se lisaron usando PBS con ácido etilendiaminotetraacético 2 mM (EDTA), inhibidor de la proteasa Complete Mini de Roche (Roche Applied Science) y Triton-X-100 al 1 % (octilfenoxipolietoxietanol) (Sigma) 24 horas después de la infección. La separación y la transferencia Western se realizaron como se describe (Gabbard *et al.*, 2009, *Prot Eng Des Sel*; 22: 189-198). Se usó suero hiperinmune de ratones infectados con rg A/VN-PR8 como anticuerpo primario para detectar HA y se usaron anticuerpos monoclonales específicos de V/P para detectar V/P. Se usó proteína Precision Plus Protein WesternC (BioRad) como patrón.

Inmunofluorescencia. Se cultivaron células Vero en placas de 24 pocillos y se infectaron con PIV5 o ZL46 a una multiplicidad de infección (Mdl) de 5 ufp/célula, o mediante infección simulada. A las 24 horas después de la inducción, se fijaron las células con formalina tamponada al 5 % durante 10 min a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron luego con tampón de permeabilización y luego se incubaron durante 1 h con una dilución de 1:1.000 (1 µg/ml) de anticuerpo monoclonal A/VN/1203/04 anti-HA (H5) (BEI Resources). Se aplicó una dilución de 1:250 de Ig de cabra anti-ratón PE (BD Pharmingen) durante 45 min para detectar el HA. Para detectar el PIV5, a continuación, se añadieron anticuerpos específicos de V/P (diluidos a 1:1.000) y se incubaron durante 1 h. Para visualizar el PIV5, un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor-488 (Invitrogen), diluido a 1:500, se añadió y se incubó durante 30 min y luego se lavó. Se añadieron 0,5 ml de PBS a cada pocillo y se examinó la fluorescencia usando un microscopio fluorescente AMS EVOS fl. Las células se lavaron en profundidad entre cada etapa con PBS.

Dispersión de luz dinámica (DLS) La DLS se realizó como se describe (Driskell *et al.*, Tripp, 2011, *Analyst*; 136: 3083-3090). Se usó el mAb A/VN/1203/04 anti-HA (H5) (recursos de BEI). Se purificó la IgG del suero usando un kit de centrifugación de proteína G de Nab (Thermo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego, se desaló la IgG purificada usando columnas de desalación por centrifugación Zeba (Thermo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se concentró la IgG desalada usando unidades de filtro centrífugo Amicon Ultra-4 (Millipore) de acuerdo con las instrucciones del fabricante hasta un volumen final de aproximadamente 2 ml. La proteína se cuantificó usando un kit de ensayo de proteínas de BCA (ácido bicinonínico) Pierce (Thermo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se analizaron el PIV5, ZL46, ZL48, rg A/VN-PR8, sobrenadante del cultivo de virus, fluido alantoico y PBS.

Inmunización. Para la vacunación con PIV5 y rPIV5-H5, se administraron 10⁶ ufp de PIV5 o rPIV5-ZL46 en 50 µl de PBS por vía intranasal a ratones anestesiados con 2,2,2-tribromoetanol en alcohol *terc*-amílico (Avertin; Aldrich Chemical Co). Para la infección subletal de rg A/VN-PR8, se administraron 2.000 ufp de virus en 50 µl de PBS como se describe para la vacunación con PIV5. Para la vacunación intramuscular de rgA/VN-PR8, se administraron 2.000 ufp de rgA/VN-PR8 en 50 µl de PBS en el músculo del muslo caudal. Para la inmunización contra A/VN/1203/04 inactivado, se volvió a suspender el virus inactivado con BPL a 256 unidades de hemaglutinación (HAU)/ml en 50 µl de PBS, que se inyectó en cada uno de los músculos del muslo caudal (100 µl de 25 HAU en total). Se extrajo sangre el día 21 después de la inmunización. Se realizaron lavados nasales y los lavados alveolares bronquiales (BAL) en los días 14 o 21 después de la vacunación con 0,5 o 1 ml de PBS, respectivamente.

ELISA. Se midieron los títulos de anticuerpos en suero específicos de HA (H5) usando un ELISA de IgG. Las placas de microtitulación de 96 pocillos Immulon 2 HB (ThermoLabSystems) se recubrieron con 2 µg/ml de proteína H5 recombinante y se incubaron a 4 °C durante la noche. A continuación, se lavaron las placas con solución de lavado KPL (KPL, Inc) y se bloquearon los pocillos con 200 µl de solución de lavado KPL con leche en polvo desnatada al 5 % y BSA al 0,5 % (tampón de bloqueo) durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron diluciones en serie de muestras de suero (en tampón de bloqueo), y se transfirieron a la placa recubierta y se incubaron durante 1 h. Para detectar los anticuerpos séricos unidos, se añadieron 100 µl de una IgG anti-ratón de cabra marcada con fosfatasa alcalina de dilución 1:1000 (KPL, Inc) en un tampón de bloqueo por pocillo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se revelaron añadiendo 100 µl de sustrato de fosfatasa pNPP (KPL, Inc) por pocillo, y se dejó que se desarrollara la reacción a temperatura ambiente. Se midió la densidad óptica (DO) a 405 nm en un lector de

placas Bio-Tek Powerwave XS. Se determinó que el título de IgG era la dilución de suero más baja con una DO superior a la DO media de suero sin tratamiento previo más 2 desviaciones típicas.

Ensayo de microneutralización. Se midieron los títulos de los anticuerpos neutralizantes de la gripe en suero mediante un ensayo de microneutralización con un criterio de valoración de ELISA. Se diluyó el suero inactivado por calor en serie en DMEM con BSA al 1 %, antibiótico/antimicótico y 1 µg/ml de tripsina TPCK. A continuación, se incubó el suero diluido a DICT₅₀ de 1.000 de rg A/VN-PR8 durante dos horas a 37 °C. Luego se añadieron células MDCK y se incubaron a 37 °C durante 18-24 horas. Al final de la incubación, se fijaron los pocillos con metanol y acetona enfriados en hielo (80:20 respectivamente) y se realizó un ELISA como se ha descrito anteriormente. Se determinó que el título de neutralización era la dilución de suero más baja capaz de neutralizar la DICT₅₀ de 1.000 de rg A/VN-PR8, según lo determinado por una lectura de DO dos veces por encima de la DO de fondo.

Cosecha de linfocitos y Elispot. Doce días después de la vacunación con PIV5, ZL46 o rg A/VN-PR8, Se extrajeron los ganglios linfáticos mediastínicos (MLN) de los ratones, se combinaron y se homogeneizaron. Los linfocitos se agotaron de eritrocitos usando una solución de sal equilibrada de Gey (Sigma-Aldrich) durante 5 min a temperatura ambiente y se retiraron los residuos. Las células se contaron luego usando un analizador de tamaño y recuento de partículas Z2 Coulter (Beckman Coulter). Se realizó un ELISpot para detectar las respuestas de los linfocitos T en linfocitos hacia A/VN/1203/04 inactivado como se describe (Tompkins *et al.*, 2007, *Emerg Infect Dis*; 13: 426-435). Las células se volvieron a estimular con A/VN/1203/04 inactivado (el equivalente de 10 HAU por pocillo), GP P2 EYLFEVDNL del ébola como péptido irrelevante (1 µg/ml) y concanavalina A (2 µg/ml) en 50 µl de medio tumoral completo (CTM). Las manchas se contaron usando un lector ViruSpot de AID (Cell Technology, Inc).

Experimentos de exposición al virus. Primero se vacunaron ratones BALB/c como se describe y luego se sangraron según se indica. Al menos 3 días después de la última sangría, los ratones fueron anestesiados e inoculados por vía intranasal con DL₅₀ de 10 de A/Vietnam/1203/04 o 20.000 ufp de rg A/VN-PR8 diluido en 50 µl de PBS. Luego, se controlaron los ratones diariamente para determinar la morbilidad y la mortalidad, midiéndose los pesos corporales cada dos días. En el día 3 después de la exposición, los grupos de ratones se sacrificaron y se extrajeron los pulmones en 1,0 ml de PBS y se homogeneizaron. Se homogeneizó el homogeneizado por centrifugación. A continuación, se usó un ensayo de DICT₅₀ para determinar los títulos víricos en el homogeneizado aclarado como se describe (Soboleski *et al.*, 2011, *Plos One*; 6:e21937).

Análisis Estadístico. Las diferencias estadísticas en la supervivencia se determinaron mediante el análisis de rango logarítmico. Las diferencias en los títulos víricos pulmonares se determinaron mediante ANOVA, seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett. Un valor de $p \leq 0,05$ se consideró significativo. Los análisis estadísticos se realizaron usando GraphPad Prism.

Resultados

Expresión e incorporación de HA en el virión de rPIV5-H5. Para probar la expresión normal y el empaquetamiento de los virus PIV5 recombinantes, se infectaron células MDBK con PIV5, ZL48, ZL46 o mediante infección simulada. ZL48 tiene el gen H5 insertado entre HN y L (Ejemplo 3) y se incluyó como un control comparable al virus publicado anteriormente. Los sobrenadantes fueron recogidos, purificados sobre sacarosa, separados por SDS-PAGE y teñidos con Coomassie para visualizar las bandas de proteínas. Se pudieron ver con facilidad bandas de proteína a los tamaños apropiados para HN, NP, F, M de PIV5 y las proteínas M en todas las muestras, mientras que se observó una banda en un tamaño apropiado para la HA gripal en las muestras de ZL48 y ZL46, pero no en PIV5 (Fig. 34B). Las identidades de estas bandas han sido confirmadas mediante transferencia Western.

Para confirmar la incorporación de HA de H5 al virión, se utilizaron marcadores de dispersión de luz dinámica (DLS) y nanopartículas de oro (AuNP) para detectar HA en el rPIV5 superficial frente a los viriones de ZL46. Se incubaron sobrenadantes de cultivo de virus aclarados de PIV5, ZL46 y rgA/VN-PR8 con anticuerpos anti-HA (H5) marcados con AuNP y luego se midió la agregación de las sondas de AuNP como se ha descrito anteriormente (Driskell *et al.*, Tripp, 2011, *Analyst*; 136: 3083-3090). El grado de agregación de AuNP se correlaciona con la presencia de virus que contienen HA específico, con aumentos en la agregación creciente del virus y cambio de Z. Se observó un aumento en el diámetro hidrodinámico medio (Z medio) de 8 nm para ZL46, en comparación con PIV5 (90,41 ± 1,316 frente a 82,08 ± 0,605 nm, respectivamente), lo que indica que hubo una agregación específica del antígeno de las sondas de AuNP tras la introducción de los virus, sugiriendo que HA está presente en la superficie del virión. El diámetro medio observado para PIV5 fue aproximadamente del mismo tamaño que el sobrenadante del cultivo o el fluido alantoico solo (77,06 ± 0,609 y 81,25 ± 1,287 nm, respectivamente). El control positivo, virus rgA/VN-PR8, tenía un diámetro medio de 113,67 ± 1,475 nm.

Para confirmar que el HA nativo se expresaba durante la infección por PIV5-H5, se infectaron células Vero con PIV5, ZL46 (Mdl = 5) o mediante infección simulada, y 24 horas después se lisaron y se analizaron mediante transferencia Western. La detección con antisuero policlonal generado contra el virus rgA/VN-PR8 (H5N1) presentó una proteína de 75 kD, el tamaño del monómero HA0 de la gripe en el lisado de células ZL46, pero no el PIV5 ni los lisados simulados (Fig. 34C). Hay una banda de 46 kDa detectada con el mAb específico de V/P de PIV5 presente en todos los lisados infectados. Para confirmar que HA de H5 se expresa en la superficie de las células infectadas, se realizó tinción

inmunofluorescente. Se tiñeron células Vero infectadas con PIV5, ZL46 (Mdl = 5) o mediante infección simulada con un mAAb anti-HA (H5) o un anticuerpo monoclonal específico de las proteínas V/P de PIV5 (anti-V/P). Se detectó una potente expresión equivalente de V/P tanto en células infectadas con ZL46 como con PIV5, mientras que H5 se detectó solo en células infectadas con ZL46, lo que confirma que HA se está expresando en células infectadas con rPIV5-H5 (Fig. 34D).

La inmunización intramuscular o intranasal con PIV5-H5 induce respuestas inmunitarias específicas de HA. La inmunización intranasal con construcciones de PIV5 recombinante que expresan el HA de un virus H3 o un H5 de HPAI H5N1 demostró ser protectora contra la exposición al virus de la gripe en ratones (Ejemplo 3 y Tompkins *et al.*, 2007, *Virology*; 362: 139-150). Sin embargo, la inmunización intramuscular, una vía de inmunización ampliamente usada para la vacunación, no se ha probado. Por otra parte, ya que se detectó HA de H5 en el virión de rPIV5-H5, era posible que la vacuna inactivada pudiera inducir respuestas inmunitarias protectoras, de forma similar a las actuales vacunas de la gripe inactivadas. Para determinar si rPIV5-H5 es inmunogénico cuando se administra por vía intramuscular (IM), los ratones fueron vacunados con rPIV5-H5 por vía IN con virus vivo (ZL46) y vía IM con virus vivo o inactivado (iZL46). Un último grupo de ratones recibió A/VN/1203/04 inactivado (iA/VN/1203/04) como control positivo, y todos los grupos se compararon con ratones que habían recibido PIV5 por vía intranasal (IN). Los ratones se sangraron los días 7, 14 y 21, y se evaluaron sus sueros para detectar anticuerpos neutralizantes de la gripe IgG y H5N1 específicos de HA. Los ratones vacunados por vía intranasal o intramuscular con rPIV5-H5 (ZL46) produjeron niveles altos de IgG tan pronto como 7 o 14 días después de la inmunización, respectivamente (Fig. 35A), con títulos comparables a los de los ratones inmunizados con el virus de la gripe entero inactivado (iA/VN/1203/04). Asimismo, la inmunización IM o IN con ZL46 generó potentes anticuerpos séricos neutralizantes (Fig. 35B), aunque el título del virus de la gripe inactivado fue mayor en el día 21 después de la inmunización. Por el contrario, los ratones vacunados con ZL46 inactivado (iZL46) por vía IM produjeron IgG y anticuerpo neutralizante limitados, lo que sugiere que las cantidades de antígeno HA son insuficientes para generar respuestas humorales potentes o que la replicación de PIV5 puede ser necesaria para inducir inmunidad. Como era de esperar, los ratones vacunados con PIV5 no produjeron anticuerpos IgG específicos de HA ni anticuerpos neutralizantes de rgA/VN-PR8 detectables (Fig. 35A y 35B).

Una ventaja de la inmunización intranasal es la posibilidad de inducir una respuesta inmunitaria de la mucosa. Para evaluar las diferencias en las respuestas de IgA en ratones vacunados con rPIV5-H5 por vía IM frente a la vía IN, los ratones fueron vacunados con PIV5, rPIV5-H5 (ZL46) por vía IM o IN, o se inocularon con una dosis subletal de rgA/VN-PR8, y se realizaron lavados nasales y lavados alveolares bronquiales (BAL) los días 14 o 21 después de la inmunización. No se detectó IgA en el lavado nasal ni en el fluido de BAL en los ratones vacunados por vía IM con rPIV5-H5. Por el contrario, la administración intranasal de rPIV5-H5 indujo potentes respuestas de IgA en las fosas nasales y en los pulmones de los ratones inmunizados (Fig. 35C y 35D, respectivamente). Los niveles de IgA fueron comparables a los de los ratones infectados con rgA/VN-PR8 en el día 14, sin embargo, la respuesta de IgA en las mucosas en ratones inoculados con la gripe continuó aumentando después del día 14, probablemente debido al mayor tiempo de replicación del virus antes del aclaramiento en comparación con el rPIV5.

Para evaluar las diferencias en la sensibilización de los linfocitos T con la vía de administración, los grupos de ratones vacunados por vía IM o IN con rPIV5-H5 o rgA/VN-PR8 se sacrificaron el día 12 después de la infección, y se analizaron los linfocitos de los ganglios linfáticos para detectar los linfocitos T productores de IFN- γ específicos de la gripe. La vacunación intranasal con rPIV5-H5 o el virus de la gripe generó potentes respuestas de los linfocitos T específicos de la gripe en los ganglios linfáticos drenantes, pero también hubo un aumento de las respuestas no específicas en comparación con los ratones inmunizados por vía IM (Fig. 35E). La vacunación por vía IM con rPIV5-H5 (ZL46) generó una respuesta de linfocitos T específica A/VN/1203/04 más eficazmente que la administración por vía IM de rgA/VN-PR8, posiblemente debido a una mejor replicación de PIV5 en el tejido muscular en comparación con el virus de la gripe. Esto sería una ventaja para la vacunación por vía IM con PIV5, pues los linfocitos T pueden desempeñar un papel en la protección contra la infección por el virus de la gripe.

Para determinar si esta respuesta de la mucosa es necesaria para la protección contra la infección por el virus de la gripe, es decir, si la inmunización por vía IM con rPIV5-H5 podría proteger contra la exposición, los ratones fueron vacunados con PIV5, rPIV5-H5 o rgA/VN-PR8, administrados por vía IN o IM. Un grupo de ratones también se vacunó con PIV5-H5 inactivado (iZL46) por vía IM para determinar si las respuestas de IgG débiles detectadas (Fig. 35A) eran protectoras. En el día 28 después de la inmunización, se expusieron los ratones a HPAI H5N1 A/VN/1203/04 a una DL₅₀ de 10. De acuerdo con los resultados anteriores y los títulos de anticuerpos observados, los ratones vacunados con rPIV5-H5 por vía IN fueron protegidos de la pérdida de peso y la mortalidad asociada con la exposición a HPAI H5N1 (Fig. 36A y 36B). Los ratones vacunados con ZL46 por vía IM también fueron protegidos de la exposición a H5N1, sin embargo, hubo una mortalidad y pérdida de peso limitadas tardías en la infección, lo que sugiere que las respuestas de los anticuerpos de la mucosa son importantes para una protección completa. Los títulos víricos se evaluaron en un subconjunto de ratones tres días después de la exposición. El virus H5N1 fue indetectable en ratones inmunizados con ZL46 o rgA/VN-PR8 por vía IN. Por el contrario, los ratones inmunizados con ZL46 por vía IM no tuvieron reducción en el título vírico en comparación con los ratones inmunizados con PIV5 por vía IM, mientras que los ratones inmunizados con rgA/VN-PR8 por vía IM tampoco tenían virus detectables (Fig. 36C). Esto sugiere nuevamente que la IgA de la mucosa generada por la inmunización con rPIV5-H5 por vía IN es importante para una protección completa. Como alternativa, la sensibilización de las respuestas inmunitarias hacia múltiples antígenos de la gripe, a partir de la inmunización con rgA/VN-PR8, puede cubrir la necesidad de respuestas de IgA. No se observó

protección en los ratones vacunados con rPIV5-H5 inactivado (iZL46), lo que confirma que el virus vivo y, presumiblemente, la replicación, son necesarios para la inducción de inmunidad protectora. Por tanto, aunque ambas vías de administración son protectoras (según la pérdida de peso y la supervivencia), la inducción de la respuesta de IgA en la mucosa y/o el aumento en el número de linfocitos T de IFN- γ asociado con la inmunización por vía IN están limitando la infección y la replicación del virus en el pulmón.

El refuerzo mejora las respuestas inmunitarias específicas de HA asociadas con la inmunización con PIV5-H5. Una única inmunización por vía IM con PIV5-HA inactivado indujo una IgG sérica específica de HA limitada (Fig. 34A), pero no anticuerpos neutralizantes (Fig. 34B), y no proporcionó protección contra la infección (Fig. 36). Se han observado resultados similares con otros antígenos de la vacuna de H5 (Lu *et al.*, 1999, *J Virol*; 73: 5903-5911), para probar si un refuerzo podría aumentar la respuesta inmunitaria a los niveles de protección, los ratones reforzados con ZL46 se sangraron semanalmente, se reforzaron el día 28 después de la sensibilización, y se recogió el suero 7 y 14 días después. Se compararon los ratones inmunizados con ZL46 vivo por vía IN o IM con los ratones inmunizados con ZL46 inactivado (iZL46) o A/VN/1203/04 inactivado (iA/VN/1203/04).

Una vez más, el ZL46 vivo indujo potentes respuestas de IgG y anticuerpos neutralizantes 21 días después de la sensibilización con respuestas más modestas de IgG y ninguna respuesta de anticuerpos neutralizantes a partir de iZL46. Sin embargo, una semana después del refuerzo, los tres métodos de inmunización con ZL46 (vía IN vivo, por vía IM vivo y vía IM inactivado) tuvieron respuestas de anticuerpos séricos neutralizantes de IgG y H5 específicas de HA (Fig. 37A y 37B). Seis semanas después del refuerzo, los ratones fueron desafiados con el virus rgA/VN-PR8 y tres días después, se les aplicó la eutanasia para evaluar los títulos víricos pulmonares. Sorprendentemente, todos los ratones vacunados (ZL46 por vía IN o IM, iZL46 IM, iA/VN/1203/04 IM) tuvieron títulos víricos pulmonares significativamente reducidos en comparación con los ratones de control inmunizados con PIV5 (Fig. 37C; $p < 0,05$, ANOVA, seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett), mientras que ninguno de los grupos vacunados con HA fueron significativamente diferentes entre sí. Mientras que la inmunización por vía IN con ZL46 siguió brindando la mejor protección (3/5 ratones tuvieron títulos víricos no detectables, mientras que el resto de los ratones inmunizados con ZL46 tuvieron virus detectables el día 3 después de la exposición), la inmunización por vía IM con PIV5-HA vivo o inactivado fue eficaz en la inducción de respuestas de anticuerpos séricos neutralizantes protectores, comparables al virus de la gripe de tipo silvestre inactivado, entero.

Las vacunas inactivadas contra el virus HPAI H5N1 generalmente son poco inmunogénicas en los mamíferos, lo que requiere altas dosis de antígeno, inmunizaciones múltiples y adyuvantes en algunos casos (Lipatov *et al.*, 2006, *J Infect Dis.* 194:1040-1043; Lu *et al.*, 1999, *J Virol*; 73:5903-5911; Treanor *et al.* 2001, *Vaccine*; 19:1732-1737; y Tumpey *et al.* 2001, *J Virol*; 75: 5141-5150). Las vacunas de HPAI tanto vivo como inactivado tienen problemas con la producción, incluyendo la reducción de los rendimientos de la vacuna durante la producción, dificultad para generar cepas de semillas y problemas de seguridad (Steel, 2011, *BioDrugs*; 25: 285-298). Con la presente invención, se ha desarrollado un nuevo vector vacunal de paramixovirus recombinante, el PIV5 que expresa la HA del virus de la gripe H5N1, que induce inmunidad protectora contra la infección por el virus HPAI (véanse Fig. 34-36 y Ejemplo 3). En este caso, se evalúa la eficacia de esta vacuna usando diferentes métodos de inmunización y comparando la vacuna viva y la vacuna inactivada.

La inmunización intranasal con PIV5-H5 vivo induce potentes respuestas de anticuerpos en suero y mucosa específicas del transgén HA. La respuesta específica de HA inducida por una única inmunización con la vacuna de PIV5-H5 avirulenta es comparable a las respuestas inducidas por una infección subletal con el virus de la gripe rgA/VN-PR8, en la que los ratones inmunizados contra la gripe tenían signos clínicos de enfermedad y perdieron hasta 15 % de su (Fig. 35). Por lo tanto, PIV5 proporciona un método atractivo para la inmunización intranasal sin las preocupaciones de reordenamiento planteadas por las vacunas de la gripe atenuadas y vivas.

A diferencia del virus de la gripe, que, en general, se replica en las células de las vías respiratorias o en las células epiteliales intestinales debido a las necesidades del receptor y la proteasa (Rott *et al.*, 1995, *Am J Respir Crit Care Med*; 152:S16-19), PIV5 tiene el potencial de un tropismo celular más amplio. Esta característica lo convierte en un candidato atractivo para su uso como vacuna intramuscular viva. Mientras, esto también presenta la posibilidad de que una vacuna de PIV5 pueda diseminarse a otros tejidos, estudios previos no encontraron evidencia de patología en otros tejidos después de la infección intranasal con PIV5 (Tompkins *et al.*, 2007, *Emerg Infect Dis*; 13: 426-435), lo que sugiere que la inmunización intramuscular con un vector rPIV5 sería segura, también.

La inmunización intramuscular con PIV5-H5 induce fuertes respuestas de anticuerpos séricos neutralizantes y específicas de HA, comparables a la inmunización intranasal con PIV5-H5 o la inmunización intramuscular con el virus H5N1 inactivado entero (Fig. 35). La inmunización intramuscular con el PIV5-H5 vivo tiene la ventaja añadida de generar también potentes respuestas de linfocitos T específicas de HA. Aunque la ausencia de respuestas de anticuerpos de la mucosa hizo que la inmunización intramuscular con PIV5-H5 fuera imperfecta, proporciona una vía de inmunización potencialmente más adecuada para individuos con asma u otras contraindicaciones para la inmunización intranasal. Por otra parte, proporciona una oportunidad para combinar esta vacuna con otras vacunas inyectables, así como una formulación de vacuna inyectable, que puede ser atractiva para aplicaciones agrícolas.

Los anticuerpos de la mucosa se han asociado con la protección contra la inmunidad homóloga y heterosubtípica. Este ejemplo encontró que la administración intramuscular de una vacuna de rPIV5-H5 vivo no pudo inducir respuestas de IgA en la mucosa, pero protegió contra la exposición letal a H5N1 (Fig. 35 y 36). La inmunización de la mucosa (intranasal) con la misma vacuna generó títulos comparables de anticuerpos séricos neutralizantes de virus, pero también indujo IgA pulmonar y nasal específica del virus (Fig. 35). Estos ratones también estaban protegidos de la mortalidad asociada con una infección letal por H5N1, pero tampoco tenían virus detectable en el pulmón el día 3 después de la infección. Por el contrario, los ratones sin IgA detectable (grupos inmunizados por vía intramuscular) tenían títulos víricos similares a los animales de control. Por lo tanto, aunque la inmunización intramuscular puede tener algunas ventajas sobre la inmunización intranasal, en particular, para los individuos con enfermedades respiratorias crónicas, la inmunización intranasal es probablemente la vía de administración más eficaz.

El rPIV5-H5 inactivado no fue eficaz cuando se administró una vez por vía intramuscular. Es posible que la cantidad de HA incorporada en el virión sea insuficiente para generar de manera eficaz una respuesta de anticuerpos protectores contra la infección de la gripe; sin embargo, las vacunas inactivadas contra la gripe del virus completo no han logrado inducir respuestas de anticuerpos séricos neutralizantes de virus después de una sola inmunización (Lipatov *et al.*, 2006, *J Infect Dis.* 194:1040-1043; y Lu *et al.*, 1999, *J Virol*; 73: 5903-5911). En este caso, el virus entero homólogo inactivado indujo anticuerpos neutralizantes, posiblemente debido a la alta dosis de antígeno (25 HAU); además, el virus entero tiene la ventaja de que genera respuestas a múltiples antígenos de la gripe, lo que puede contribuir a la protección frente a la exposición. Como alternativa, el virus de la gripe puede contener otros antígenos o PAMP que generen la respuesta de manera más eficaz (es decir, actúen como adyuvantes) y el virus PIV5 carece de estas moléculas estimulantes. Esto se refleja en la actividad observada con las vacunas del virión entero (Bernstein *et al.*, 1982, *Pediatrics*; 69: 404-408). En cualquier caso, la replicación competente de rPIV5-H5 resolvió esta deficiencia, generando respuestas tanto de linfocitos T como de los anticuerpos neutralizantes que protegieron contra la exposición a HPAI homólogo. Por otra parte, el refuerzo con la vacuna de PIV5-H5 inactivada (iZL46) tuvo éxito en la generación de respuestas de anticuerpos neutralizantes de la gripe que redujeron los títulos del virus H5N1 después de la exposición comparativamente con la vacuna de PIV5-H5 vivo y H5N1 inactivado (Fig. 37). Como las vacunas de PIV5 se pueden cultivar fácilmente en estirpes celulares aprobadas para vacunas (por ejemplo, células Vero), PIV5-HA puede proporcionar una vía para la rápida producción segura de una vacuna contra la gripe pandémica inactivada específica de HA tradicional sin las exposiciones asociadas con la identificación y el desarrollo de cepas de semillas de vacuna contra la gripe. La formulación de vacunas de PIV5-HA inactivado con un adyuvante puede permitir la generación de títulos de anticuerpos neutralizantes con una sola inmunización, de manera similar a otras vacunas basadas en HA de H5 (Steel, 2011, *BioDrugs*; 25: 285-298).

Aunque la administración intranasal de rPIV5-HA ha demostrado ser segura en ratones, la administración respiratoria de vacunas vectorizadas con virus de replicación vivos puede ser una preocupación para los pacientes asmáticos o inmunocomprometidos. La opción de la administración intramuscular de la vacuna viva o la vacuna inactivada sería proporcionar alternativas atractivas a la inmunización intranasal, sin la modificación de la plataforma de la vacuna. Esto se opone a las alternativas actuales, en las que bien se administra una vacuna contra el virus de la gripe vivo atenuado o una vacuna del virus de tipo silvestre inactivado por vía intranasal o intramuscular, respectivamente. Por otra parte, la inmunización intramuscular con una vacuna de PIV5-HA vivo o inactivado podría permitir la formulación simultánea con las vacunas vivas o basadas en antígenos (inactivadas) existentes, mejorando la posible utilidad en campañas de vacunación masiva, en particular. Por último, la disponibilidad de múltiples opciones de administración y formulación sería útil para los programas de vacunación agrícola, en los que una plataforma de producción universal para diversas aplicaciones podría proporcionar una opción más segura y rentable, y mejorar la vacunación. Por lo tanto, la vacuna de PIV5-HA es una plataforma de vacunación versátil para la producción de vacunas para proteger contra los virus de la gripe emergentes o pandémicos y el virus HPAI de H5N1, en particular.

Ejemplo 8

La vacunación de una sola dosis del virus paragripal 5 recombinante que expresa la NP del H5N1 proporciona una amplia inmunidad contra los virus de la gripe A

Los virus de la gripe suelen evadir la inmunidad del hospedador a través de la deriva y el cambio antigénicos a pesar de la infección y/o la vacunación de los virus de la gripe previos. Las vacunas que coinciden con las cepas de virus circulantes son necesarias para una protección óptima. El desarrollo de una vacuna universal contra la gripe que proporcione una inmunidad de protección cruzada será una gran ventaja. La nucleoproteína (NP) del virus de la gripe A está altamente conservada entre todas las cepas de virus de la gripe A, y se ha explorado como un antígeno para desarrollar una vacuna universal contra el virus de la gripe. En este ejemplo, se generó un virus paragripal 5 (PIV5) recombinante que contenía NP de H5N1 (A/Vietnam/1203/2004), un virus de la gripe aviar altamente patógeno (HPAI), entre HN y L (PIV5-NP-HN/L), y se probó su eficacia. PIV5-NP-HN/L indujo respuestas humorales y de linfocitos T en ratones. Una sola inoculación de PIV5-NP-HN/L proporcionó una protección completa contra la exposición de H1N1 heterosubtípico letal y una protección del 50 % contra la exposición de HPAI H5N1 letal. Para mejorar la eficacia, se insertó NP en diferentes ubicaciones dentro del genoma de PIV5. El PIV5 recombinante que contiene NP entre F y SH (PIV5-NP-F/SH) o entre SH y HN (PIV5-NP-SH/HN) brindó una mejor protección contra la exposición a HPAI H5N1 que contra PIV5-NP-HN/L. Estos resultados indican que el PIV5 que expresa NP del H5N1 tiene el potencial de ser usado como una vacuna universal contra el virus de la gripe.

El virus de la gripe es un virus de ARN de cadena negativa con un genoma segmentado. El virus de la gripe A está asociado con pandemias y se clasifica por sus dos glicoproteínas superficiales principales, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Existen 17 subtipos de HA y 9 de NA, que difieren en aproximadamente un 30 % en la homología de proteínas, que se usan para clasificar los virus de la gripe A en subtipos (por ejemplo, H1N1, H3N2, H5N1, etc.). Las mutaciones puntuales en los sitios de unión a anticuerpos de las glicoproteínas de superficie permiten que los virus evadan la inmunidad mediada por anticuerpos y vuelvan a infectar a seres humanos y animales (deriva antigénica). Cuando diferentes subtipos de virus de la gripe A infectan al mismo hospedador, se puede producir el intercambio de segmentos de genes, dando lugar a un nuevo virus con una combinación única de genoma vírico (cambio antigénico), lo que puede dar lugar a pandemias. El virus de la gripe A causa morbilidad y mortalidad significativas cada año. Las cepas que circulan actualmente en los seres humanos (es decir, H1N1, H1N2 y H3N2) infectan hasta el 15 % de la población mundial y causan una media de 36.000 muertes y 226.000 hospitalizaciones en Estados Unidos (Harper *et al.*, 2005, *MMWR Recomm Rep*; 54: 1-40), así como millones de muertes en todo el mundo (hoja informativa sobre la gripe, 2003, *Wkly Epidemiol Rec*; 78: 77-80). Los brotes esporádicos de la gripe pandémica han causado una mortalidad significativa en el último siglo, más notablemente la gripe española de 1918, y han causado más de 50 millones de muertes en todo el mundo (revisado en Lipatov *et al.*, Webster, 2004, *J Virol*; 78: 8951-8959). En el horizonte, se encuentra otra cepa potencialmente pandémica de la gripe, la H5N1. Este virus de la gripe aviar surgió especialmente en el sudeste asiático y causó la destrucción de millones de aves, dando lugar a 608 casos en seres humanos informados, de los que 359 fueron fatales desde 2003.

Sería ideal contar con una vacuna que pudiera brindar una amplia protección contra diferentes subtipos de virus de la gripe A. Se han explorado vacunas candidatas dirigidas a proteínas conservadas del virus de la gripe como posibles vacunas universales contra el virus de la gripe. La nucleoproteína (NP) del virus de la gripe A, que encapsula el genoma vírico, está bien conservada entre todos los virus de la gripe con más del 90 por ciento de homología de restos de aminoácidos, y se ha identificado como un componente para el desarrollo de una vacuna universal contra el virus de la gripe. Se ha demostrado que un adenovirus que contiene NP proporciona protección contra un virus de la gripe homólogo y heterosubtipo (Price *et al.*, 2010, *PLoS One*; 5:e13162). Por otra parte, un virus recombinante de Vaccinia modificado Ankara (MVA) que contiene NP y M1 del virus de la gripe indujo la respuesta de linfocitos T CD8+, y redujo la gravedad de los síntomas y la propagación del virus en seres humanos en los ensayos de fase 1 y 2a, sugiriendo que la NP se puede usar para desarrollar una vacuna potencialmente protectora contra el virus de la gripe de amplia protección. Las vacunas de ADN recombinante que expresan el antígeno de la gripe NP se han probado en modelos animales, y se ha demostrado que inducen respuestas protectoras de anticuerpos y linfocitos T; sin embargo, la necesidad de una administración repetida de ADN puede ser un obstáculo para el uso de una vacuna basada en ADN contra una pandemia de virus de la gripe de propagación rápida.

Como se muestra en los ejemplos incluidos en el presente documento, las vacunas vectorizadas con PIV5 son eficaces en animales. Como se muestra en el Ejemplo 3, una inoculación intranasal (IN) de una sola dosis de tan solo 10^3 ufp de PIV5 que expresa HA del virus de la gripe A H5N1 protegió contra la exposición letal a H5N1 en ratones (véase también Li *et al.*, 2013, *J Virol*; 87: 354-362). Asimismo, como se muestra en el Ejemplo 2, se ha demostrado que una vacuna basada en PIV5 induce inmunidad protectora en perros que fueron expuestos a PIV5. Los niveles de inmunidad fueron comparables en perros con y sin exposición previa a PIV5, lo que indica que la inmunidad anti-PIV5 preexistente no afecta negativamente a la inmunogenicidad de una vacuna basada en PIV5 (véase también Chen *et al.*, 2012, *PLoS One*; 7:e50144).

En este ejemplo, se generó un PIV5 recombinante que contenía el gen NP de HPAI de H5N1 (A/Vietnam/1203/2004) y se probó su eficacia para proteger contra un homólogo letal, así como una exposición del virus de la gripe heterosubtipo en ratones.

Materiales y métodos

Células. Se mantuvieron cultivos de monocapas de células MDBK, MDCK y Vero en DMEM que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10 %, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Las células BHK y BSR-T7 se mantuvieron en DMEM que contenía FBS al 10 %, caldo de fosfato de triptosa (TPB) al 10 %. Se añadió G418 a las células BSR-T7. Todas las células se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las células infectadas con virus se cultivaron en medios que contenían FBS reducido (2 %). Los ensayos en placa de los virus PIV5 se realizaron usando células BHK como se ha descrito anteriormente (He *et al.*, 1997, *Virology*; 237: 249-260). Los ensayos de DICT₅₀ del virus de la gripe se realizaron usando células MDCK como se ha descrito anteriormente (Soboleski *et al.*, 2011, *PLoS One*; 6:e21937).

Virus de la gripe. Se propagaron A/Puerto Rico/8/34 (H1N1; PR8), X-31 (H3N2; recombinación de A/Aichi/2/68 X PR8) (Baez *et al.*, 1980, *J Infect Dis.* 141:362-365) y rgA/VN-PR8 (H5N1; proporcionado por el Dr. Ruben Donis, CDC, Atlanta, GA) en la cavidad alantoica de huevos de gallina embrionarios a 37 °C durante 48-72 horas. Se propagó A/Vietnam/1203/2004 altamente patógeno (H5N1; proporcionado por Richard Webby, Hospital de investigación infantil St. Jude, Memphis, TN) en la cavidad alantoica de huevos de gallina embrionarios a 37 °C durante 24 horas. Todos los virus se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C. Todos los experimentos en los que se usó A/Vietnam/1203/2004 altamente patógeno, vivo, fueron revisados y aprobados por el programa institucional de

bioseguridad de la Universidad de Georgia, y se realizaron en una contención mejorada de nivel de bioseguridad 3 (BSL3 +) siguiendo las pautas para el uso de Agentes Selectos aprobadas por el CDC.

Ratones. Se usaron ratones BALB/c hembra de 6 a 8 semanas de vida (Charles River Labs, Frederick, MD) para todos los estudios. Los ratones se anestesiaron mediante la administración intraperitoneal de Avertin (2,2,2-tribromoetanol) antes de todas las vacunaciones intranasales y las exposiciones al virus de la gripe. Las inmunizaciones de ratón y los estudios con virus BSL2 se realizaron en instalaciones mejoradas para BSL2 en aisladores con filtro HEPA. Las infecciones por HPAI en ratones se realizaron en instalaciones mejoradas para BSL3 en aisladores con filtro HEPA, siguiendo las pautas aprobadas por el programa institucional de bioseguridad en la Universidad de Georgia y para el uso de Agentes Selectos aprobados por el CDC. Todos los estudios en animales se realizaron según las pautas aprobadas por el Comité institucional de cuidado y uso de animales de la Universidad de Georgia.

Construcción de plásmido recombinante. Para generar un plásmido que contuviera la inserción de NP entre los genes HN y L en el genoma de PIV5 (PIV5-NP-HN/I), se utilizó el plásmido BH311 que contenía el genoma de longitud completa de PIV5 y un gen GFP extra entre los genes HN y L (He *et al.*, 1997, *Virology*; 237: 249-260). El ORF de NP del virus de la gripe H5N1 altamente patógeno (HPAI de H5N1, A/Vietnam/1203/2004). Para generar plásmidos que contuvieran la inserción de NP entre M y F (PIV5-NP-M/F), F y SH (PIV5-NP-F/SH) o SH y HN (PIV5-NP-SH/HN), se usó el plásmido BH276 que contenía el genoma de longitud completa de PIV5 (He *et al.*, 1997, *Virology*; 237: 249-260). Para obtener el gen NP, se extrajo ARN de HPAI de H5N1 y se generó ADNc. El ADNc se amplificó para generar el gen NP usando cebadores específicos de NP. El plásmido de expresión pET-15b-NP codificante de una proteína H5N1-NP marcada con His se construyó usando el vector pET-15b.

Rescate y secuenciación del virus. Se transfectaron conjuntamente los plásmidos PIV5-NP-M/F, PIV5-NP-F/SH, PIV5-NP-SH/HN o PIV5-NP-HN/I codificantes del genoma de longitud completa de PIV5 con la inserción del gen NP en la unión del gen indicado, y tres plásmidos auxiliares pPIV5-NP, pPIV5-P y pPIV5-L que codifican las proteínas NP, P y L, en células BSR-T7 al 95 % de confluencia en placas de 6 cm con Jetprime (transfección Polyplus, Inc., Nueva York). Las cantidades de plásmidos usadas fueron las siguientes: 5 µg de plásmidos PIV5-NP de longitud completa, 1 µg de pPIV5-NP, 0,3 µg de pPIV5-P y 1,5 µg de pPIV5-L. Después de 72 h de incubación a 37 °C, se recogieron los medios y se sedimentaron los restos celulares mediante centrifugación a baja velocidad (3.000 rpm, 10 min). Se usaron ensayos de placa para obtener clones individuales de virus recombinantes.

Se secuenció el genoma de longitud completa de los virus PIV5-NP purificados en placa. Se purificó el ARN total de los medios de las células Vero infectadas con el virus PIV5-NP usando un kit de extracción de ARN vírico (Qiagen Inc, Valencia, CA). Los ADNc se prepararon usando hexámeros aleatorios y las partes alícuotas del ADNc se amplificaron luego en reacciones de PCR usando pares de cebadores oligonucleotídicos apropiados como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 3 y Li *et al.*, 2013, *J Virol*; 87: 354-362). Los productos de PCR fueron secuenciados.

Detección de la expresión de proteínas víricas. Se usaron ensayos de inmunofluorescencia (IF) e inmunoprecipitación (IP) para detectar la expresión de proteínas víricas. Para el ensayo de IF, se infectaron células MDBK en placas de 24 pocillos de forma simulada o se infectaron con PIV5 o PIV5-NP-HN/I a una Mdl de 0,1. 2 días después de la infección, las células se lavaron con PBS y luego se fijaron en formaldehído al 0,5 %. Las células se permeabilizaron en solución de PBS-saponina al 0,1 % y luego se incubaron durante 30 min con anticuerpos monoclonales anti-PIV5-V/P o anti-H5N1-NP. Las células se lavaron con PBS/BSA al 1 % y se incubaron con anticuerpo anti-ratón de cabra marcado con FITC. Las células se incubaron durante 30 min, se lavaron, se examinaron y se fotografiaron usando un microscopio de fluorescencia (Advanced Microscopy Group).

Para la IP, se infectaron células MDBK en placas de 6 pocillos de forma simulada o se infectaron con PIV5 o PIV5-NP-HN/I a una Mdl de 5. A las 22 hdi, las células se marcaron con 35S-Mct/Cys Promix (100 µCi/ml) durante 2 h. Las células se lisaron en tampón RIPA y se inmunoprecipitaron alícuotas usando anticuerpos monoclonales anti-PIV5-V/P o anti-H5N1-NP. Las proteínas precipitadas se resolvieron mediante SDS-PAGE al 15 % y se examinaron mediante autorradiografía con un Storm Phosphorimager (Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, CA).

Se compararon los niveles de expresión de H5-NP en las células infectadas por virus usando células MDBK en placas de 6 pocillos que se habían infectado de forma simulada o con PIV5, PIV5-NP-M/F, PIV5-NP-F/SH, PIV5-NP-SH/HN o PIV5-NP-HN/I a una Mdl de 5. Las células se recogieron a 2 ddi y se fijaron con formaldehído al 0,5 % durante 1 h. Se volvieron a suspender las células fijadas en FBS-DMEM (50:50) y luego se permeabilizaron en etanol al 70 % durante la noche. Las células se lavaron una vez con PBS y luego se incubaron con anticuerpo anti-H5N1 NP de ratón o anticuerpo anti-PIV5-V/P en PBS/BSA al 1 % (1: 200) durante 1 h a 4 °C. Las células se tiñeron con anticuerpo anti-ratón marcado con ficoeritrina durante 1 h a 4 °C a oscuras y luego se lavaron una vez con PBS/BSA al 1 %. La intensidad de la fluorescencia se midió usando un citómetro de flujo (BD LSR II).

Crecimiento de virus *in vitro* e *in vivo*. Se infectaron células MDBK en placas de 6 pocillos con PIV5, PIV5-NP-M/F, PIV5-NP-F/SH, PIV5-NP-SH/HN o PIV5-NP-HN/I a una Mdl de 0,1. Las células se lavaron luego con PBS y se mantuvieron en DMEM-FBS al 2 %. Los medios fueron recogidos a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la infección. Los títulos de los virus se determinaron mediante ensayo de placa en células BHK.

Para comparar el crecimiento de los virus en ratones, Se vacunaron ratones BALB/cJ de tipo silvestre de 6 semanas de vida con 10^5 ufp de PIV5, PIV5-NP-M/F, PIV5-NP-F/SH, PIV5-NP-SH/HN, o PIV5-NP-HN/I en un volumen de 50 μ l por vía intranasal. Se sacrificaron los ratones y se recogieron los pulmones para determinar los títulos víricos a los 3 días después de la infección.

ELISA. Para generar proteína NP de la gripe purificada, se transformó el plásmido pET 15b-NP en células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. La proteína His-NP x6 recombinante se purificó usando resina cargada con Ni (Novagen), y se examinó mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Para la generación de suero inmunizante, los ratones fueron vacunados con 10^6 ufp de PIV5, PIV5-NP-HN/I o 10^5 ufp de X31 por vía intranasal, y se recogieron muestras de sangre el día 21 después de la vacunación. Se recubrió la proteína NP purificada a 2 μ g/ml en placas de 96 pocillos a 4 °C durante la noche. Se realizó un ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (KPL, Inc). Se añadió la dilución en serie de muestras de sueros de ratones inoculados con PIV5, PIV5-NP-HN/I y X31 a placas recubiertas. Se añadió IgG anti-ratón de cabra conjugada con AP (KPL, Inc) y se revelaron las placas. Se midió la densidad óptica (DO) a 405 nm en un lector de placas Bio-Tek Powerwave XS.

Ensayo ELISpot de interferón- γ (IFN- γ). Para detectar la respuesta de CTL en bazos de ratones vacunados, se realizó el ensayo ELISpot de IFN- γ . Los ratones fueron vacunados usando PBS, 10^7 ufp de PIV5, PIV5-NP-F/SH, PIV5-NP-SH/HN, PIV5-NP-HN/I o DL_{50} de 0,1 de PR8 por vía intranasal. El día 21 después de la vacunación, se sacrificaron los ratones y se recogieron los bazos. Se homogeneizaron los bazos y se lavaron con medio HBSS. Se añadió solución de Gey para eliminar los glóbulos rojos. Se añadieron esplenocitos en medio tumoral completo (CTM) a una placa de 96 pocillos (Millipor MAIPSWU10) previamente tratada con etanol al 70 % y recubierta con mAb AN18 anti-IFN- γ de ratón (Mabtech, Inc). Las células se reestimularon de forma simulada o se reestimularon con el péptido Flu-NP 147-155 (TYQRTRALV) (SEQ ID NO: 9). GP P2 del ébola (EYLFEVDNL) (SEQ ID NO: 10) como un péptido irrelevante o PMA/ionomicina. Los cultivos fueron incubados a 37 °C, CO_2 al 5 % durante 48 horas. Se retiraron los esplenocitos, y las placas se lavaron y se incubaron con mAb R4-6A2 anti-IFN- γ de ratón biotinilado (Mabtech, Inc) a temperatura ambiente durante 1 h. Tras el lavado, se incubaron las placas con estreptavidina-fosfatasa alcalina (KPL, Inc) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Las placas se desarrollaron usando una solución BCIP/NBT (KPL, Inc). Se contaron las manchas usando un lector AID ViruSpot (Cell Technology, Inc). Los resultados se presentan como el número medio de células secretoras de citocinas sustraídas por el número medio de estimulación simulada por 10^6 esplenocitos.

Infección de ratones con virus de la gripe A. Los ratones H1N1 se inmunizaron con una sola dosis de PBS, 10^6 ufp de PIV5, PIV5-NP-HN/I o 10^5 ufp de X31 por vía intranasal. El día 21 después de la vacunación, se expusieron los ratones a DL_{50} de 10 de A/PR/8/34 (H1N1). En el día 3 después de la exposición, Se sacrificaron grupos de ratones, y se extrajeron y homogeneizaron los pulmones. Se usó un ensayo de $DICT_{50}$ para determinar los títulos víricos en el homogeneizado aclarado.

Los ratones H5N1 se inmunizaron con una sola administración intranasal de PBS, 10^7 ufp de PIV5, PIV5-NP-HN/I, PIV5-NP-F/SH, PIV5-NP-SH/HN, o 2.000 ufp de rgA/VN-PR8. El día 21 después de la vacunación, los ratones se expusieron a una DL_{50} de 10 o 20 de HPAI de H5N1 como se indica. Tras la exposición, los ratones se controlaron diariamente para determinar la pérdida de peso y la supervivencia. Los ratones se clasificaron según los signos clínicos de infección (piel erizada, postura encorvada, disnea: 1 punto cada una, < 25 % de pérdida de peso: 1 punto, 25-35 % de pérdida de peso: 2 puntos, > 35 % de pérdida de peso: 3 puntos, síntomas neurológicos: 3 puntos). Los animales fueron sacrificados con humanidad al alcanzar los 3 puntos. Las exposiciones relacionados con A/Vietnam/1203/2004 se llevaron a cabo en la contención de ABSL3+. Todos los estudios en animales se realizaron según las pautas aprobadas por el Comité institucional de cuidado y uso de animales de la Universidad de Georgia.

Resultados

Generación y análisis de PIV5-NP-HN/I. Para probar si el PIV5 recombinante que expresa NP a partir de la HPAI de H5N1 puede brindar protección contra diferentes subtipos de virus de la gripe en ratones, se insertó el gen NP de HPAI de H5N1 en el ADNc de PIV5 entre los genes HN y L (Fig. 38). El plásmido que contiene el genoma de PIV5 con el gen NP insertado entre los genes HN y L se transfectó junto con tres plásmidos auxiliares que codifican los genes NP, P y L de PIV5 de las células BSR-T7 para recuperar el virus infecciosos como se ha descrito anteriormente (Sun *et al.*, 2011, *J Virol*; 85: 8376-8385). El virus infeccioso PIV5-NP-HN/I se purificó en placa y se determinó la secuencia del genoma de longitud completa de PIV5-NP-HN/I usando la secuenciación de RT-PCR como se describe en el Ejemplo 3 (véase también Li *et al.*, 2013, *J Virol*; 87:354-362 21). Se usó un clon purificado en placa coincidente con el ADNc exacto de la secuencia del genoma para todos los experimentos adicionales.

La expresión de NP a partir de células infectadas con PIV5-NP-HN/I se confirmó usando el ensayo de inmunofluorescencia e inmunoprecipitación. La proteína H5N1-NP se detectó en células infectadas con PIV5-NP-HN/I, pero no en células infectadas de forma simulada o infectadas con PIV5. Para probar si la expresión de NP afectó a los niveles de expresión de la proteína vírica PIV5, se inmunoprecipitaron las proteínas víricas PIV5 usando un anticuerpo PIV5-V/P. No se observaron diferencias en los niveles de expresión de la proteína vírica PIV5 entre los virus PIV5 y PIV5-NP-HN/I.

Para comparar el crecimiento de PIV5 y PIV5-NP-HN/I en células cultivadas en tejido, se realizaron curvas de crecimiento en múltiples etapas usando células MDBK. PIV5-NP-HN/I creció de forma ligeramente más lenta que PIV5 (Fig. 39A). Para examinar el crecimiento de PIV5 y PIV5-NP-HN/I *in vivo*, los ratones BALB/c fueron vacunados con 10⁵ ufp de PIV5 o PIV5-NP-HN/I por vía intranasal. Los títulos víricos en los pulmones de ratones vacunados se determinaron a los 3 días después de la infección. Los títulos en los pulmones de los ratones vacunados con PIV5-NP-HN/I fueron más bajos que los de los ratones vacunados con PIV5; sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los dos grupos (Fig. 39B).

Respuestas inmunitarias a la inoculación con PIV5-NP-HN/I en ratones. Para investigar si PIV5-NP-HN/I podría generar anticuerpos específicos contra NP *in vivo*, los ratones fueron vacunados con PIV5, PIV5-NP-HN/I o X31 por vía intranasal. El día 21 después de la vacunación, se recogieron muestras de sangre y se prepararon sueros. Se usó la proteína NP purificada marcada con Hi de las bacterias para recubrir placas de 96 pocillos. Se añadieron muestras de suero diluidas en serie a las placas. La vacunación con PIV5-NP-HN/I indujo potentes títulos de IgG séricos anti-NP comparables a los inducidos por una infección por el virus de la gripe vivo (Fig. 40).

Para examinar si PIV5-NP puede inducir una respuesta inmunitaria celular, los ratones fueron vacunados con PBS, PIV5, PIV5-NP-HN/I o PR8 por vía intranasal. El día 21 después de la vacunación, los ratones se sometieron a eutanasia y se realizó el ensayo ELISpot de IFN- γ . Los ratones vacunados con PIV5-NP-HN/I indujeron un nivel similar de respuesta de linfocitos T CD8⁺ específicos de NP en comparación con los ratones vacunados con PR8 (Fig. 41).

Determinación de la eficacia de PIV5-NP-HN/I contra la exposición a H1N1 heterosubtipo en ratones. Para examinar si PIV5-NP-HN/I podría proporcionar protección cruzada contra una exposición a H1N1 heterosubtipo, los ratones se inmunizaron con una sola dosis de PIV5-NP-HN/I por vía intranasal. El día 21 después de la vacunación, se expusieron los ratones a DL₅₀ de 10 de A/PR/8/34 (H1N1). Los ratones inmunizados con PBS y PIV5 perdieron peso corporal, y todos los ratones murieron el día 10 después de la exposición. Por el contrario, ninguno de los ratones inmunizados con PIV5-NP-HN/I mostró una pérdida de peso significativa mientras duró el experimento y todos los ratones sobrevivieron a la exposición (Fig. 42A y 42B). Esto fue comparable al grupo de control positivo sensibilizado con X31. El virus de la gripe se detectó en los pulmones de los ratones inmunizados con PIV5-NP-HN/I 3 días después de la exposición (Fig. 42C) y, aunque los títulos víricos en el grupo de PIV5-NP-HN/I fueron más bajos que los del grupo PBS, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos.

Determinación de la eficacia de PIV5-NP-HN/I contra la exposición a HPAI de H5N1 en ratones. Para examinar si PIV5-NP-HN/I podría proporcionar protección contra una exposición a HPAI de H5N1 homólogo, los ratones se inmunizaron con una sola dosis de PIV5-NP-HN/I por vía intranasal. El día 21 después de la vacunación, los ratones se expusieron a una DL₅₀ de 10 de HPAI de H5N1. Todos los ratones inmunizados con PBS y PIV5 perdieron peso corporal y sucumbieron a la infección. Los ratones vacunados con PIV5-NP-HN/I mostraron una supervivencia del 50 % después de la exposición, perdiendo los ratones supervivientes menos del 20 % de su peso corporal original (Fig. 43A y 43B).

Generación y análisis de PIV5 que expresa NP de H5N1 en diferentes ubicaciones dentro del genoma de PIV5. Como se muestra en el Ejemplo 3, el sitio de inserción dentro del genoma de PIV5 afectó a la inmunogenicidad de los antígenos insertados (véase también Li *et al.*, 2013, *J Virol*; 87:354-362 21). Para investigar si la inserción de NP en diferentes ubicaciones dentro del genoma de PIV5 resultará en una mejora en la eficacia de la vacuna, se insertó NP entre diferentes uniones genéticas dentro del genoma de PIV5. La inserción de NP entre la secuencia líder y el gen NP no dio lugar a un virus infeccioso viable. Debido a que la inserción de un gen foráneo cadena arriba del gen M dentro del genoma de PIV5 afectó al crecimiento del virus *in vitro* e *in vivo* (Ejemplo 3 y Li *et al.*, 2013, *J Virol*; 87:354-362), se insertó NP en las regiones de unión cadena abajo del gen M dentro del genoma de PIV5. PIV5-NP-M/F, PIV5-NP-F/SH, PIV5-NP-SH/HN y PIV5-NP-HN/I crecieron de manera similar entre sí y con una reducción en el título en comparación con PIV5 (Fig. 44A). La proporción de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de NP con respecto a la de PIV5 V/P se examinó mediante citometría de flujo para determinar los niveles de expresión de la proteína H5N1-NP. PIV5-NP-F/SH produjo la proporción más alta, mientras que PIV5-NP-SH/HN y PIV5-NP-HN/I produjeron proporciones similares. PIV5-NP-M/F produjo la proporción más baja. Estos resultados sugieren que PIV5-NP-F/SH induce los niveles más altos de expresión de NP (Fig. 44B). También se comparó la capacidad de estos virus para replicarse en ratones. Aunque los títulos víricos pulmonares en ratones vacunados con PIV5-NP-F/SH, PIV5-NP-SH/HN y PIV5-NP-HN/I fueron ligeramente más bajos que los de los ratones vacunados solo con PIV5, no hubo diferencias significativas en el día 3 después de la vacunación (Fig. 44C).

Respuesta celular a la infección por el virus PIV5-NP. Para determinar si los niveles de expresión de NP afectaron a las respuestas inmunitarias como era de esperar, los ratones fueron vacunados con PBS, PIV5, PIV5-NP-F/SH, PIV5-NP-SH/HN, PIV5-NP-HN/I o PR8 por vía intranasal. El día 21 después de la vacunación, se sometieron los ratones a eutanasia y se realizaron ensayos de IFN- α ELISpot. Los ratones vacunados con PIV5-NP indujeron un nivel más alto de respuesta de linfocitos T CD8⁺ específicos de NP que los ratones vacunados con PIV5. Los ratones vacunados con PIV5-NP-F/SH produjeron el mayor nivel de respuesta de linfocitos T CD8⁺ específicos de NP en comparación con los ratones vacunados con otros virus PIV5-NP y con PR8 (Fig. 45), aunque la diferencia entre los virus PIV5 y PIV5-NP, o entre los virus PIV5-NP y PR8 no fue estadísticamente significativa.

Determinación de la eficacia del virus PIV5-NP contra la exposición a HPAI de H5N1 en ratones. Para investigar si la inmunización con PIV5-NP-F/SH y PIV5-NP-SH/HN podría brindar una mejor protección contra la exposición a HPAI de H5N1, los ratones se inmunizaron con una sola dosis de virus PIV5-NP por vía intranasal. El día 21 después de la vacunación, los ratones se expusieron a una DL₅₀ de 20 de HPAI de H5N1. Esta dosis de exposición más alta se usó para maximizar cualquier posible diferencia entre las diferentes vacunas candidatas. Todos los ratones inmunizados con PBS y PIV5 perdieron peso corporal y sucumbieron a la infección 10 días después de la exposición. Por el contrario, el 20 % de ratones vacunados con PIV5-NP-HN/I, el 30 % de ratones vacunados con PIV5-NP-SH/HN y el 67 % de ratones vacunados con PIV5-NP-F/SH sobrevivieron a la exposición, lo que indica que la inserción de NP entre F y SH dentro de PIV5 proporcionó la mejor protección (Fig. 46A y 46B).

Discusión

Este ejemplo es el primer informe de una vacuna basada en un vector vírico vivo que expresa un solo gen NP que fue completamente protectora contra la exposición letal a H1N1 y que brindó una protección sustancial (67 %) contra una exposición a H5N1 altamente letal en un modelo de exposición potente (exposición a DL₅₀ de 20) en ratones, lo que indica que PIV5 es un vector vírico más eficaz que AdV y VV para una vacuna basada en NP.

En general, se piensa que la inmunidad protectora contra el virus de la gripe A generada por NP está mediada por células con anticuerpos contra NP no esencial para la protección mediada por NP. Recientemente, sin embargo, los informes indican que el anticuerpo anti-NP puede desempeñar un papel en la inmunidad protectora. Coincidiendo con que los anticuerpos anti-NP son irrelevantes, no se observó una correlación entre los títulos séricos anti-NP y la pérdida de peso. Esta falta de correlación, sin embargo, no excluye la contribución del anticuerpo en las respuestas inmunitarias protectoras. En este ejemplo, PIV5-NP-HN/I generó una respuesta potente de los linfocitos T CD8+ específicos de NP como se demostró en un ensayo ELISpot de IFN-γ. Los ratones inmunizados con PIV5-NP-HN/I indujeron un nivel similar de respuestas de linfocitos T CD8+ específicos de NP como infección subletal por H1N1 (Fig. 40B). En consonancia con la observación de que la inmunidad mediada por células no elimina la infección por el virus de la gripe, los títulos de virus de la gripe de la exposición en los pulmones de ratones con PBS y ratones inmunizados fueron similares (Fig. 41C). Los ratones inmunizados con PIV5-NP-F/SH, que tuvieron la mayor cantidad de linfocitos T CD8+ específicos de NP, tuvieron la tasa de supervivencia más alta (67 %) después de la exposición a HPAI de H5N1 entre los grupos de ratones inmunizados con diferentes PIV5 recombinantes que expresaban NP.

La polaridad de la transcripción se encuentra en el orden *Mononegavirale* que contiene un único promotor de facto en el extremo 3' del genoma, es decir, la secuencia líder. Los genes víricos más cercanos al extremo 3' del genoma se transcriben con mayor abundancia que los del extremo 5'. En el Ejemplo 3, la inserción de HA de HPAI de H5N1 entre SH y HN en PIV5 (ZL46, PIV5-H5-SH/HN) dio lugar a una mejor protección contra la exposición a HPAI de H5N1 que las inserciones en las uniones de NP y V/P, V/P y M, o HN y L de PIV5 (ZL48, PIV5-H5-HN/I), presumiblemente porque PIV5-H5-SH/HN produjo los niveles más altos de expresión de HA sin afectar negativamente al crecimiento del virus (véase también Li *et al.*, 2013, *J Virol*; 87:354-362 21). Para mejorar la eficacia de esta vacuna de NP basada en PIV5, se insertó el gen NP cadena arriba del gen NP de PIV5, entre los genes M y F, los genes F y SH, y los genes SH y HN. Como se informa en el ejemplo 3, la inserción cadena arriba del gen NP de PIV5 no condujo a un PIV5 recombinante viable, lo que sugiere que la inserción de un gen foráneo cadena arriba del gen NP de PIV5 es letal. Curiosamente, las células infectadas con el virus PIV5-NP-F/SH produjeron los niveles más altos de expresión de NP. PIV5-NP-M/F, que contenía un NP insertado más cerca de la secuencia líder del extremo 3' y debería tener los niveles de expresión más altos de NP, tuvieron el nivel de expresión más bajo de NP (Fig. 43B).

La unión entre M y F es la más larga entre todas las uniones dentro del genoma de PIV5, y la transcripción de lectura de M a F es la más alta entre las regiones de unión de PIV5 (Parks *et al.*, 2001, *J Virol*; 75: 2213-2223). Probablemente, la interrupción de la unión de M y F afectó negativamente a la expresión del gen insertado. Los ratones vacunados con PIV5-NP-SH/HN y PIV5-NP-HN/I indujeron niveles similares de respuesta de linfocitos T CD8+ específicos de NP como PR8 (H1N1). Los ratones vacunados con PIV5-NP-F/SH indujeron un nivel ligeramente más alto de respuesta de linfocitos T, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 44). Curiosamente, los niveles de expresión de NP producidos en las células infectadas con virus PIV5-NP se correlacionaron con los niveles de respuesta de linfocitos T CD8+ específicos de NP, lo que sugiere que aumentar el nivel de expresión de un gen foráneo puede conducir a un nivel más alto de respuestas inmunitarias celulares generadas por el gen foráneo.

La eficacia de estas vacunas candidatas se mejorará al aumentar la dosis de inoculación y/o al usar la pauta de sensibilización-refuerzo. PIV5-NP se combinará con otros antígenos del virus de la gripe, tales como M2, para mejorar aún más su eficacia, conduciendo a una vacuna contra el virus de la gripe que es más eficaz que el PIV5-NP solo.

Ejemplo 9

Una vacuna contra H5N1 basada en el virus paragripal 5 (PIV5)

Este ejemplo continuará desarrollando una vacuna contra el H5N1 usando PIV5 como vector y explorará el uso de PIV5 como vector para la vacuna universal contra el virus de la gripe. Este ejemplo incluirá probar las eficacias de PIV5 recombinante que expresa antígenos H5N1 frente a la exposición a HPAI de H5N1 en hurones. Se han generado

PIV5 recombinantes que expresan el antígeno HA, NA, NP, M1 y M2 de H5N1 (denominados colectivamente PIV5-H5N1). La inoculación de una sola dosis de algunos PIV5-H5N1 proporcionó una protección completa (sin mortalidad, sin morbilidad y sin virus de exposición detectado en los pulmones, que se define como inmunidad esterilizante) contra la exposición letal a HPAI de H5N1 en ratones. La eficacia de estas vacunas candidatas se probará en modelos animales adicionales, incluyendo, pero sin limitación, un modelo con hurones. El hurón es el mejor modelo de animal pequeño para la infección por el virus de la gripe. Existe una notable similitud en la fisiología y morfología de los pulmones entre los hurones y los seres humanos. Los hurones son altamente susceptibles a la infección con el virus de la gripe. Las vacunas candidatas se probarán en hurones contra la exposición a H5N1. Este ejemplo estudiará más a fondo los mecanismos de inmunidad generados por las vacunas candidatas basadas en PIV5 en ratones y en hurones. Este ejemplo incluirá la mejora de la eficacia de PIV5 recombinante que expresa antígenos H5N1 contra H5N1 y el desarrollo de una vacuna universal contra el virus de la gripe. El vector se modificará aún más para lograr una mejor eficacia y para reducir el riesgo potencial de seguridad. rPIV5-NP proporciona protección no solo contra la exposición a H5N1, sino también contra la exposición a H1N1. Curiosamente, PIV5 recombinante que expresa NA de H1N1 no solo protege completamente la exposición letal a H1N1, sino que también protegió parcialmente contra la exposición letal a H5N1 y H3N2. Las vacunas candidatas se modificarán aún más no solo para aumentar la eficacia contra el H5N1, sino también para brindar una mejor protección contra la exposición al virus de la gripe heterosubtipo, conduciendo a una vacuna universal.

PIV5 es un nuevo vector vacunal para seres humanos, un nuevo vector vírico para el H5N1 y tiene el potencial de ser un vector para la vacuna universal contra el virus de la gripe. Una vacuna basada en NA basada en PIV5 para el virus de la gripe será algo nuevo. Desarrollo de estrategias novedosas para mejorar las respuestas inmunitarias mediante la manipulación de la capacidad del vector para inducir la apoptosis. Desarrollo de estrategias novedosas para potenciar las respuestas inmunitarias mediante la regulación de la vía de señalización de IFN.

El presente ejemplo tiene tres objetivos. El primer objetivo será el de probar el PIV5 recombinante que expresa HA de H5N1 (PIV5-H5) como una vacuna para H5N1. Para probar si el PIV5 recombinante que expresa HA de H5N1 puede proteger a los ratones contra la exposición letal a HPAI H5N1, el virus de la gripe más letal en ratones, se ha generado un PIV5-H5 que contiene un H5 de H5N1 sin sitio de escisión, que inactivó la función de la proteína HA, en la unión entre el gen HN y L de PIV5 (virus ZL48). El virus creció tan bien como el virus de tipo silvestre. Todos los ratones inmunizados con una sola dosis de 10^6 ufp de ZL48 sobrevivieron a la exposición y no tuvieron pérdida de peso. No se detectó H5N1 en los pulmones de ratones inmunizados. El experimento de transferencia de anticuerpos confirmó que el anticuerpo anti-H5 medió la protección. Mientras que la inoculación de una sola dosis de PIV5-H5 protegió por completo a los ratones contra la exposición letal al H5N1, una segunda dosis reforzó aún más los títulos de los anticuerpos neutralizantes. El hecho de que la inmunidad con el vector preexistente no impida el refuerzo con un virus vivo coincide con el informe de que los anticuerpos anti-PIV5 no previenen la infección por PIV5 (Young *et al.*, 1990, *J Virol*; 64(11):5403-11). Véase el Ejemplo 3 y Li *et al.* 2013, *J Virol*; 87(1):354-62 (59).

El aumento del nivel de expresión de H5 probablemente mejorará la eficacia del virus recombinante como vacuna candidata. La distancia a la secuencia líder, el único promotor de facto para PIV5, es inversamente proporcional a los niveles de expresión génica. La unión de genes entre los genes HN y L es la secuencia más distante a la líder en PIV5. El traslado del gen de interés de la unión de genes HN-L más cerca de la secuencia líder aumentará el nivel de expresión génica. El gen HA de H5N1 se ha insertado en diferentes ubicaciones dentro del genoma de PIV5 (Fig. 47; Ejemplo 3; y Li *et al.*, 2013, *J Virol*; 87(1):354-62). Como todas las construcciones proporcionaron una protección completa contra la exposición a H5N1 en ratones después de la inoculación de una sola dosis alta (10^6 ufp), se realizó un estudio de dosis-respuesta (10^3 , 10^4 , y 10^5 ufp). Todos los ratones inoculados con 10^4 ufp y por encima de ZL46, ZL47 o ZL48 sobrevivieron a la exposición letal a H5N1 (Ejemplo 3; y Li *et al.*, 2013, *J Virol*; 87(1):354-62). 10^3 ufp de ZL46 protegieron a los ratones al 100 % contra la exposición letal a H5N1.

Mientras que ZL48 protegió al 70 %, ZL47 solo protegió al 30 % de los ratones a una dosis de 10^3 ufp. Dado que la inmunización del virus de la gripe humana habitual se realiza principalmente por vía IM, y la vacuna del virus de la gripe atenuado vivo se inocula por vía intranasal, se compararon las eficacias de la inmunización por vía IM e IN. Aunque funcionaron tanto la vía IM como la vía IN, la vía IN proporcionó una mejor protección que la vía IM. Curiosamente, el PIV5-H5 inactivado no protegió por vía IM ni por vía IN, lo que sugiere que la replicación de PIV5 es esencial para su eficacia, incluso en la inoculación por vía IM. PIV5 es un agente infeccioso respiratorio. Se detectó IgA anti-HA en el lavado alveolar bronquial y lavado nasal de ratones inmunizados con PIV5-H5 por vía IN, lo que sugiere que la vacuna basada en PIV5 puede generar una potente inmunidad de la mucosa en las vías respiratorias. Véase el Ejemplo 7 y Mooney *et al.*

Prueba del potencial de otras proteínas H5N1 expresadas usando PIV5 como antígenos para la vacuna. Se han generado PIV5 recombinantes que expresan las proteínas de H5N1 NA, M1, M2 y NP (Fig. 47A) y se han evaluado sus eficiencias como vacunas candidatas contra el H5N1. También se generó y se probó PIV5 que expresaba H1 o N1 de H1N1. Para todas estas construcciones, se insertaron los genes en la unión de HN y L como punto de partida para evitar posibles efectos perjudiciales en la replicación del genoma de PIV5. Excepto rPIV5-M2, todos los virus crecieron bien en células de cultivo de tejidos.

La inoculación de ratones con ZL116 (Fig. 47A), que contiene el gen NA de H5N1, protegió por completo a los ratones frente a la exposición a H5N1 letal. Además, no se detectó H5N1 en los pulmones de los ratones inmunizados con rPIV5-N1 (H5N1). Este emocionante resultado supone la primera vez que se observa una inmunidad esterilizante (sin mortalidad, sin morbilidad y sin virus de exposición detectado en el pulmón) contra el H5N1 usando una vacuna de NA basada en un vector vírico. Para investigar si la protección mediada por N1 de H5N1 es específica y solo se limita a NA de H5N1, se probó ZL108 (PIV5 que expresa N1 de H1N1). Confirmando que la inmunidad generada por NA puede ser protectora, rPIV5-N1 (H1N1) protegió por completo a los ratones contra la exposición letal a H1N1. Curiosamente, rPIV5-N1 (H5N1) proporcionó una protección completa contra la prueba letal de H1N1; rPIV5-N1 (H1N1) también proporcionó protección parcial (60 %) contra la exposición letal a H5N1. Para examinar más a fondo si la protección basada en NA puede ser amplia, se probaron rPIV5-N1 (H5N1) y rPIV5-N1 (H1N1) contra la exposición letal a H3N2. Sorprendentemente, rPIV5-N1 (H1N1) protegió parcialmente (40 %) contra la exposición a H3N2, mientras que rPIV5-N1 (H5N1) no protegió en absoluto.

NP del virus de la gripe A está bien conservada. Se cree que la inmunidad generada por NP está mediada por células. Recientemente, se ha usado NP como componente para el desarrollo de una vacuna universal contra el virus de la gripe (Soboleski *et al.*, 2011, *PLoS One*; 6(7):e21937). Se generó un PIV5 que expresaba NP de H5N1 y se probó su eficacia frente a una exposición letal al virus H1N1 (cepa PR8), un subtipo diferente del H5N1. La inoculación de una sola dosis en ratones con PIV5-NP proporcionó una protección del 100 por cien contra la exposición letal a la cepa PR8. Sin embargo, hubo cierta pérdida de peso (del 5 al 10 %). Coincidiendo con que el anti-NP es irrelevante, no se observó correlación entre los títulos anti-NP y la pérdida de peso. Asimismo, el virus PR8 no se detectó en los pulmones de los ratones inmunizados, de acuerdo con los informes anteriores de que la inmunidad mediada por NP no previene la infección por el virus de la gripe. Por el contrario, un VV que expresa NP no proporcionó ninguna protección contra la exposición del mismo virus, y un adenovirus que contiene NP proporciona una protección del 80 % contra la exposición letal a H1N1, pero los ratones perdieron aproximadamente un 30 % del peso. El hecho de que estas construcciones de PIV5 funcionaron mejor que las vacunas de NP basadas en AdV y en VV demuestra que PIV5 es un mejor vector vacunal para el virus de la gripe que AdV o VV (MVA).

Se probó PIV5-NP contra la exposición letal al H5N1, y se observó una protección parcial contra la mortalidad y cierta pérdida de peso (10 a 20 %). Aunque la protección contra el H5N1 fue solo del 50 %, es la mejor que se ha informado para una vacunación de monodosis con una vacuna candidata de NP de vectorización vírica. Esto se mejorará al aumentar la dosis de inmunización, cambiando el sitio de inserción de NP dentro del genoma de PIV5, modificando el vector de PIV5 y combinándolo con otros antígenos del virus de la gripe descritos en el presente documento.

La proteína M1 del virus de la gripe A se conserva. Se determinó la eficacia de un PIV5 recombinante que expresaba M1 de H5N1 entre HN y L (rPIV5-M1) (Fig. 47A). Curiosamente, rPIV5-M1 proporcionó protección parcial (70 %) contra PR8 letal en ratones. La protección inferior a la ideal es más probable debido a una mutación inesperada en la secuencia de inicio del gen M1. Se generará PIV5 recombinante que expresa M1 con mejor eficacia.

Se generaron mutantes de PIV5 que expresaban H5 (Fig. 47A). Como parte del análisis rutinario de los virus recombinantes, se purifica en placa y se secuencian el genoma completo del virus. Aunque PIV5ΔSH-H5 (ZL128) tiene las secuencias de entrada exactas, hay mutaciones en el genoma de los virus PIV5VΔC-H5. Anteriormente, después de que rPIV5VΔC pasara en células Vero, una estirpe celular defectuosa en interferón, surgieron virus con mutaciones que recuperaron la expresión de la proteína V, así como mutaciones en otros sitios. Esto se debe probablemente a la forma en que se realizó la eliminación del extremo C y a la importancia de la proteína V en la replicación del virus. Debido a que los ARNm de V y P se transcriben a partir del mismo gen V/P, no se puede eliminar la secuencia de codificación completa para V del genoma de PIV5 sin eliminar también el extremo N de la proteína P, una parte esencial del complejo de ARN polimerasa vírico. En cambio, se introdujeron múltiples mutaciones puntuales dentro de la región del gen V/P, que es fundamental para la transcripción de ambos ARNm, para forzar que el gen V/P solo generara el ARNm de P, y no el ARNm de V. Muchos clones de rPIV5VΔC-H5 fueron secuenciados y todos contienen mutaciones en diferentes ubicaciones. Se escogieron y probaron dos clones de virus recuperados con diferentes mutaciones además de las mutaciones previstas que anulan la expresión del extremo C de la proteína V. El fundamento es que si todos los mutantes tienen los mismos efectos y la característica común es la falta de un extremo C conservado de V, es probable que la falta del extremo C de V sea un factor determinante en el fenotipo. Se generó la inmunidad generada por los virus y se probó la eficacia de los virus recombinantes en ratones frente a la exposición letal a H5N1. PIV5ΔSH-H5 había generado mejores respuestas de anticuerpos y respuestas mediadas por células que PIV5-H5. Uno de los dos clones de PIV5VΔC-H5 examinado había generado un mejor anticuerpo y el otro había generado mejores respuestas mediadas por células hacia H5. Todos los PIV5 mutantes proporcionaron una mejor protección contra la exposición a H5N1 que PIV5 de tipo silvestre. Se han generado mutantes rPIV5VΔCΔSH-H5, rPIV5VΔC-NP y rPIV5ΔSH-NP (Fig. 47A), y se están realizando pruebas.

Inmunización de perros con exposición previa a PIV5 con rPIV5-H3. Para examinar si la inmunidad preexistente a PIV5 afecta negativamente al uso de PIV5 como vector vacunal, a continuación, se estudiaron los perros no tratados previamente con PIV5 y los perros que habían sido vacunados contra PIV5 varias veces. Se confirmó la falta de anti-PIV5 neutralizante en perros sin tratamiento con PIV5 y los títulos de anticuerpos neutralizantes (nAb) contra PIV5 en los perros vacunados con PIV5 fueron tan altos como de 300 (véase el Ejemplo 2 y Chen *et al.*, 2012, *PLoS One*; 7(11):e50144). Los perros fueron vacunados con PBS, PIV5 o rPIV5-H3 por vía IN. Los perros no tratados previamente

con PIV5 vacunados con rPIV5-H3 tuvieron títulos de HAI que variaron entre 20 y 80 (media de 42). Los perros positivos en PIV5 vacunados con rPIV5-H3 tuvieron títulos de HAI que variaron entre 40 y 80 (media de 77) (la diferencia de HAI entre dos grupos no es estadísticamente significativa), lo que indica que la vacunación con rPIV5-H3 generó inmunidad contra el virus de la gripe (un aumento de 4 veces el título de HAI o un título de HAI de 40 se considera protector contra la infección por el virus de la gripe), y sugiere que los títulos de nAb anti-PIV5 preexistentes no afectaron a la eficacia de la vacuna basada en PIV5 en perros. Los resultados coincidieron con un informe previo de que el nAb contra PIV5 no previene la infección por PIV5 en ratones (Young *et al.*, 1990, *J Virol*; 64(11):5403-11). Todavía no se ha determinado la capacidad del perro para eliminar una infección por PIV5. Dado que el PIV5 tiene replicación autolimitada en los perros, es probable que la inmunidad mediada por células también desempeñe un papel fundamental en la eliminación de la infección. Debido a que se requiere tiempo para que la inmunidad mediada por células responda y sea eficaz, este desfase de tiempo ofrece una ventana de oportunidad para que la vacuna viva basada en PIV5 se replique en células y genere una respuesta inmunitaria consistente.

El primer objetivo probará la eficacia de PIV5 recombinante que expresa antígenos de H5N1 frente a la exposición a H5N1 en hurones. Se han obtenido vacunas candidatas contra H5N1 basada en PIV5 que son eficaces contra la exposición a HPAI de H5N1 en ratones. La eficacia se probará en modelos de animales adicionales, incluyendo un hurón, dado que el hurón es el mejor modelo de animal pequeño para la infección por el virus de la gripe. Se han probado muchas vacunas candidatas en ratones, incluyendo las 13 enumerados en la Fig. 47. Estas se probarán en hurones. Dado que el objetivo principal es desarrollar la vacuna contra el H5N1, primero se probará PIV5-H5, ya que el anticuerpo contra H5 es un parámetro bien aceptado para evaluar la eficacia de las vacunas candidatas. En el caso de PIV5-H5, ZL46 se probará primero, porque es el más eficaz entre todos los PIV5-H5 de tipo silvestre. En segundo lugar, se probará PIV5 Δ SH-H5 (ZL128), que es el mejor entre los PIV5-H5 mutantes y también es estable. La determinación de si la activación de TNF- α por rPIV5 Δ SH-H5 afecta a las respuestas inmunitarias adaptativas arrojará información para el diseño de nuevas vacunas. En tercer lugar, se probará PIV5-N1 (H5N1) (ZL116), porque nadie ha informado sobre el éxito de una vacuna de NA de vector vírico en los hurones. El trabajo será esencial para determinar si AN puede ser un antígeno eficaz y si PIV5 que expresa AN puede ser eficaz en hurones contra el virus de la gripe. En cuarto lugar, se probará PIV5-NP (ZL112) en hurones, porque se cree que la inmunidad contra la vacuna basada en NP está mediada por las respuestas inmunitarias celulares. No solo se comprobará si el PIV5 que expresa NP puede ser eficaz en los hurones, sino también será una determinación de si la vacuna basada en PIV5 puede generar una respuesta inmunitaria celular potente en los hurones.

Examen de seguridad, de estabilidad e inmunogenicidad de PIV5-H5N1. Se probarán cuatro conjuntos de vacunas candidatas: PIV5-H5, PIV5 Δ SH-H5, PIV5-N1 y PIV5-NP. se incluirán PBS y PIV5 como control negativo para cada conjunto. Se usará H5N1 inactivado como control positivo. Para la vacuna de PIV5 Δ SH-H5 (ZL128), también se incluirá PIV5-H5 (ZL48) a modo comparativo, porque ambos contienen la inserción de H5 en la misma ubicación dentro del genoma de PIV5. Los hurones de un grupo de 6 serán inoculados con 10^6 ufp del virus parental PIV5 recombinante (PIV5) o PIV5-H5N1, o PBS en un volumen de 0,5 ml bajo anestesia. Como control positivo para la inmunogenicidad, 3 hurones serán inmunizados por vía intramuscular (IM) con 15 ug de H5N1 inactivado, que se ha demostrado que induce respuestas de anticuerpos específicos de HA y protege contra la exposición letal en un modelo de infección de hurón. Los animales serán controlados para determinar los síntomas clínicos (fiebre, letargo y pérdida de peso) durante 14 días. Los días 2, 4, 6, 8, 10, 14 y 21 después de la inoculación, se recogerán lavados nasales y se determinarán los títulos víricos de los mismos mediante el análisis de placa. Los lavados nasales también se analizarán en busca de respuestas de anticuerpos de la mucosa usando un ELISA de IgA específico de HA. También se recogerán suero y sangre completa los días 0, 8, 14 y 21 para medir la CBC, la bioquímica clínica, las respuestas de los anticuerpos séricos y/o las respuestas inmunitarias mediadas por células. Al cuarto día (máximo de supresión de PIV5) después de la inoculación, tres hurones serán sacrificados con humanidad y necropsiados para analizar la patología macroscópica y los cambios patológicos microscópicos. Asimismo, se extraerán los pulmones y los cornetes nasales, y se determinarán los títulos víricos. Se recogerán tejidos adicionales para el análisis de los linfocitos (respuesta inmunitaria). Los cambios patológicos se examinarán usando la tinción con H&E. Los hurones que queden se expondrán al H5N1 el día 21 después de la inmunización.

Para los estudios de estabilidad, se usará el lavado nasal para obtener el ARN vírico para la secuenciación directa de la RT-PCR y/o se cultivará en células Vero, y luego se usará para la secuenciación de la RT-PCR en caso de que haya suficiente virus en los lavados nasales para la secuenciación directa de la RT-PCR. Para los estudios de patología, tras la patología macroscópica, se extraerán tejidos del animal sacrificado, se colocarán en una cuadrícula y se seleccionarán fragmentos de 1 cm (que representan todo el órgano), fijándolos en formalina tamponada al 10 %. Se recogerán fragmentos adicionales para el análisis del título del virus mediante el ensayo de placa. Los tejidos fijos serán embebidos en parafina, cortados en 3 micrómetros, teñidos con hematoxilina y eosina (H&E), examinados mediante microscopía óptica y calificados con ocultación por parte de un patólogo. Si los resultados de H&E lo sugieren, los tejidos se someterán a inmunotinción con mAb específicos del virus o específicos de los linfocitos (por ejemplo, CD4, CD8, linfocitos B) y se calificarán en cuanto al nivel de expresión del antígeno del virus y/o la infiltración de los linfocitos.

Inmunidad local. Los sitios de inducción de respuestas inmunitarias pueden alterar la naturaleza de la respuesta inmunitaria e impactar drásticamente en la eficacia protectora. Se ha demostrado que la inmunización de la mucosa induce una respuesta de IgA e IgG de la mucosa específica de la gripe que protege contra la exposición tanto

coincidente y heterosubtípica. La inmunización con PIV5 intranasal tiene el potencial de inducir respuestas locales de inmunoglobulina y linfocitos T específicos de la gripe que median la protección contra la exposición a la gripe. Las respuestas inmunitarias locales (es decir, las de los pulmones) específicas de PIV5 y las específicas de la gripe se evaluarán mediante el análisis de lavados nasales y de pulmones (en los días de eutanasia). Se recogerán por centrifugación poblaciones de linfocitos infiltrantes y el lavado de BAL se analizará en busca de Ig en la mucosa.

Análisis de la inmunidad mediada por células (linfocitos T) se medirán las respuestas de los linfocitos T inducidas por la vacunación y los cambios en las respuestas de los linfocitos T tras la exposición mediante la producción de IFN específicos del antígeno. Específicamente, se analizarán los linfocitos de sangre periférica, BAL, el bazo y/o el ganglio linfático drenante para determinar las respuestas de los linfocitos T específicos de la gripe mediante la reestimulación con H5N1 inactivado. 6:2 PR8:A/VN/1203/04 de genética inversa, HA recombinante (NA o NP), o agrupaciones de péptidos HA de H5N1 (o NA, NP). Se determinarán las respuestas de IFN- γ mediante la tinción intracelular de citocinas, ensayos ELISA y/o ELISPOT. Se ha identificado una variedad de epítopos peptídicos específicos de HA tras la infección por el virus de la gripe. Si bien no se han identificado epítopos específicos en el A/Vi- etnam/1203/04 HA para los hurones, se dispone de bancos de péptidos HA para los virus de la gripe H5N1, y se pueden rastrear poblaciones de células inmunitarias para determinar su reactividad a fin de identificar epítopos peptídicos según sea necesario.

Análisis de inmunidad humoral (anticuerpos) se medirán las respuestas inmunitarias humorales específicas de HA (NA o NP) en el suero, el lavado nasal y el lavado de BAL mediante un ensayo ELISA convencional usando virus homólogos (A/Vietnam/1203/04) o heterólogos (A/Udon) o HA recombinante (NA o NP) como antígenos unidos a la placa. Tanto la IgA como la IgG se evaluarán usando anticuerpos específicos de la clase de hurón. Los títulos de anticuerpos específicos de HA también se medirán mediante el ensayo de microneutralización del virus o HAI. Las muestras que demuestren reactividad frente a HA A/VN/1203/04 (clado 1) homóloga se evaluarán para determinar la reactividad del clado cruzado hacia A/Anhui/1/2005 (clado 2.3.4). Todas las muestras de suero y de lavado BAL se compararán con las muestras preinmunes e inmunizadas con control correspondientes.

Examen de la eficacia de PIV5-H5N1 frente a la exposición a H5N1. Los experimentos de exposición se realizarán en la contención de BSL3AG+. El hurón inmunizado como se ha explicado anteriormente, se inoculará por vía IN con una DL₅₀ de diez de H5N1. Los hurones serán controlados para determinar los síntomas clínicos incluyendo actividad, pérdida de peso, temperatura corporal y supervivencia durante 14 días. Se recogerán lavados nasales los días 2, 4, 6 y 8 posteriores a la infección y se analizarán para determinar el título del virus mediante el ensayo de DICT50. En el día 14, los animales supervivientes se sangrarán para analizar el anticuerpo sérico específico de la gripe.

Se infectaron los hurones con PIV5 de tipo silvestre o rPIV5-H5 (ZL46), y se midieron los títulos de anticuerpos contra H5 usando ELISA y un ensayo de neutralización vírica. Esta vacuna candidata fue eficaz en la generación de títulos de anticuerpos anti-H5 que se consideran protectores (Fig. 47B). Debido a los resultados con PIV5-H5, PIV5-N1 y PIV5-NP en ratones, y este experimento de PIV5-H5 en hurones, se espera que PIV5-H5 y PIV5-N1 sean inmunogénicos y eficaces para proteger a los hurones contra la exposición letal a H5N1. Se ha observado una potente reactividad cruzada de los sueros de ratones inmunizados con PIV5-H5 (H5N1, VN) hacia H5N1 Anhui (un virus del clado 2), lo que sugiere que PIV5-H5 (VN, Clado 1) será protector contra la exposición de un virus del Clado 2.

La inoculación inicial comenzará con 10⁶ ufp (Fig. 47B) de una vacuna candidata. Si esto no es suficiente para una protección completa (sin síntomas, sin mortalidad y sin virus detectables), se aumentará la dosis hasta 10⁸ ufp por hurón. Si una sola dosis no es suficiente para una protección completa, se usará una pauta de sensibilización-refuerzo para mejorar la inmunidad. Todos los reactivos relacionados con el virus de la gripe se pueden obtener fácilmente, y se han producido NP y M1 purificados para el análisis de linfocitos T.

Para este estudio en hurones, los reactivos necesarios para los ensayos inmunológicos eficaces, tales como anticuerpos anti-hurón, se obtendrá de BEI y de otras fuentes comerciales, y se pueden usar anticuerpos de reactividad cruzada. Además, se generarán anticuerpos monoclonales contra proteínas de hurón. Para este fin, se han desarrollado dos hibridomas de anti-CD4 de hurones y tres hibridomas de anti-IFN- β de hurones.

El segundo objetivo incluye la mejora de la eficacia de PIV5 recombinante que expresa antígenos H5N1 contra H5N1, así como la exposición al virus de la gripe heterosubtípico, para mejorar aún más la vacuna contra el virus H5N1 basada en PIV5, así como para la vacuna contra el virus de la gripe universal, potencial general.

Incorporación de mutaciones que inducen la expresión de IFN y bloquean la señalización de IFN. Se sabe que la activación de respuestas inmunitarias innatas tales como la expresión de IFN mejora las respuestas inmunitarias adaptativas. Para el vector vírico, esta es una espada de doble filo. Si un vector vírico induce una expresión potente de IFN, esta inducción de IFN inhibirá a su vez la replicación del vector, reduciendo la eficacia del vector. Será ideal un vector vírico que permita la inducción de la producción de IFN y siga manteniendo su capacidad de bloquear la señalización de IFN para permitir su replicación eficaz. Se han identificado restos en las proteínas PIV5 que son capaces de inducir la expresión de citocinas, como el interferón de tipo I (Sun D *et al.*, 2009, *PLoS Pathog*; 5(7):e1000525). El resto de S157 de la proteína P de PIV5 es un sitio de unión para la quinasa PLK1 del hospedador, y el resto S308 de la proteína P de PIV5 es un sitio de fosforilación de PLK1. La mutación de S157 o S308 en el resto

de aminoácido A da lugar a un virus que aumenta la expresión de interferón- β . Lo que es más importante, el virus sigue expresando una proteína V que bloquea la señalización de IFN. Por lo tanto, este es un vector vírico que puede inducir la expresión de IFN sin afectar negativamente a su propia replicación. Se generará PIV5 recombinante que exprese H5 o NP (Fig. 47B), y se determinará la inmunogenicidad y eficacia contra la exposición a H5N1 en ratones y en hurones. Se usará HA para probar el efecto de P-S308A en la respuesta de los anticuerpos y se usará NP para probar el efecto de P-S308A en la respuesta mediada por células.

Prueba de la eficacia de la inmunización mixta con PIV5-NP con PIV5-NA, M1, M2 y/o HAstem como vacuna universal. Dado que rPIV5-NP protegió de H1N1, así como H5N1, y que PIV5-N1 (H1N1) no solo protegió de la exposición a H1N1, sino también a H3N2, se espera que un PIV5 que exprese NP, así como otros antígenos del virus de la gripe, sean un buen candidato para una vacuna universal contra el virus de la gripe. En primer lugar, se evaluará si una combinación de dos vacunas proporcionará sinergia en la protección. Si lo hace, entonces se pueden combinar en un único vector vírico. Dado que se sabe que NP proporciona una amplia protección, se usará NP como base para mezclar con otros. PIV5-NP se probará con PIV5-NA, PIV5-M2 y/o PIV5-M1, así como PIV5-HAstem (la región del tallo de HA) en ratones, y luego en hurones.

M2 está relativamente conservado entre las proteínas del virus de la gripe. Se ha demostrado que M2 puede generar una amplia inmunidad contra el virus antigripal. Sin embargo, los estudios actuales no detectaron ninguna protección cuando se expresó M2 funcional de longitud completa desde PIV5. Es probable que este fallo en la generación de una respuesta inmunitaria a M2 sea la toxicidad de M2 en las células infectadas con PIV5-M2. M2 es un canal iónico, y se han identificado restos fundamentales para esta función. Se sabe que H37 y W41 son fundamentales para la actividad del canal iónico. La mutación de estos restos anula la actividad del canal iónico sin afectar a la estructura de M2 (M2 es un homotetrámero con un solo dominio transmembrana). Al deshabilitar la actividad del canal iónico de M2, se generará un PIV5 que expresará altos niveles de M2 sin matar a las células infectadas demasiado rápido. Asimismo, ya que los epítomos para M2 son conocidos y están en el ectodominio de M2, se generará una proteína híbrida entre SH de PIV5 y M2. SH de PIV5 es una proteína transmembrana de 44 aminoácidos de longitud con un ectodominio de 7 restos de aminoácido. Se añadirá un ectodominio de M2 al ectodominio de SH (SH-M2). Recientemente, se ha informado que un anticuerpo que reconoce la región conservada de HA que es la región del tallo de HA es eficaz para prevenir la infección de todos los subtipos de virus de la gripe. Se expresará la región del tallo de HA de PIV5 (Fig. 47B) y se examinará su inmunogenicidad en ratones. La construcción PIV5-M1 ya proporcionaba un 70 % de protección contra la exposición letal de PR8. Este virus se mejorará aún más mediante el uso correcto de la secuencia de inicio del gen y la inserción de M1 entre SH y HN.

Generación de PIV5 expresando más de un antígeno del virus de la gripe. En aras de la simplicidad y de evitar cargas reglamentarias innecesarias, la expresión de múltiples antígenos desde un solo virus puede ser deseable en comparación con el uso de una mezcla de PIV5 que exprese diferentes antígenos. Se combinará la expresión de NP con la expresión de NA, HAstem, M1 y/o M2 del mismo PIV5 (Fig. 47B).

Prueba de la eficacia de PIV5 que expresa múltiples antígenos del virus de la gripe como una vacuna universal. Una vez generado un PIV5 que exprese NA, NP, M2 mut y/o M1, se probarán sus eficacias primero en ratones, en primer lugar, contra las exposiciones a H1N1, H3N2 y H5N1. Si son eficaces en ratones, se probarán en hurones.

El tercer objetivo incluye estudios para aumentar la comprensión de la inmunidad basada en el vector PIV5. Se probarán los mecanismos de inmunidad generados por las vacunas candidatas basadas en PIV5 en ratones y en hurones. Con las vacunas tradicionales del virus de la gripe, los anticuerpos neutralizantes hacia HA generalmente se consideran el sello distintivo de la inmunidad protectora. Sin embargo, la inmunización con una vacuna viva aumenta la probabilidad de generar respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares. Estos ejemplos han demostrado que el PIV5 que expresa NA y NP brindó protección a un nivel que no se había observado anteriormente. La presentación alterada del antígeno por los virus PIV5 recombinante probablemente habría modificado la respuesta inmunitaria. Se cree que las vías apoptóticas afectan a la presentación de antígenos. Dado que las vías que conducen a la apoptosis inducida por PIV5 Δ SH y PIV5V Δ C se han identificado y son diferentes, estos virus brindan una oportunidad única para examinar la presentación de antígenos con virus que expresan el mismo antígeno, pero que activan diferentes vías de apoptosis. Es posible que una vía apoptótica pueda mejorar preferentemente las respuestas de los anticuerpos, mientras que la otra puede afectar a las respuestas de los linfocitos T. Comprender cómo la apoptosis afecta a la respuesta inmunitaria a la infección por virus no solo nos ayudará a diseñar una mejor vacuna contra el H5N1, sino que también proporcionará conocimientos generales sobre el diseño de vacunas y respuestas inmunitarias. La vacuna basada en PIV5-P-S308A permitirá el estudio de los efectos de la inducción de IFN sobre las respuestas inmunitarias adaptativas sin la preocupación sobre los efectos de IFN en la replicación en el vector vírico. En este objetivo, se abordará el mecanismo inmunitario de protección proporcionado por rPIV5-H5, rPIV5-NA y rPIV5-NP.

El mecanismo de protección inducida por PIV5 se examinará mediante tres métodos. Para determinar si el anticuerpo es suficiente para la protección, se transferirá pasivamente suero de ratones sin tratamiento previo, y de ratones inmunes a PIV5, a PIV5-H5N1 (refiriéndose a todos los PIV5, conteniendo mutación o no, que expresan antígenos H5N1) o a H5N1 a ratones sin tratamiento previo. Los destinatarios de la transferencia serán expuestos a la gripe H5N1. Algunos animales se sacrificarán para el análisis del título vírico varios días después de la exposición, y otros ratones se controlarán para determinar la morbilidad y la mortalidad. Para determinar si el anticuerpo es esencial para

la protección, los ratones MT que son defectuosos en la producción de anticuerpos se usarán para la inmunización. Si los ratones inmunizados sobreviven a una exposición letal, ello indicará que no se requiere anticuerpo y que las respuestas inmunitarias mediadas por células serán suficientes para la protección. Para evaluar el papel de las respuestas inmunitarias celulares, los ratones se inmunizarán como antes y agotarán agudamente los animales inmunes de distintos subconjuntos de linfocitos T (CD4, CD8 o ambos) mediante el agotamiento de mAb. Después del agotamiento, los ratones serán expuestos a la gripe H5N1 y se evaluará la protección como se ha indicado anteriormente. En ocasiones, los estudios de agotamiento agudo pueden generar datos no concluyentes; por ejemplo, el agotamiento de los linfocitos T CD4 y CD8 no anula la protección, pero la adición de un agotamiento de CD90 da lugar a una pérdida completa de la protección. Hay una serie de posibles explicaciones para este resultado inusual, incluyendo el agotamiento incompleto con los mAb específicos de CD4 y CD8 o un rol para una célula doble negativa de CD4/CD8 en la protección. Además, El agotamiento agudo no solo elimina los linfocitos T sensibilizados, sino también los linfocitos T sin tratamiento previo, eliminando cualquier contribución de una respuesta primaria a la exposición que contribuye a la protección. De manera similar a la transferencia de suero pasiva, la transferencia adoptiva de linfocitos T sensibilizados a un animal sin tratamiento previo puede describir directamente un papel de las poblaciones de células individuales en una respuesta inmunitaria protectora. Como alternativa al agotamiento agudo, se usarán ratones deficientes en clase I para evaluar la contribución de la actividad de(CTL) CD8+, inmunizando ratones de tipo silvestre y deficientes en $\beta 2m$ y evaluando la eficacia protectora. Los ratones deficientes en clase II (linfocitos T CD4+) son otro enfoque alternativo, pero tienen problemas adicionales con la inducción de CTL y respuestas de anticuerpos séricos eficaces.

Ejemplo 10

Vacunas mejoradas contra la rabia

La rabia sigue siendo una amenaza importante para la salud pública en todo el mundo, y causa más de 70.000 muertes humanas al año. La prevención de la rabia humana incluye la inmunización de los animales de compañía y de los vehículos de vida silvestre, la inmunización previa a la exposición de personas en riesgo y el tratamiento posterior a la exposición de las personas mordidas por animales rabiosos. Aunque las vacunas inactivadas contra el virus de la rabia (RV) preparadas a partir de cultivos celulares son seguras y eficaces, tienen desventajas. En primer lugar, estas vacunas son costosas y, por lo tanto, están fuera del alcance de la mayoría de las personas que necesitan las vacunas en los países en desarrollo. Además, se requieren inmunizaciones repetidas con vacunas inactivadas para producir una respuesta inmunitaria protectora. Además, estas vacunas inactivadas siempre incluyen adyuvantes que pueden causar efectos secundarios. Por lo tanto, se necesitan vacunas contra RV más baratas y más eficaces.

Este ejemplo tiene tres objetivos. Uno, probar la eficacia de rPIV5-G en perros. Se examinará la eficacia de rPIV5-G en perros usando diferentes vías de vacunación (intranasal, oral e intramuscular) y para determinar la respuesta a la dosis de rPIV5-G. Dos, mejorar la eficacia de PIV5 recombinante que expresa G. El sitio de inserción del antígeno dentro del genoma de PIV5 afectó a la inmunogenicidad de la vacuna candidata en animales. En estudios anteriores, se ha insertado el gen G del virus de la rabia entre los genes HN y L. Se insertará G en otras ubicaciones dentro del genoma de PIV5 y se probará su eficacia en ratones y perros. Las modificaciones realizadas en PIV5 pueden mejorar las respuestas inmunitarias a los antígenos. Por ejemplo, la eliminación del gen SH produjo una mayor inmunidad a un gen foráneo en comparación con el PIV5 de tipo silvestre. El genoma de PIV5 se modificará para obtener la máxima inmunidad a la proteína G. Asimismo, tres, probar la inmunidad de otras proteínas víricas de la rabia. Aunque G es suficiente para generar inmunidad protectora contra la exposición a la rabia, la proteína vírica de la rabia N también es conocida por generar inmunidad protectora. Se construirá y se probará un PIV5 recombinante que exprese N. Además, se incorporará M, un componente fundamental de la partícula vírica para generar una partícula de tipo vírico (VLP) basada en PIV5 y probar su eficacia como una vacuna contra la rabia.

Este ejemplo no solo conducirá a una nueva vacuna segura y eficaz contra la rabia que se podrá administrar por múltiples vías, sino que también proporcionará una nueva estrategia para desarrollar vacunas para perros y, posiblemente, animales silvestres. El conocimiento obtenido del trabajo guiará el diseño de vacunas basadas en PIV5 para otras enfermedades tales como el VIH y la tuberculosis micobacteriana.

Pruebas de eficacia de rPIV5-G en perros. Se examinará la eficacia de rPIV5-G en perros usando diferentes vías de vacunación (intranasal, oral e intramuscular) y para determinar respuesta a la dosis de rPIV5-G. Examen de seguridad, estabilidad e inmunogenicidad de rPIV5-G en perros La seguridad de PIV5 se ha probado esencialmente en perros, ya que está contenida en las vacunas contra la tos de las perreras. La seguridad y la inmunogenicidad se probarán más a fondo en la dosis más alta posible por varias vías de inmunización. Se inocularán perros de un grupo de 8 con 10^8 ufp de virus parental PIV5 recombinante (PIV5) o PIV5-G por vía IM, oral o IN. Como control, se incluirá rLBSNE (esencialmente SAG-2, una vacuna comercial contra la rabia) por vía IM. Los animales serán controlados para determinar los síntomas clínicos (fiebre, letargo y pérdida de peso) durante 14 días. Los días 2, 4, 6, 8, 10, 14 y 21 después de la inoculación, se recogerán lavados nasales y se determinarán los títulos víricos de los mismos mediante el análisis de placa. También se recogerán suero y sangre completa los días 0, 7, 14 y 21 para medir la CBC y la bioquímica clínica. Al cuarto día (máximo de supresión de PIV5) después de la inoculación, los perros (4 de cada grupo) serán sometidos a eutanasia con humanidad y se les hará una necropsia para analizar la patología macroscópica y los cambios patológicos microscópicos. Asimismo, se extraerán los pulmones y los cornetes nasales,

- y se determinarán los títulos víricos. Para los estudios de patología, tras la patología macroscópica, se extraerán tejidos del animal sacrificado, se colocarán en una cuadrícula y se seleccionarán fragmentos de 1 cm (que representan todo el órgano), fijándolos en formalina tamponada al 10 %. Se recogerán fragmentos adicionales para el análisis del título del virus mediante el ensayo de placa. Los tejidos fijos serán embebidos en parafina, cortados en 3 micrómetros, teñidos con hematoxilina y eosina (H&E), examinados mediante microscopía óptica y calificados con ocultación. Si los resultados de H&E lo sugieren, los tejidos se someterán a inmunotinción con mAb específicos del virus o específicos de los linfocitos (por ejemplo, CD4, CD8, linfocitos B) y se calificarán en cuanto al nivel de expresión del antígeno del virus y/o la infiltración de los linfocitos.
- Los lavados nasales también se analizarán en busca de respuestas de anticuerpos de la mucosa usando un ELISA de IgA específico de G. También se recogerán el y la sangre completa los días 0, 7, 14 y 21 para medir las respuestas de anticuerpos y/o las respuestas inmunitarias mediadas por células. El resto de perros (4 de cada grupo) se expondrá a la rabia el día 21 después de la inmunización.
- Inmunidad local. Los sitios de inducción de respuestas inmunitarias pueden alterar la naturaleza de la respuesta inmunitaria e impactar drásticamente en la eficacia protectora. Se ha demostrado que la inmunización de la mucosa induce una respuesta de IgA e IgG de la mucosa específica de la gripe que protege contra la exposición tanto coincidente y heterosubtípica. La inmunización con PIV5 intranasal tiene el potencial de inducir respuestas locales de inmunoglobulina y linfocitos T específicos de la rabia que median la protección contra la exposición a la rabia. Las respuestas inmunitarias locales (es decir, las de los pulmones) específicas de PIV5 y las específicas de la rabia se evaluarán mediante el análisis de lavados nasales y de pulmones (en los días de eutanasia). Se recogerán por centrifugación poblaciones de linfocitos infiltrantes y el lavado de BAL se analizará en busca de Ig en la mucosa.
- Análisis de la inmunidad mediada por células (linfocitos T) se medirán las respuestas de los linfocitos T inducidas por la vacunación y los cambios en las respuestas de los linfocitos T tras la exposición mediante la producción de IFN específicos del antígeno. Específicamente, se analizarán los linfocitos de sangre periférica, BAL, el bazo y/o el ganglio linfático drenante para determinar las respuestas de los linfocitos T específicos de la rabia mediante la reestimulación con virus de la rabia inactivado. Se determinarán las respuestas de IFN- γ mediante la tinción intracelular de citocinas, ensayos ELISA y/o ELISPOT.
- Análisis de inmunidad humoral (anticuerpos) Se medirán las respuestas inmunitarias humorales específicas de la rabia en el suero, el lavado nasal y el lavado BAL mediante un ensayo de ELISA convencional usando el virus de la rabia purificado como antígenos unidos a la placa. Tanto la IgA como la IgG se evaluarán usando anticuerpos específicos del isotipo de los perros. Los títulos de anticuerpos específicos de G también se medirán mediante el ensayo de microneutralización del virus. Todas las muestras de suero y de lavado BAL se compararán con las muestras preinmunes e inmunizadas de forma simulada correspondientes.
- Se probará la estabilidad del PIV5-G recombinante tanto en cultivos celulares como en perros. En el cultivo celular, el virus se pasará en serie en células Vero durante al menos veinte pasadas. El virus se recogerá en cada pasada y se almacenará a -80 °C. En perros, el virus se pasará en serie durante diez pasadas por vía oral. Se aislarán virus de la cavidad bucal cada dos días durante 6 días. Los virus recogidos o aislados se usarán para la RT-PCR del gen G insertado para asegurarse de que el transgén aún se encuentre en el genoma del virus recombinante. El lavado nasal se usará para obtener ARN vírico para la secuenciación directa de RT-PCR en caso de que no haya suficiente virus en los lavados nasales para aislar virus vivos.
- Examen de la eficacia de PIV5-G contra la exposición a la rabia. Los experimentos de exposición se realizarán en la contención de BSL3AG+. Perros inmunizados como se ha explicado anteriormente, se inocularán IC con DL₅₀ intracerebral para ratones de 500 (MICLD₅₀) de un virus de la rabia callejera aislado de un perro mexicano. Los perros serán controlados para determinar los síntomas clínicos incluyendo actividad, pérdida de peso y temperatura corporal (uso de implantes de microchip) y supervivencia durante 45 días. En el día 14, los animales supervivientes se sangrarán para analizar el anticuerpo sérico específico de la rabia. El día 45 después de la exposición, se sacrificarán los perros y se extraerán tejidos de los perros. Además de los estudios patológicos de rutina, se determinará si existe algún virus de la rabia en el cerebro de los perros.
- Una sola inyección del virus de la rabia en perros produjo la muerte en el transcurso de 14 días. Por lo tanto, los perros serán observados durante 45 días después de la exposición para ahorrar costes. Dado que esta vacuna candidata superó a SAG-2, una vacuna comercial contra la rabia (viva atenuada), en ratones, se espera que esta vacuna también funcione mejor que SAG-2 en perros. Dado que la inoculación por vía IN e IM proporcionó una protección del 100 por cien contra una exposición muy potente a la rabia en ratones, se espera que la inoculación por vía IN e IM de los perros conduzca a una excelente protección. Sin embargo, para la inoculación oral, es posible que la protección sea menos ideal (inferior al 50 %), incluso mejor que SAG-2. Si este es el caso, se evaluarán los candidatos más nuevos de los objetivos específicos dos y tres.
- Mejora de la eficacia de PIV5 recombinante que expresa G. El sitio de inserción del antígeno dentro del genoma de PIV5 afectó a la inmunogenicidad de la vacuna candidata en animales. Que el modelo base, que contiene el genoma de PIV5 de tipo silvestre con la inserción de genes foráneos en la unión de HN y L, funcionara bien es alentador. Se ha insertado el gen G del virus de la rabia entre los genes HN y L. Aunque rPIV5-G protegió al 100 por cien con la

inoculación de una sola dosis de 10^6 ufp, el 100 % de protección por vía IM requirió 10^8 ufp y la inoculación oral de 10^8 ufp solo protegió al 50 % de los ratones (véase Ejemplo 4). El aumento de la eficacia para la administración de por vía IN e IM reducirá la cantidad de virus necesarios para una vacunación eficaz, por lo tanto, reduciendo el coste de la vacunación por vía IN e IM. El aumento de la eficacia de la inoculación oral mejorará la aplicabilidad de las vacunas candidatas en animales silvestres. Se insertará G en otras ubicaciones dentro del genoma de PIV5 y se probará su eficacia en ratones y perros. Las modificaciones realizadas en PIV5 pueden mejorar las respuestas inmunitarias a los antígenos, y el genoma de PIV5 se modificará para obtener la máxima inmunidad frente a la proteína G.

Expresión de G entre SH y HN. Se sabe que la inserción de HA entre SH y HN dio la mejor inmunidad contra el H5N1. Se generará un PIV5 recombinante que expresa G en la misma ubicación (Fig. 48) (rPIV5-G-SH/HN) y se probará su eficacia en ratones y en perros. Expresión de G en PIV5 que carece de SH. Se sabe que la eliminación de SH dio lugar a un aumento de la inmunidad contra el gen foráneo. SH será reemplazado por G, lo que resulta en la eliminación de SH, así como la colocación del gen G cadena arriba de HN (Fig. 48), y el virus se analizará en células de cultivo de tejidos, se examinará su inmunogenicidad en ratones y se probará su eficacia en ratones y perros.

Incorporación de mutaciones que inducen la expresión de IFN y bloquean la señalización de IFN. Se sabe que la activación de respuestas inmunitarias innatas tales como la expresión de IFN mejora las respuestas inmunitarias adaptativas. Para los virus vivos atenuados, esta es una espada de doble filo. Si bien muchos virus vivos pueden inducir una expresión potente de IFN, esta inducción de IFN inhibirá, a su vez, la replicación del virus vivo. En el caso de PIV5 Δ C, el virus induce mayores niveles de expresión de IFN e IL-6 debido a la falta del V que inhibe la producción de IFN, así como la señalización de IFN. Será ideal un virus que permita la inducción de la producción de IFN y siga manteniendo su capacidad de bloquear la señalización de IFN para permitir su replicación eficaz. Se han identificado restos en las proteínas PIV5 que son capaces de mejorar la expresión génica vírica e inducir la expresión de citocinas tales como el interferón de tipo I (Sun *et al.*, 2009, *PLoS Pathog*; 5(7):e1000525). El resto de S157 de la proteína P de PIV5 es un sitio de unión para la quinasa PLK1 del hospedador, y el resto S308 de la proteína P de PIV5 es un sitio de fosforilación de PLK1. La mutación de S157 o S308 en el resto de aminoácido A da lugar a un virus que aumenta la expresión del gen vírico, así como la inducción de la expresión del interferón. Lo que es más importante, el virus sigue expresando una proteína V que bloquea la señalización de IFN. Se generará PIV5 recombinante que expresa G o N (Fig. 48), y se examinarán su inmunogenicidad y eficacia contra la exposición a la rabia en ratones y en perros. Se usará G para probar el efecto de P-S308A en la respuesta de los anticuerpos y se usará N para probar el efecto de P-S308A en la respuesta mediada por células. Las mutaciones de P-S308A y Δ SH se combinarán si P-S308A es eficaz para provocar respuestas inmunitarias más potentes contra los antígenos del virus de la rabia. Estos virus recombinantes se probarán en ratones y en perros como se ha descrito anteriormente por su seguridad e inmunogenicidad.

La eficacia de estas vacunas candidatas se probará primero en ratones. Se probarán en perros aquellas que brinden mejor protección que rPIV5-G. Para ser considerado mejor que rPIV5-G en ratones, la vacuna candidata tendrá una tasa de protección del 100 por cien por vía IN e IM con una dosis más baja que rPIV5-G, y/o mejor que la tasa de protección del 50 por cien obtenida a través de la inoculación oral.

Prueba de inmunidad de otras proteínas víricas de la rabia. Aunque G es suficiente para generar inmunidad protectora contra la exposición a la rabia, la proteína N vírica de la rabia también es conocida por generar inmunidad protectora. Para mejorar aún más la eficacia de las vacunas candidatas contra la rabia basadas en PIV5, se construirá y se probará un PIV5 recombinante que expresará proteínas víricas de la rabia adicionales tales como N y M (Fig. 48). Se sabe que M es fundamental para el ensamblaje y la gemación del virus. Si G, N y M se pueden expresar todos juntos, se generará una partícula de tipo virus (VLP) del virus de la rabia en células infectadas con rPIV5-G-N-M.

Generación y prueba de PIV5 recombinante que expresa N. Se sabe que el N de la rabia es inmunogénico y que la inmunidad puede ser protectora. En primer lugar, se insertará N entre HN y L de PIV5, ya que la unión entre HN y L es la más alejada de la secuencia líder y, por tanto, el que es menos probable que tenga un efecto perjudicial en la replicación de PIV5. Luego, se moverá N a la unión entre SH y HN como en ZL46 (Fig. 48). La eficacia de estas vacunas candidatas se probará en ratones primero por sí mismos y en combinación con rPIV5-G. Si la combinación de rPIV5-N y rPIV5-G proporciona alguna protección en comparación con rPIV5-G solo, se probará en perros.

Generación y prueba de PIV5 recombinante que expresa M. Los vectores víricos que expresan NA y NP no tuvieron éxito en el desarrollo de la vacuna contra el virus de la gripe, lo que conduce a la hipótesis de que NA y NP no eran antígenos ideales para el enfoque de vacuna basada en vectores víricos. Sin embargo, NA y NP son antígenos capaces cuando se expresan desde PIV5. Por lo tanto, e puede usar PIV5 para generar inmunidad hacia los antígenos que antes no eran buenos antígenos. No se ha probado el efecto de M en la inmunidad contra la rabia. El potencial de M como antígeno se probará en una vacuna basada en PIV5. Como N M se insertará entre HN y L, y luego otro PIV5 recombinante que exprese M entre SH y HN (Fig. 48). La eficacia de estas vacunas candidatas se probará en ratones primero por sí mismos y en combinación con rPIV5-G. Si la combinación de rPIV5-M y rPIV5-G proporciona mejor protección en comparación con rPIV5-G solo, se probará en perros. Las eficacias de la combinación de rPIV5-G, rPIV5-N y rPIV5-M se probarán en ratones, luego en los perros. Generación y prueba de PIV5 recombinante que expresa G y N y/o M. Se generará PIV5 recombinante que expresa G y N (Fig. 48). Se insertará M si sPIV5-M proporciona inmunidad contra la exposición a la rabia (Fig. 48).

Ejemplo 11

PIV5 como Vacuna contra la tuberculosis bacteriana

Mycobacterium tuberculosis (Mtb), el agente etiológico de la tuberculosis (TB), es un patógeno bacteriano intracelular que mata a aproximadamente 1,4 millones de personas cada año y que ha infectado a un tercio de la población mundial. Los resultados de más de un siglo de investigación y uso clínico han demostrado que las vacunas vivas ofrecen la mejor protección contra las infecciones por aerosoles con Mtb. La vacuna más administrada que se usa hoy en día es BCG, que es una variante atenuada vida de *Mycobacterium bovis*, Una especie estrechamente relacionada que causa tuberculosis en los rumiantes. La vacuna BCG se administra por vía subcutánea al nacer en la mayoría de los países del mundo, Pero la protección es variable y se desvanece con la adolescencia. La administración de BCG a un individuo inmunodeprimido puede diseminarse y conducir a una infección grave potencialmente mortal. Este riesgo de seguridad inherente permanece en las vacunas BCG de segunda generación modificadas para expresar antígenos de Mtb y/o factores que imbuyen a las bacterias con una mayor supervivencia dentro de las células hospedadoras. Además, las respuestas inmunitarias a la vacunación con BCG reaccionan de forma cruzada con la prueba cutánea de la tuberculina. la prueba de la TB más usada en el mundo. haciendo que los resultados sean poco fiables. Por estas razones, los Servicios de Salud Pública de Estados Unidos y Canadá no recomiendan el uso de la vacuna BCG. Por lo tanto, existe la necesidad de una vacuna contra la TB segura y más eficaz. Este ejemplo desarrollará una nueva vacuna contra la tuberculosis basada en el virus paragripal 5 (PIV5).

PIV5 se probará como una vacuna para Mtb. Dado que PIV5 es un virus respiratorio, puede proporcionar una inmunidad localizada superior contra Mtb (un patógeno respiratorio) que otros vectores víricos tales como el virus vaccinia, que se introduce por vía parenteral. Este ejemplo también será el primer uso de PIV5 para expresar antígenos bacterianos.

Este ejemplo incluye los siguientes objetivos. Uno, generar y analizar PIV5 recombinante que exprese los antígenos de Mtb 85A (rPIV5PIV5-85A) y 85B (rPIV5PIV5-85B). PIV5 es un virus de ARN de cadena negativa. Manipular su genoma directamente es imposible. Por lo tanto, se desarrolló un sistema de genética inversa en el que se clonó el ADNc de su genoma de ARN completo, haciendo que el genoma del ARN se pudiera manipular. Este sistema se ha usado para generar PIV5 infeccioso que expresa una variedad de genes foráneos, incluyendo los genes HA de los virus de la gripe. En este objetivo, se generarán y se confirmarán virus recombinantes que expresen antígenos de Mtb, y se examinarán los perfiles de seguridad de estos virus recombinantes en el modelo de ratones. Dos, Evaluar la inmunogenicidad y eficacia de los virus recombinantes *in vivo*. Se examinará la inmunogenicidad de los virus recombinantes en ratones vacunados. La eficacia protectora de los virus que generan respuestas inmunitarias potentes en ratones se evaluará mediante la exposición a aerosol de Mtb. El modelo de infección murina en aerosol se acepta como un modelo de ensayo de primera línea para determinar la potencia, la seguridad, la capacidad de respuesta inmunitaria y la eficacia de la nueva vacuna antes de los ensayos posteriores en cobayas y/o primates no humanos.

La vacuna BCG, que es una versión atenuada de *M. bovis* desarrollada hace casi un siglo, se usa habitualmente para vacunar a los recién nacidos contra la tuberculosis (TB). Las agencias de salud pública de todo el mundo la aceptan como relativamente segura y fácil de obtenerse en la mayoría de los países. La inmunización con BCG parece ser más útil en bebés y en niños pequeños, reduciendo la incidencia de formas diseminadas graves de tuberculosis. Los ensayos controlados, sin embargo, han establecido que BCG ofrece niveles variables de protección contra las formas pulmonares más frecuentes de la enfermedad en adultos. Además, la vacunación con BCG parece tener la menor eficacia en las regiones del mundo más afectadas por la TB, y no ha tenido un impacto evidente en la epidemia mundial de TB. El número estimado de casos nuevos de TB y la incidencia per cápita en todo el mundo siguen aumentando cada año. Aunque la incidencia de la tuberculosis en Estados Unidos ya no está aumentando, la enfermedad sigue siendo un problema importante en poblaciones inmunodeprimidas y en muchas ciudades, en especial, entre los inmigrantes. En EE.UU, como en otros lugares, la diseminación de cepas multirresistentes de *M. tuberculosis* (Mtb) amenaza la eficacia de los esfuerzos actuales de control de la TB. La mejor esperanza para poner bajo control la epidemia mundial de TB es el desarrollo de una nueva vacuna eficaz contra la tuberculosis. Debido a esta necesidad urgente, se está realizando un esfuerzo de investigación global y se está examinando una gran cantidad de vacunas candidatas. Varias vacunas candidatas, incluyendo un BCG recombinante que sobreexpresa el antígeno 85B (Ag85B), un virus de vaccinia modificado que sobreexpresa Ag85A (MVA-85A), un péptido de fusión que abarca otros dos antígenos (denominado 72f) combinado con un adyuvante, otra proteína de fusión con adyuvante que contiene Ag85B y ESAT-6 y un BCG recombinante que expresa listeriolisina O de *Listeria monocytogenes* - están en ensayos clínicos de fase I o fase II. De los tres tipos generales de vacunas: vacuna viva atenuada, vacuna muerta o "subunidad" y vacunas de ADN, se cree que las vacunas vivas aportan la protección más fuerte y duradera contra la TB, siempre que sean fiables para todos los destinatarios, incluyendo los inmunodeprimidos.

Los componentes proteicos secretados del complejo de antígeno 85 (Ag85A y Ag85B) son algunos de los antígenos Mtb más comúnmente probados para los diversos sistemas de administración de vacunas contra la TB. Estas proteínas se expresan infectando los bacilos de Mtb en el transcurso de la infección natural en seres humanos y animales induciendo respuestas inmunitarias tanto humores como mediadas por células (CD4 y CD8), y en modelos animales cuando se administran como una vacuna previa a la infección. Se ha demostrado que las diversas construcciones de

vacunas que expresan estos antígenos proporcionan niveles de protección en ratones, cobayas y monos cuando se administran por vía parenteral y en aerosol. Una vacuna candidata en particular, un virus Vaccinia modificado recombinante vivo Ankara (MVA) que expresa Ag85A (MVA.85A) ha mostrado una protección significativa cuando se administra después de la vacunación con BCG en modelos de pequeños vertebrados. Mejora la vacuna y las respuestas generadas de forma natural en seres humanos, y actualmente se encuentra en evaluación clínica de Fase 2. En estos estudios, se demostró que la inmunización pulmonar aprovecha la ubicación y la capacidad para atacar a las células presentadoras de antígenos (principalmente macrófagos alveolares) en los pulmones envolviendo el vehículo de administración de la vacuna. Asimismo, las construcciones de vacunas de este ejemplo se examinarán para determinar su capacidad para expresar Ag85A y Ag85B, y se administrarán a los animales de prueba mediante inoculación en aerosol.

Diseño experimental

Generación y análisis de PIV5 que expresa Ag85A o Ag85B (PIV5-85A u 85B). Se generará PIV5 recombinante que exprese Mtb Ag85A o Ag85B (PIV5-85A y PIV5-85B), y se analizarán las características de crecimiento del virus y la seguridad *in vitro* e *in vivo*.

Generación de PIV5 recombinante que expresa Ag85A o Ag85B y análisis de los virus *in vitro*. La inserción del gen H5 del virus de la gripe entre los genes HN y L de PIV5 (PIV5-H5) proporcionó inmunidad de esterilización contra la exposición letal a H5N1 en ratones (Ejemplo 3). Para generar PIV5 recombinante que exprese Mtb Ag85A y Ag85B, los genes se sintetizarán con el uso de optimización de codones para células humanas empleando un proveedor comercial (Genscript). El gen Mtb se combinará con el extremo del gen (GE), la región intergénica (I) y inicio del gen (GS), que son importantes para la síntesis de ARNm vírico de PIV5. Las secuencias se insertarán entre los genes HN y L. Los PIV5-85A y PIV5-85B se recuperarán, se confirmarán y se analizarán. Se secuenciará todo el genoma de los virus recombinantes para confirmar que coinciden con las secuencias de ADNc de entrada. Cinética de crecimiento de los virus. Se examinarán los niveles de expresión de proteínas víricas y los niveles de expresión de Ag85A y Ag85B en células infectadas, así como los niveles secretados en los sobrenadantes de cultivo.

Examen de la seguridad de PIV5-85A u 85B. Se cultivarán reservas de alto título de virus de vacunas candidatas en células Vero se tomarán alícuotas y se almacenarán a -80 °C para su uso en todos los estudios *in vivo*. Se confirmarán los títulos víricos después de la dilución mediante un ensayo de placa antes del almacenamiento y, en el momento de la inmunización, el PIV5 infecta muchos tipos de células, porque HN del PIV5 se une a los restos de ácido siálico en la superficie celular. Para investigar si PIV5-85A u 85B ha expandido el tropismo más allá de PIV5, se comparará la distribución de PIV5-85A u 85B en ratones atímicos con PIV5. Los ratones atímicos serán inyectados con 10^7 ufp de PIV5-85A, 85B, virus de control PIV5 en 200 µl de PBS o PBS solo a través de la vena de la cola. Los pesos de los ratones se controlarán diariamente durante los primeros siete días y luego cada tres días durante dos semanas. Cuatro ratones de cada grupo serán sacrificados a los 0, 3, 7 y 14 días después de la inoculación. Se extraerán la mitad del cerebro, el pulmón, el hígado, el bazo, el corazón y el riñón, se fijarán y se procesarán para la tinción H&E y se calificarán patológicamente como se ha explicado anteriormente. La mitad de los órganos se procesarán para la tinción inmunohistoquímica con anticuerpos PIV5.

Además, los ratones de tipo silvestre se inocularán por vía intranasal (IN) con 10^6 ufp de virus parental PIV5 (PIV5), PIV5-85A u 85B, o PBS. Los animales inmunizados serán controlados para detectar cualquier signo de síntomas clínicos (es decir, pérdida de peso, pelaje erizado, etc.). Además, se examinarán los títulos víricos pulmonares y la patología pulmonar para confirmar que los diversos virus recombinantes mantengan su capacidad para infectar al hospedador y no causan patología pulmonar. Para los estudios de patología, Los pulmones se perfundirán con formalina tamponada al 10 % a través de la tráquea y se colocarán en formalina para la fijación. Los lóbulos pulmonares se embeberán en parafina, se cortarán en 5 micrómetros, se teñirán con hematoxilina y eosina (H&E) y se examinarán mediante microscopía óptica. Para cada muestra, se puntuarán subjetivamente cuatro cambios pulmonares principales (infiltraciones peribroncolares; infiltraciones perivasculares; infiltraciones parenquimales; infiltraciones subpleurales) sin el conocimiento de los grupos de tratamiento de la siguiente manera: 0-3 con 0 = sin cambio y 3 = el mayor cambio y una puntuación total determinada. Si los resultados de H&E muestran una inflamación significativa, los tejidos se someterán a inmunotinción con mA b específicos del virus o específicos de los linfocitos (por ejemplo, CD4, CD8, linfocitos B) y se calificarán en cuanto al nivel de expresión del antígeno del virus y/o la infiltración de los linfocitos.

Evaluación de la inmunogenicidad y eficacia de los virus recombinantes *in vivo*. Este estudio de exposición está diseñado para comparar el logaritmo de ufp de bacilos de Mtb en los pulmones y bazos de los grupos vacunados con los del grupo no vacunado (control), determinado mediante un análisis de varianza de una vía. Se usará BCG como control positivo para la comparación. La vacuna eficaz reducirá la cantidad de ufc de bacilos de Mtb en los pulmones y bazos a las 4 y 8 semanas después de la exposición.

Examen de la inmunogenicidad de PIV5-85A o PIV5-85B. Se medirán las respuestas inmunitarias específicas de PIV5 y Mtb Ag85A o Ag85B en ratones inmunizados con PIV5-85A o PIV5-85B usando una variedad de criterios de valoración. Como controles, los ratones serán inmunizados por vía intranasal con 10^6 ufp de cualquiera de las cepas de la vacuna PIV5 o por vía subcutánea con 10^5 ufc de la cepa danesa de BCB *M. bovis* (Statens Serum Institut,

Copenhague; SSI). Se adquirirán alícuotas congeladas de *M. bovis*, la cepa danesa de BCG, en SSI. La BCG danesa de estas alícuotas se ha cultivado según especificaciones internacionales precisas, tomándose alícuotas y determinándose la viabilidad antes del envío. El número requerido de alícuotas se descongelará inmediatamente antes de la vacunación. En varios puntos de tiempo después de la inmunización, se medirá la inmunidad local y sistémica hacia PIV5 y Ag85A o Ag85B. Se ha demostrado que la inmunización de la mucosa induce una respuesta de IgA e IgG de la mucosa específica de Mtb. Por lo tanto, La inmunización con PIV5 intranasal tiene el potencial de inducir respuestas locales de inmunoglobulina y linfocitos T específicos de Mtb que median la protección contra la exposición a Mtb. Las respuestas inmunes locales (es decir, las de los pulmones) específicas de PIV5 y las específicas de Mtb se evaluarán mediante el análisis de las muestras de BAL recogidas en puntos de tiempo después de la inmunización o el exposición. Se recogerán por centrifugación poblaciones de linfocitos infiltrantes y el lavado de BAL se analizará en busca de inmunoglobulinas en la mucosa. Las respuestas sistémicas se evaluarán mediante el análisis de las poblaciones de anticuerpos séricos y de linfocitos esplénicos o mediastínicos (MLN).

Análisis de la inmunidad mediada por células (linfocitos T). se medirán las respuestas de los linfocitos T inducidas por la vacunación y los cambios en las respuestas de los linfocitos T tras la exposición mediante la producción de IFN específicos del antígeno. Específicamente, se analizarán los linfocitos del BAL, bazo y/o ganglio linfático drenante para determinar las respuestas de los linfocitos T específicos de PIV5 o Mtb mediante la reestimulación con PIV5. proteínas Ag85A o Ag85B de Mtb, o PPD. Se determinarán las respuestas de IFN- γ mediante tinción intracelular de citocinas y/o ensayos ELISPOT. Otros investigadores demostraron que se pueden usar los ensayos ELISPOT productores de IFN γ en ratones inmunizados con la vacuna experimental MVA85A (ahora en ensayos clínicos de Fase II) como prueba de potencia de la vacuna (NIH/FDA TB Vaccine Workshop).

Análisis de inmunidad humoral (anticuerpos). Aunque no se sabe que el anticuerpo desempeñe un papel fundamental en la inmunidad de Mtb, se examinará la inmunidad humoral después de la vacunación con PIV5-85A y PIV5-85B. PIV5 es un nuevo vector vacunal para Mtb. Es posible que PIV5-85A y PIV5-85B utilicen un mecanismo de protección diferente y/o adicional. Para los estudios de inmunidad humoral, se recogerán muestras de suero normales coincidentes de ratones 1 semana antes de la inmunización con un corte en la vena de la cola. Los anticuerpos anti-PIV5 del suero y del lavado de BAL se medirán mediante ELISA específico de PIV5. Asimismo, las respuestas inmunitarias humorales específicas de Mtb Ag85A o Ag85B se medirán mediante un ensayo de ELISA convencional usando Ag85A recombinante u 85B como antígenos unidos a la placa. En los ensayos de ELISA, también se determinarán los isotipos (IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) de los anticuerpos usando anticuerpos secundarios apropiados. Todas las muestras de suero y lavado BAL se compararán con la muestra preinmune correspondiente.

Examen de la eficacia de PIV5-85A/PIV5-85B en un modelo de exposición de ratón. Se expondrán ratones vacunados con PIV5-85A y PIV5-85B por vía intranasal, BCG por vía subcutánea y no vacunados (grupos de 20) a 50-100 ufc de Mtb, y los animales se controlarán hasta 8 semanas. La cepa virulenta de Mtb Erdman fue almacenada por la FDA en 2005 y está disponible para los investigadores. El número requerido de alícuotas se descongelará inmediatamente antes de la exposición. Todos los ratones se expondrán a Mtb Erdman usando una cámara de aerosol Madison. Antes de la infección, se dispondrán cultivos unicelulares de Mtb en el recipiente del nebulizador de la cámara de aerosol con el ciclo de exposición preestablecido para administrar la dosis de infección adecuada. Después del período de exposición cronometrado, se purgará la cámara de infección con aire limpio y filtrado, y los grupos de ratones se devolverán a sus jaulas. Durante cada ciclo de infección, se tomará una muestra de la corriente de aire portadora de bacilos Mtb en aerosol en un borboteador de vidrio que contendrá solución salina tamponada con fosfato (PBS) para calcular la dosis infectiva real (ufc) administrada a cada grupo. Se inocularán 100 μ l de PBS de cada borboteador (sin diluir, diluciones de 1 en 10, 1 en 100 y 1 en 1000 en PBS) por cuadruplicado en placas de agar 7H11-OADC y se incubarán a una temperatura de 37 °C hasta las 6 semanas. Además, cada vez se utiliza una cámara de aerosol de Madison para la exposición, se sacrificarán 5 ratones no vacunados el día después de la exposición para confirmar que la dosis de exposición real de Mtb sea de 50 a 100 ufc en los pulmones. Se determinarán curvas de supervivencia de los animales para cada grupo hasta las 8 semanas, y se evaluará la patología tisular/carga bacteriana a las 4 y 8 semanas después de la exposición. Todos los ratones, independientemente de la vía de vacunación serán controlados diariamente durante la primera semana para detectar malestar; también se medirá la temperatura corporal durante la primera semana de infección. Todos los ratones se pesarán semanalmente para detectar anorexia u otras reacciones adversas que puedan afectar al peso. A los ratones inyectados con BCG subcutáneo se les examinarán los sitios de inyección al principio diariamente y luego semanalmente. Se usará un sistema de puntuación para controlar la reactogenicidad de la vacuna respiratoria superior con el fin de obtener una puntuación cuantitativa para cada ratón vacunado por vía intranasal. Los elementos del sistema de puntuación serán: Inflamación visible de las fosas nasales externas (0-3), secreción nasal caracterizada como nula, ligeramente serosa, notablemente serosa, ligeramente mucopurulenta o notablemente mucopurulenta (0-4) y frecuencia respiratoria, lo que ha sido validado como un índice que refleja el bloqueo nasal de los ratones (0-3). Se sacrificarán 10 ratones (la mitad del grupo) de cada grupo experimental a las 4 semanas después de la exposición, y la otra mitad se sacrificará a las 8 semanas después de la exposición. Después de la eutanasia, se extraerán tejidos incluyendo pulmones, hígado, bazo y tejidos nasales, y se asignarán a diferentes experimentos. Un veterinario patólogo llevará a cabo estudios generales y de microhistopatología usando un sistema de puntuación definido. El sistema de puntuación descrito anteriormente para las observaciones clínicas y los estudios de patología también se usará para obtener una medición cuantitativa. Cada una de estas medidas se comparará mediante la prueba t de Student para diferencias significativas entre grupos.

Ejemplo 12

Construcciones adicionales de antígeno PIV5

Se han realizado las siguientes construcciones de antígeno PIV5 adicionales que se muestran en las Fig. 49A-49H. Estas incluyen construcciones de PIV5 que expresan los antígenos F y G del VSR (Fig. 49A), construcciones de PIV5 que expresan los antígenos F y G del virus Nipah (Fig. 49B), construcciones de PIV5 que expresan los Antígenos 85A, 85B y ESAT6 de *Micobacterias Tuberculosis* (Fig. 49C), Construcciones de PIV5 que expresan antígenos de PRRSV (Fig. 49D), construcciones de PIV5 que expresan antígenos del circovirus porcino (PCV2) (Fig. 49E), construcciones de PIV5 que expresan el antígeno Ts de *T. Cruzi* (Fig. 49F), construcciones de PIV5 que expresan antígenos de Norovirus (Fig. 49G) y construcciones de PIV5 que expresan antígenos del VIH Env (gp160, gp140 o gp120 y Gag) (Fig. 49H).

Ejemplo 13

Vectores de PIV5 adicionales

Con este ejemplo, se obtuvieron todas las vacunas contra la tos de las perreras disponibles en el mercado, y se secuenciaron estas cepas de PIV5. Se secuenciaron las cepas de PIV5 aisladas de las siguientes vacunas comerciales para la tos de las perreras: Vacunas BI, FD, Merck y Merial. También se secuenciaron dos aislados de PIV5 depositados en la ATCC; la cepa 78-238 del virus paragripal canino (número ATC VR-1573) (Evermann *et al.*, 1980, *J Am Vet Med Assoc*; 177:1132-1134; y Evermann *et al.* 1981, *Arch Virol*; 68: 165-172) y la cepa D008 del virus paragripal canino (número ATC VR-399) (Binn *et al.*, 1967, *Proc Soc Exp Biol Med*; 126: 140-145). Las secuencias de nucleótidos se comparan en la Tabla 2. Esta es la primera comparación de secuencias entre la cepa de laboratorio común (cepa WR) y las cepas de vacuna contra la tos de las perreras y los aislados de tipo silvestre (representados por las dos cepas obtenidas de ATCC).

Tabla 2. Comparación de secuencias de PIV5 (cepa WR) y otras cepas. 78-238 y D008 son cepas de tipo silvestre de la ATCC. BI (Boehringer Ingelheim), FD (Fort Dodge), Merck y Merial son cepas de vacunas aisladas de vacunas comerciales contra la tos de las perreras.

Identidad de la secuencia del genoma (%)							
	PIV5	78-238	D008	BI	FD	Merck	Merial
PIV5		98,0	99,0	99,2	98,9	98,9	99,0
78-238			98,5	98,4	98,3	98,3	98,5
D008				99,3	99,2	99,2	99,9
BI					99,3	99,3	99,3
FD						99,9	99,2
Merck							99,2
Merial							

Las construcciones de PIV5 se generarán y se probarán basándose en las cepas de PIV5 de las vacunas actuales contra la tos de las perreras y los depósitos de la ATCC. Curiosamente, una de las cepas de la vacuna (Merial) es casi idéntica a una de las cepas de tipo silvestre (D008) (99,9 % de identidad de secuencia del genoma), lo que sugiere que es probable que las personas hayan estado expuestas al PIV5 de tipo silvestre mediante la vacunación de sus perros. No obstante, para mitigar la posible preocupación en materia de seguridad, se generarán construcciones de PIV5 recombinantes basadas en cepas de vacuna contra la tos de las perreras. La cepa de la vacuna Merck se usará primero como una base para construcciones de vacunas, porque es la que más se diferencia de la cepa PIV5 de la presente invención (98,9 % de identidad) y ha sido ampliamente usada en perros. Se generará un sistema de genética inversa para la cepa Merck y se insertará H5 o NP en el genoma. Se comparará la inmunogenicidad de PIV5-H5 frente a Merck-H5 y la de PIV5-NP frente a Merck-NP en ratones y en hurones. Otros estudios utilizarán cualquiera de las cepas enumeradas en la Tabla 2 y cualquiera de las construcciones de antígenos de vacunas descritas en el presente documento.

LISTADO LIBRE DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:1, 2, 9 y 10

SEQ ID NO: 3-8

Péptidos sintéticos

Cebadores oligonucleotídicos sintéticos

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> FUNDACIÓN DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE GEORGIA, INC. HE, Biao
 <120> VACUNAS BASADAS EN EL VIRUS PARAGRIPIAL 5
 <130> 235.01960201
- 10 <150> US 61/590. 070
 <151> 24/01/2012
 <150> US 61/683.810 06-08-2012
- 15 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial
- 25 <220>
 <223> péptido H5N1 HA (O) sintético de tipo silvestre
 <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Ser | Pro | Gln | Arg | Glu | Arg | Arg | Arg | Lys | Lys | Arg | Gly | Leu | Phe | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
- 30 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial
- 35 <220>
 péptido H5N1 H5 sintético
 <400> 2
- | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Ser | Pro | Gln | Gly | Leu | Phe | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | |
- 40 <210> 3
 <211> 26
 <212 ADN>
 <213> artificial
- 45 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico sintético>
- 50 <400> 3
 ccagtggaggc ttagctaatt gacctc 26
- 55 <210> 4
 <211> 25
 <212 ADN>
 <213> artificial
- 60 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico sintético

	<400> 4 ggattcccc cgatcctgtt cgtag	25	
5	<210> 5 <211> 51 <212 ADN> <213> artificial		
10	<220> <223> cebador oligonucleotídico sintético		
	<400> 5 aacaagcggc gccgcgcc accatggtcc ctcaggctct cctgttgta c	51	
15	<210> 6 <211> 40 <212 ADN> <213> artificial		
20	<220> <223> cebador oligonucleotídico sintético		
25	<400> 6 aacaagcgcg gccgctcaca gtctggtctc acccccactc	40	
30	<210> 7 <211> 29 <212 ADN> <213> artificial		
	<220> <223> cebador oligonucleotídico sintético		
35	<400> 7 cagattgtcc catttatccg tcagggtgac		
40	<210> 8 <211> 29 <212 ADN> <213> artificial		
	<220> <223> cebador oligonucleotídico sintético		
45	<400> 8 aggtcgatct catttgggag gttccaag		
50	<210> 9 <211> 9 <212> PRT <213> artificial		
	<220> Péptido sintético Flu-NP 147-155		
55	<400> 9		
			Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val
			1 5
60	<210> 10 <211> 9 <212> PRT artificial		
	<220>		

Péptido de ébola GP P2 sintético

<400> 10

5

Glu	Tyr	Leu	Phe	Glu	Val	Asp	Asn	Leu
1				5				

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión vírico que comprende un genoma del virus paragripal 5 (PIV5) que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que expresa un polipéptido heterólogo, en el que la secuencia de nucleótidos heteróloga está insertada entre el gen de la proteína hidrófoba pequeña (SH) y el gen de la hemaglutinina-neuroaminidasa (HN) del genoma de PIV5, y en el que el polipéptido heterólogo comprende una hemaglutinina de la gripe (HA), para su uso en la prevención de la infección de la gripe.
2. El vector de expresión vírico para el uso de la reivindicación 1, en el que la gripe comprende la gripe A, la gripe B o la gripe C.
3. El vector de expresión vírico para el uso de la reivindicación 1, en el que HA de la gripe comprende HA de la cepa del virus de la gripe A de los subtipos H1 a H8.
4. El vector de expresión vírico para el uso de la reivindicación 1, en el que HA de la gripe comprende HA de la cepa H5N1, H3N2 o H1N1 del virus de la gripe A.
5. El vector de expresión vírico para el uso de la reivindicación 1, en el que el vector comprende además una mutación del gen V/P, una mutación del extremo N compartido de las proteínas V y P, una mutación de los restos 26, 32, 33, 50, 102 y/o 157 del extremo N compartido de las proteínas V y P, una mutación que carece del extremo C de la proteína V, una mutación de la proteína de fusión (F), una mutación de la fosfoproteína (P), una mutación de la proteína ARN polimerasa grande (L), una mutación que tiene incorporados restos del virus paragripal canino, una mutación que induce apoptosis o una combinación de las mismas.
6. El vector de expresión vírico para el uso de la reivindicación 1, en el que el genoma de PIV5 contiene una mutación puntual S308G en el resto S308 de la proteína P.
7. Una partícula vírica que comprende un vector de expresión vírico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en la prevención de la infección de la gripe.
8. Una composición que comprende el vector de expresión vírico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la partícula vírica definida en la reivindicación 7 para su uso en la prevención de la infección de la gripe.
9. Un método de expresión *in vitro* de un polipéptido heterólogo en una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula con un vector de expresión vírico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, una partícula vírica como se define en la reivindicación 7 o con una composición como se define en la reivindicación 8.

Figura 1

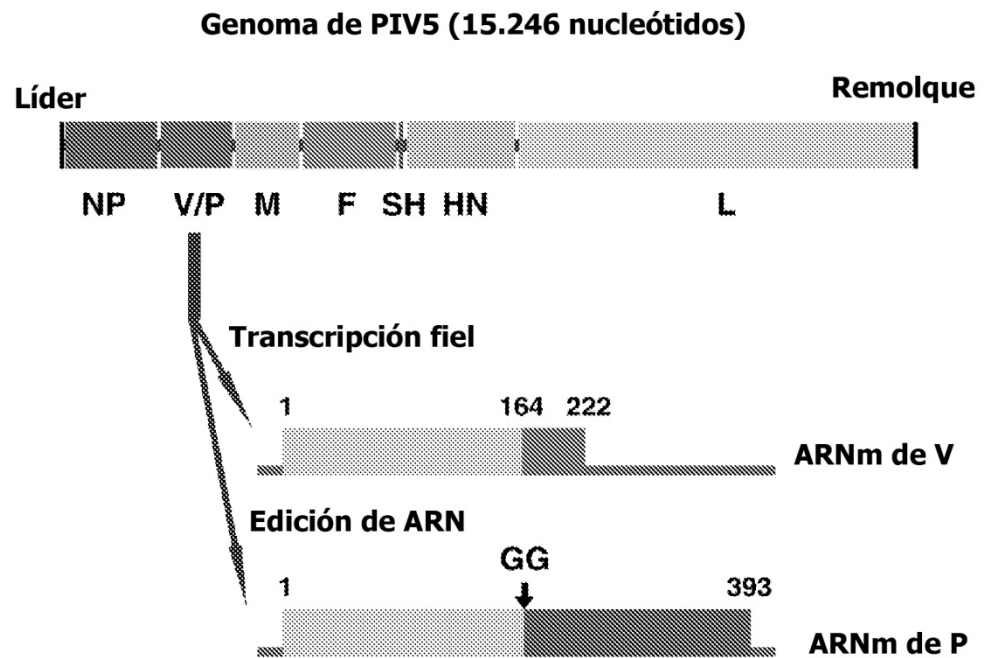


Figura 2A

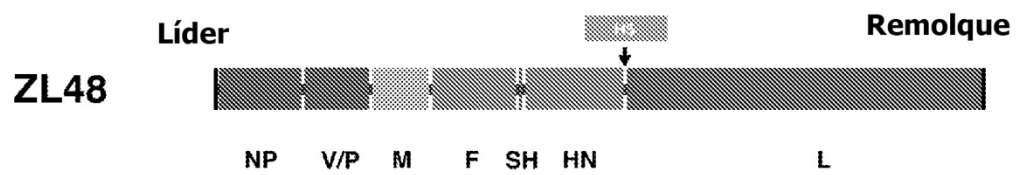


Figura 2B

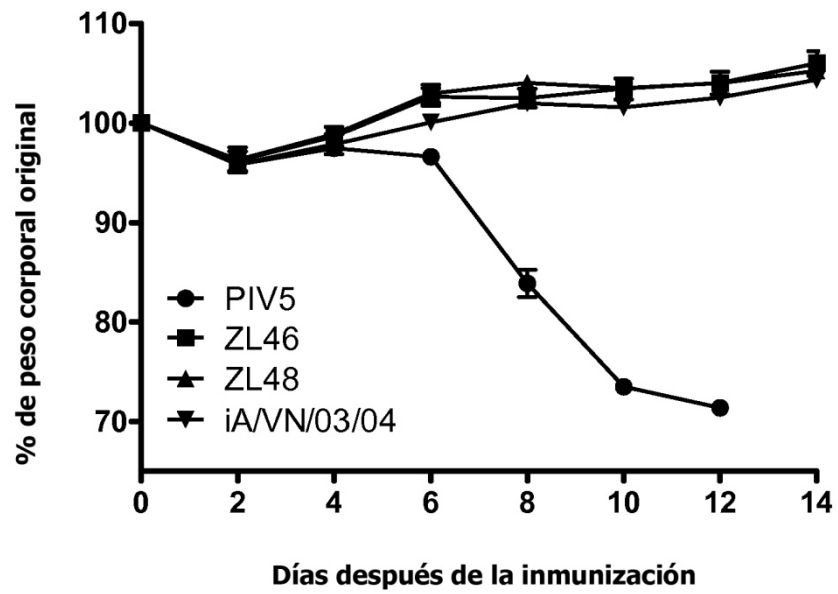


Figura 2C

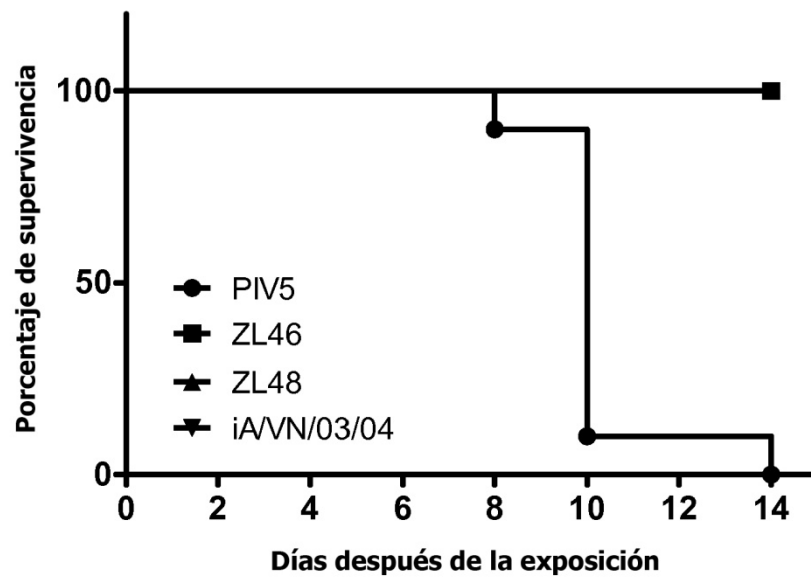


Figura 2D

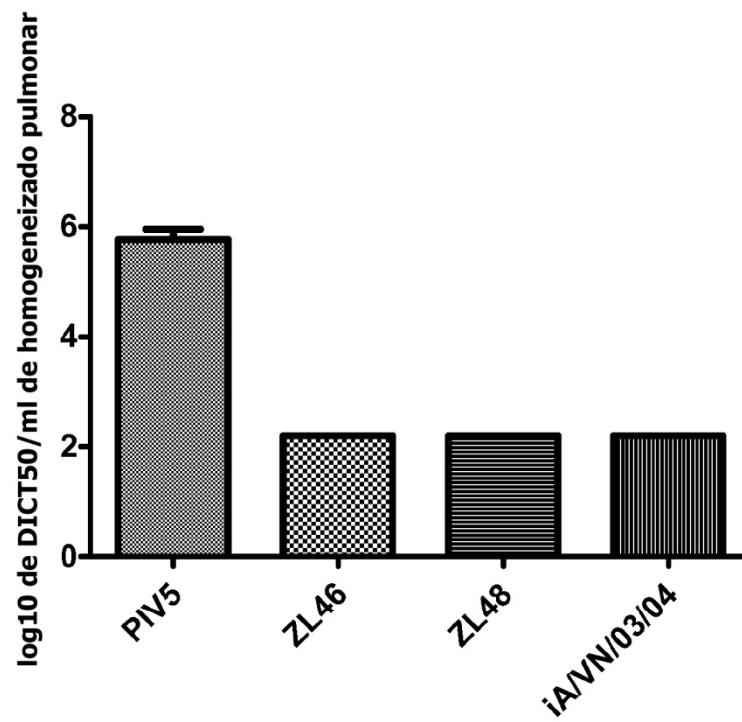


Figura 3A

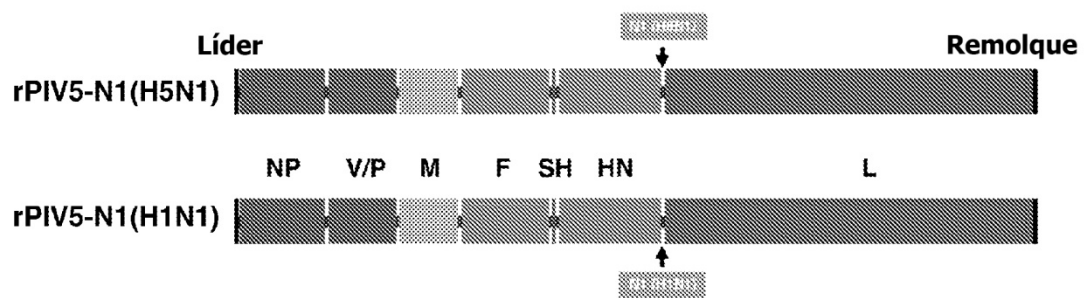


Figura 3B

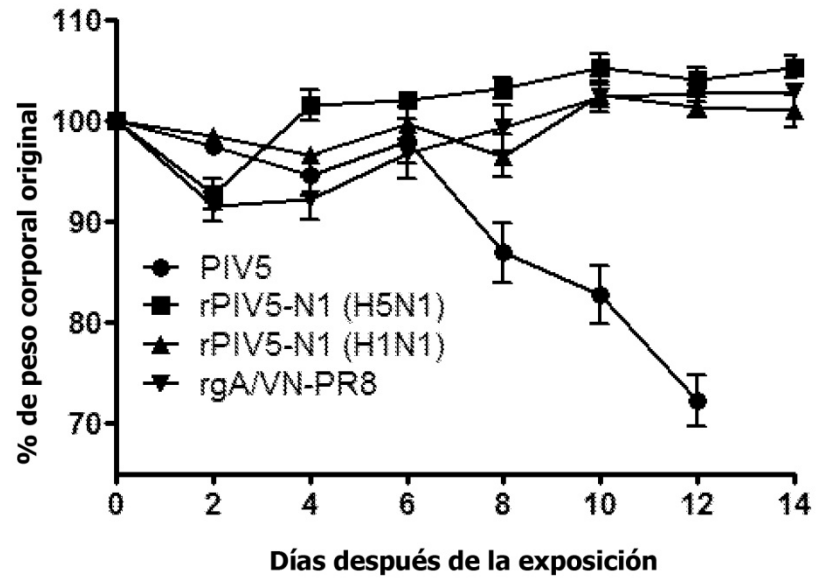


Figura 3C

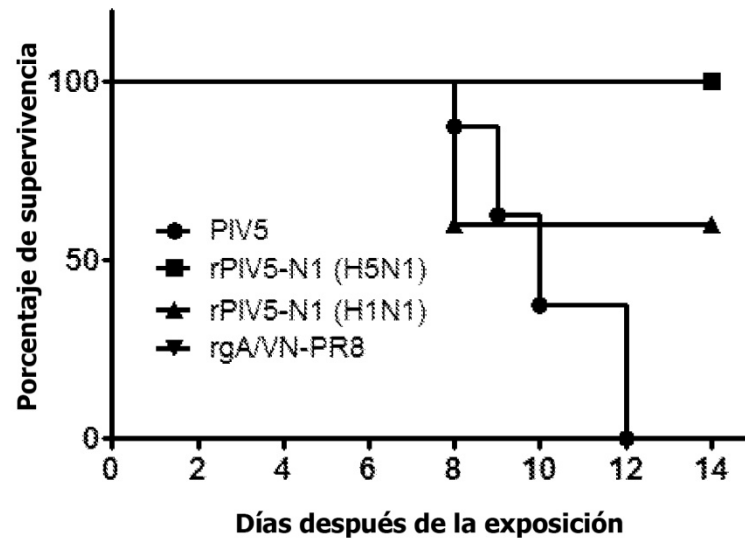


Figura 4A

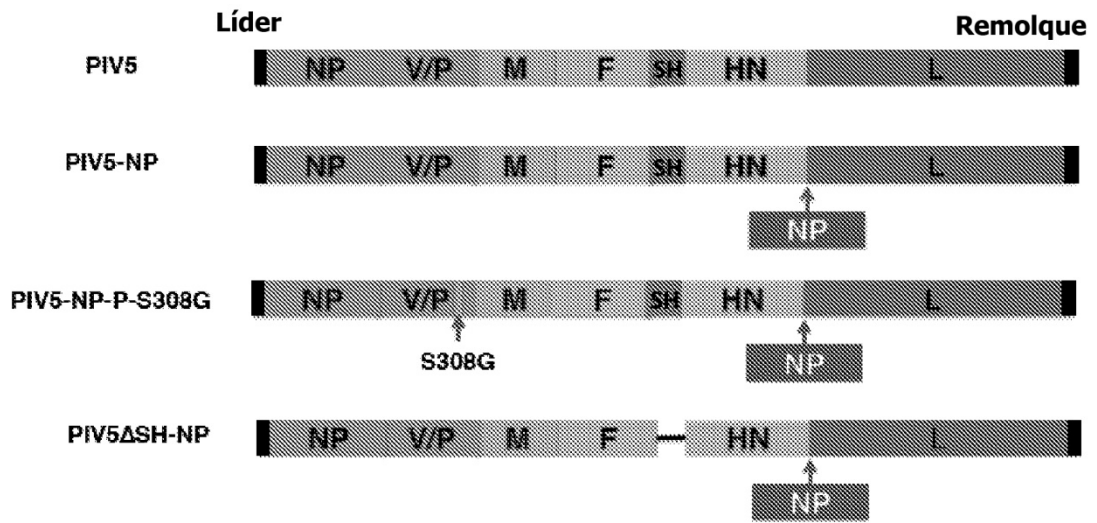


Figura 4B

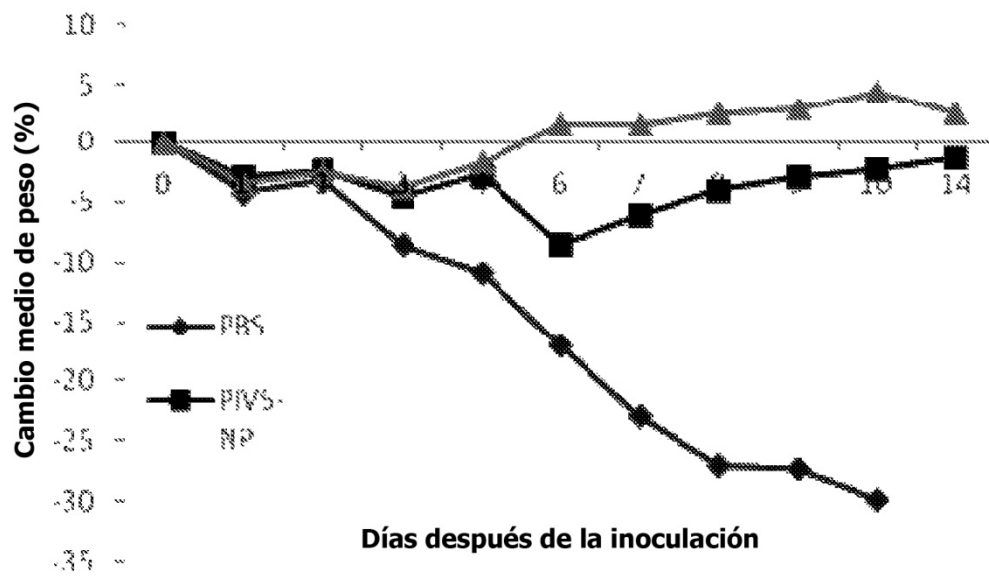


Figura 4C

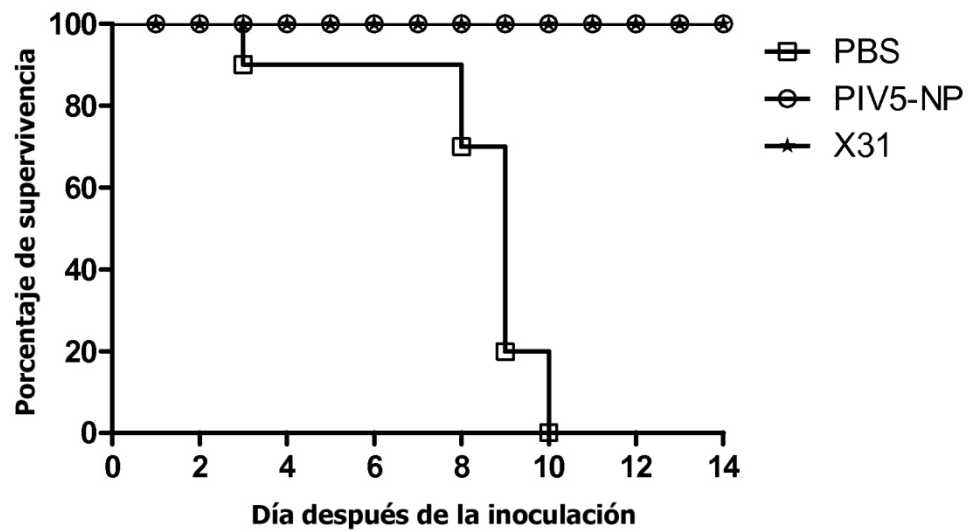


Figura 5

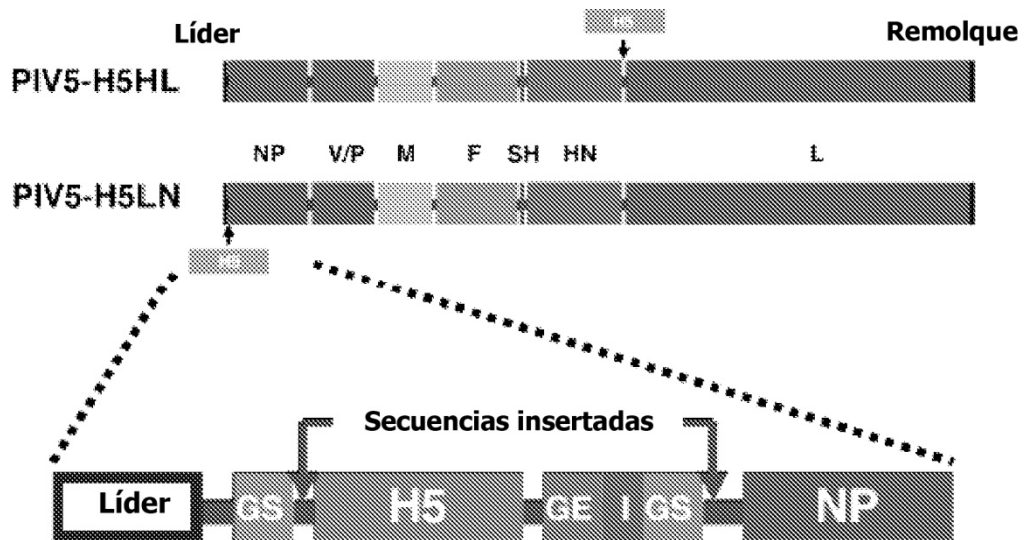


Figura 6A

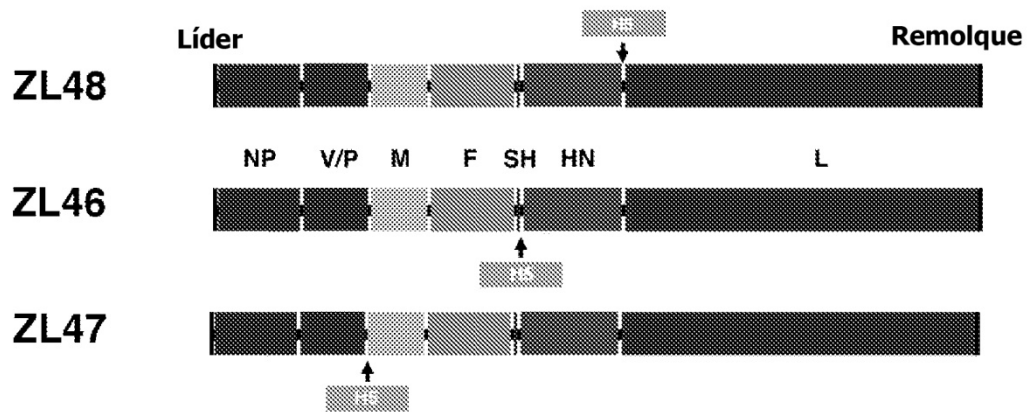


Figura 6B

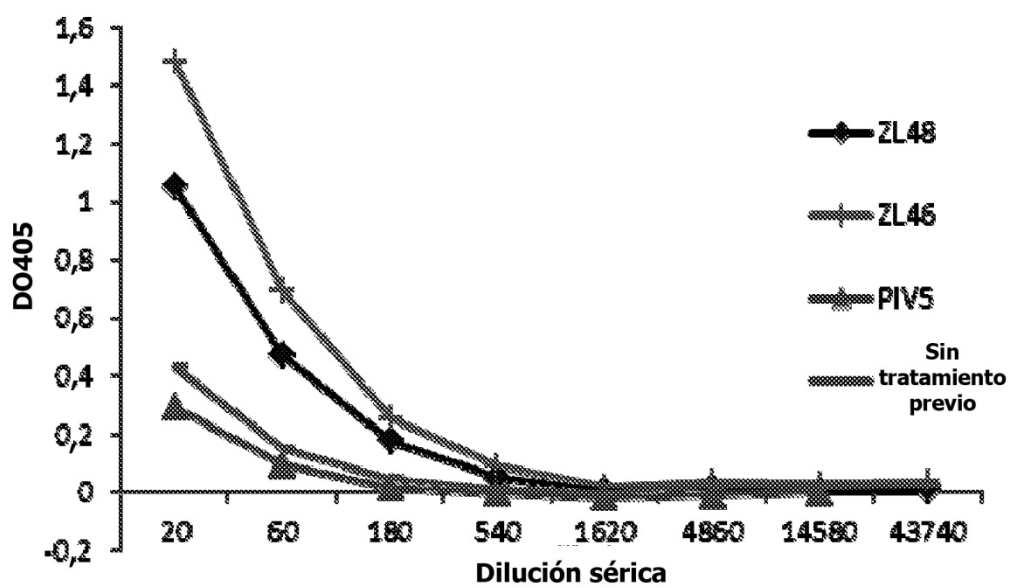


Figura 6C

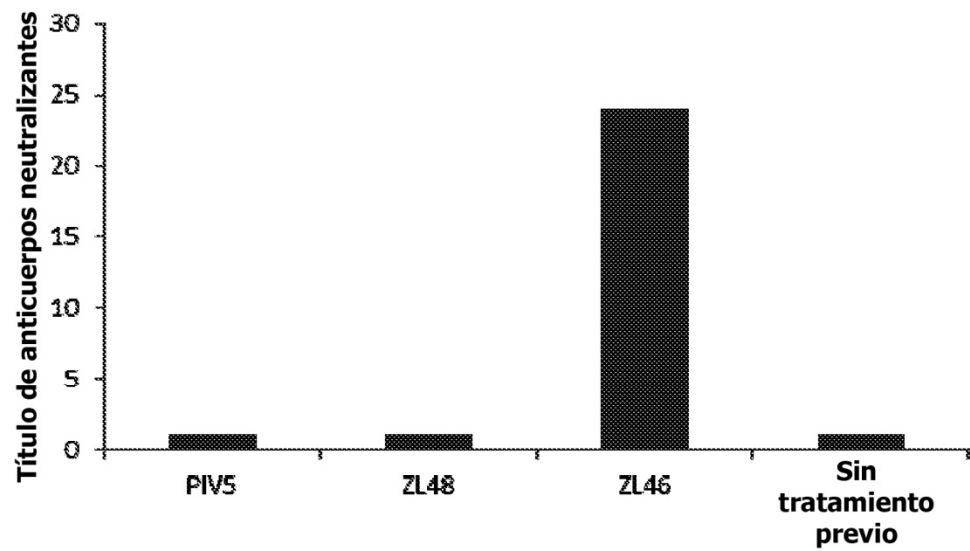


Figura 7A

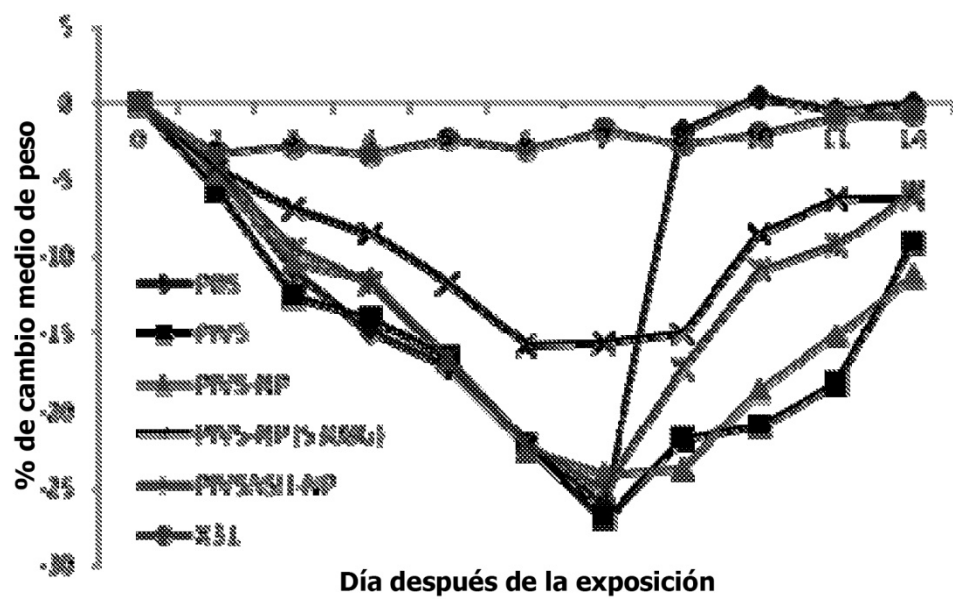


Figura 7B

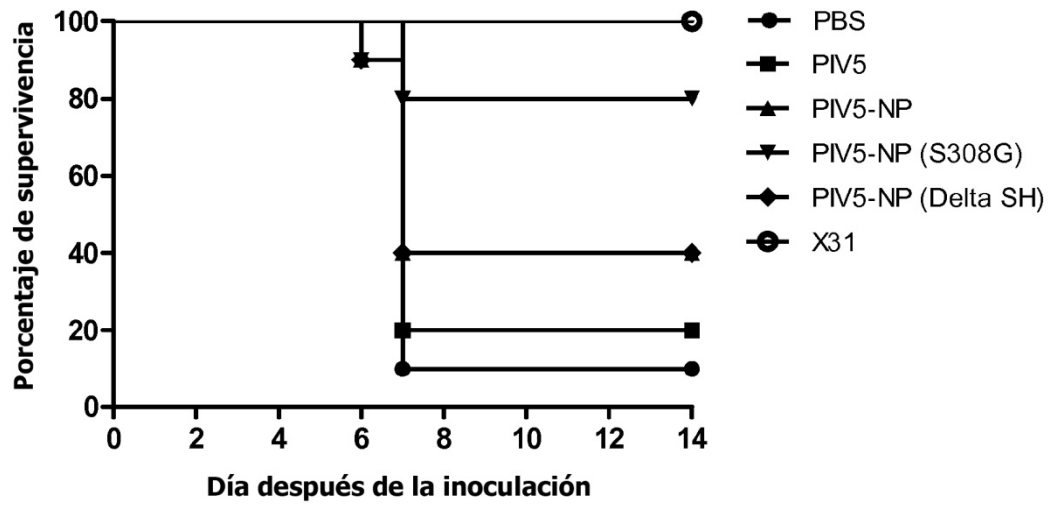


Figura 8A

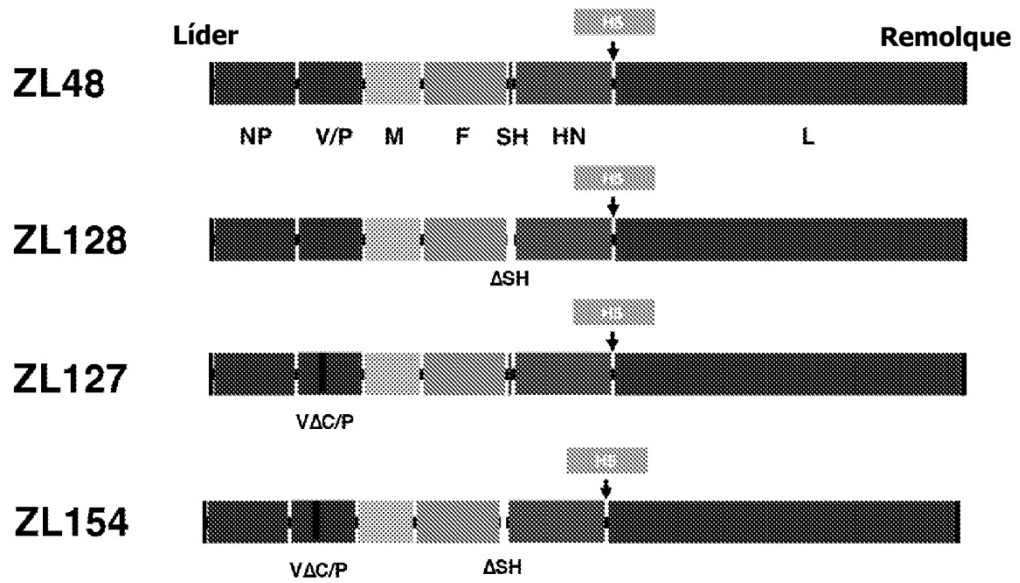


Figura 8B

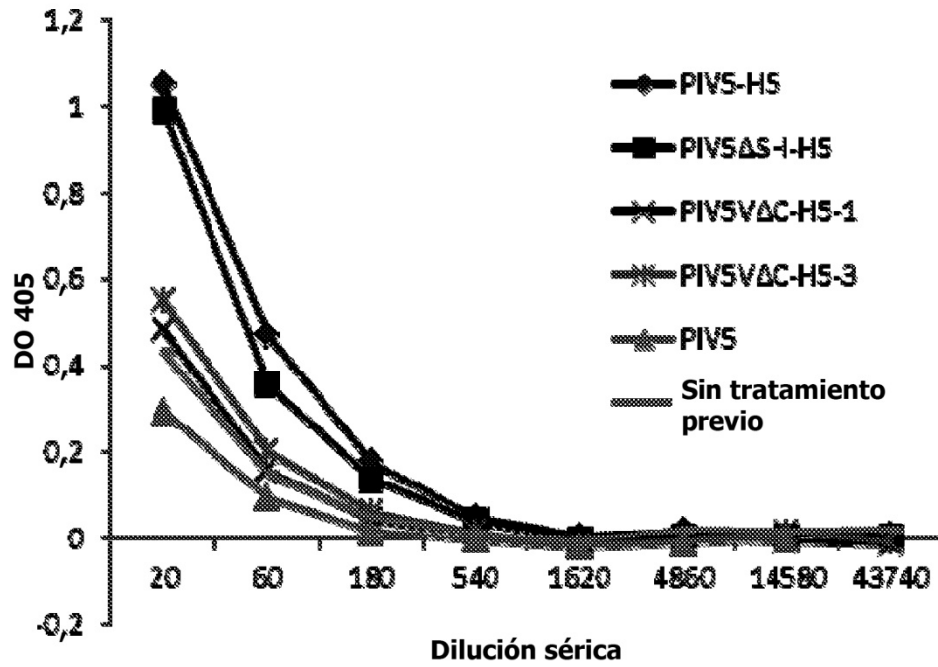


Figura 9

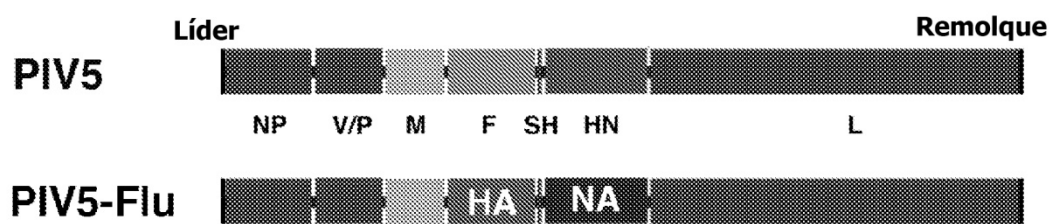


Figura 10A

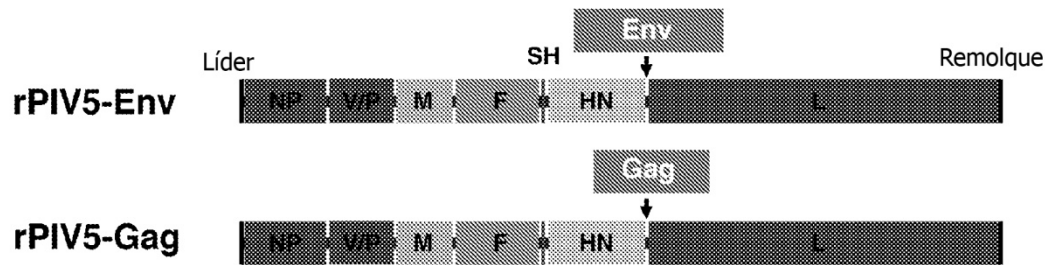


Figura 10B

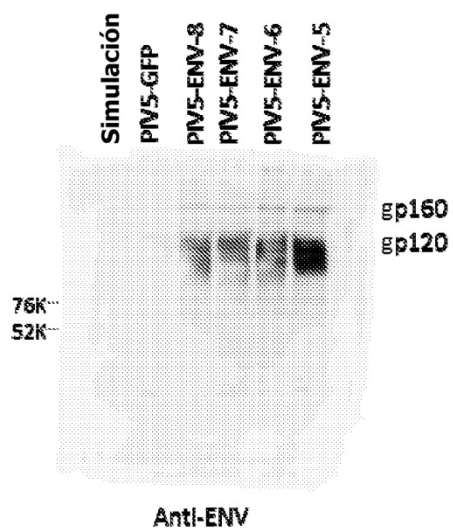


Figura 10C

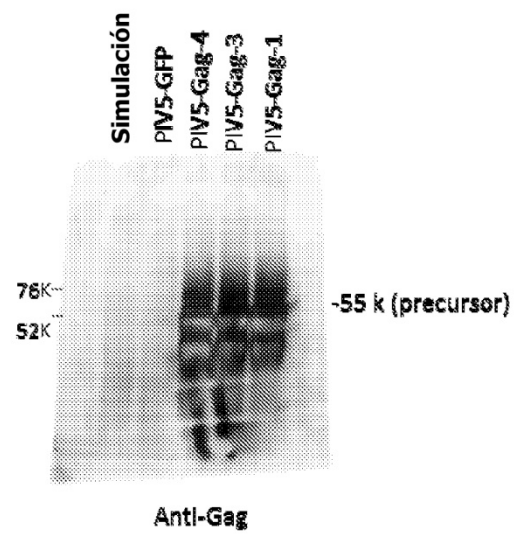


Figura 11A

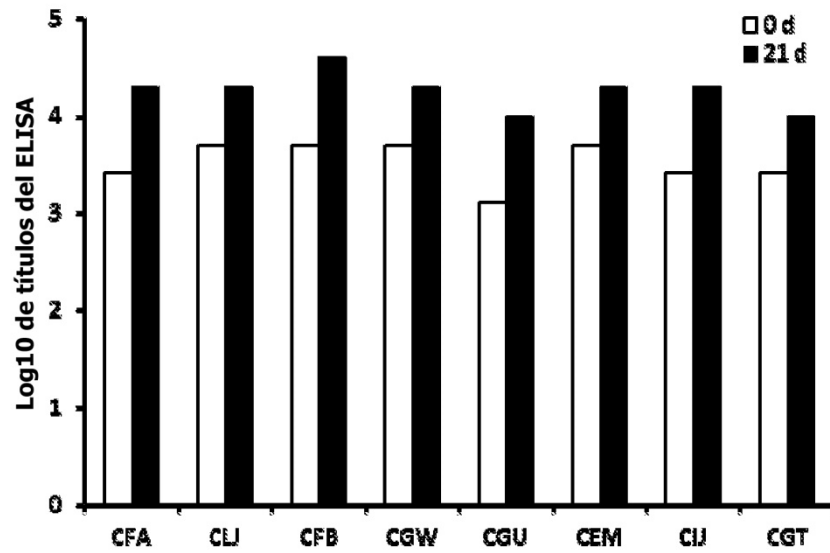


Figura 11B

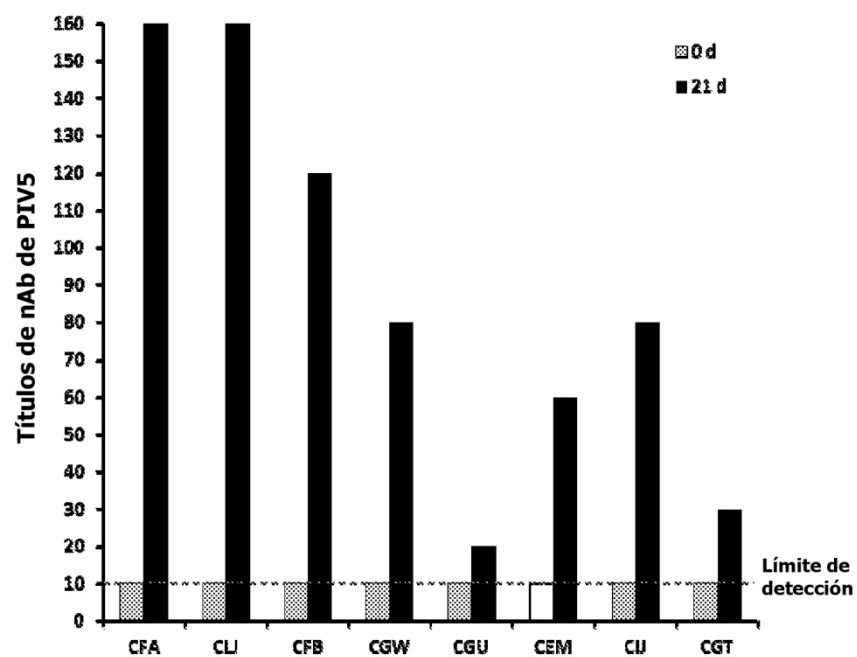


Figura 12A

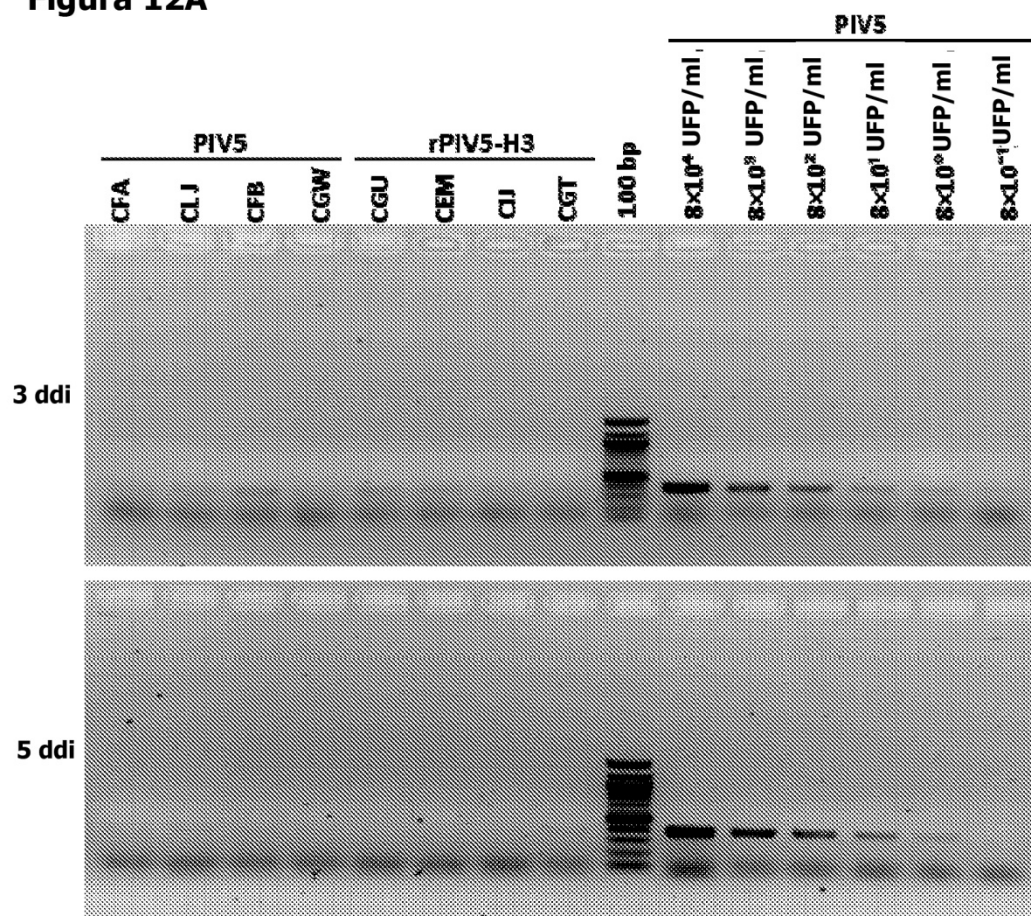


Figura 12B

Hisopos de perros	CFA	CLJ	CFB	CGW	CGU	CEM	CUJ	CGT
3 ddi (UFP/ml)	0	0	0	0	0	0	0	0
5 ddi (UFP/ml)	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 13

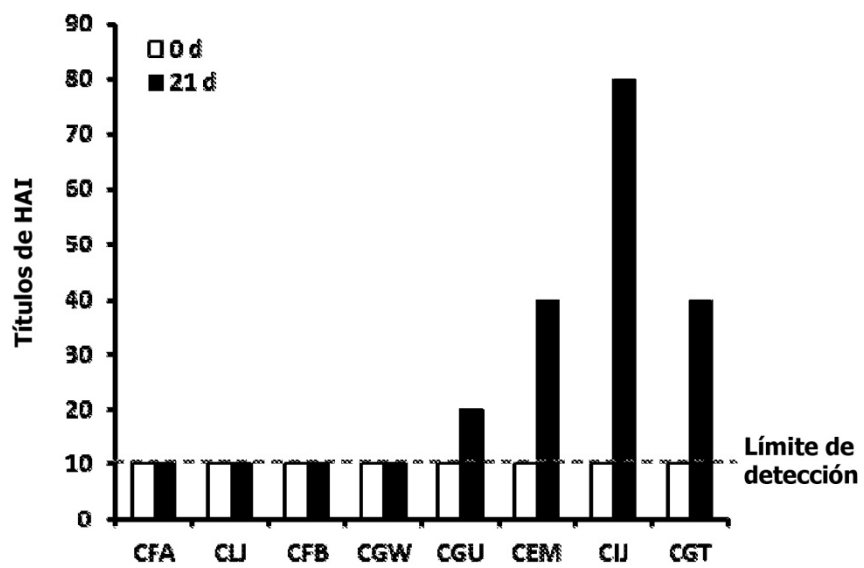


Figura 14A

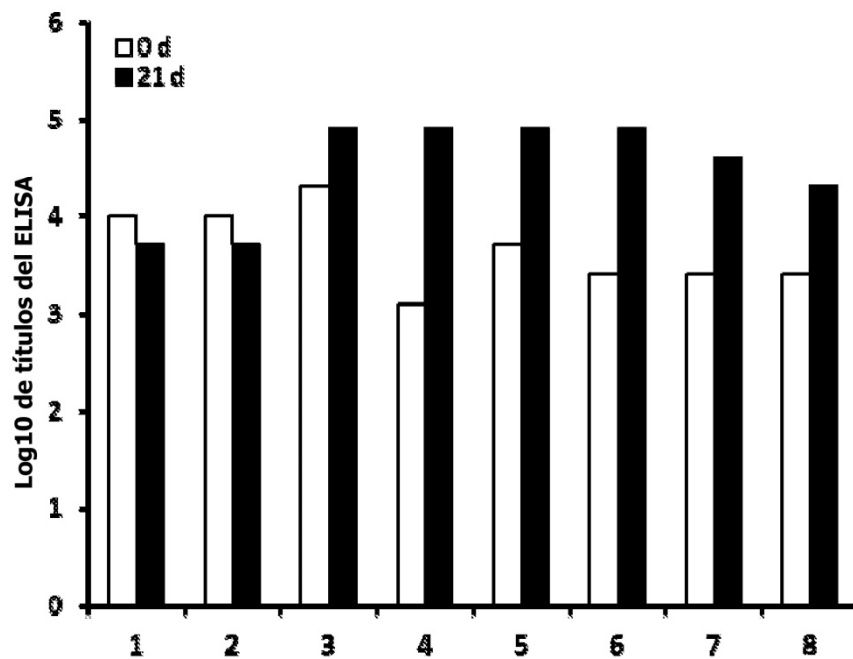


Figura 14B

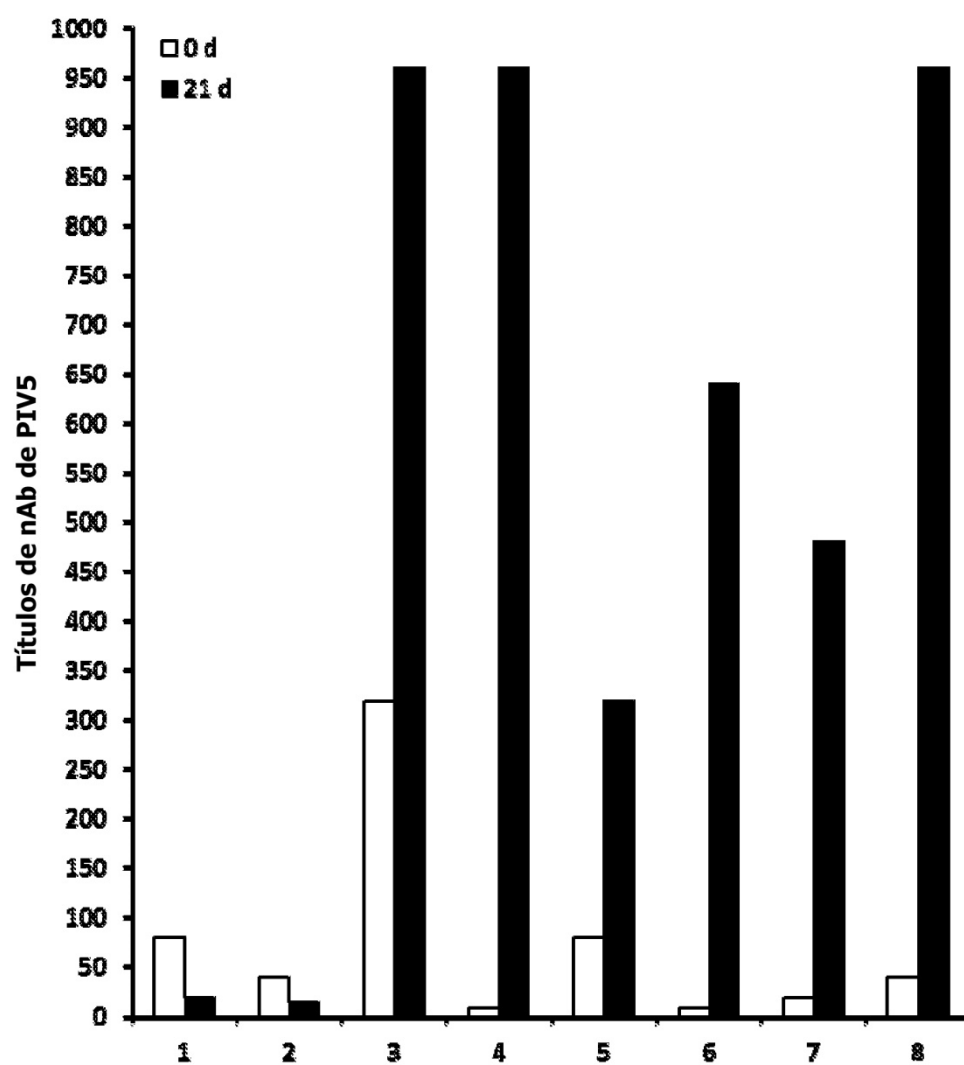


Figura 15A

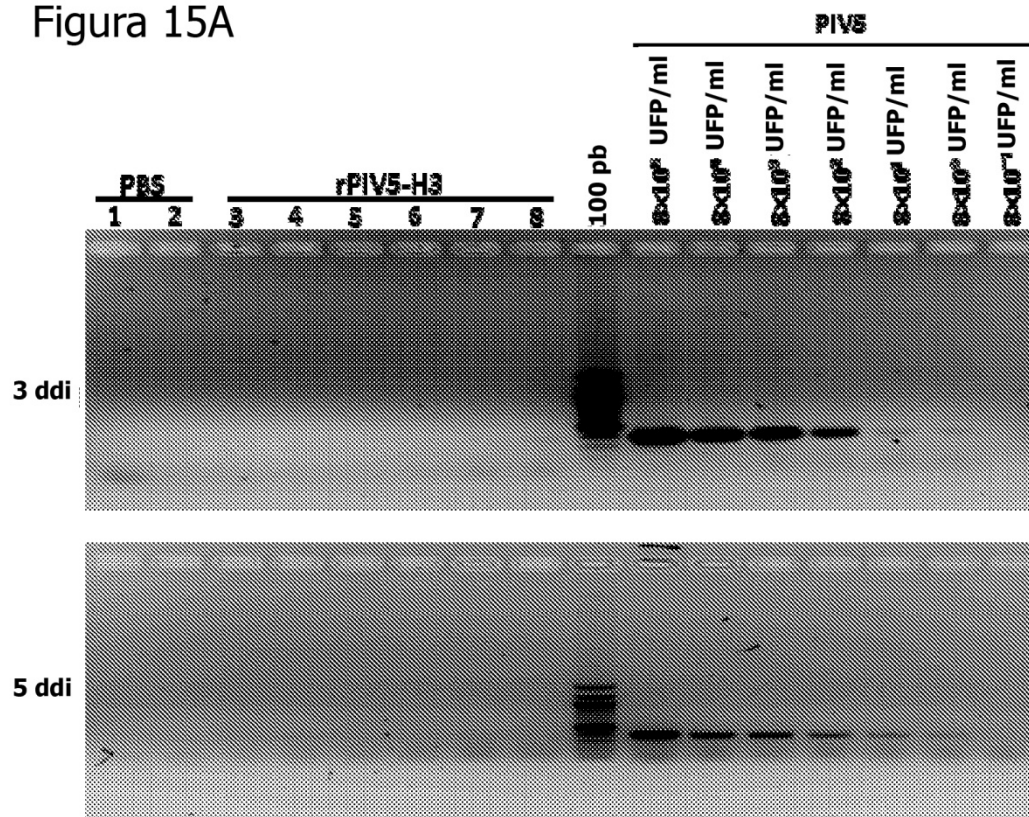


Figura 15B

Hisopos de perros	1	2	3	4	5	6	7	8
3 ddi (UFP/ml)	0	0	0	0	0	0	0	0
5 ddi (UFP/ml)	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 16

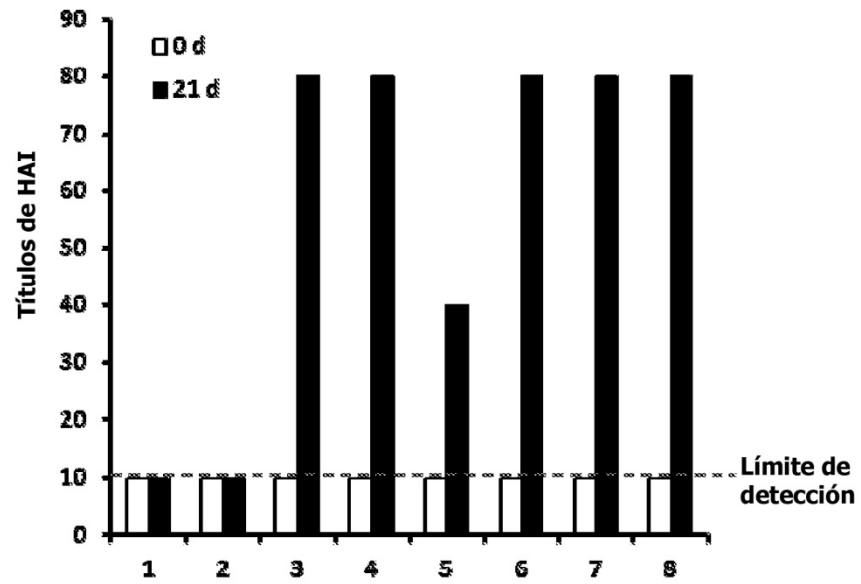


Figura 17A

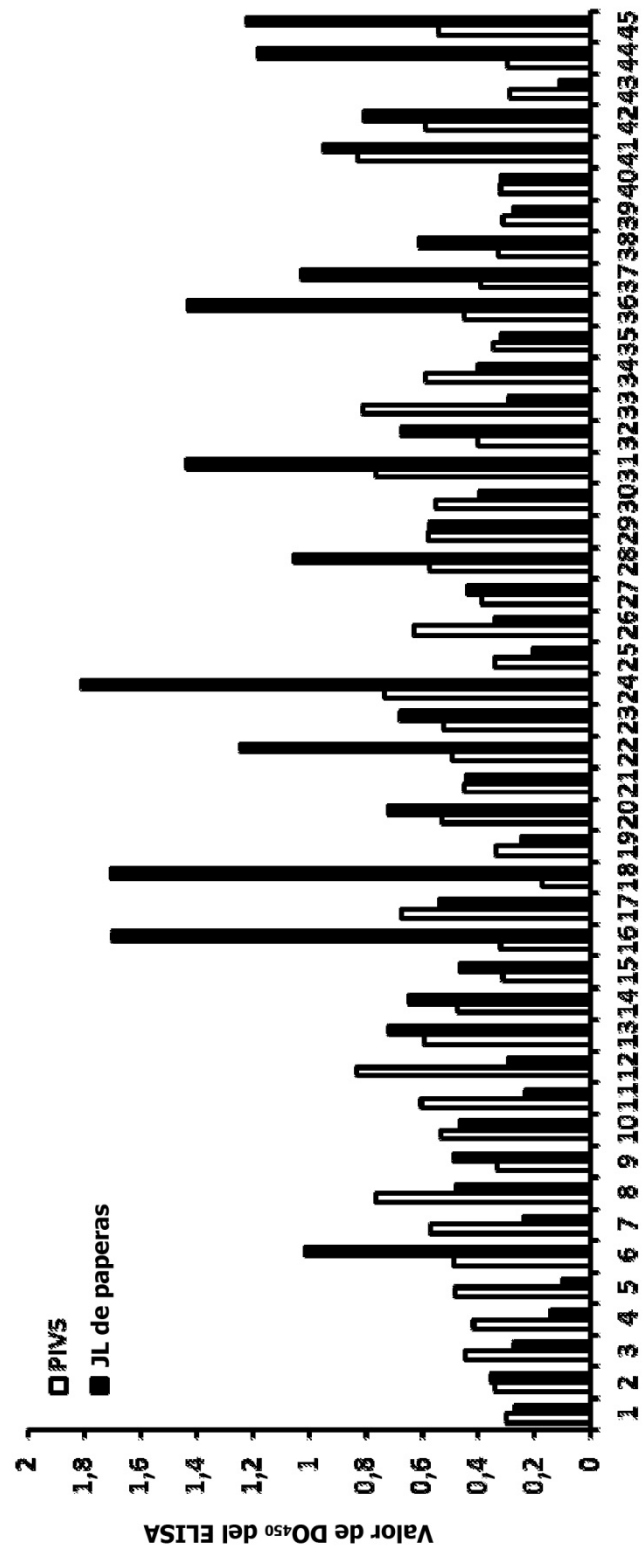


Figura 17B

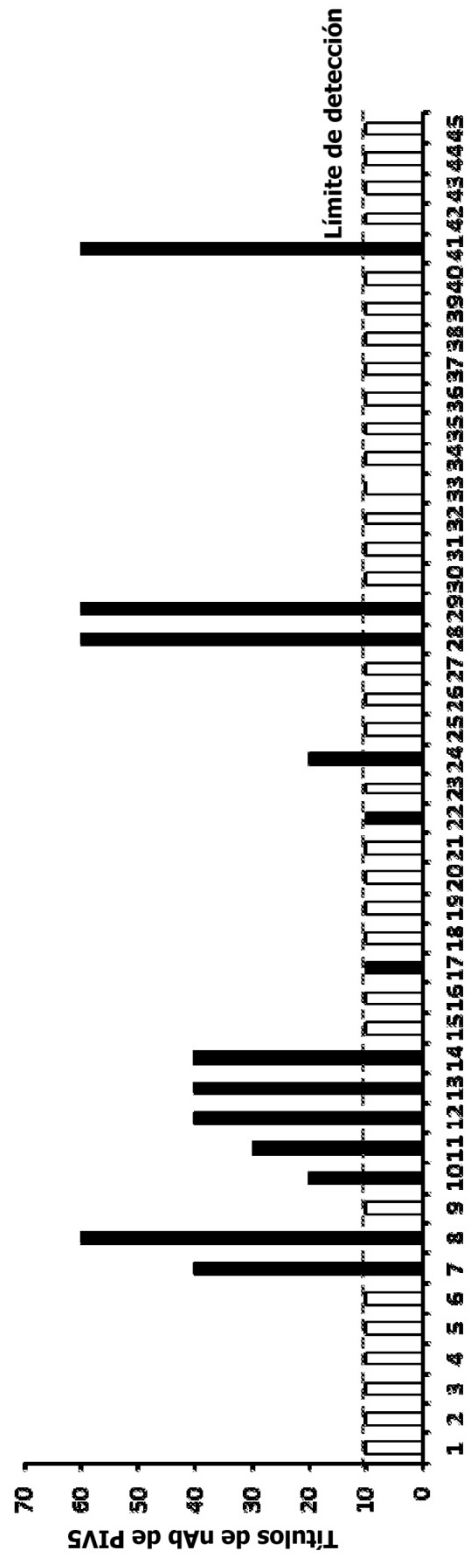


Figura 18A

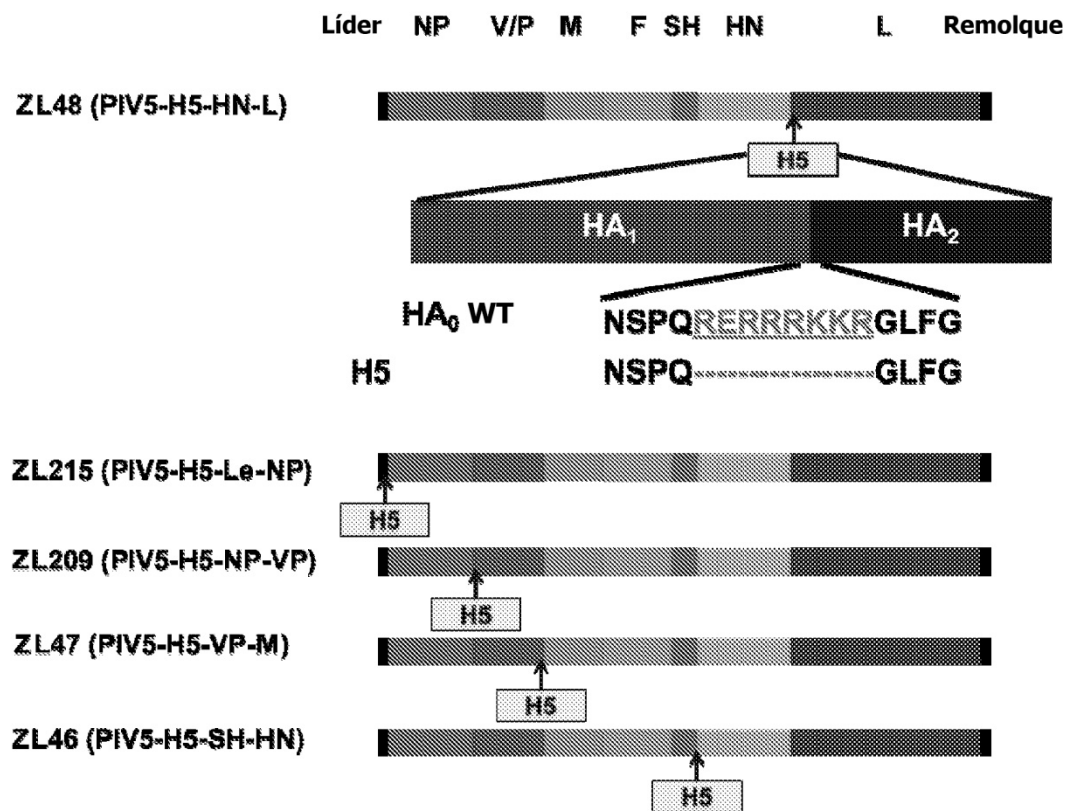


Figura 18B

Virus	Títulos más altos (ufp/ml)
PIV5	2X10 ⁸
ZL48	1X10 ⁸
ZL46	1X10 ⁸
ZL47	1X10 ⁸
ZL209	1X10 ⁵

Figura 19A

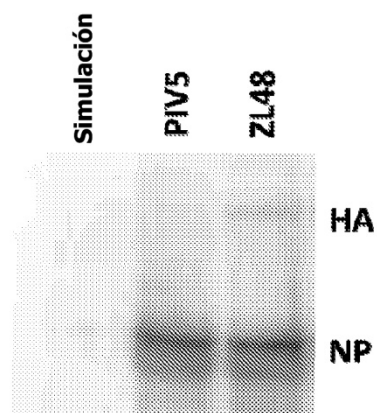


Figura 19B

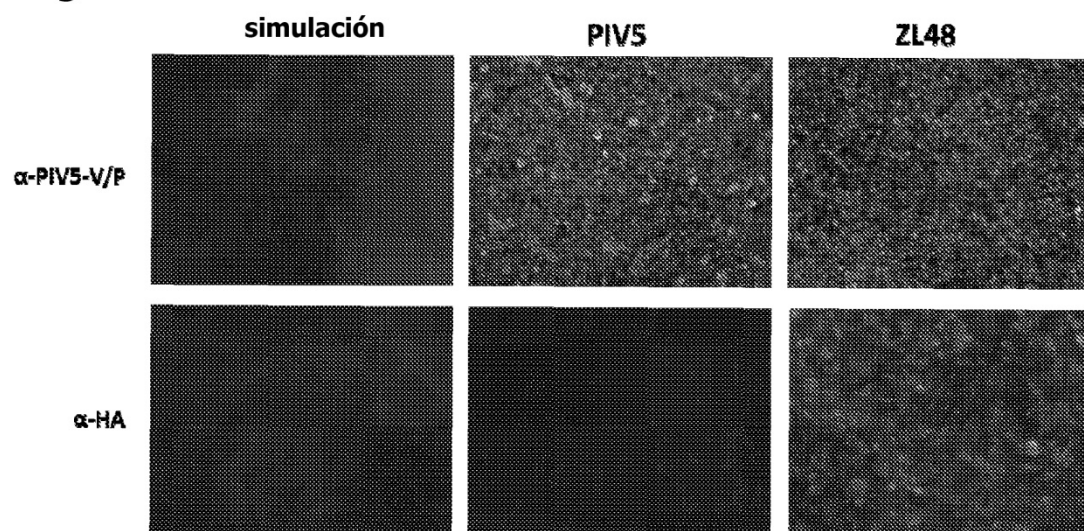


Figura 19C

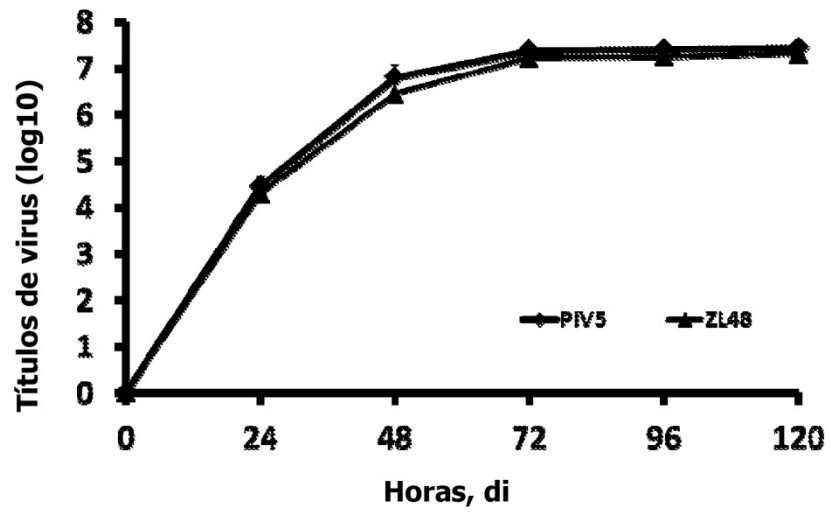


Figura 20A

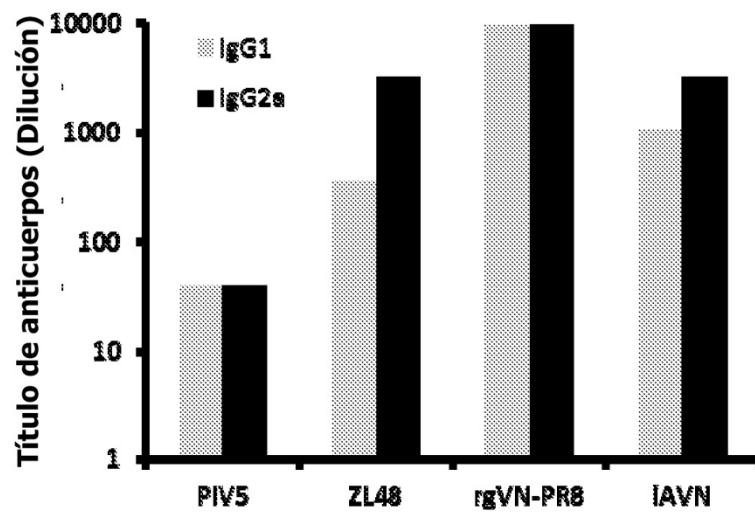


Figura 20B

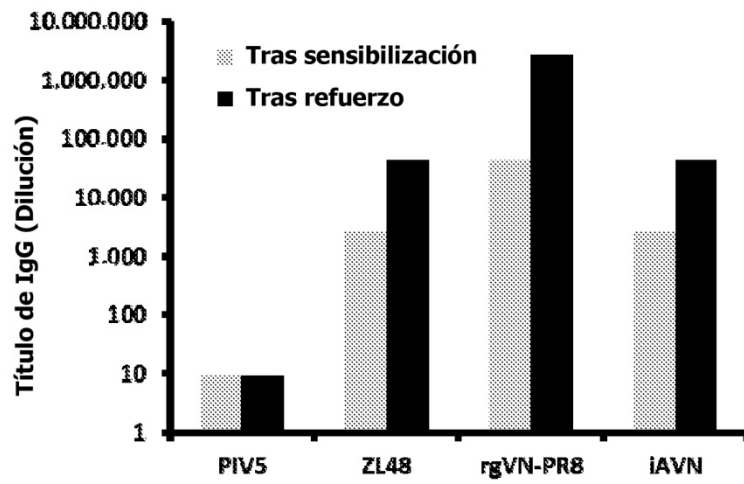


Figura 20C

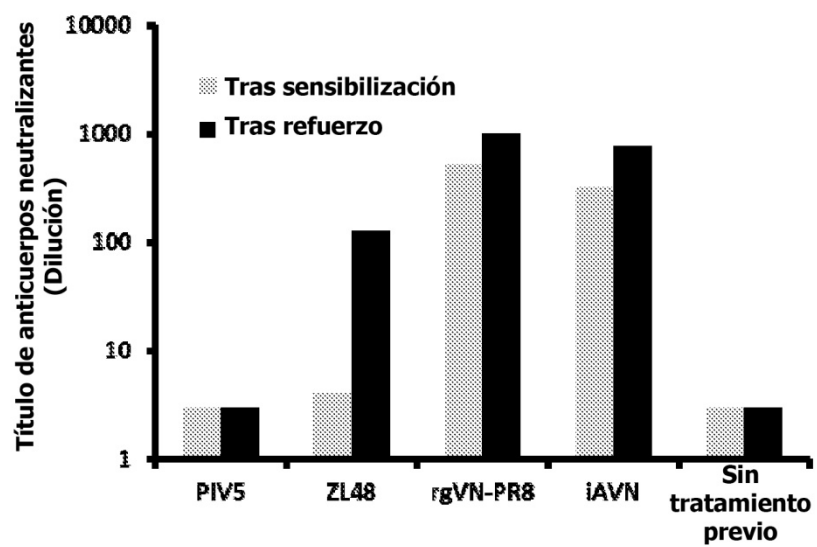


Figura 20D

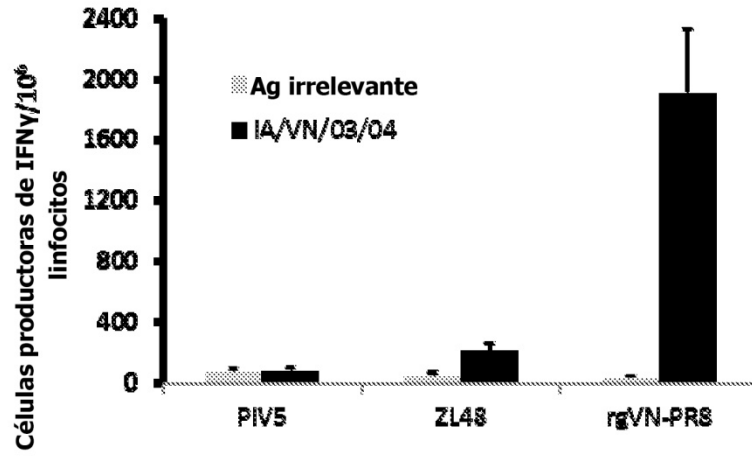


Figura 21A

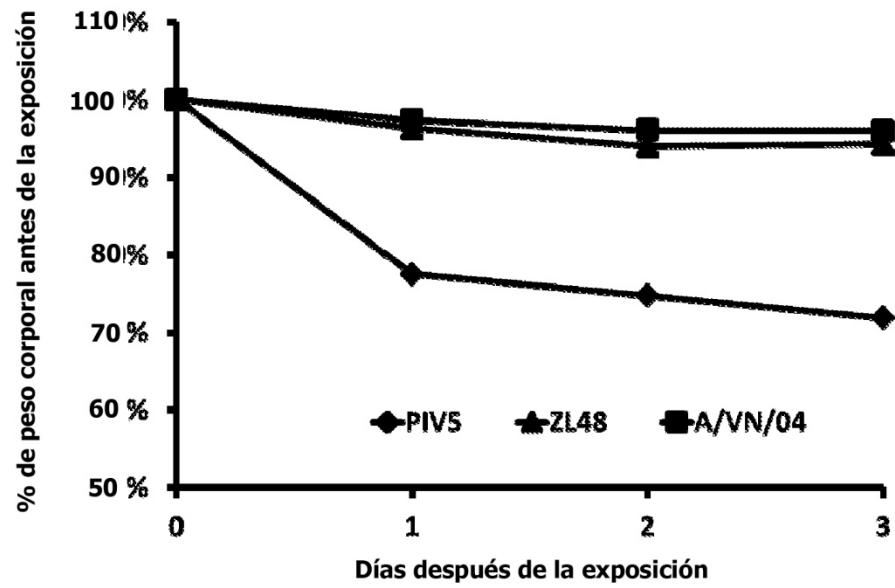


Figura 21B

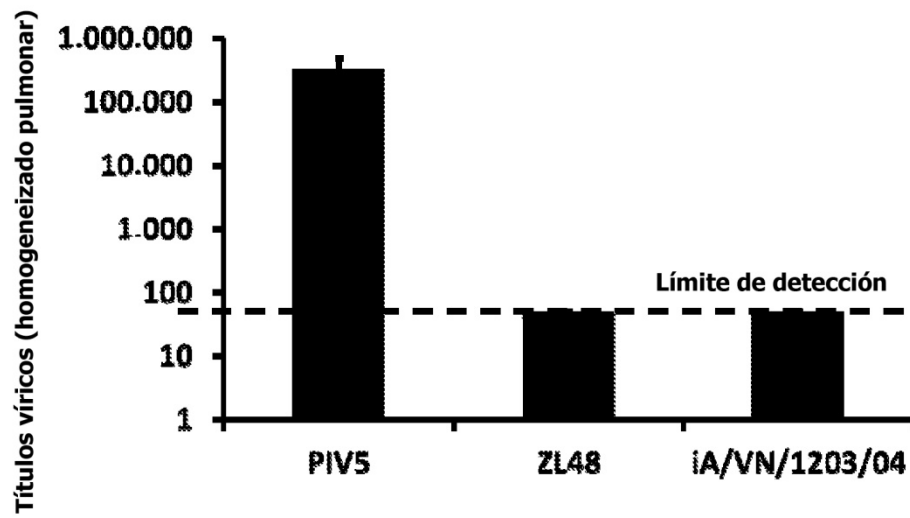


Figura 22A

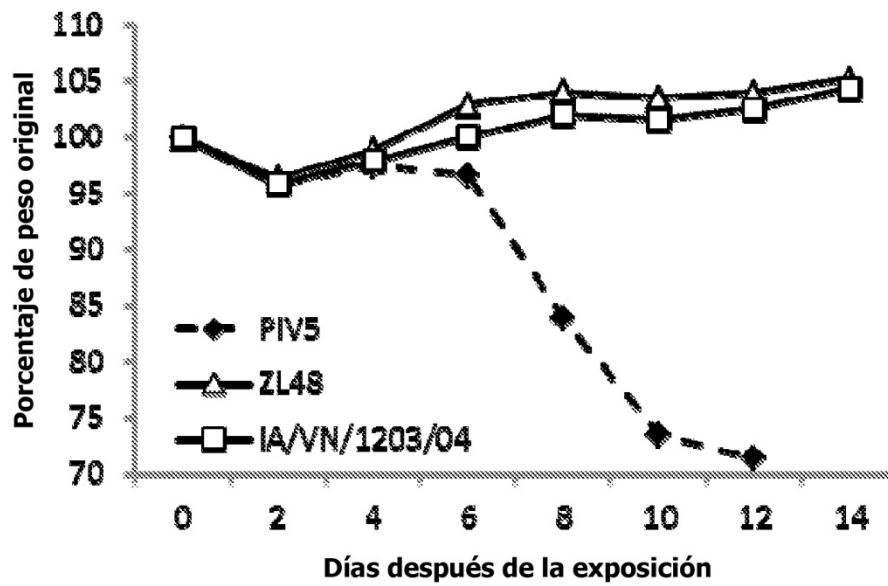


Figura 22B

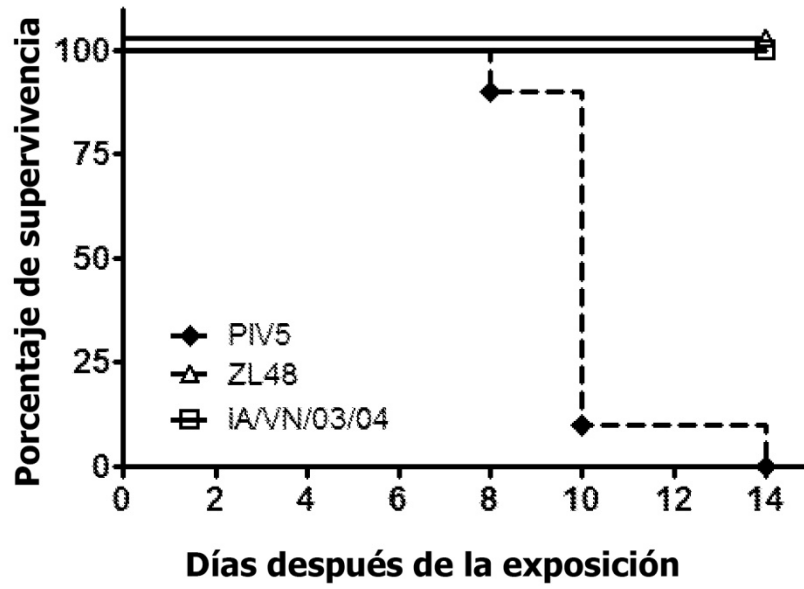


Figura 22C

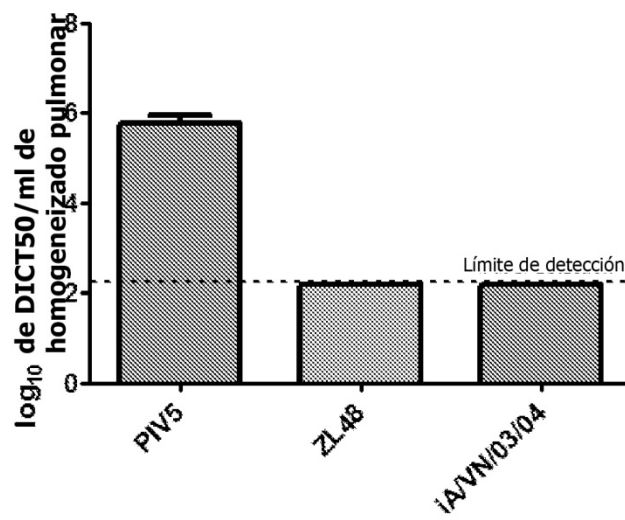


Figura 23A

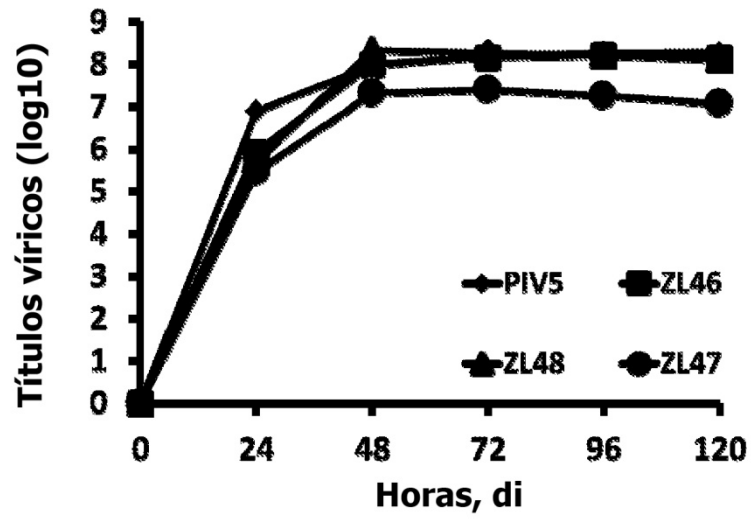


Figura 23B

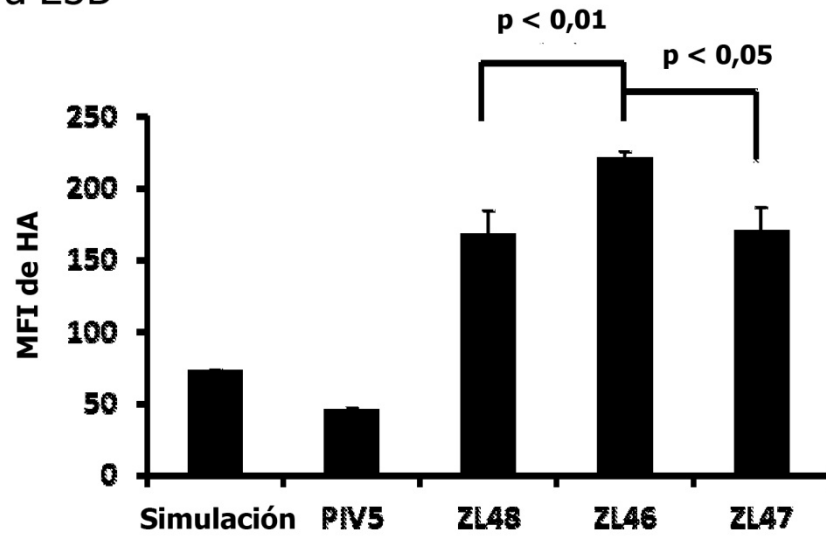


Figura 24

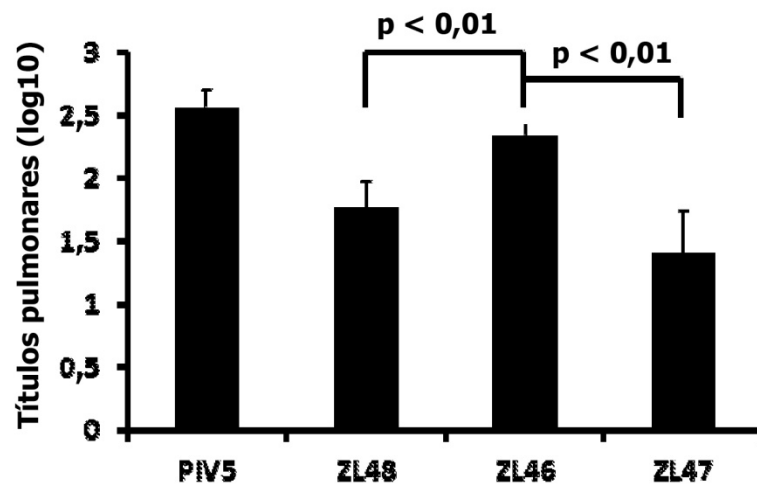


Figura 25A

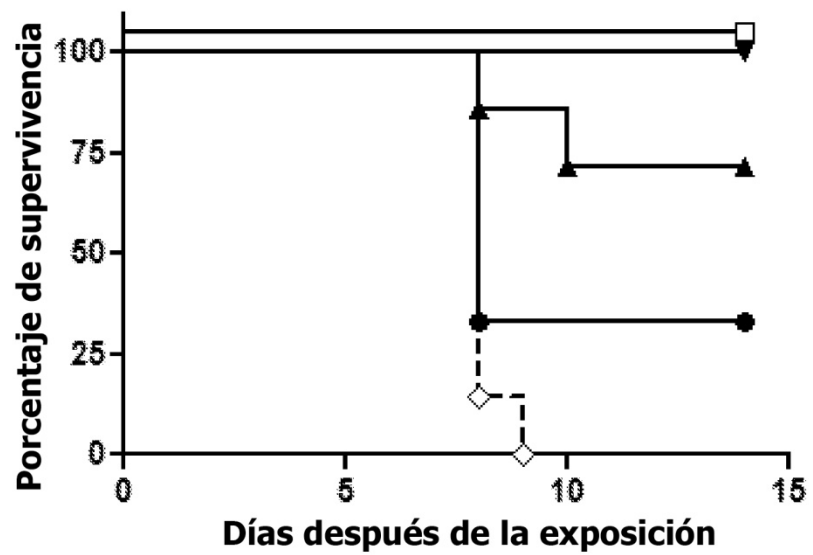


Figura 25B

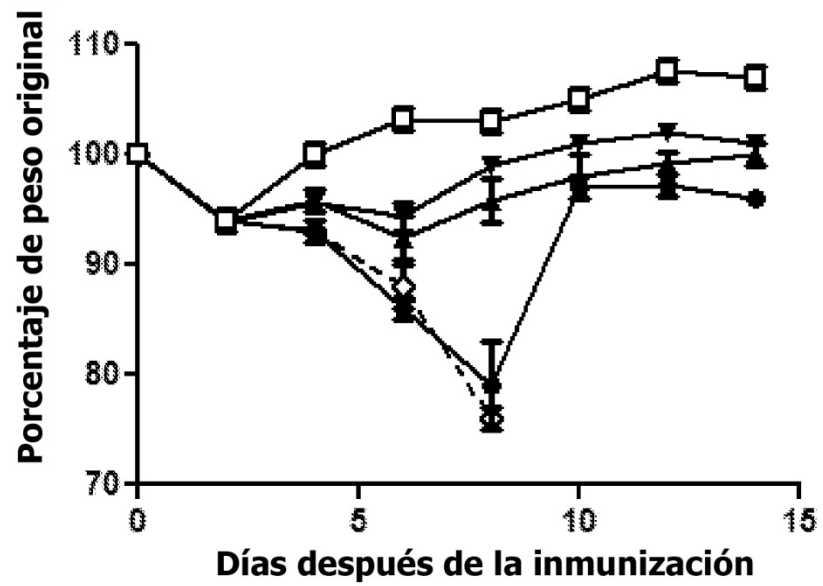


Figura 25C

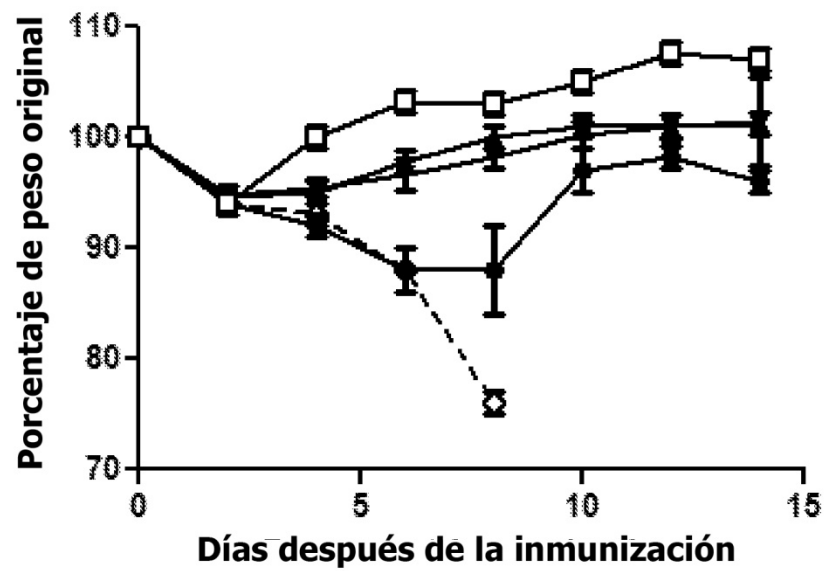


Figura 25D

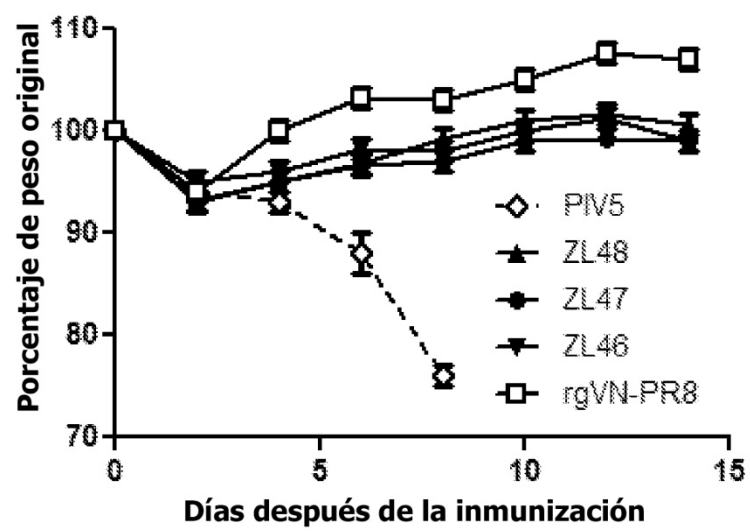


Figura 26A

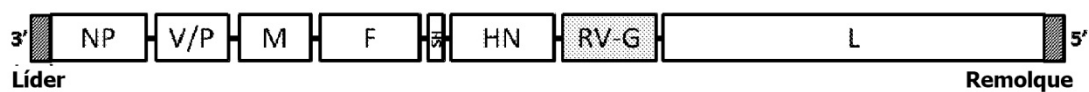


Figura 26B

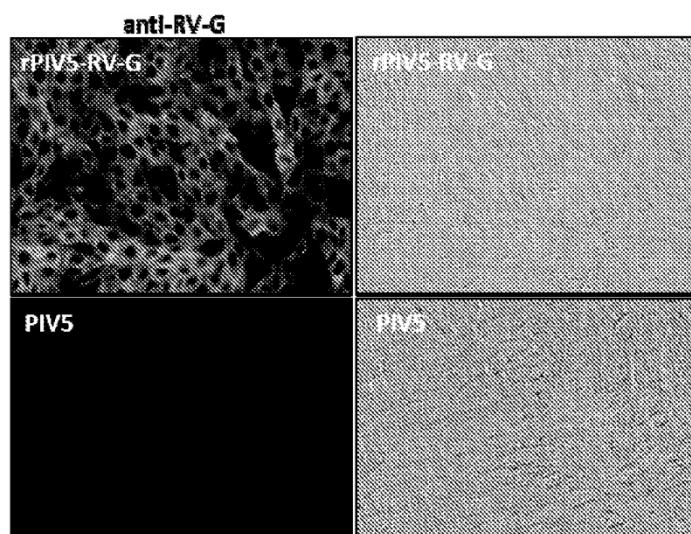


Figura 26C

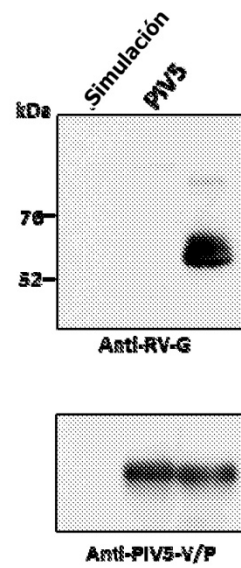


Figura 27A

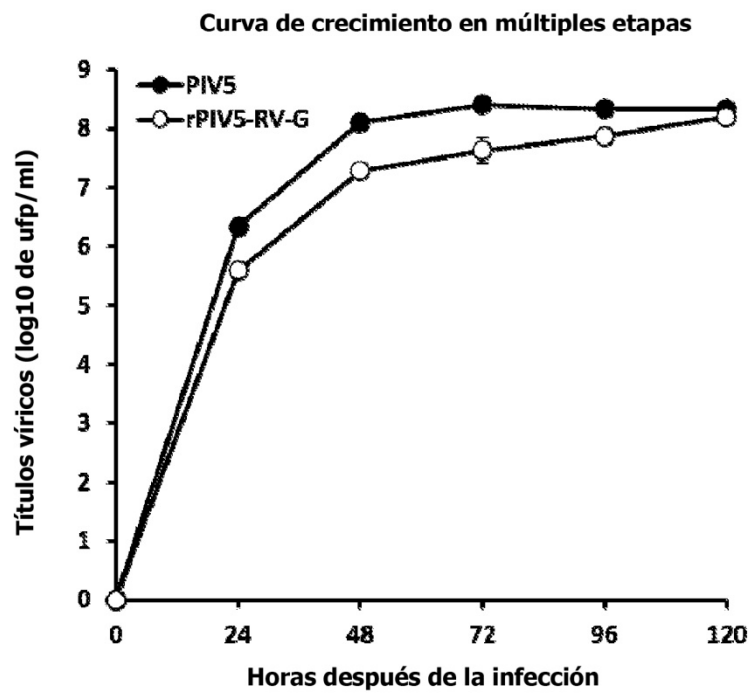


Figura 27B

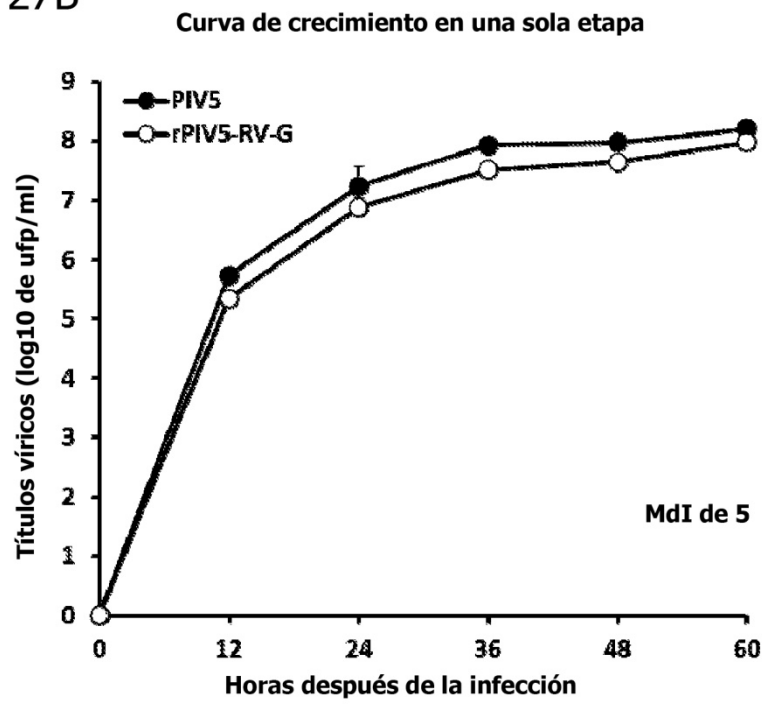


Figura 28

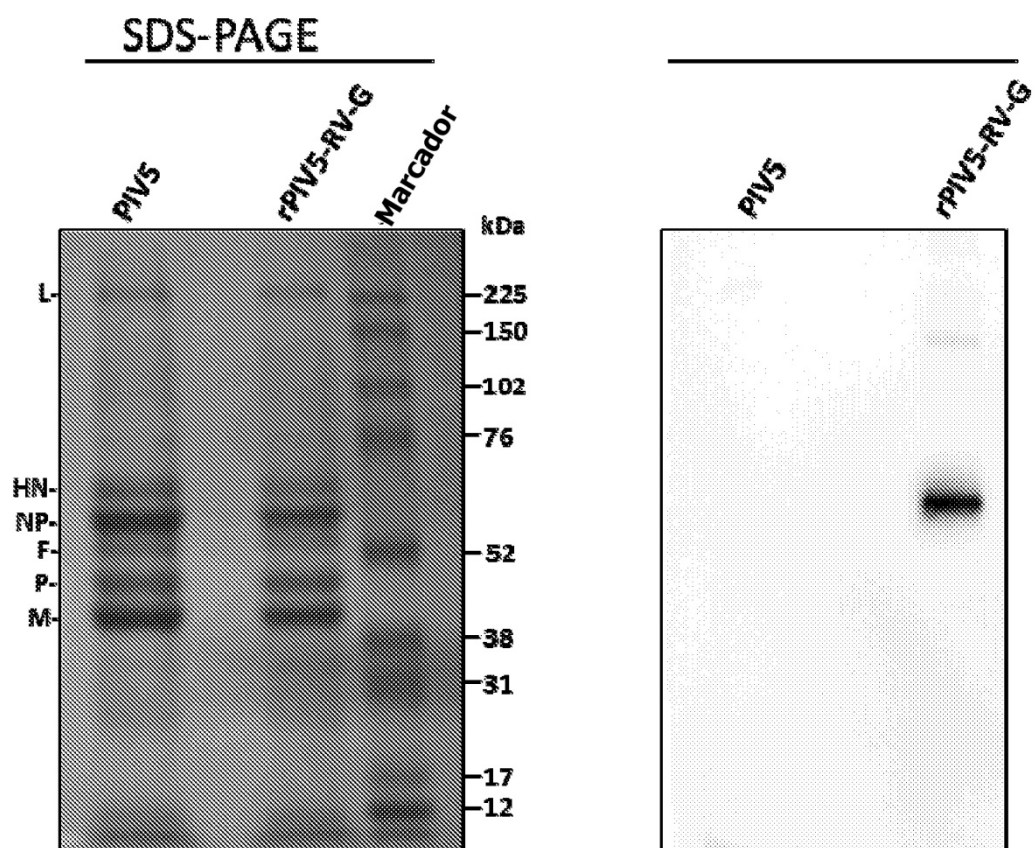


Figura 29A

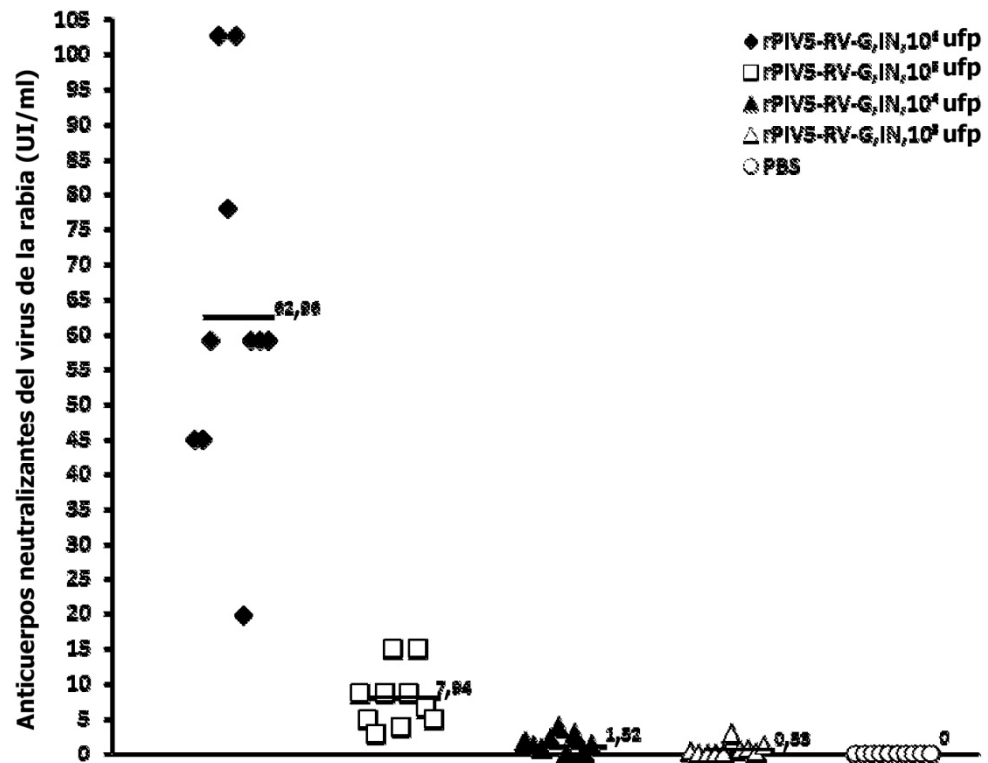


Figura 29B

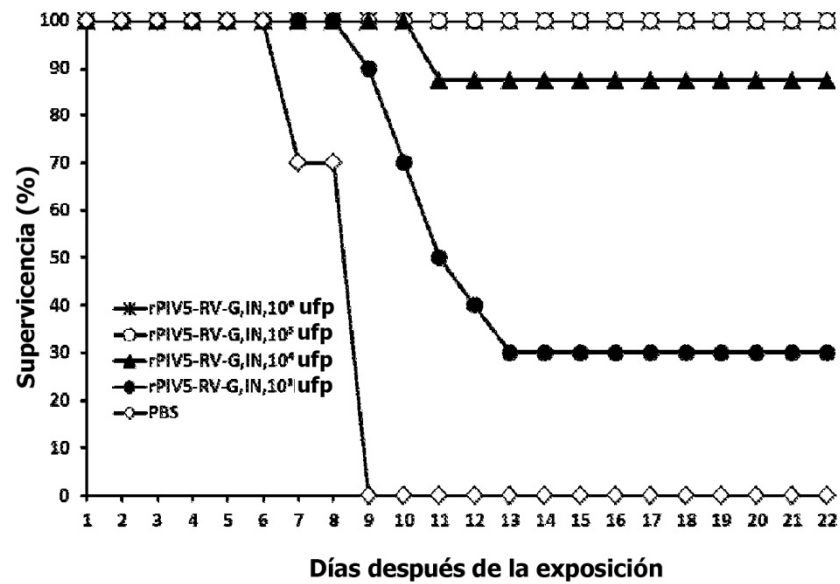


Figura 30A

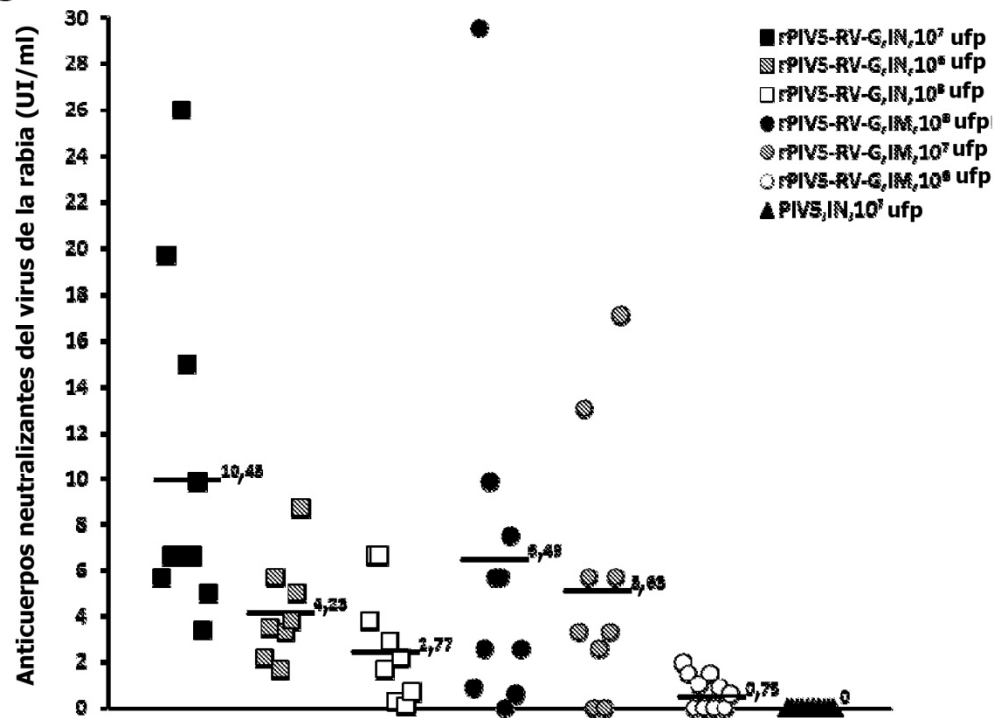


Figura 30B

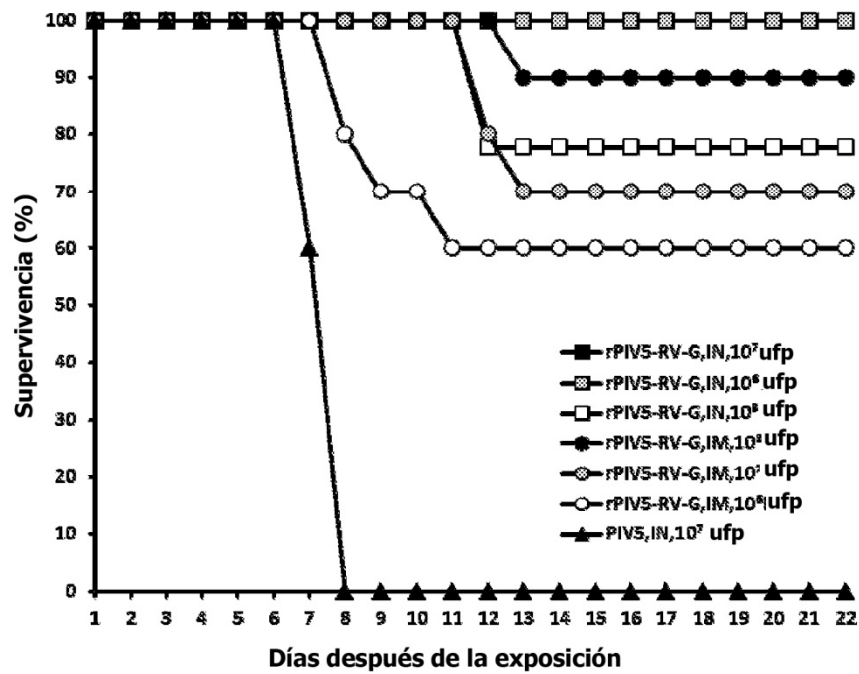


Figura 31A

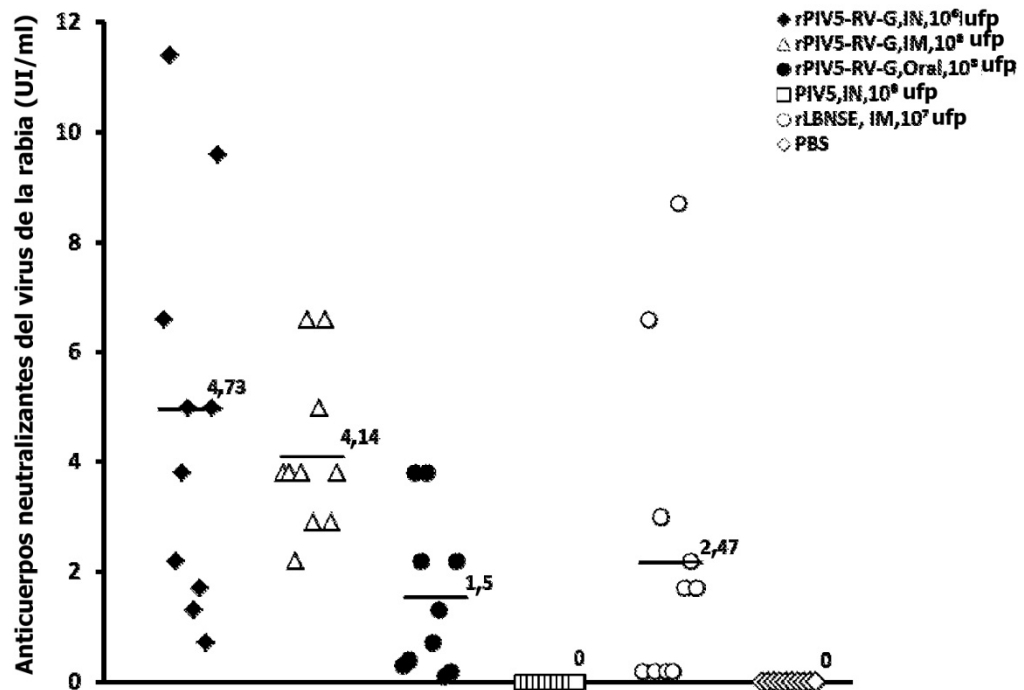


Figura 31B

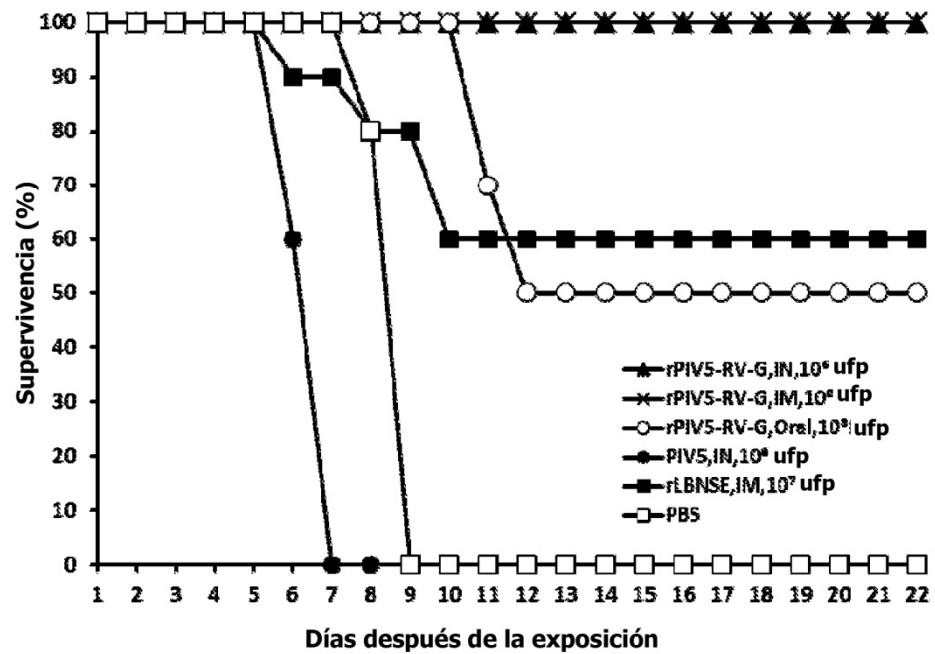


Figura 32

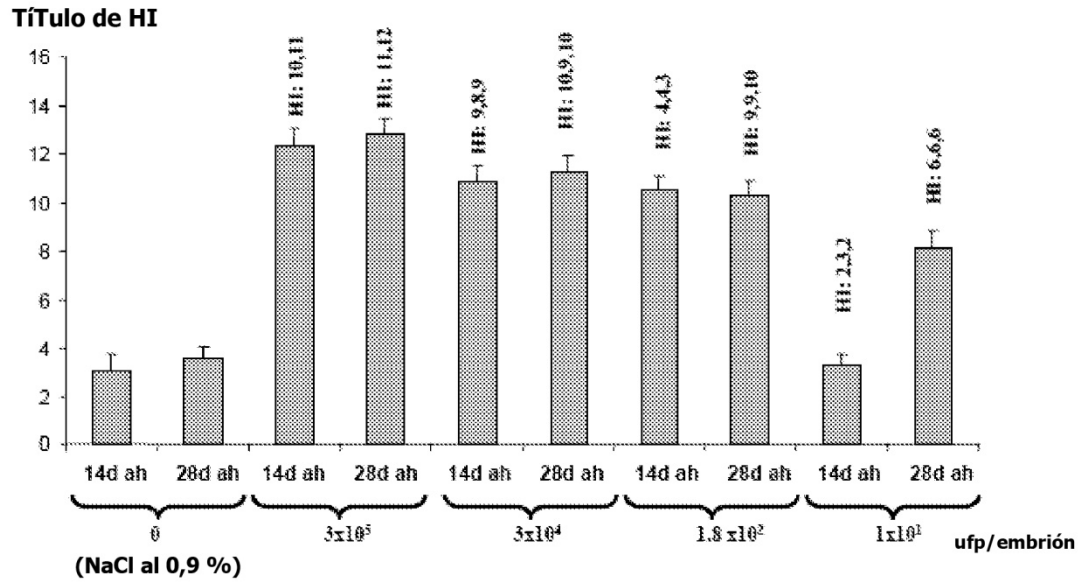


Figura 33

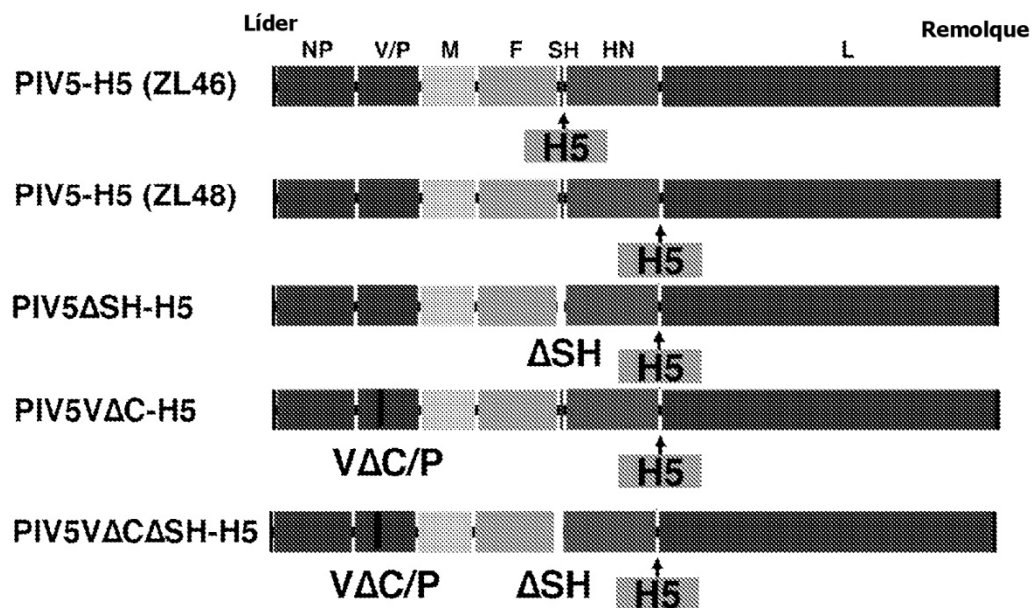


Figura 34A

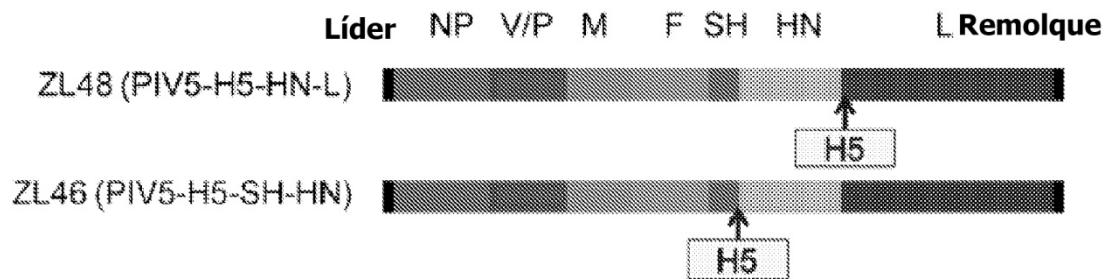


Figura 34B

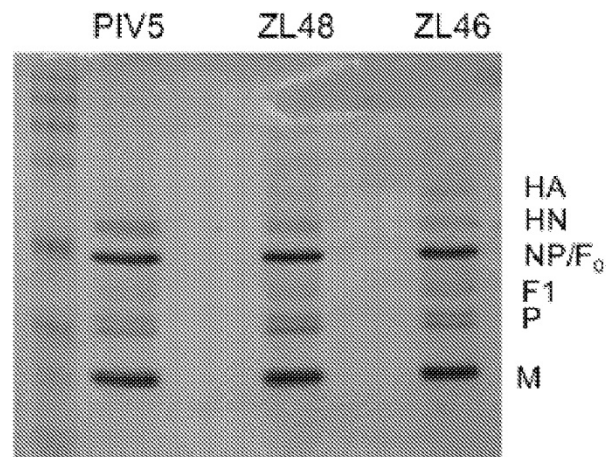


Figura 34C

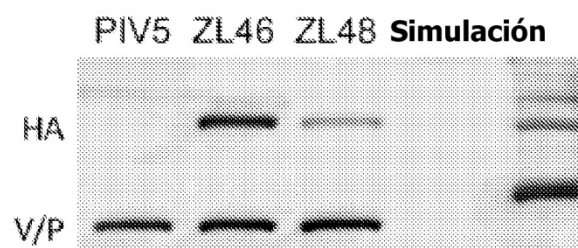


Figura 34D

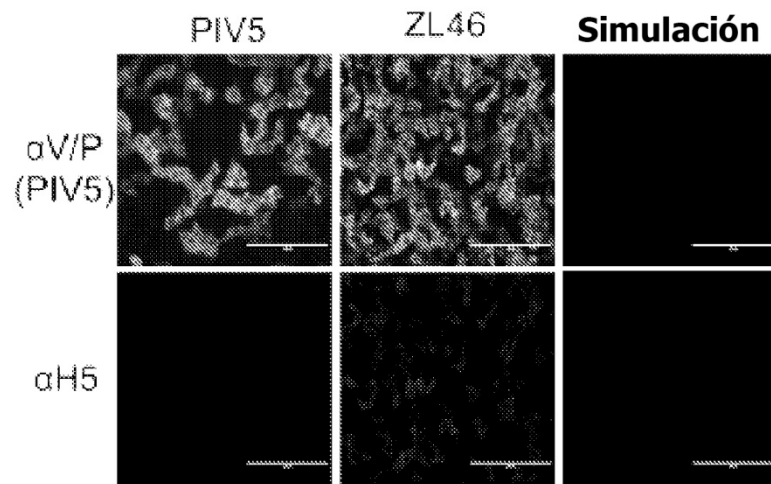


Figura 35A

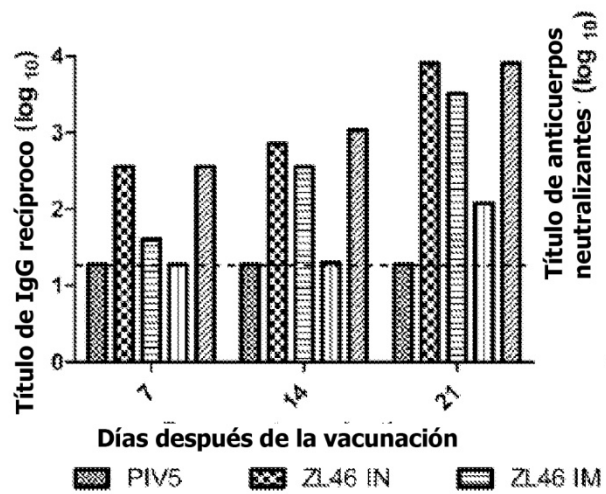


Figura 35B

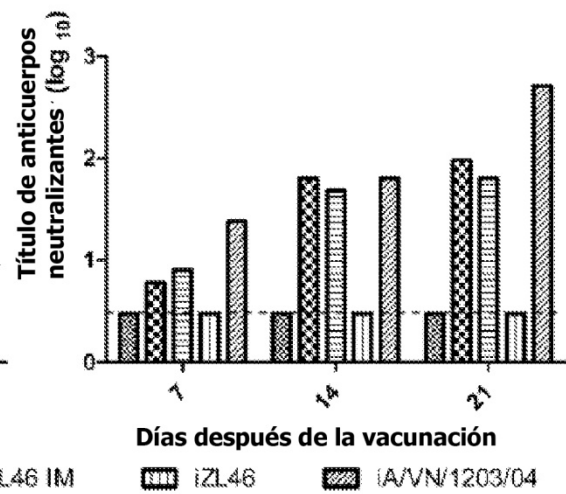


Figura 35C

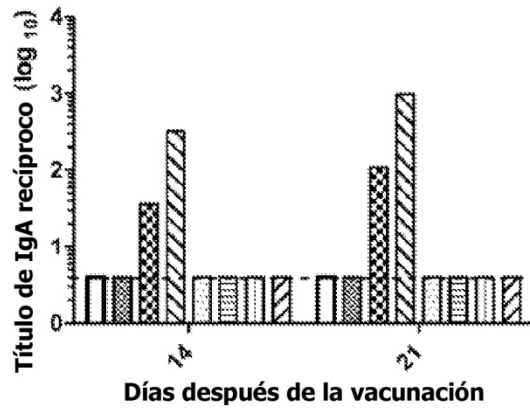


Figura 35D

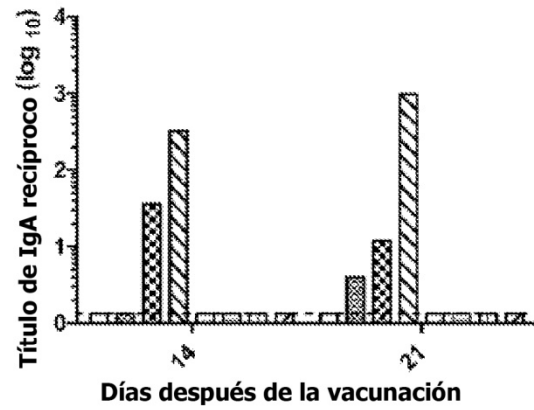


Figura 35E

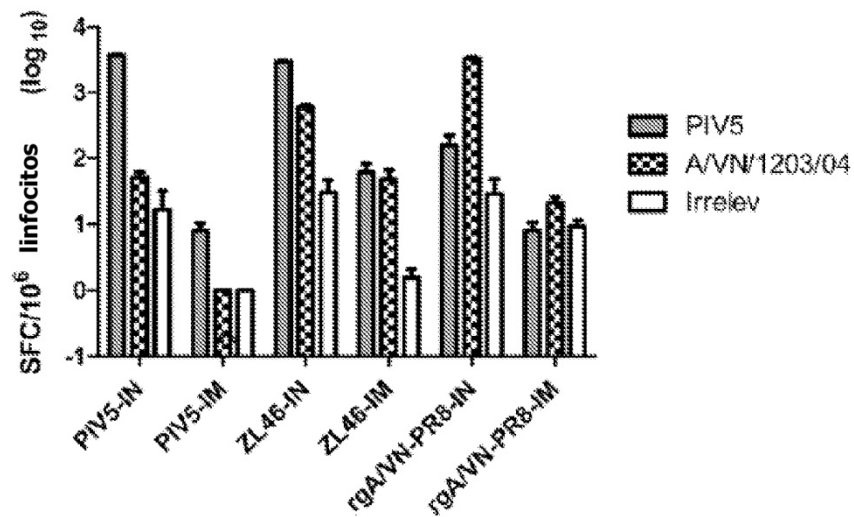


Figura 36A

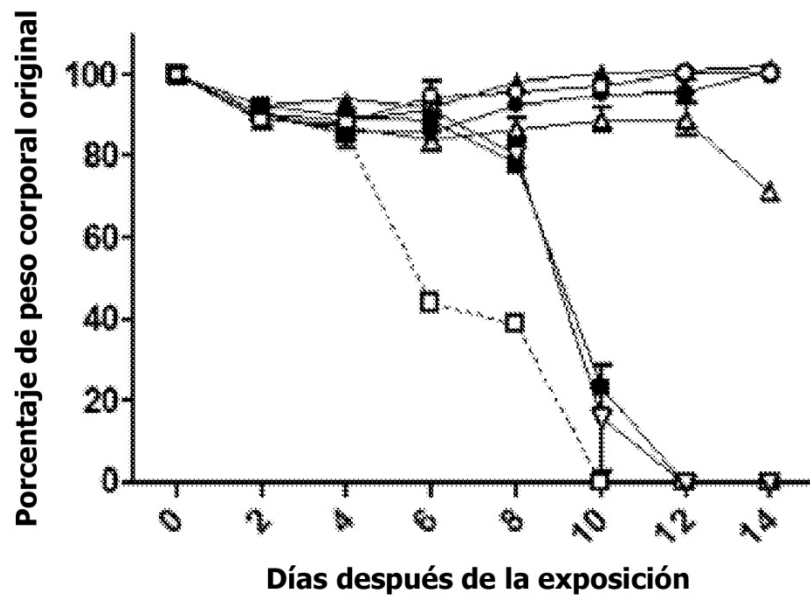


Figura 36B

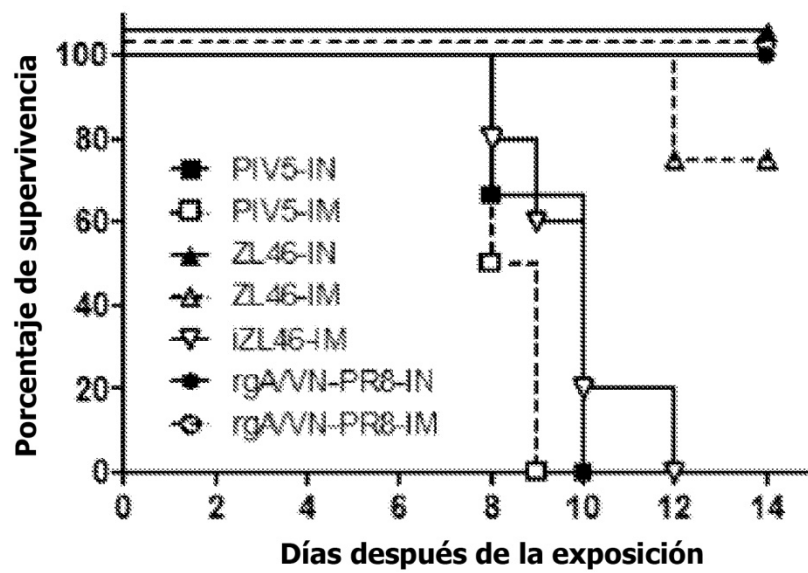


Figura 36C

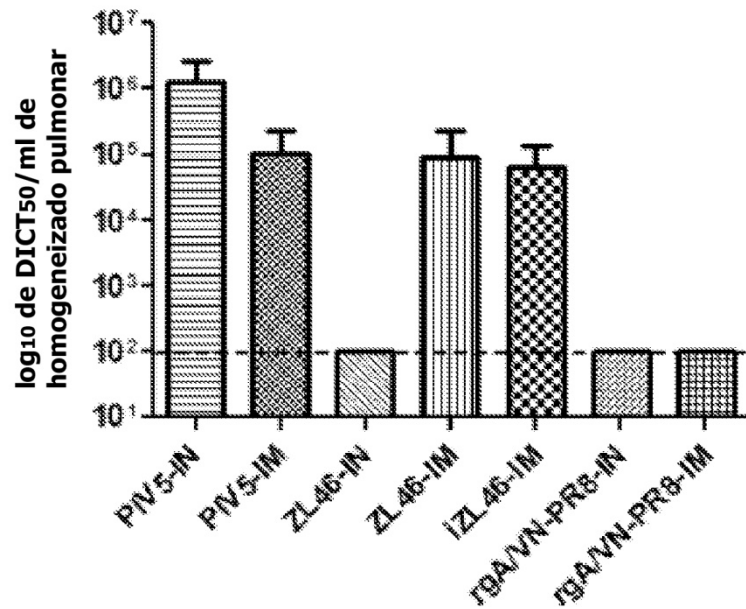


Figura 37A

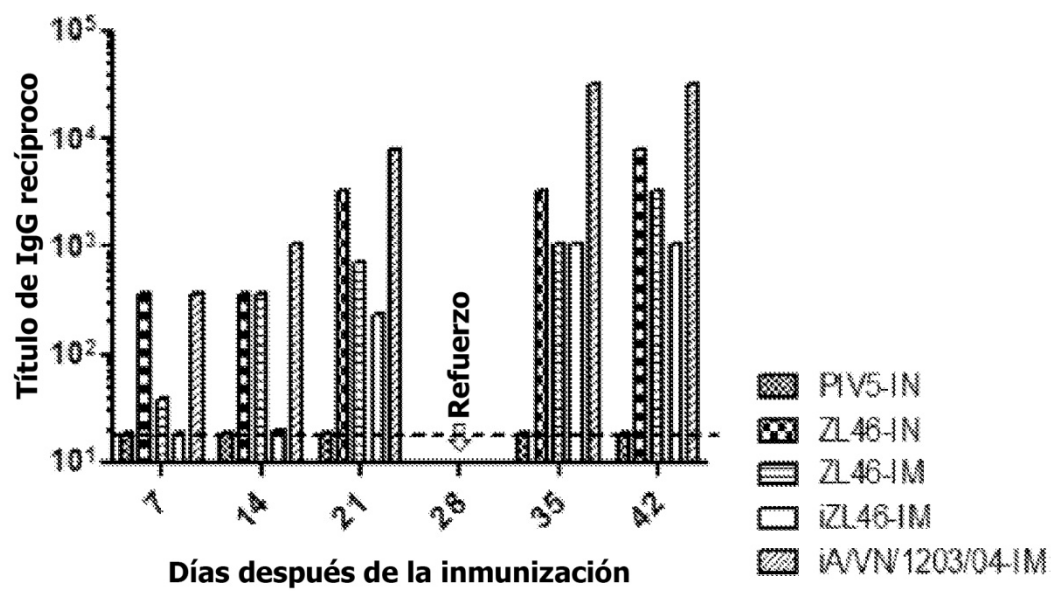


Figura 37B

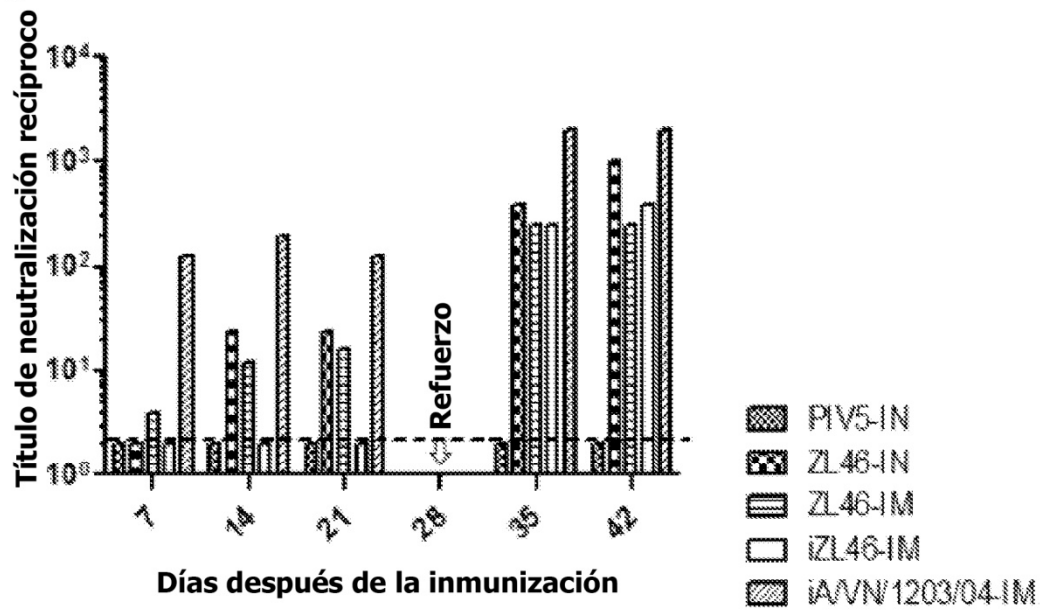


Figura 37C

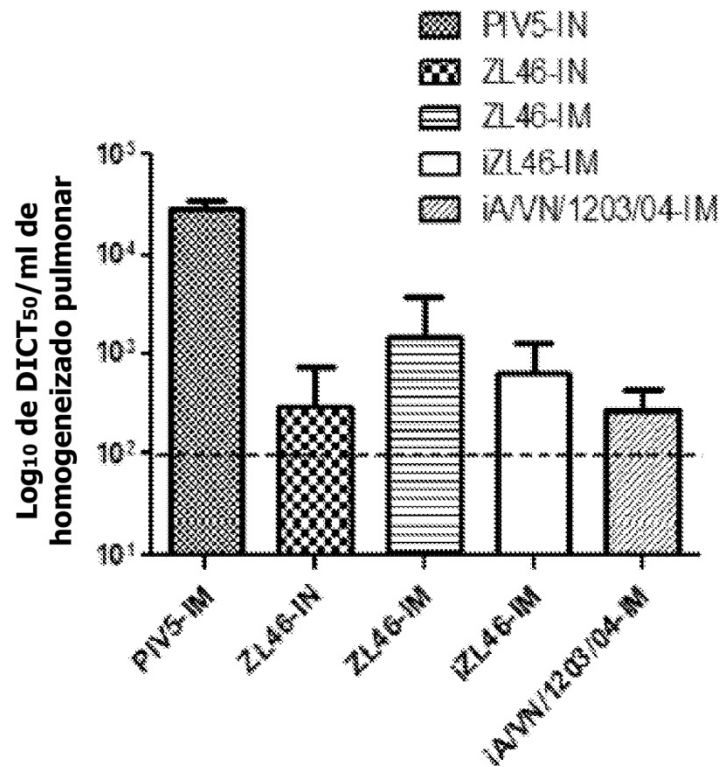


Figura 38

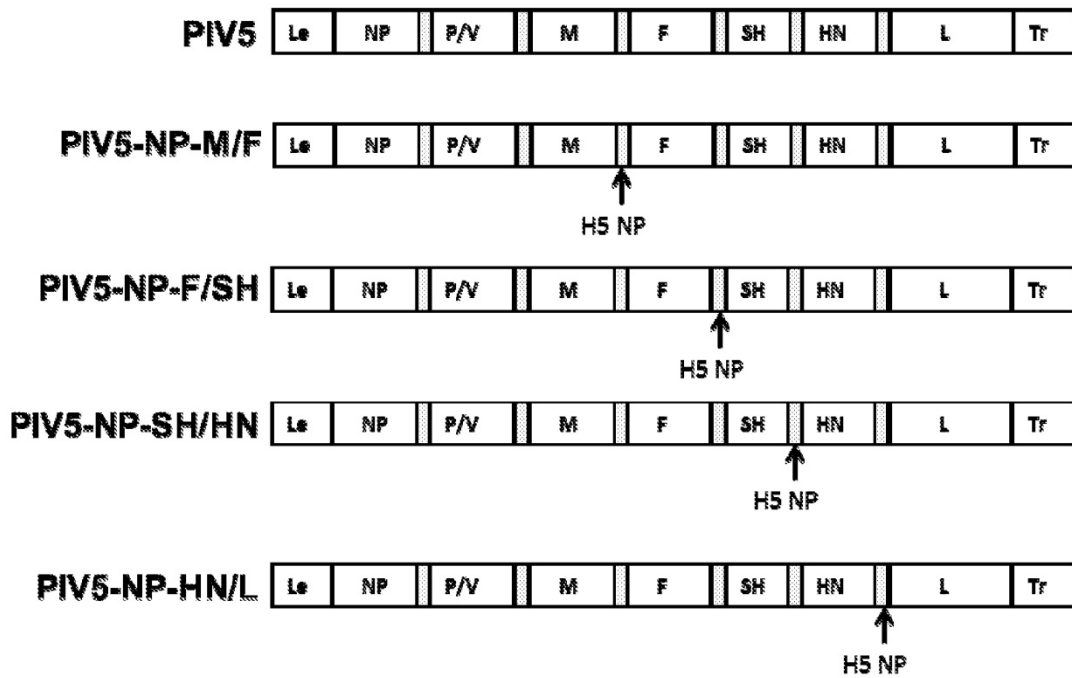


Figura 39A

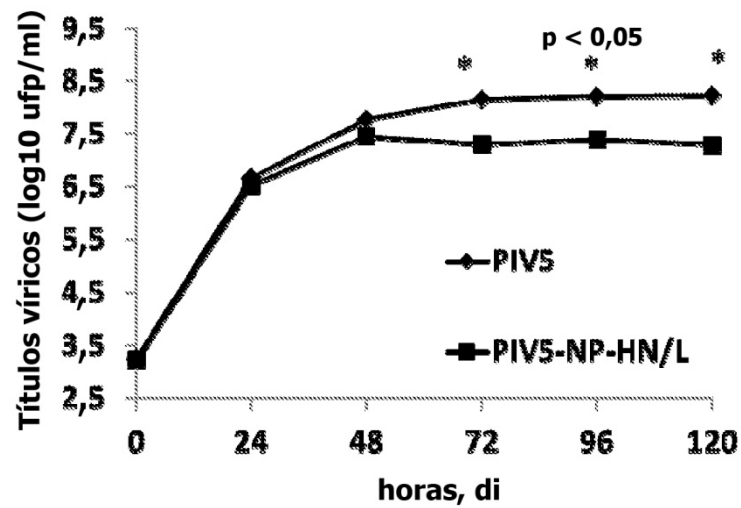


Figura 39B

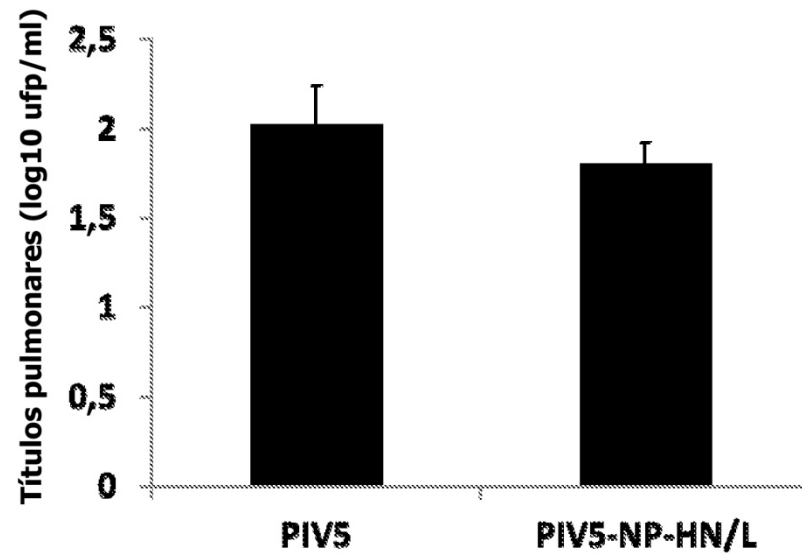


Figura 40

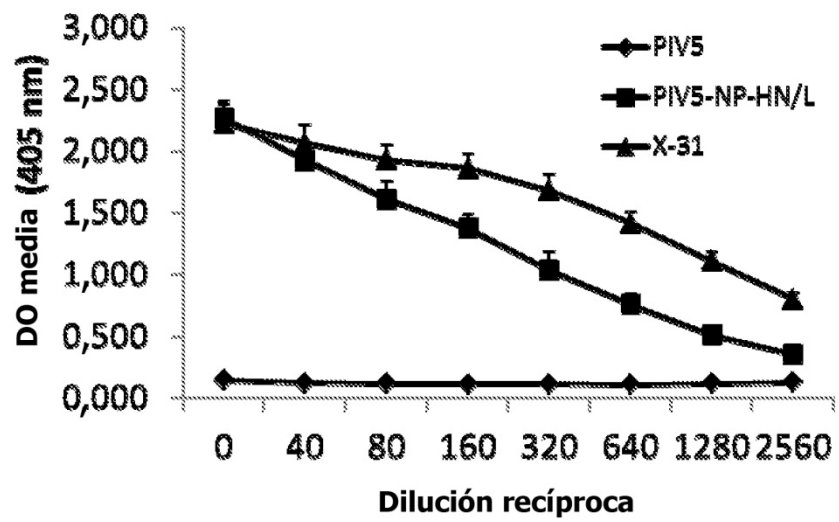


Figura 41

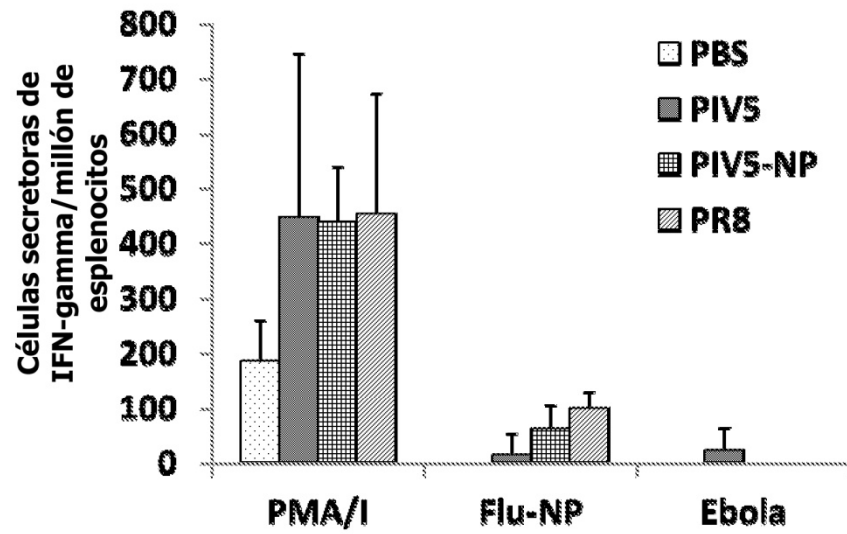


Figura 42A

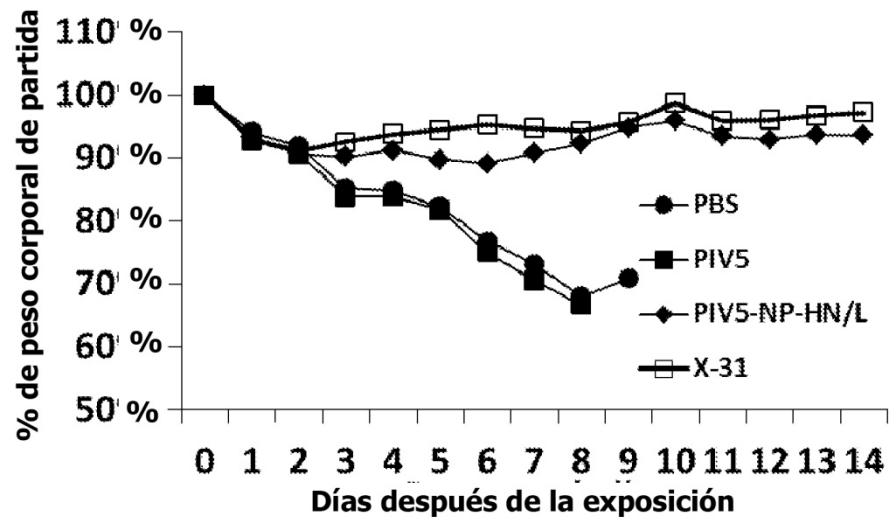


Figura 42B

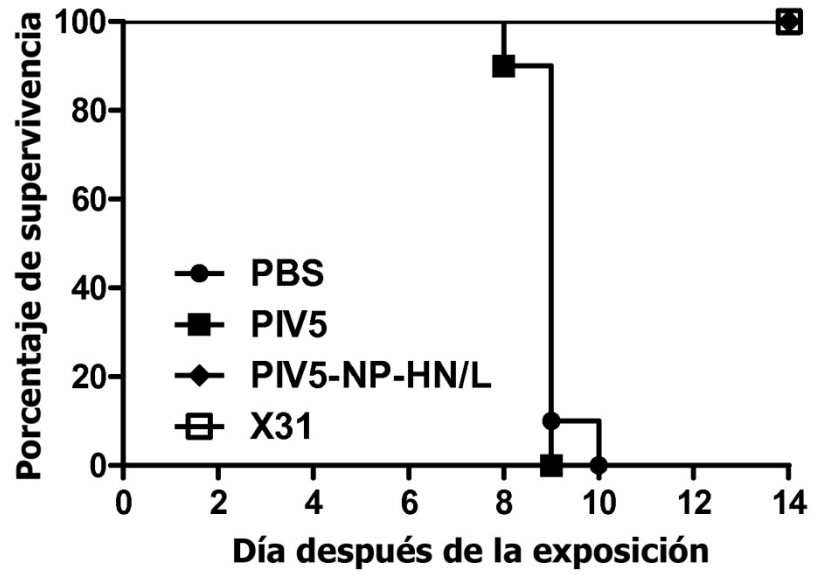


Figura 42C

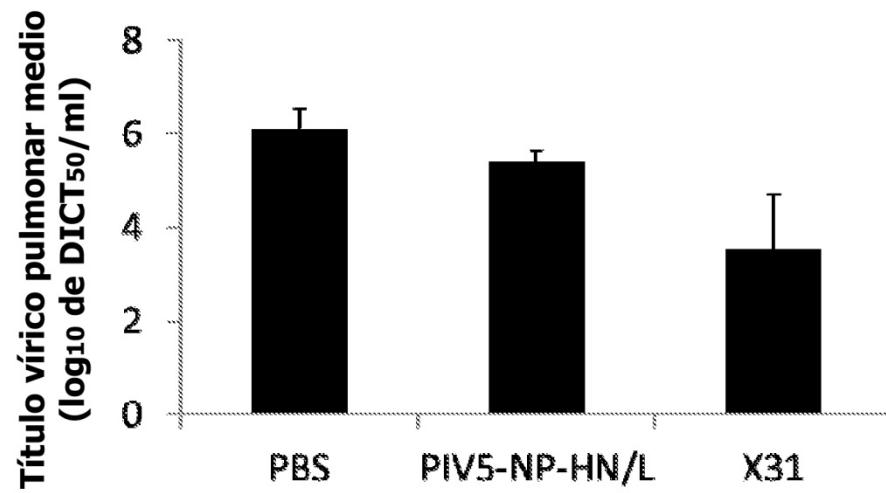


Figura 43A

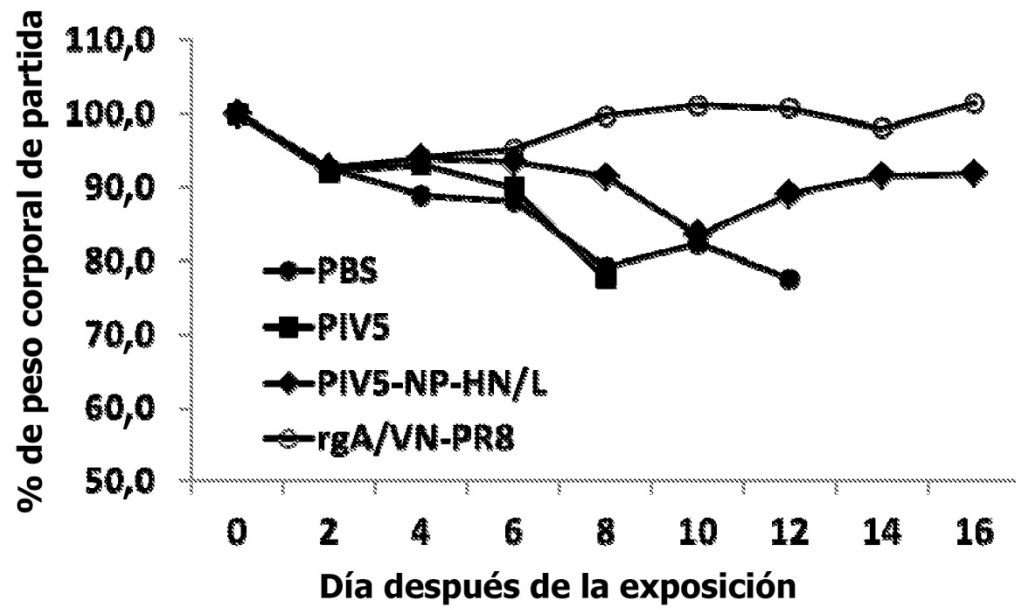


Figura 43B

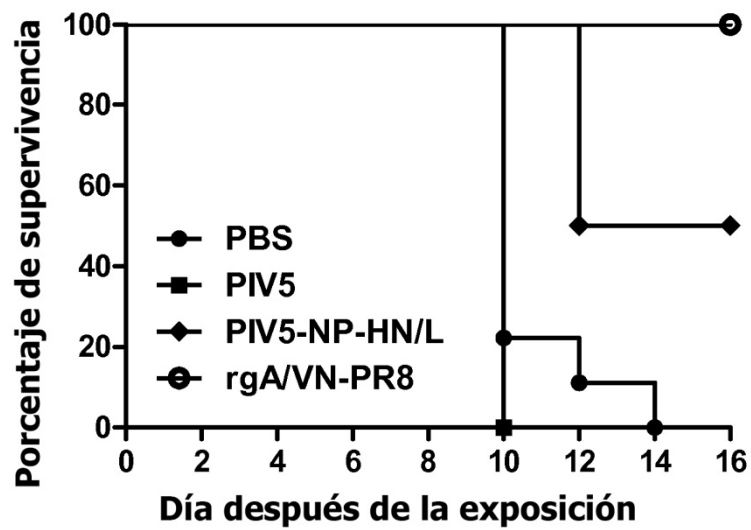


Figura 44A

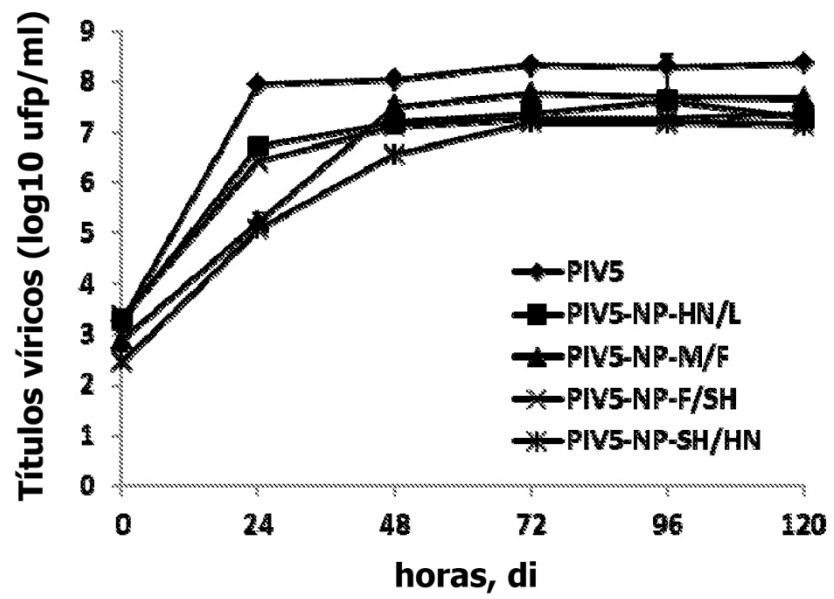


Figura 44B

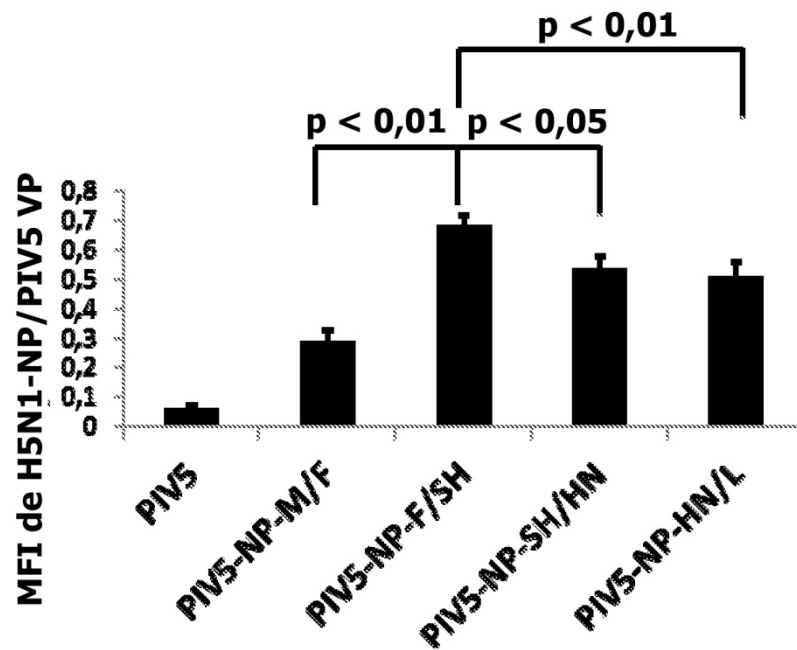


Figura 44C

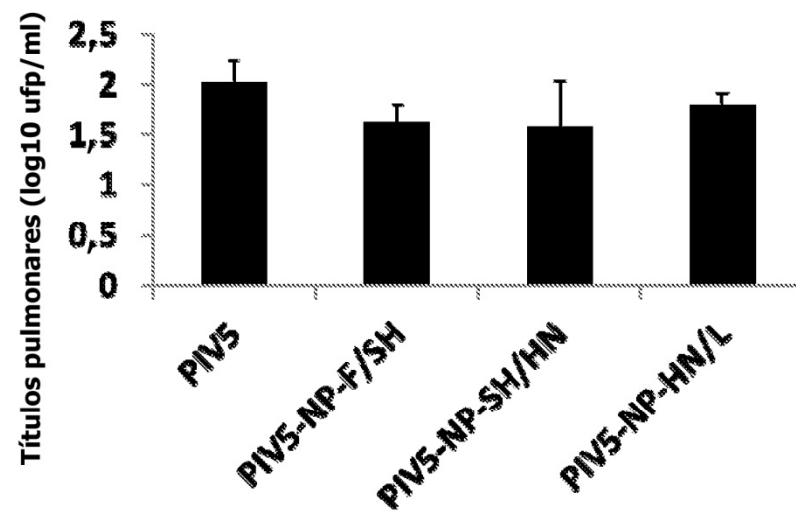


Figura 45

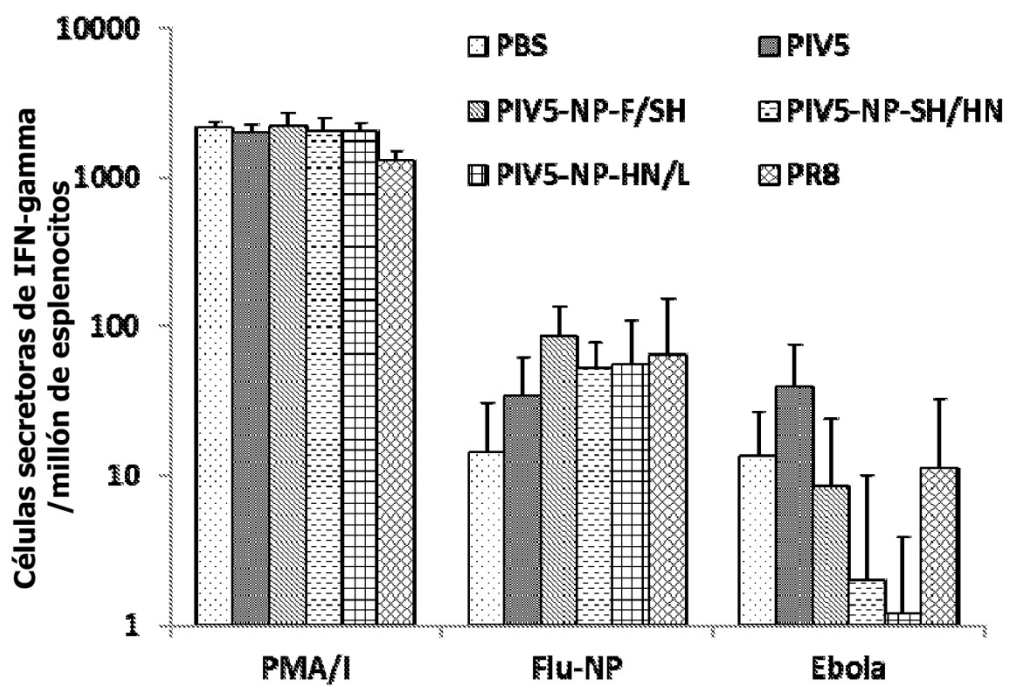


Figura 46A

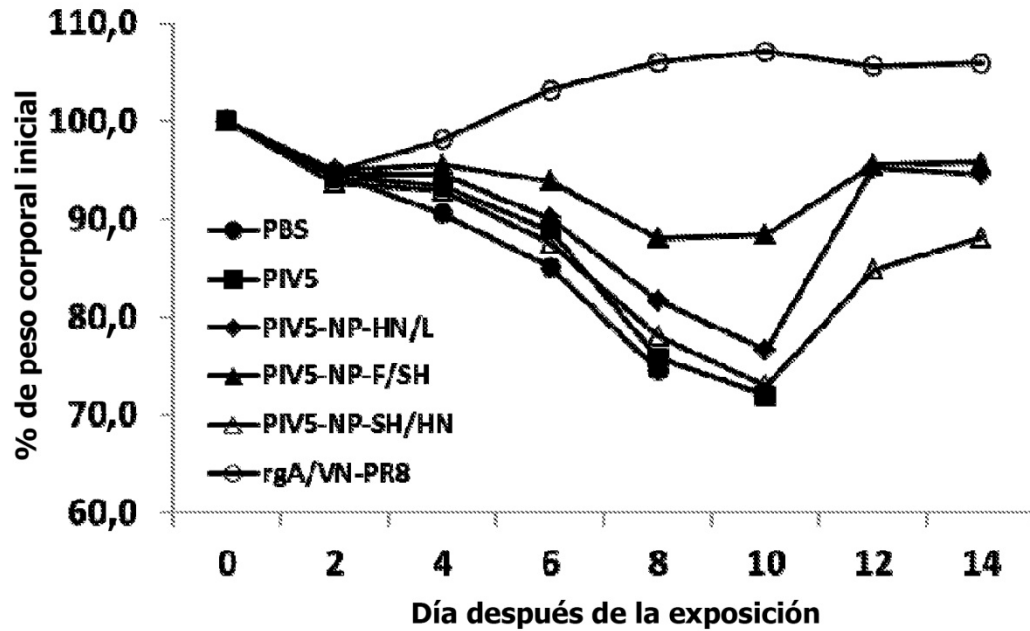


Figura 46B

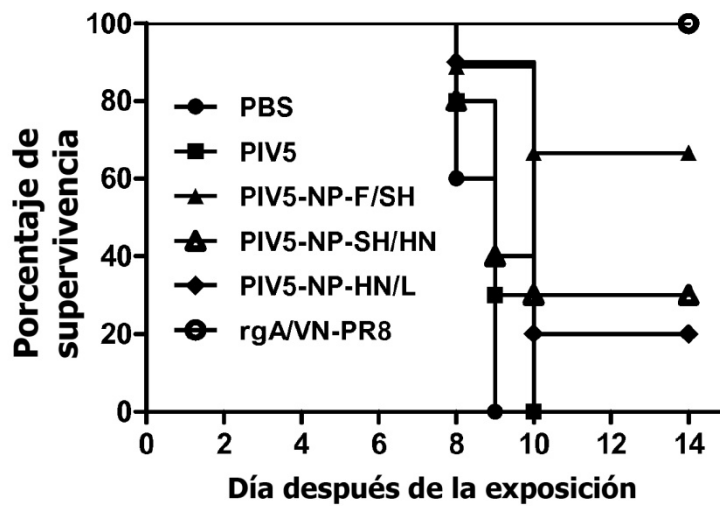


Figura 47A

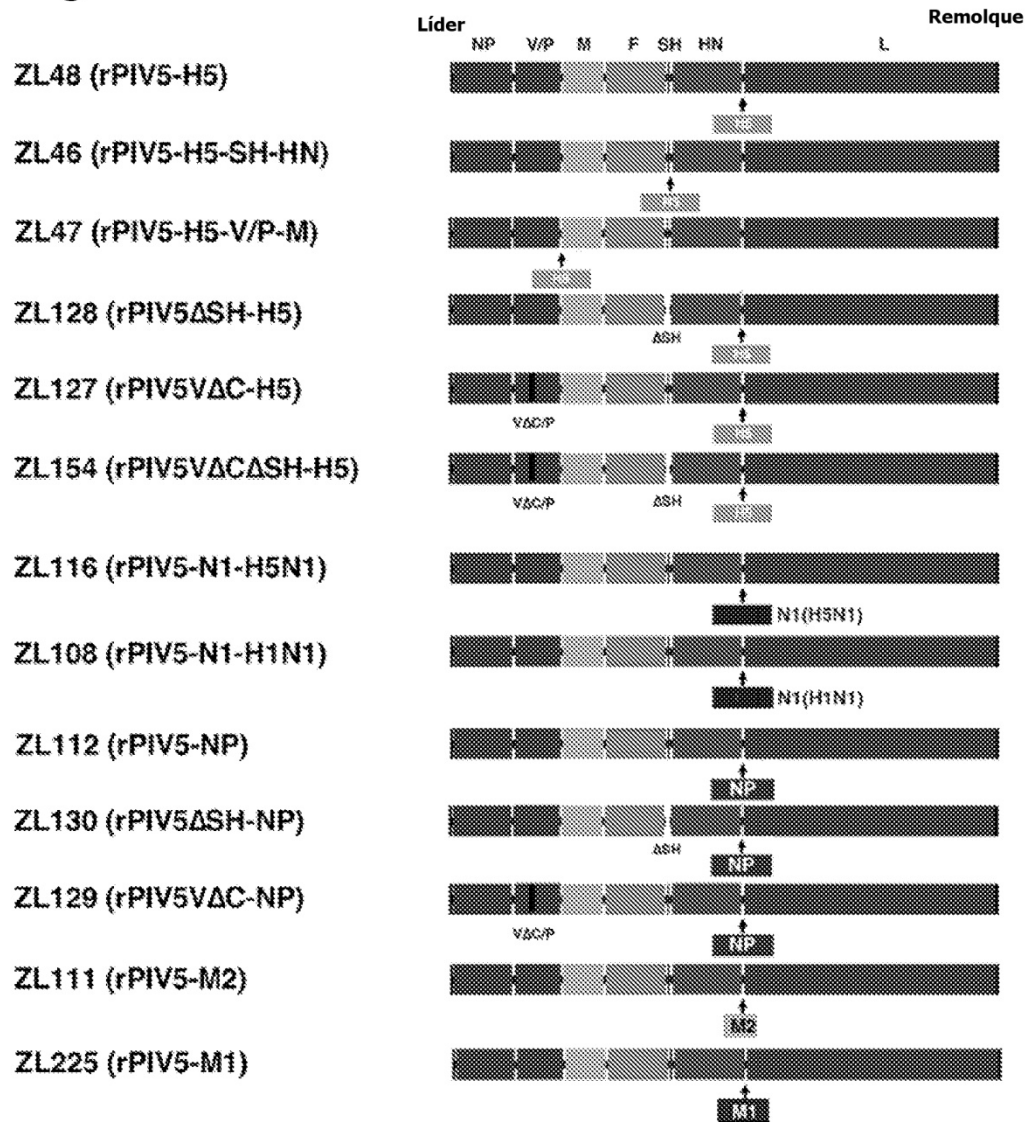


Figura 47B

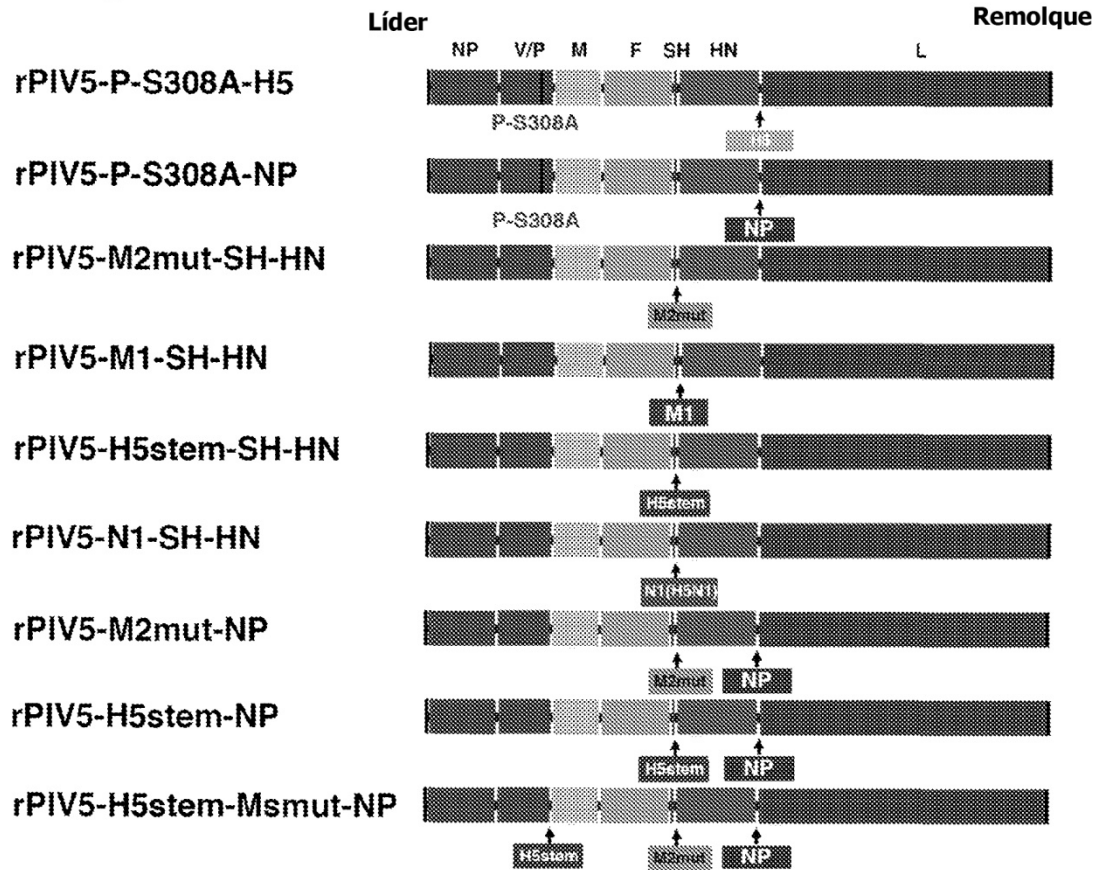


Figura 48

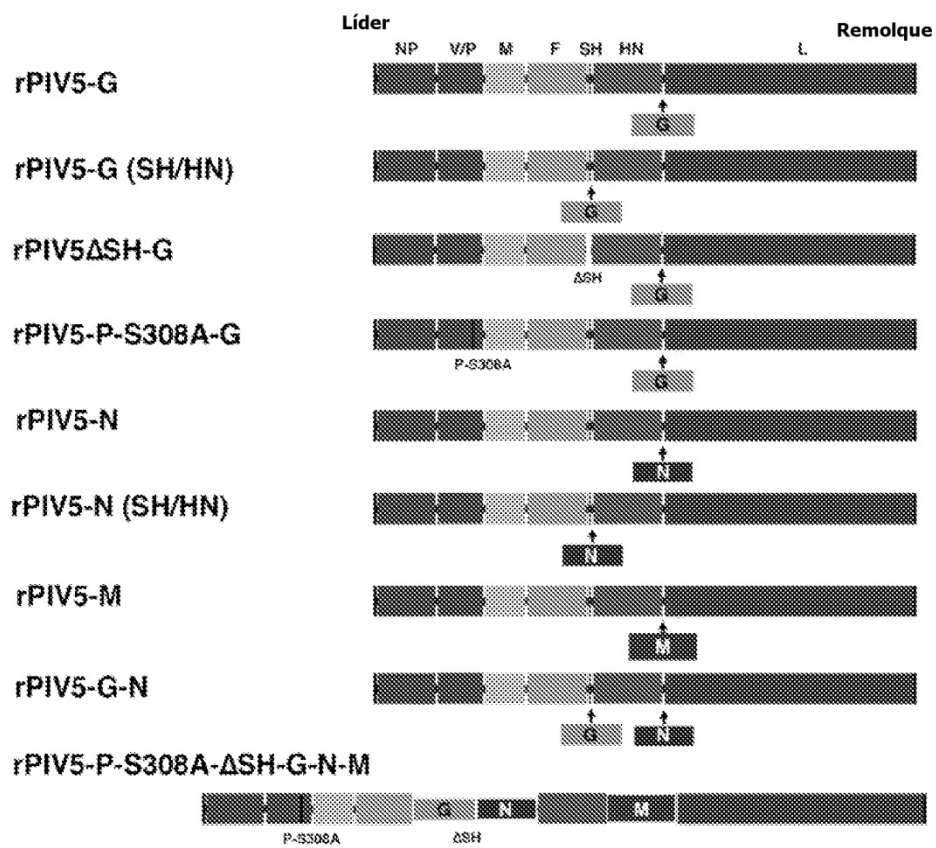


Figura 49A

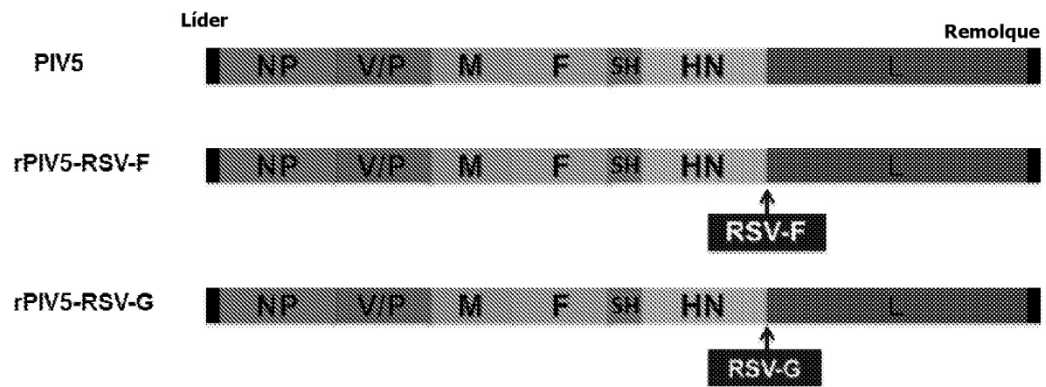


Figura 49B

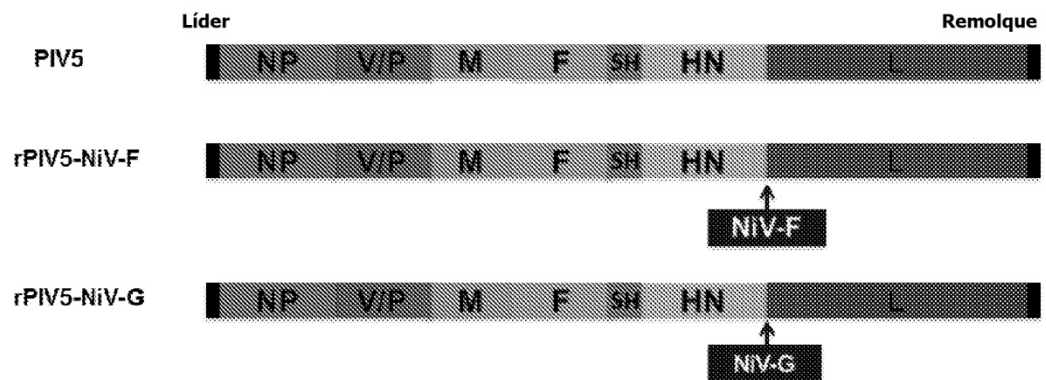


Figura 49C

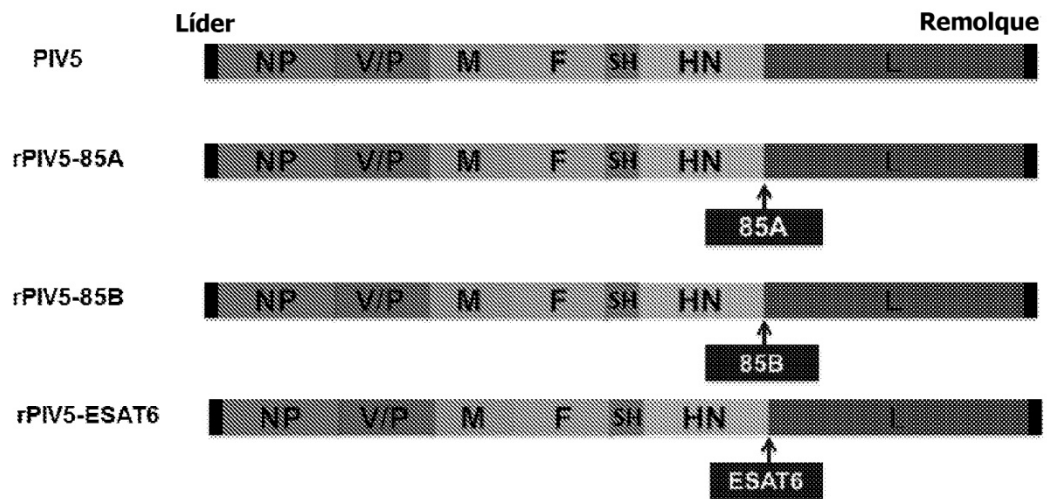


Figura 49D

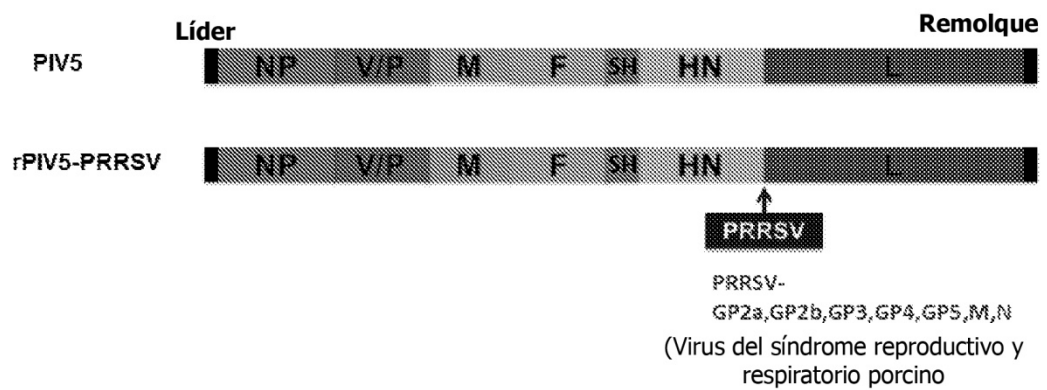


Figura 49E

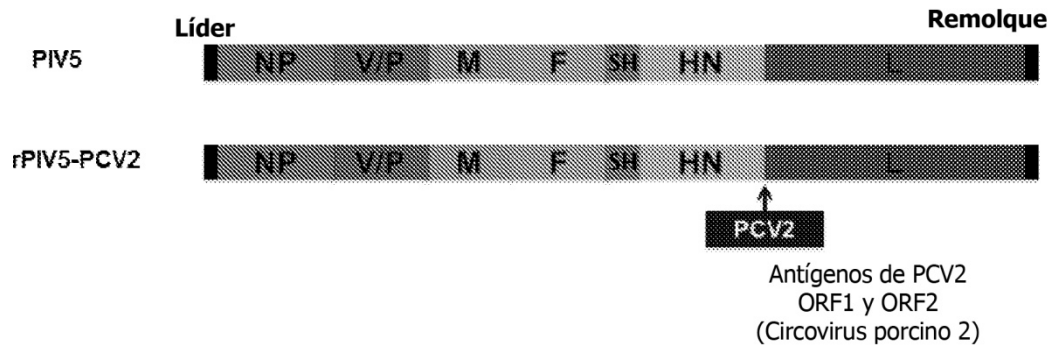


Figura 49F

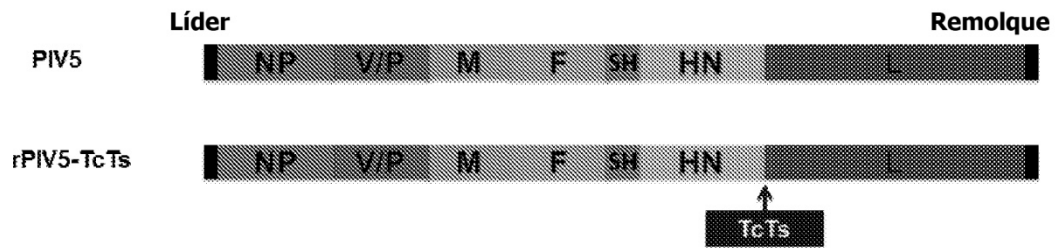


Figura 49G

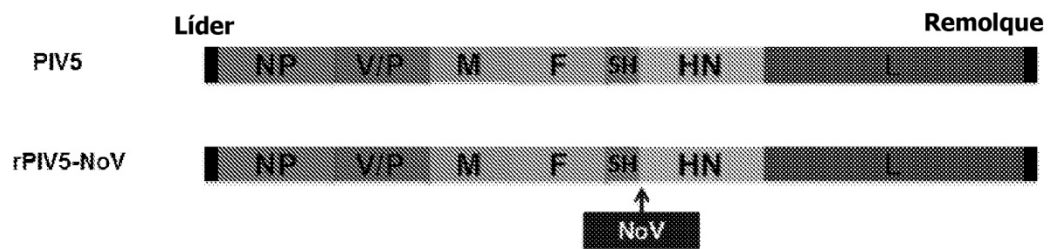


Figura 49H

