



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 719**

51 Int. Cl.:
C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02722030 .0**

96 Fecha de presentación : **18.01.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1362109**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2003**

54 Título: **Complejos de proteína oligomérica recombinante con potencial inmunogénico mejorado.**

30 Prioridad: **18.01.2001 EP 01200193**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.11.2009

73 Titular/es: **Vlaams Interuniversitair Instituut voor
Biotechnologie vzw.
Rijvisschestraat 120
9052 Zwijnaarde, BE**

72 Inventor/es: **De Filette, Marina;
Deroo, Tom, Maria;
Fiers, Walter;
Maras, Marleen y
Min Jou, Willy, Alfons**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 327 719 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

Complejos de proteína oligomérica recombinante con un potencial inmunogénico mejorado.

5 La presente invención se refiere a una proteína quimérica que comprende un antígeno y un dominio de oligomerización. La presente invención se refiere además a complejos de proteína oligomérica recombinante que comprenden dicha proteína quimérica, y al uso de los mismos para la fabricación de una vacuna.

10 Muchos de los antígenos de origen natural, independientemente de su origen, son oligoméricos por naturaleza. Algunos ejemplos no limitantes son Hsp16.3 de *Mycobacterium tuberculosis* y varias toxinas bacterianas. Hsp16.3, un antígeno inmunodominante de *Mycobacterium tuberculosis* con valor serodiagnóstico, aparece como una estructura oligomérica, presumiblemente basada en trímeros (Chang *et al.*, 1996). La toxina del cólera, así como la toxina termolábil estrechamente relacionada de *Escherichia coli*, está compuesta por dos subunidades, A y B, que forman un ensamblaje oligomérico AB₅. La porción de la subunidad B de la toxina del cólera puede usarse como un agente inmunizante en seres humanos, proporcionando protección tanto frente al cólera como frente a la diarrea causada por *E. coli* enterotoxigénica (Sanchez *et al.* 1990). De una forma similar, el oligómero B, que es un constituyente de la toxina pertussis, puede usarse para generar respuestas inmunoprotectoras contra *Bordetella pertussis*.

20 Los antígenos virales también aparecen con frecuencia como estructuras oligoméricas. Como ejemplos no limitantes, puede citarse la glicoproteína B del virus herpes simple tipo 1 (Lin *et al.*, 1996) o la proteína no estructural NS1 de flavivirus, que se ha usado en una vacuna recombinante contra el dengue-2, y que existe normalmente como un homodímero en células infectadas (Winkler *et al.*, 1988). Las moléculas de la envoltura del VIH-1 gp41 y gp120, que pueden ser dianas interesantes para el desarrollo de vacunas, forman igualmente una estructura oligomérica (Burton, 1997). Los antígenos predominantes del virus influenza también son oligómeros. La hemaglutinina (HA) aparece de forma natural como un homotrímero. La neuraminidasa (NA) aparece de forma natural como un homotetrámero, compuesto por dos dímeros unidos por disulfuro que se mantienen juntos por interacciones no covalentes (Laver y Valentine, 1969; Bucher y Kilbourne, 1972; Varghese *et al.*, 1983; Ward *et al.*, 1983). La proteína M2 de influenza también aparece normalmente como un homotetrámero.

30 La mayoría de las vacunas en el mercado son vacunas vivas inactivadas o atenuadas. Estas vacunas se producen con frecuencia en cultivos de células animales, implicando un alto nivel de riesgo biológico debido a la manipulación directa de virus patógenos, y con un alto coste de producción debido a materias primas caras y a procesos de producto complicados.

35 Aunque se supone que los antígenos oligoméricos mantienen su estructura oligomérica en estas vacunas, éste no es siempre el caso. Por ejemplo, en la preparación de vacunas divididas de influenza, los antígenos oligoméricos pueden perder su estructura oligomérica durante la etapa de lisis viral. Para virus influenza, existe una complicación adicional debido al hecho de que experimentan una variación antigénica significativa en sus dos antígenos de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) (deriva antigénica).

40 Debido a la variabilidad de estas dos proteínas, hasta ahora no se ha desarrollado una vacuna contra influenza de amplio espectro y larga duración. La vacuna de influenza comúnmente usada debe adaptarse casi todos los años para seguir la deriva antigénica. Cuando se producen cambios más drásticos en el virus, conocidos como cambios antigénicos, una vacuna anterior ya no es protectora. Las presentes vacunas se basan en material de virus que se ha producido en huevos de pollo. Aunque se ha descubierto que estas preparaciones de vacunas son eficaces frente a una infección por influenza causada por la cepa de virus homóloga, existen varios inconvenientes, tales como el tiempo de producción, que hace imposible comercializar una vacuna adaptada tras un aviso a corto plazo. Además, considerando la deriva antigénica o incluso la aparición súbita de una variante de cambio antigénico, existe el riesgo añadido de seleccionar variantes antigénicas del virus por el propio proceso de cultivo en los huevos (Koduhalli *et al.*, 1995).

50 Por lo tanto, se han destinado esfuerzos considerables al desarrollo de vacunas recombinantes. Las vacunas recombinantes pueden basarse en epítomos seleccionados y, generalmente, son más seguras y más baratas de producir. Además, como se describe por ejemplo en el documento WO9319185, en vacunas recombinantes, el antígeno puede fusionarse a dominios inmunoestimuladores para evitar o limitar el uso de un adyuvante en la preparación de vacuna, o para reforzar la respuesta inmune de epítomos débilmente inmunógenos. Se han desarrollado vacunas recombinantes contra varias enfermedades importantes, tales como sarampión, tétanos, tos ferina, TBC, hepatitis B, cólera e influenza. Varias otras, tales como, por ejemplo, una vacuna recombinante contra el VIH, están en desarrollo.

60 Como ejemplo, se han descrito vacunas recombinantes contra virus influenza en los documentos WO9406468, WO9407533, WO9518861 y WO9520660. Además, se ha desarrollado una vacuna recombinante basada en la proteína de membrana M2, que tiene la ventaja adicional de inducir una protección de amplio espectro a largo plazo (Neirynck *et al.*, 1999; documentos WO9303173, WO9907839, WO9928478).

65 Tanto la NA (Laver y Valentine, 1969; Bucher y Kilbourne, 1972; Varghese *et al.*, 1983; Ward *et al.*, 1983) como la M2 (Sugrue y Hay, 1991) aparecen de forma natural como homotetrámeros. Sin embargo, las preparaciones recombinantes de NA producen homotetrámeros sólo en parte, siendo la parte principal de la preparación monómeros y dímeros.

Aunque podría esperarse que los epítomos antigénicos sean también, si no más, accesibles en estos mono- y dímeros, sorprendentemente, se descubrió que las moléculas tetraméricas eran considerablemente mejores en la generación de una respuesta de anticuerpos específicos. Aunque pueden obtenerse preparaciones tetraméricas de estas moléculas mediante una etapa de purificación adicional de la proteína recombinante, tal como cromatografía de exclusión por tamaño, dicha purificación conduciría a una pérdida importante de rendimiento. Además, no puede excluirse una disociación renovada del material purificado. Por fusión de un dominio de oligomerización con el antígeno de influenza, podría obtenerse una tetramerización espontánea de la proteína de fusión, produciendo una proteína recombinante en una forma casi puramente tetramérica. Sorprendentemente, se descubrió que estos tetrámeros de fusión mostraban una capacidad antigénica aumentada similar a la de la proteína recombinante tetramérica purificada.

El objeto de la invención es proporcionar un complejo de proteínas antigénicas recombinantes altamente inmunógeno, preferiblemente un complejo de proteínas antigénicas de influenza recombinantes.

Un primer aspecto de la invención es proporcionar una proteína quimérica que comprende un antígeno, obtenido de un complejo de proteínas oligoméricas de origen natural, y un dominio de oligomerización. Dicho dominio de oligomerización es heterólogo, es decir, procede de otra proteína distinta a la del antígeno. El dominio de oligomerización está dirigiendo la oligomerización de la proteína quimérica para formar un complejo de proteínas oligoméricas recombinantes. Preferentemente, el grado de oligomerización (dimerica, trimérica, tetramérica o superior) de la proteína quimérica es idéntico al grado de oligomerización del complejo de proteínas de origen natural del que procede el antígeno, y el dominio antigénico de la proteína quimérica se presenta en una estructura terciaria que es similar o idéntica a la estructura terciaria del dominio antigénico en la proteína de origen natural. Preferiblemente, dicho antígeno es un antígeno de influenza. Más preferiblemente, dicho antígeno es la neuraminidasa de influenza o la proteína M2 de influenza, o un fragmento funcional de las mismas. Más preferiblemente, dicho antígeno se selecciona del grupo que consiste en neuraminidasa de influenza A, M2 de influenza A o proteína NB de influenza B. Los especialistas en la técnica conocen dominios de oligomerización y se han descrito, entre otros, en los documentos WO9637621, WO9818943, WO9856906, WO9962953 y WO0069907. Preferentemente, el dominio de oligomerización es una cremallera de leucina. Más preferentemente, el dominio de oligomerización es una cremallera de leucina procedente del factor de transcripción de levaduras *GCN4*, o una forma modificada de la misma. Más preferentemente, el dominio de oligomerización es una cremallera de leucina modificada procedente del factor de transcripción de levaduras *GCN4*, como se describe por Harbury *et al.* (1993). Una realización preferida de la invención es la neuraminidasa de influenza B o un fragmento funcional de la misma, tal como el ectodominio de la neuraminidasa B, fusionado con un dominio de oligomerización tal como una cremallera de leucina modificada, procedente del factor de transcripción de levaduras *GCN4*, como se describe por Harbury *et al.* (1993). Otra realización preferida es la proteína NB de influenza B o un fragmento funcional de la misma, fusionada con un dominio de oligomerización.

Un objetivo de la presente invención es presentar el complejo de proteínas recombinantes en una conformación que se asemeje a la conformación del complejo de proteínas de origen natural. En los casos en los que el complejo de proteínas de origen natural tiene una actividad enzimática definida, como en el caso de la neuraminidasa de influenza, el complejo de proteínas recombinantes tendrá una actividad enzimática comparable.

Aparte del dominio de oligomerización y del antígeno, la proteína quimérica puede comprender otras secuencias polipeptídicas, tales como secuencias enlazadoras o secuencias polipeptídicas que aumenten la respuesta inmune. El especialista en la técnica conoce dichas secuencias polipeptídicas que aumentan la respuesta inmune e incluyen, como un ejemplo no limitante, una más o más copias del fragmento d de la tercera proteína del complemento (C3d; Dempsey *et al.*, 1996) o el fragmento C de la toxina tetánica o el fragmento A o B de la enterotoxina de *Escherichia coli* o epítomos de células T procedentes del mismo patógeno que el antígeno.

Otro aspecto de la invención es un complejo de proteínas oligoméricas recombinantes que comprende una proteína quimérica de acuerdo con la invención. Preferentemente, dicho complejo de proteínas oligoméricas recombinantes es un dímero o un tetrámero. Más preferentemente, dicho complejo de proteínas oligoméricas recombinantes es un homodímero o un homotetrámero. Preferiblemente, dicho complejo de proteínas oligoméricas genera una respuesta inmune superior que la subunidad monomérica. Una realización preferida de la invención es un complejo de proteínas oligoméricas recombinantes que tiene una actividad enzimática comparable a la del complejo de proteínas oligoméricas de origen natural del que procede el antígeno incluido en la proteína quimérica que forma dicho complejo de proteínas oligoméricas recombinantes.

Otro aspecto más de la invención es un ácido nucleico, que codifica una proteína quimérica de acuerdo con la invención. Una realización preferida es un ácido nucleico que comprende la secuencia presentada en la SEC ID N° 1. Otra realización preferida es un ácido nucleico que comprende la secuencia presentada en la SEC ID N° 3. Otra realización preferida más es un ácido nucleico que comprende la secuencia presentada en la SEC ID N° 5.

Una realización especial es un ácido nucleico de acuerdo con la invención que puede usarse en una vacunación con ADN. El especialista en la técnica conoce vectores para la vacunación con ADN y se describen, entre otros, en los documentos WO9604394, WO9728259 y WO9908713. Se han descrito métodos para la vacunación con ADN, entre otros, en el documento WO0012121.

Un aspecto adicional de la invención es un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención y que permite la expresión de una proteína quimérica de acuerdo con la invención. Dicho vector de ex-

presión puede ser cualquier vector de expresión eucariota o procariota, como sabe el especialista en la técnica. En una realización preferida, el vector de expresión es pACGCN4NAs (Depósito en BCCM - (nº depósito LMBP 4270)), que comprende el dominio antigénico principal de NA, en el que la parte N-terminal se ha sustituido por una cremallera de leucina modificada procedente del factor de transcripción de levaduras *GCN4*, que está imponiendo la tetramerización (Harbury *et al.*, 1993). Esta construcción se fusiona con la señal de secreción de la hemaglutinina de influenza y la construcción se coloca bajo el control del promotor de polihedrina de baculovirus. Otra realización preferida es pACsM2eGCN4 (nº depósito LMBP 4271), que comprende el ectodominio de M2, fusionado en su extremo N-terminal con la señal de secreción de GP67 de Baculovirus y en su extremo C-terminal con la cremallera de leucina de tetramerización modificada procedente del factor de transcripción de levaduras *GCN4* (Harbury *et al.*, 1993). Otra realización preferida más es pACsM2eGCN4C3d (Depósito en BCCM - (nº depósito LMBP 4463)), en la que dicho ectodominio de M2, colocado después de la señal de secreción de GP67 de Baculovirus y fusionado con la cremallera de leucina de GCN4, se fusiona con el dominio C3d.

Otro aspecto más de la invención es una célula hospedadora transformada con un vector de expresión de acuerdo con la invención. Dicha célula puede ser cualquier célula hospedadora procariota o eucariota. El especialista en la técnica conoce procedimientos de transformación.

Un aspecto adicional de la invención es el uso de una proteína quimérica de acuerdo con la invención y/o el uso de un complejo de proteínas oligoméricas recombinantes de acuerdo con la invención para la preparación de una vacuna contra influenza. Una realización especial es el uso de dicha proteína quimérica, en el que dicha proteína quimérica comprende la SEC ID N° 2, SEC ID N° 4 o SEC ID N° 6. La proteína quimérica también puede usarse para generar anticuerpos monoclonales o policlonales usando procedimientos conocidos por el especialista en la técnica, por lo que dichos anticuerpos pueden usarse para fines de diagnóstico o terapéuticos. Pueden ser especialmente útiles anticuerpos humanos o humanizados como agentes terapéuticos para personas con una respuesta inmune disminuida, tales como pacientes con VIH.

Otro aspecto más de la invención es una vacuna contra influenza que comprende una proteína quimérica y/o un complejo de proteínas oligoméricas recombinantes de acuerdo con la invención.

Otro aspecto más de la invención es una es una vacuna contra influenza que comprende una forma tetramérica sustancialmente pura de un antígeno de influenza recombinante. En una realización preferida, dicho antígeno de influenza recombinante es neuraminidasa de influenza recombinante o un fragmento funcional de la misma. En otra realización preferida, dicho antígeno de influenza recombinante es M2 recombinante o un fragmento funcional de la misma.

Más preferiblemente, dicha vacuna de influenza se fusiona con un dominio de oligomerización heterólogo, más preferiblemente, dicha vacuna de influenza se fusiona con la cremallera de leucina de tetramerización modificada procedente del factor de transcripción de levaduras *GCN4* (Harbury *et al.*, 1993). Una realización preferida es una vacuna que comprende una forma tetramérica sustancialmente pura de neuraminidasa o un fragmento funcional de la misma, en la que dicha forma tetramérica sustancialmente pura tiene una actividad enzimática que es comparable a la neuraminidasa de influenza de origen natural.

Otro aspecto más de la invención es el uso de una proteína quimérica de acuerdo con la invención y/o el uso de un complejo de proteínas oligoméricas recombinantes de acuerdo con la invención para seleccionar inhibidores de la actividad biológica del complejo de proteínas de origen natural. Una realización preferida es dicho uso para seleccionar inhibidores de neuraminidasa de influenza A o influenza B o inhibidores de M2 de influenza A o de proteína NB de influenza B.

En particular, se describe lo siguiente.

- (i) Un complejo de proteínas oligoméricas recombinantes que comprende:
 - un antígeno de influenza oligomérico que puede generar una respuesta inmune contra un virus influenza y
 - un dominio de oligomerización de cremallera de leucina

en el que cada subunidad de dicho antígeno de influenza oligomérico está unida al dominio de oligomerización de cremallera de leucina y

en el que dicho complejo de proteínas oligoméricas recombinantes es un di-, tri- o tetrámero.
- (ii) Un complejo de proteínas oligoméricas recombinantes como se ha expuesto en (i) anteriormente, en el que dicho dominio de oligomerización de cremallera de leucina es la cremallera de leucina de GCN4.
- (iii) Un complejo de proteínas oligoméricas recombinantes como se ha expuesto en cualquiera de (i) o (ii) anteriormente, en el que dicho antígeno de influenza es neuraminidasa de influenza, M2 de influenza A o NB de influenza B, o un fragmento de cualquiera de las mismas.

- (iv) Un ácido nucleico que codifica una subunidad de un antígeno de influenza oligomérico y un dominio de oligomerización de cremallera de leucina como se ha expuesto en (i)-(iii) anteriormente.
- (v) Un ácido nucleico como se ha expuesto en (iv) anteriormente, que comprende la secuencia presentada en la SEC ID N° 1, SEC ID N° 3 o SEC ID N° 5.
- (vi) Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico como se ha expuesto en (iv)-(v) anteriormente.
- (vii) Una célula hospedadora que comprende un vector de expresión como se ha expuesto en (vi) anteriormente.
- (viii) Uso de un complejo de proteínas como se ha expuesto en (i)-(iii) anteriormente, o un ácido nucleico como se ha expuesto en (iv)-(v) anteriormente, para la preparación de una vacuna de influenza.
- (ix) Una vacuna de influenza que comprende un complejo de proteínas como se ha expuesto en (i)-(iii) anteriormente, o un ácido nucleico como se ha expuesto en (iv)-(v) anteriormente.

Definiciones

- La expresión *proteína quimérica*, como se usa en este documento, significa que la proteína está compuesta por al menos dos polipéptidos, que no aparecen en la misma proteína de forma natural.
- El término *antígeno*, como se usa en este documento, se refiere a un antígeno procedente de una proteína oligomérica de origen natural de un organismo o microorganismo patógeno, incluyendo virus, y puede usarse en un hospedador, preferiblemente, pero sin limitación, un hospedador humano, para generar una respuesta inmune contra dicho organismo o microorganismo patógeno.
- Un *complejo de proteínas oligoméricas recombinantes* es un complejo de proteínas en el que al menos una de las subunidades es una proteína quimérica que comprende un dominio de oligomerización.
- La expresión *antígeno recombinante*, como se usa en este documento, significa que dicho antígeno se produce por técnicas de ADN recombinante. El antígeno puede producirse en cualquier célula hospedadora procariota o eucariota, tal como, como un ejemplo no limitante, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* o *Kluyveromyces* sp., células fúngicas, células de insecto, células vegetales o células de mamífero.
- La expresión *actividad enzimática comparable* significa que tanto el complejo de proteínas de origen natural como el complejo de proteínas oligoméricas recombinantes pueden realizar al menos una transformación bioquímica idéntica de al menos un sustrato, pero que la actividad específica de los complejos enzimáticos puede ser diferente. Una transformación bioquímica idéntica significa que el sustrato se transforma por la acción de la actividad enzimática en un producto final idéntico o productos finales idénticos.
- La expresión *forma tetramérica sustancialmente pura* de un antígeno recombinante significa que dicho antígeno recombinante está al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90% en la forma tetramérica.
- Un *fragmento funcional* de neuraminidasa de influenza o de M2 de influenza es cualquier fragmento que puede generar una respuesta inmune contra un virus influenza. Como un ejemplo no limitante, un fragmento funcional de M2 de influenza es el ectodominio de M2.
- A menos que se mencione explícitamente como vacuna de ADN, el término *vacuna*, como se usa en este documento, puede ser cualquier vacuna basada en proteínas, incluyendo vacunas inyectables así como vacunas de administración por vía mucosa.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Construcción de pACGCN4NAs

Ph_{prom}: promotor de polihedrina
sHA: señal de secreción de la hemaglutinina de influenza
GCN4: cremallera de leucina de GCN4 modificada
NA: neuraminidasa
bla: β -lactamasa
ori: origen de replicación
línea gris gruesa: región de homología de baculovirus

ES 2 327 719 T3

Figura 2: Construcción de pACsM2eGCN4

Phprom: promotor de polihedrina

sGP67: señal de secreción de la proteína GP67 de baculovirus

M2e : parte extracelular de M2 (ectodominio de M2)

GCN4: cremallera de leucina de GCN4 modificada

bla: β -lactamasa

ori: origen de replicación

línea gris gruesa: región de homología de baculovirus

Figura 3: Diagrama de flujo para la construcción de pACsM2eGCN4C3d. Sólo se han indicado los sitios de restricción relevantes para el procedimiento de clonación.

Figura 4: Respuesta de anticuerpos contra diferentes subformas oligoméricas de neuraminidasa recombinante.

Figura 5: Supervivencia de ratones vacunados con diferentes subformas oligoméricas de neuraminidasa recombinante después de una exposición letal a virus influenza homólogo adaptado a ratón.

Figura 6: Análisis de la expresión de GCN4NAs por transferencia de Western.

Figura 7: Patrón de gradiente de sacarosa de neuraminidasa secretada y GCN4NAs química secretada.

Figura 8: Estructura propuesta de GCN4NAs basada en la estructura conocida de sus dos dominios constituyentes.

Figura 9: GCN4NAs es un tetramero como se muestra por entrecruzamiento químico de sus subunidades.

Carril 1: incubación de 30 min de GCN4NAs con BS3 1,2 mM

Carril 2: incubación de 5 min de GCN4NAs con BS3 1,2 mM

Carril 3: incubación de 30 min de GCN4NAs con BS3 0,6 mM

Carril 4: incubación de 5 min de GCN4NAs con BS3 0,6 mM

Carril 5: incubación de 30 min de GCN4NAs con BS3 0,3 mM

Carril 6: incubación de 5 min de GCN4NAs con BS3 0,3 mM

Carril 7: GCN4NAs sin entrecruzante

Carril 8: PM

Figura 10: Caracterización de la expresión de sM2eGCN4.

Figura 11: Análisis mediante SDS-PAGE al 12% de proteínas secretadas por células Sf9 infectadas con baculovirus en medio TC100. Se disolvieron proteínas precipitadas con TCA a partir de 800 μ l de medio en tampón de carga.

Los carriles A1 y B1 se cargaron con proteínas procedentes de células infectadas con baculovirus obtenidos por recombinación con un vector de expresión vacío. Los carriles A2 y B2 se cargaron con proteínas procedentes de células infectadas con baculovirus que contenían la información genética para la expresión de sM2eGCN4C3d.

A: Detección mediante análisis de transferencia de Western usando el anticuerpo monoclonal 2C9 (Neirynck *et al.*, 1999).

B: Se tiñeron proteínas con SyproOrange (Molecular Probes, Eugene, OR., Estados Unidos). Una flecha indica la posición de la proteína recombinante sM2eGCN4C3d.

M1 = Marcadores de peso molecular de proteínas preteñidos "Benchmark" (Gibco BRL, Bethesda, MD., Estados Unidos). M2 = marcadores de peso molecular de proteínas de Molecular Probes (Eugene, OR., Estados Unidos).

Figura 12: Cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex 200 HR (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia).

(A) Perfil de elución después de la separación de una mezcla de proteínas de referencia para calibración.

(B) Perfil de elución de sM2eGCN4C3d recombinante parcialmente purificada; se analizaron fracciones por transferencia de Western como se describe en la leyenda de la figura 11.

Figura 13: sM2eGCN4C3d es un tetrámero como se muestra por entrecruzamiento químico de sus subunidades.

Análisis de transferencia de Western de sM2eGCN4C3d antes (carril 1) y después del tratamiento con agente entrecruzante BS3 4, 6 y 12 mM (carriles 2, 3 y 4, respectivamente). Las proteínas se desnaturalizaron en tampón de Laemmli en presencia de DTT como agente reductor y se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida de gradiente del 5-14%. La transferencia de las proteínas se siguió de exploración con un anticuerpo monoclonal anti-M2 2C9, seguido de un anticuerpo secundario (conjugado de rata anti-IgG de ratón con peroxidasa; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO., Estados Unidos). Se revelaron las señales positivas después de la adición de solución de sustrato quimioluminiscente "Renaissance" (NEN Life Science Products, Boston, MA, Estados Unidos).

Figura 14: Respuesta de anticuerpos contra sM2eGCN4C3d

Se inyectó i. p. a ratones PBS + adyuvante o sM2eGCN4C3d + adyuvante y las inyecciones se repitieron dos veces a intervalos de 2 semanas (consúltese el Ejemplo 13). Se extrajo suero 10 días después de cada inyección y se determinaron los títulos de anticuerpos usando péptido M2e o sM2eGCN4C3d para la inmovilización. Vac, b1 y b2: sueros extraídos después de la primera inyección, primer refuerzo y segundo refuerzo, respectivamente.

Figura 15: Supervivencia de ratones después de una exposición a virus influenza adaptado a ratón

Se inmunizaron ratones Balb/c tres veces con PBS o 10 µg de sM2eGCN4C3d (consúltese el Ejemplo 13) y se expusieron a virus X47 homólogo adaptado a ratón.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de pACGCN4NAs

Todas las amplificaciones por PCR se realizaron usando la polimerasa Vent (New England Biolabs, Beverly, MA, Estados Unidos), con un total de 10 ciclos y 200 ng de plásmido para todas las reacciones. Las condiciones de ciclado eran según se especifica para las amplificaciones individuales. Los oligonucleótidos usados para las construcciones se muestran en la Tabla I.

El vector de transferencia de baculovirus pAC2IVNAs (que contiene la secuencia de ADNc de la neuraminidasa N2 del virus influenza A/Victoria/3/75 cuyo anclaje de membrana se sustituyó por la secuencia señal escindible de la hemaglutinina; descrito en detalle en Deroo *et al.*, 1996) se usó como molde para generar dos productos de PCR usando las parejas de cebadores BACfor/GCN4nh (desnaturalización: 94°C, 1 min; hibridación 57°C, 1 min; síntesis 75°C, 30 s) y GCN4cooh/BACrev (desnaturalización: 94°C, 1 min; hibridación 59°C, 1 min; síntesis 75°C, 2 min 30 s), que se digirieron posteriormente con PstI/HindIII y BclI/XbaI, respectivamente. Después, los fragmentos resultantes y un fragmento de ADN sintético fosforilado en su extremo 5' (pareja de oligonucleótidos complementarios GCN4pos/GCN4neg) se ligaron con el fragmento de vector de 10089 pb PstI/XbaI de pAC2IVNAs. La secuencia insertada en el vector de transferencia de baculovirus obtenido de este modo (pACGCN4NAs), codifica el dominio principal antigénico y catalítico de la neuraminidasa (NA) precedido por una cremallera de leucina de GCN4 modificada que promueve la formación de una proteína tetramérica (Harbury *et al.*, 1993) y por la señal de secreción de la hemaglutinina de influenza (sHA). La expresión del gen de fusión está controlada por el promotor de polihedrina de baculovirus (*Phprom*). El baculovirus recombinante correspondiente (denominado AcNPV[GCN4NAs]) se generó por cotransfección con fosfato de calcio de células de insecto Sf9 con ADN de baculovirus BaculoGold (Pharming, San Diego, CA., Estados Unidos), siguiendo el procedimiento que se describe en King y Possee (1992). La construcción se resume en la Figura 1.

Ejemplo 2

Construcción de pACsM2eGCN4

Después de la amplificación por PCR de la señal de secreción de GP67 de baculovirus (cebadores GP67s y GP67a; desnaturalización: 94°C, 1 min; hibridación 62°C, 1 min; síntesis 75°C, 45 s) a partir de pACGP67A (vector de transferencia de baculovirus adquirido en Pharmingen, San Diego, CA., Estados Unidos) y de la digestión con SpeI/HindIII,

el fragmento se subclonó en la secuencia de vector SpeI/HindIII de pUCC3d (descrito en el ejemplo 3), dando como resultado pUCsgp. Después de la digestión de pUCsgp con HindIII/NaeI, la señal de secreción de GP67 se fusionó con el fragmento M2e (que codifica el ectodominio de la proteína M2) obtenido por amplificación por PCR (cebadores M2Ss y UM2ECa; desnaturalización: 94°C, 1 min; hibridación: 62°C, 1 min; síntesis: 75°C, 20 s) y posterior tratamiento con HindIII. Esta construcción, denominada pUCsgpM2e, se usó como molde para generar un nuevo fragmento de PCR (cebadores GP67s y M2rev; desnaturalización: 94°C, 1 min; hibridación 56°C, 1 min; síntesis 75°C, 30 s) que se digirió con SpeI y BspEI. Después, el fragmento de PCR GCN4 obtenido de pACGCN4NAs (cebadores GCNfor y GCNrev; desnaturalización: 94°C, 1 min; hibridación 58°C, 1 min; síntesis 75°C, 30 s) se ligó junto con el primer fragmento con el fragmento de vector SpeI/BgIII de 9610 pb de pACGP67A. En el vector de transferencia de baculovirus resultante pACsM2eGCN4, la secuencia que codifica el ectodominio de M2 (M2e) se fusiona en su extremo C-terminal con una cremallera de leucina de GCN4 modificada que es capaz de inducir la tetramerización (Harbury *et al.*, 1993) y está precedida por la señal de secreción de GP67 (sGP67) y por el promotor de polihedrina (*Phprom*). El baculovirus recombinante correspondiente (designado AcNPV[sM2eGCN4]) se generó por cotransfección con fosfato de calcio de células de insecto Sf9 con ADN de baculovirus BaculoGold (Pharmingen, San Diego, CA., Estados Unidos), siguiendo el procedimiento que se describe en King y Possee (1992). La construcción se resume en la Figura 2.

Ejemplo 3

Construcción de pACsM2eGCN4C3d

El plásmido pSG5.C3d3.YL (Dempsey *et al.*, 1996) se obtuvo por cortesía del Dr. D. T. Fearon, Departamento de Medicina, Escuela de Medicina de la Universidad de Cambridge, Cambridge, Reino Unido. La información genética de C3d se amplificó primero y se subclonó en el vector pUC18 (Norrander *et al.*, 1983) de la forma siguiente: La secuencia de C3d se amplificó por PCR (cebadores C3ds y C3da, pSG5.C3d3.YL como molde; desnaturalización: 94°C, 30 s; hibridación: 60°C, 20 s; síntesis: 72°C, 2 min) seguido de escisión con SpeI y BgIII para permitir la inserción en el vector intermedio pUC18f digerido con SpeI/BgIII. Este último se ha generado por inserción de un sitio de restricción SpeI en un PUC18 abierto con SmaI, usando el adaptador 5'TCACTAGTGA3', y por inserción de un sitio de restricción BgIII en el vector abierto con HindII, usando el adaptador 5'CAGATCTG3'. El resultado de clonar el fragmento de PCR en pUC18f era el plásmido pUCC3d. El plásmido de partida pSG5.C3d3.YL también se escindió con XbaI, seguido de generación de extremos romos con ADN polimerasa de T4 y de una digestión posterior con BspEI, que proporcionaba un fragmento de 680 pb. Este último se insertó en el vector pUCC3d previamente escindido con SpeI, enromado con ADN polimerasa de T4 y después cortado con BspEI. El resultado era el plásmido pUCC3dEEF. Partiendo del plásmido pACsM2eGCN4 (ejemplo 2) y usando los cebadores GP67s y GCNrev2, la secuencia codificante de sM2eGCN4 se amplificó por PCR (desnaturalización: 94°C, 1 min; hibridación: 57°C, 1 min; síntesis: 75°C, 30 s) y después se trató con SpeI y BamHI. El fragmento resultante se insertó en pACGP67A digerido con SpeI/BamHI (vector de transferencia de baculovirus adquirido en Pharmingen, San Diego, CA., Estados Unidos). Esto proporcionaba la construcción intermedia pACsM2eGCN4f. El plásmido mencionado anteriormente pUCC3dEEF se digirió con BgIII y EcoRI para proporcionar un fragmento de 1094 pb que codifica C3dEEF, que se subclonó en pACsM2eGCN4f abierto con BamHI y EcoRI. Esto proporcionaba el plásmido pACsM2eGCN4C3d. En este vector de transferencia de baculovirus, el promotor de polihedrina (*Phprom*) está seguido de un gen de fusión multicomponente que codifica la señal de secreción de GP67 (sGP67), el ectodominio M2e (M2e), la cremallera de leucina de GCN4, el dominio C3d de ratón y un marcador "EEF" C-terminal. El baculovirus correspondiente (designado AcNPV[sM2eGCN4C3d]) se generó por cotransfección con fosfato de calcio de células de insecto Sf9 con ADN de baculovirus BaculoGold (Pharmingen, San Diego, CA., Estados Unidos), siguiendo el procedimiento que se describe en King y Possee (1992). La construcción se resume en la Figura 3.

Ejemplo 4

Análisis de la respuesta de anticuerpos contra diferentes subformas oligoméricas de neuraminidasa secretada purificada

Se produjo NA recombinante secretada (NAs) mediante un sistema de expresión de baculovirus y, posteriormente, se purificó de acuerdo con Deroo *et al.* (1996). Después de la filtración en gel Superdex 200, que es la etapa final del procedimiento de purificación descrito en Deroo *et al.* (1996), las fracciones correspondientes a NAs monomérica, dimérica y tetramérica se combinaron por separado y se concentraron por ultrafiltración usando dispositivos Centriplus (límite de 10 kDa) (Amicon, Danvers, MA., Estados Unidos). Después se inmunizaron grupos de 12 ratones Balb/c hembra (SCK Mol, Bélgica) tres veces mediante inyección subcutánea de 1 µg de una subforma oligomérica específica en presencia de un adyuvante poco reactógeno, como se describe en Deroo *et al.* (1996). Dos semanas después de cada inmunización, se extrajo sangre de la vena de la cola y se preparó el suero. Las muestras de suero se analizaron posteriormente mediante ELISA. Con este fin, se recubrieron placas de 96 pocillos con NA escindida con pronasa purificada (Deroo *et al.*, 1993) y se incubaron con diluciones de suero de 2 veces. Se midieron los títulos de anticuerpos séricos por adición de anticuerpo de cabra anti-[IgG de ratón] conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., Estados Unidos) y fosfato de p-nitrofenilo (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., Estados Unidos) como sustrato. El título de anticuerpos séricos se corresponde con el valor log₂ del factor de dilución que daba una DO de 0,5 por encima del control. Los ratones inmunizados con NAs tetramérica muestran una respuesta de anticuerpos

superior durante todo el régimen de inmunización (Figura 4). Después de 2 inmunizaciones, se detectó una diferencia de ~17 veces a favor de los ratones inmunizados con NAs tetramérica en comparación con los que recibieron una dosis equivalente de NAs dimérica, y una diferencia de ~137 veces en comparación con el grupo inmunizado con una dosis equivalente de NAs monomérica. La diferente entre vacunas tetraméricas y monoméricas aumentaba aún más después de la tercera inmunización, hasta un factor de ~360.

Ejemplo 5

Supervivencia de ratones expuestos a una dosis letal de virus de influenza después de la vacunación con diferentes subformas oligoméricas de neuraminidasa secretada purificada

Se inmunizaron grupos de 12 ratones Balb/c hembra por vía subcutánea con diferentes subformas oligoméricas de neuraminidasa secretada purificada (NAs), como se resume en el ejemplo 4. Tres semanas después de la tercera inyección, los ratones se expusieron a una dosis potencialmente letal de virus influenza adaptado a ratón (cepa de genoma reordenado X47) como se describe en Deroo *et al.* (1996). No se observó letalidad entre los animales que recibieron una vacuna de NAs tetramérica. Por el contrario, sólo el 75% y el 50% de los animales inmunizados con NAs dimérica y monomérica, respectivamente, sobrevivieron a la exposición (Figura 5).

Ejemplo 6

Análisis de la expresión de GCN4NAs por transferencia de Western

Se inocularon células de insecto Sf9 en fase de crecimiento logarítmico con el baculovirus indicado a una multiplicidad de infección elevada (>10). Las células se transfirieron posteriormente a medio TC100 sin suero (Gibco BRL, Bethesda, MD., Estados Unidos) y se incubaron adicionalmente durante 48 h antes de recoger el sobrenadante. Las proteínas se precipitaron por adición de un volumen equivalente de acetona (pre-equilibrada a -20°C) y posteriormente se analizaron mediante un SDS-PAGE reductor al 12% seguido de transferencia de Western. Se visualizaron las bandas usando un anticuerpo policlonal de IgG de conejo contra neuraminidasa escindida con pronasa, seguido de incubación con un anticuerpo secundario (conjugado de cabra anti-[IgG de conejo] con fosfatasa alcalina; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., SA) y solución de sustrato BCIP/NBT. La neuraminidasa fusionada con GCN4 secretada (GCN4NAs), después de la desnaturalización, es claramente visible como una banda de -55 kDa (Figura 6).

Ejemplo 7

Centrifugación en gradiente de sacarosa de NAs frente a GCN4NAs

Se produjeron neuraminidasa secretada (NAs) y neuraminidasa fusionada con GCN4 secretada (GCN4NAs), como se resume en el ejemplo 4, por infección de células Sf9 con el baculovirus recombinante descrito en Deroo *et al.* (1996) o con AcNPV[GCN4NAs], respectivamente. Se concentró el sobrenadante recogido (10 ml) usando dispositivos Centriplus (límite de 10 kDa) (Amicon, Danvers, MA., Estados Unidos) hasta ~1 ml y se complementó posteriormente con 1 volumen de Tris.Cl 100 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, Triton X-100 al 0,2%, que contiene un combinado inhibidor de proteasas (Complete, Roche Molecular Biochemicals, Basel, Suiza). Como alternativa, cuando se trabajaba con grandes volúmenes de sobrenadante recogido (200 ml), se precipitó la GCN4NAs con sulfato de amonio. El material que precipitaba a una saturación de (NH₄)₂SO₄ de entre el 60% y el 80% se recogió por centrifugación (10000 g, 60 min) y se disolvió en Tris.Cl 50 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, Triton X-100 al 0,2% que contenía un combinado inhibidor de proteasas (Complete, Roche Molecular Biochemicals, Basel, Suiza). Esta solución que contenía GCN4NAs se dializó contra el mismo tampón.

Después de la centrifugación para eliminar componentes insolubles (10 min a 14000 rpm), se cargó una muestra de 1 ml en un gradiente continuo de sacarosa de 30 ml (5%-25%) preparado en Tris.Cl 10 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, Triton X-100 al 0,1% y complementado con inhibidores de proteasas Complete. Los gradientes se centrifugaron a 10°C en un rotor SW28 Beckman durante 16 h a 28000 rpm. Después se recogieron fracciones de 1,5 ml del fondo del gradiente y se analizaron por ELISA y por actividad enzimática. El ELISA se realizó en placas de 96 pocillos recubiertas con una fracción de IgG de conejo generada contra neuraminidasa escindida con pronasa purificada (consúltese el ejemplo 6). Se añadieron fracciones de gradiente a las placas y se detectó la NAs unida por adición de IgG de conejo anti-NA escindida con pronasa conjugada con biotina. Las placas se revelaron por incubación de las mismas con conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Gibco BRL, Bethesda, MD., Estados Unidos) y fosfato de p-nitrofenilo como sustrato. Se leyeron los valores de DO a 405 nm. El análisis de la actividad enzimática se realizó como se describe en Deroo *et al.* (1996). El perfil obtenido con NAs después de la centrifugación en gradiente de sacarosa concuerda con el perfil de filtración en gel de NAs purificada descrito en Deroo *et al.* (1996) y, típicamente, da como resultado dos picos principales que se corresponden con NAs tetramérica catalíticamente activa y NAs dimérica catalíticamente inactiva, respectivamente, representando esta última forma aproximadamente 2/3 de la cantidad total de NAs secretada (Figura 7). La cantidad de NAs monomérica estaba por debajo de los niveles de detección en esta preparación experimental. Por el contrario, la GCN4NAs se secretaba completamente como una proteína tetramérica catalíticamente activa, sin cantidades detectables de formas oligoméricas de menor orden. Su sedimentación a la

ES 2 327 719 T3

misma velocidad que la NAs tetramérica recombinante indica una masa molecular similar. Las actividades enzimáticas específicas relativas de las proteínas purificadas por gradiente de sacarosa se comparan en la Tabla II. Se muestra un modelo del complejo de proteínas tetraméricas recombinantes en la figura 8.

5 Ejemplo 8

Caracterización de GCN4NAs por entrecruzamiento

10 Se concentraron muestras de GCN4NAs parcialmente purificada obtenida por centrifugación en gradiente de sacarosa, como se describe en el ejemplo 7, usando dispositivos Microcon (límite de 10 kDa) (Amicon, Danvers, MA., Estados Unidos) y se dializaron usando un Spectra/Por Sispodialyzer (límite de 8 kDa) (Spectrum, Rancho Dominguez, CA, Estados Unidos) durante una noche contra PBS para eliminar el tampón Tris. Se obtuvieron entrecruzantes en Pierce (Rockford, IL, Estados Unidos). Se añadió bis(sulfosucinimidil)suberato (BS3) a partir de una solución madre 20 mM en DMSO recién preparada a concentraciones finales de 2 a 6 mM. Las reacciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y se inactivaron durante 15 minutos por adición de tampón Tris, pH 8, a una concentración final de 300 mM. Después del entrecruzamiento, se añadió un volumen equivalente de tampón de carga SDS 2x (SDS al 5%, DTT 100 mM, glicerol al 20%, EDTA 5 mM, tampón Tris 50 mM, pH 8) y la muestra se llevó a ebullición durante 5 minutos. Se realizó un análisis de SDS PAGE en un aparato MiniProtean II (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos) usando geles premoldeados de gradiente del 4-15%. La electrotransferencia de geles de SDS PAGE sobre membranas de nitrocelulosa (NC) se realizó usando una celda Mini Trans-Blot (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos) y requería 45 min a 100 V. Después de eso, las membranas de NC se bloquearon en PBS que contenía BSA al 2% durante 2 h. Las transferencias se incubaron con suero de conejo anti-NA (consúltese el ejemplo 6) diluido (1/5000) en PBS que contenía BSA al 1% y Tween-20 (PBT) al 0,1%. Después de retirar por lavado los anticuerpos no unidos, se añadió suero de cabra anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Organon Teknika, West Chester, PA, Estados Unidos) a una dilución de 1/7000 en PBT. La detección se realizó con NBT/BCIP (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, Estados Unidos). Se usó como referencia un marcador de peso molecular preteñido de amplio intervalo (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos).

30 La incubación de GCN4NAs en presencia del entrecruzante BS3 daba como resultado la formación de oligómeros unidos covalentemente, como se representa en la figura 9. Las especies entrecruzadas principales tienen una masa molecular estimada de 250 kDa y 115 kDa, que se corresponden con tetrámeros y dímeros entrecruzados, respectivamente. La presencia de las formas diméricas disminuía con el aumento de la concentración de entrecruzante. Este resultado confirma los datos obtenidos por sedimentación y por actividad enzimática, indicando todos que la GCN4NAs existe en solución como tetrámero.

Ejemplo 9

40 *Caracterización de la expresión de sM2eGCN4*

Se inocularon células de insecto Sf9 en fase de crecimiento logarítmico con baculovirus AcNPV[sM2eGCN4] (ejemplo 2) o virus de control a una multiplicidad de infección elevada (>10). Posteriormente, las células se transfirieron a medio TC100 sin suero (Gibco BRL, Bethesda, MD., Estados Unidos) y se incubaron adicionalmente durante 48 h antes de recoger el sobrenadante. Las proteínas se precipitaron por adición de un volumen equivalente de acetona (pre-equilibrada a -20°C), se disolvieron en tampón de carga y se separaron mediante SDS-PAGE reductor al 15%, seguido de transferencia de Western. Las bandas se visualizaron usando el anticuerpo monoclonal 2C9 dirigido contra el dominio M2e (Neirynck *et al.* 1999), seguido de incubación con un anticuerpo secundario (de cabra anti-[IgG de ratón]) conjugado con fosfatasa alcalina; (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., Estados Unidos) y solución de sustrato BCIP/NBT. Después de la desnaturalización, se detectó la M2e fusionada con GCN4 secretada (sM2eGCN4) como una banda de ~10,5 kDa (Figura 10).

Ejemplo 10

55 *Caracterización de la expresión de sM2eGCN4C3d*

Se inocularon células de insecto Sf9 en fase de crecimiento logarítmico con baculovirus AcNPV[sM2eGCN4C3d] (consúltese el ejemplo 3) o virus de control ("infección simulada") a una multiplicidad de infección elevada (>10). Posteriormente, las células se transfirieron a medio TC100 sin suero (Gibco BRL, Bethesda, MD., Estados Unidos) y se incubaron adicionalmente durante 48 h antes de recoger el sobrenadante. Las proteínas se analizaron por precipitación con TCA enfriado en hielo y, posteriormente, se separaron mediante SDS-PAGE reductor al 12% seguido de tinción con SyproOrange (Molecular Probes, Eugene, OR., Estados Unidos). La sM2eGCN4C3d secretada se reveló como una banda de ~41 kDa, que no estaba presente en el medio de células Sf9 con infección "simulada" (Figura 11). Para la infección "simulada" se ha generado un baculovirus por cotransfección con fosfato de calcio de células Sf9 con un vector de transferencia pACGP67A sin inserto para expresión y ADN de baculovirus BaculoGold (Pharmingen, San Diego, CA., Estados Unidos), siguiendo el procedimiento que se describe en King y Possee (1992).

Mediante transferencia de Western, la sM2eGCN4C3d se visualizó de nuevo como una banda de ~41 kDa usando el anticuerpo monoclonal anti-M2e 2C9 (Neiryck *et al.*, 1999), seguido de incubación con un anticuerpo secundario (conjugado de rata anti-[IgG de ratón] con peroxidasa; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., Estados Unidos) y solución de sustrato de quimioluminiscente "Renaissance" (NEN Life Science Products, Boston, MA., Estados Unidos). Se detectó la misma banda cuando se usó anticuerpo monoclonal de rata YL 1/2 contra el marcador "EEF" (Abcam Ltd, Cambridge, Reino Unido) o anticuerpo policlonal de oveja contra la proteína 3 del complemento de ratón (Biogenesis, Poole, Reino Unido). Se usaron los siguientes anticuerpos secundarios: monoclonales de ratón anti-cadenas ligeras kappa y lambda de rata (clones RT-39 y RL-6) conjugados con fosfatasa alcalina y de burro anti-IgG de oveja conjugado con fosfatasa alcalina, respectivamente (Sigma, St. Louis, MO., Estados Unidos).

Para una caracterización adicional, las proteínas transferidas se tiñeron con negro amido, la banda de ~41 kDa se aisló por corte de la membrana y el análisis de secuencia N-terminal se realizó de acuerdo con Bauw *et al.* (1987). Los primeros cuatro aminoácidos se identificaron como serina, leucina, leucina y treonina, respectivamente. Este resultado demuestra que la escisión de la secuencia señal de GP67 se ha llevado a cabo correctamente y confirma que la banda de ~41 kDa es sin ninguna duda sM2eGCN4C3d.

Ejemplo 11

Caracterización del estado oligomérico de sM2eGCN4C3d

Se produjo sM2eGCN4C3d recombinante secretada mediante un sistema de expresión de baculovirus como se describe en el ejemplo 10. Se llevaron a cabo las siguientes etapas de purificación, que se resumen en la Tabla III: En primer lugar, se fraccionó el medio bruto mediante precipitación diferencial con sulfato de amonio. Se añadió sulfato de amonio al medio, enfriado en hielo, hasta una saturación del 45% y las proteínas precipitadas se retiraron por centrifugación (rotor Sorvall SS34, 1 hora a 15000 rpm, 4°C). La concentración de (NH₄)₂SO₄ se aumentó hasta una saturación del 95% y el precipitado resultante se recogió por centrifugación. El sedimento se volvió a disolver en tampón Tris.Cl 50 mM, pH 7,2 (aproximadamente 1/20 del volumen original del medio) y se desalinizó sobre una columna HiPrep Sephadex G25 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) equilibrada en Tris.Cl 50 mM, pH 7,2. La solución de proteína desalinizada se cargó en una columna Q-Sepharose FF (a: 9 cm, d: 1,5 cm; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) equilibrada en tampón Tris 50 mM, pH 7,2 y la elución fue mediante un gradiente salino de NaCl de 200 a 400 mM en tampón Tris 20 mM, pH 7,2. Se usó una alícuota de 100 µl de cada fracción para análisis: Se precipitaron las proteínas mediante TCA a partir de alícuotas de 100 µl de cada fracción en la preparación para un análisis mediante SDS-PAGE al 12% seguido de transferencia de Western y exploración con el anticuerpo monoclonal anti-M2e 2C9 (Neiryck *et al.*, 1999), (consúltese ejemplo 9), usando como anticuerpo secundario (conjugado de rata anti-[IgG de ratón] con peroxidasa; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., Estados Unidos) y solución de sustrato quimioluminiscente "Renaissance" (NEN Life Science Products, Boston, MA., Estados Unidos). Se combinaron las fracciones positivas y la solución se concentró usando dispositivos de ultrafiltración Vivaspín-30 y Centricon-100 (Millipore Corporation, Bedford, MA., Estados Unidos).

Aproximadamente el 99% de la proteína recombinante quedó retenida en la membrana Centricon-100, sugiriendo que la masa molecular del oligómero sM2eGCN4C3d era superior a 100 kDa, como se esperaba para un tetrámero.

Para verificar adicionalmente el estado oligomérico de sM2eGCN4C3d, se cargaron 150 µl de la proteína recombinante concentrada parcialmente purificada en una columna de filtración en gel Superdex 200 HR (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), equilibrada en PBS y se resolvieron a un caudal de 0,4 ml/min. Esta columna Superdex 200 se había calibrado previamente usando una mezcla de proteínas altamente purificadas (kits de calibración HMW y LMW (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia)). Como se muestra en la Figura 12, se detectó solamente sM2eGCN4C3d en fracciones casi coincidentes con las de la aldolasa (masa molecular teórica 179 kDa), como puede esperarse para la sM2eGCN4C3d tetramérica.

Ejemplo 12

Caracterización del estado oligomérico de sM2eGCN4C3d mediante entrecruzamiento

Se incubaron muestras (10 µl) de sM2eGCN4C3d parcialmente purificada (aproximadamente 0,5 µg en PBS; consúltese el ejemplo 11) con el entrecruzante BS3 (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos) a concentraciones finales de 4 a 12 mM. El entrecruzante se añadió a partir de una solución madre 40 mM en DMSO recién preparada. Las reacciones se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se inactivaron durante 15 minutos por adición de tampón Tris 1 M, pH 7,5, a una concentración final de 300 mM. Después de la incubación, se añadió un volumen equivalente de tampón de carga SDS 2x (SDS al 5%, DTT 100 mM, glicerol al 20%, EDTA 5 mM, tampón Tris 50 mM, pH 8) y las muestras se llevaron a ebullición durante 5 minutos. El análisis de SDS-PAGE se realizó en un aparato MiniProtean II (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos) usando geles premoledados de gradiente del 4-15%. La electrotransferencia de geles de SDS-PAGE sobre membranas de nitrocelulosa (NC) se realizó usando una celda Mini Trans-Blot (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos) y requería 1 hora a 100 V. Después de eso, las membranas de NC se bloquearon durante una noche a 4°C en PBS que contenía BSA al 2%. Las transferencias se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-M2e 2C9 en TBT-T (tampón Tris 50 mM, pH 7,0, NaCl 50 mM y Tween-20 al 0,1%).

Después de eliminar por lavado los anticuerpos no unidos, la transferencia se exploró con un anticuerpo secundario (conjugado de rata anti-[IgG de ratón] con peroxidasa; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.; Estados Unidos) y las señales positivas se revelaron después de la adición de solución de sustrato quimioluminiscente “Renaissance” (NEN Life Science Products, Boston, MA., Estados Unidos). Se usaron proteínas marcadoras de peso molecular preteñidas de amplio intervalo (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos) como referencia. Como se muestra en la figura 13, el tratamiento de sM2eGCN4C3d con el entrecruzante BS3 dio como resultado la formación de oligómeros unidos covalentemente. La especie entrecruzada principal tenía una masa molecular estimada de aproximadamente 164 kDa, mientras que el monómero tenía una masa molecular de aproximadamente 41 kDa. Este resultado confirma los datos obtenidos por ultrafiltración y filtración en gel, indicando todos que sM2eGCN4C3d existen en solución como tetrámero.

Ejemplo 13

15 *Análisis de la respuesta de anticuerpos in vivo contra sM2eGCN4C3d*

Se produjo sM2eGCN4C3d recombinante secretada mediante un sistema de expresión de baculovirus y se purificó como se resume en los ejemplos 10 y 11. Las fracciones que contenían proteína recombinante se concentraron usando dispositivos de ultrafiltración Vivaspin-30 y Centricon-100 (Millipore Corporation, Bedford, MA., Estados Unidos). Para llevar la sM2eGCN4C3d a tampón PBSA (NaCl 171 mM, KCl 3,4 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM), este último tampón se añadió a la solución de proteína concentrada (~200 µl) para llevar el volumen de la muestra a 2 ml, después de lo cual la solución se concentró de nuevo (~10 veces) usando un Centricon-100. Esta etapa se repitió dos veces.

Se inmunizaron grupos de 7 ratones Balb/c hembra (Charles River Laboratories, Sulzfeld Alemania) a la edad de 8 semanas mediante inyección intraperitoneal de 10 µg de sM2eGCN4C3d en presencia de adyuvante Ribi (25 µg de monofosforil lípido A y 25 µg de trehalosa-6,6-dimicolato; consúltese Neirynck *et al.*, 1999) por ratón. Los ratones de control recibieron adyuvante dispersado en solución salina tamponada con fosfato. Los animales se alojaron en un entorno de temperatura controlada con ciclos de 12 h de luz/oscuridad y recibieron alimento y agua *ad libitum*. Se administraron dos inyecciones de refuerzo a intervalos de dos semanas complementado 10 µg de sM2eGCN4C3d con 25 µg de monofosforil lípido A y 25 µg de péptido adyuvante (consúltese Neirynck *et al.*, 1999) por ratón. Diez días después de cada inmunización, se extrajo sangre de la vena de la cola y se preparó el suero. Las muestras de suero se analizaron posteriormente por ELISA. Con este fin, se recubrieron placas de 96 pocillos durante una noche a 37°C con 50 µl de péptido M2e 2 µg/ml en tampón bicarbonato de sodio 50 mM, pH 9,7 y después se bloquearon con 200 µl de PBS que contenía BSA al 1% durante 1 hora. Como alternativa, se recubrieron placas de 96 pocillos durante una noche a 4°C con 50 µl de anticuerpos policlonales anti-proteína del complemento 3 de ratón 10 µg/ml (ab3163, Biogenesis Ltd, Poole, Reino Unido) y se bloquearon con 150 µl de PBS que contenía BSA al 1% durante 1 hora. Con el último recubrimiento, se permitió la captura de sM2eGCN4C3d a partir de medio de células de insecto durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado, una serie de diluciones 1/2 de las diferentes muestras de suero, partiendo de una dilución 1/50, se cargaron en pocillos recubiertos con péptido o proteína sM2eGCN4C3d. Se detectaron los anticuerpos unidos con un anticuerpo marcado con peroxidasa dirigido contra la IgG1 e IgG3 de ratón (Southern Biotechnology Associates, Inc.), respectivamente, diluido 1/6000 en PBS que contenía BSA al 1% y Tween-20 al 0,05%. Después del lavado, las placas de microtitulación se incubaron durante 20 minutos con sustrato líquido de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina para peroxidasa (Sigma, St. Louis, MO., Estados Unidos). La reacción se interrumpió por adición de H₃PO₄ 1 M y se midió la absorbancia a 450 nm. Para obtener el valor para la reactividad específica contra M2e, la absorbancia obtenida para suero preinmune a una dilución dada se restó de la absorbancia de sueros post-vacunación y post-refuerzo de la dilución correspondiente. Como se presenta en las figuras 14A y C, se indujeron anticuerpos anti-M2e de los isotipos IgG1 e IgG3 en ratones vacunados y con inyección de refuerzo. Como se muestra en las figuras 14B y D, se obtuvieron perfiles similares de respuestas de anticuerpos cuando se exploraron proteínas sM2eGCN4C3d recombinantes con antiseros de ratones vacunados y con inyecciones de refuerzo. Por lo tanto, puede concluirse que la sM2eGCN4C3d puede inducir eficazmente una respuesta de anticuerpos antigénicos en ratones.

55 Ejemplo 14

Protección de ratones expuestos a una dosis letal de virus influenza después de la vacunación con sM2eGCN4C3d

Se inmunizaron grupos de 7 ratones Balb/c hembra libres de patógenos (Charles River Laboratories Sulzfeld, Alemania) por vía intraperitoneal con sM2eGCN4C3d, como se describe en el ejemplo 13. Dos semanas después de la última inmunización, los ratones se expusieron por vía intranasal a 14 DL₅₀ de X47 adaptado a ratón (m. a.) (Neirynck *et al.*, 1999). Como se presenta en la figura 15, las vacunas de sM2eGCN4C3d protegían frente a una dosis letal de virus influenza A m. a. homólogo.

65

Tabla I: Cebadores de PCR y pareja de oligonucleótidos complementarios

Cebadores de PCR

BACfor:

5' TTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTTG 3'

GCN4nh:

5' TACAGAAAGCTTGCTTCGATTTGTTTCATACCGCCAAGGCTCTGGGCGAAAACC 3'

GCN4cooh:

5' ATCTGATCAAGAAACTGCTGGGCGAAGGTGGCAAAGAGATATGCCCAATTAG 3'

BACrev:

5' CATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGG 3'

GP67s:

5' GCTACTAGTAAATCAGTCACACCAA 3'

GP67a:

5' CGAAGCTTGCCGGCAAAGGCAGAATGCGCCGCC 3'

M2rev:

5' ACCATTCCGGATGAATCGTTGCATCTGCAC 3'

M2Ss:

5' TCTCTGCTGACCGAAGTTGAAAC 3'

UM2ECa:

5' CGAAGCTTACTAGTTCACGGATCCCCACTTGAATCGTTGCATCTGCACCC

Cebadores de PCR

GCN4for:

5' AGATTTCCGGAGGTATGAAACAAATCGAAGAC 3'

GCN4rev:

5' ATAGGAGATCTATTGCGCCAGCAGTTTCTTG 3'

GCNrev2:

5' TATTGGATCCGGTGAACCTGATCCTTCGCCAGCAGTTTCTTG3'

CCDs:

5' CCGCGCCACCGACGAGATCTCGGATCTACCCCC 3'

C3da:

5' GCACTAGTTCAAGGATCCGATCCGAACTCTTCAGATCC 3'

Pareja de oligonucleótidos complementarios

GCN4pos:

5' AGCTGGAAGAAATCCTTTTGGAACTGTACCACATCGAAACGAGCTGGCCAG 3'

GCN4neg:

5' GATCCTGGCCAGCTCGTTTTTCGATGTGGTACAGTTTCGAAAGGATTTCTTCC 3'

TABLA II

Valores relativos estimados de las actividades específicas de NAs (tetramérica) frente a GCN4ANAs

	tetramérica	dimérica	monoméricas
NAs	100%	inactiva	inactiva
GCN4NAs	>70%		

Los valores máximos de la actividad enzimática y las lecturas de ELISA obtenidas después de la centrifugación en gradiente de sacarosa se usaron para deducir una estimación aproximada de las actividades específicas relativas. La actividad enzimática específica de GCN4NAs asciende a al menos el 70% de la de la forma tetramérica de la proteína NAs no fusionada.

TABLA III

Purificación de sM2eGCN4C3d

Etapas	Volumen (ml)	Proteína (mg)	sM2eGCN4C3d (mg)	Rendimiento (%)	Purificación (veces)
Medio bruto	1200	180	2,4	100	1,0
Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ al 45-95%	48	58	1,9	79	2,5
Sepharose Q	30	6,5	0,9	37	11
Superdex 200	6	1,2	0,6	17	38

Bibliografía

- Bauw, G., De Loose, M., Inze, D., Van Montagu, M. y Vandekerckhove, J. (1987) Alternations in the phenotype of plant cell studied by N-terminal amino acid sequence analysis of proteins electroblotted from two-dimensional gel-separated total extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 4806-4810.

- Bucher, D. J. y Kilbourne, E. D. (1972). A2 (N2) neuraminidase of the X-7 influenza recombinant: determination of molecular size and subunit composition of the active unit. *J Virol*, 10, 60-66.

- Burton, D. R. (1997). A vaccine for HIV type 1: the antibody perspective. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 10018-10023.

- Chang, Z., Primm, T. P., Jakana, J., Lee, I. H., Serysheva, I., Chiu, W., Gilbert, H. F. y Quijcho, F. A. (1996) Mycobacterium tuberculosis 16-kDa Antigen (Hsp16. 3) functions as an oligomeric structure *in vitro* to suppress thermal aggregation. *J Biol Chem*, 271, 7218-7223.

- Dempsey, P. W., Allison M. E. D., Akkaraju, S., Goodnow, C. C., Fearon, D. T. (1996) C3d of complement as molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science*, 271, 348-350.

- Deroo, T., Min Jou, W. y Fiers, W. (1996). Recombinant neuraminidase protects against lethal influenza. *Vaccine* 14, 561-569.

- Domdey, H., Wiebauer, K., Kazmaier, M., Muller, V., Odink, K. y Fey, G. (1982) Characterization of the mRNA and cloned cDNA specifying the third component of mouse complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7619-7623.

- Harbury, P. B., Zhang, T., Kim, P. S. y Alber, T. (1993). A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science* 262, 1401-1407.

- **King, L. A. y Possee, R. D.** (1992). The baculovirus expression system. Chapman & Hall, University Press, Cambridge, Reino Unido.
- **Kodihalli, S., Justewicz, D. M., Gubareva, L. V. y Webster, R. G.** (1995). Selection of a single amino acid substitution in the hemagglutinin molecule by chicken eggs can render influenza A virus (H3) candidate vaccine ineffective. *J Virol*, 69, 4888-4897.
- **Laver, W. G. y Valentine, R. C.** (1969). Morphology of the isolated haemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus. *Virology*, 38, 105-119.
- **Lin, X. H., Ali, M. A., Openshaw, H. y Cantin, E. M.** (1996). Deletion of the carboxy-terminus of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) glycoprotein B does not affect oligomerization, heparin-binding activity, or its ability to protect against HSV challenge. *Arch Virol*, 141, 1153 -1165.
- **Lupas, A.** (1996) Coiled coils: new structures and new functions. *TIBS* 21, 375-382.
- **Neirynck, S., Deroo, T., Saelens, X., Vanlandschoot, P., Min Jou, W. y Fiers, W.** (1999) A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nature Medicine*, 5, 1157-1163.
- **Norrande J., Kempe T., y Messing, J.** (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide directed mutagenesis. *Gene*, 26, 101-106.
- **O'Shea, E. K., Rutkowski, R. y Kim, P. S.** (1989) Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science*, 243, 538-542.
- **Ross, T. M., Xu, Y., Bright, R. A. y Robinson, H. L.** (2000) C3d enhancement of antibodies to hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge. *Nature Immunology*, 1(2), 127-131.
- **Sanchez, J., Johansson, S., Lowenadler, B., Svennerholm, A. M. y Holmgren, J.** (1990). Recombinant cholera toxin B subunit and gene fusion proteins for oral vaccination. *Res Microbiol*, 141, 971-979.
- **Skinner, R. H., Bradley, S., Brown, A. L., Johnson, N. J. E., Rhodes, S., Stammers, D. K. y Lowe, P. N.** (1991) Use of the Glu-Glu-Phe C-terminal epitope for rapid purification of the catalytic domain of normal and mutant ras GTPase activating proteins. *J. Biol. Chem.* 266, 14163-14166.
- **Sugrue, R. J. y Hay, A. J.** (1991). Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology*, 180, 617-624.
- **Varghese, J. N., Laver, W. G. y Colman, P. M.** (1983). Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2,9 Å resolution. *Nature*, 303, 35-40.
- **Ward, C. W., Colman, P. M. y Laver, W. G.** (1983). The disulphide bonds of an Asian influenza virus neuraminidase. *FEBS Lett*, 153, 29-30.
- **Winckler, G., Randolph, V. B., Cleaves, G. R., Ryan, T. E. y Stollar, V.** (1988). Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology*, 162, 187-196.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 9319185 A [0008]
- WO 9818943 A [0013]
- WO 9406468 A [0009]
- WO 9856906 A [0013]
- WO 9407533 A [0009]
- WO 9962953 A [0013]
- WO 9518861 A [0009]
- WO 0069907 A [0013]
- WO 9520660 A [0009]
- WO 9604394 A [0018]
- WO 9303173 A [0009]
- WO 9728259 A [0018]

- WO 9907839 A [0009]
- WO 9908713 A [0018]
- WO 9928478 A [0009]
- WO 0012121 A [0018]
- 5 • WO 9637621 A [0013]

Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- 10 • **Bauw, G.; De Loose, M.; Inze, D.; Van Montagu, M.; Vandekerckhove, J.** Alternations in the phenotype of plant cell studied by N-terminal amino acid sequence analysis of proteins electroblotted from two-dimensional gel-separated total extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 4806-4810 [0052]
- 15 • **A2 (N2) neuraminidase of the X-7 influenza recombinant: determination of molecular size and subunit composition of the active unit. Bucher, D.J.; Kilbourne, E.D.** *J Virol.* 1972, vol. 10, 60-66 [0052]
- **Burton, D.R.** A vaccine for HIV type 1: the antibody perspective. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 10018-10023 [0052]
- 20 • **Chang, Z.; Primm, T.P.; Jakana, J.; Lee, I.H.; Serysheva, I.; Chiu, W.; Gilbert, H.F.; Quioco, F.A.** Mycobacterium tuberculosis 16-kDa Antigen (Hsp1 6.3) functions as an oligomeric structure *in vitro* to suppress thermal aggregation. *J Biol Chem*, 1966, vol. 271, 7218-7223 [0052]
- 25 • **Dempsey, P.W.; Allison M.E.D.; Akkaraju, S.; Goodnow, C.C.; Fearon, D.T.** C3d of complement as molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science*, 1966, vol. 271, 348-350 [0052]
- **Deroo, T.; Min Jou, W.; Fiers, W.** Recombinant neuraminidase protects against lethal influenza. *Vaccine*. 1966, vol. 14, 561-569 [0052]
- 30 • **Domdey, H.; Wiebauer, K.; Kazmaier, M.; Muller, V.; Odink, K.; Fey, G.** Characterization of the mRNA and cloned cDNA specifying the third component of mouse complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 7619-7623 [0052]
- 35 • **Harbury, P.B.; Zhang, T.; Kim, P.S.; Alber, T.** A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4leucine zipper mutants. *Science*, 1993, vol. 262, 1401-1407 [0052]
- **King, L.A.; Possee, R.D.** The baculovirus expression system. Chapman & Hall, University Press, 1992 [0052]
- 40 • **Kodihalli, S.; Justewicz, D.M.; Gubareva, L.V.; Webster, R.G.** Selection of a single amino acid substitution in the hemagglutinin molecule by chicken eggs can render influenza A virus (H3) candidate vaccine ineffective. *J Virol*, 1995, vol. 69, 4888-4897 [0052]
- 45 • **Laver, W.G.; Valentine, R.C.** Morphology of the isolated haemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus. *Virology*, 1969, vol. 38, 105-119 [0052]
- **Lin, X.H.; Ali, M.A.; Openshaw, H.; Cantin, E.M.** Deletion of the carboxy-terminus of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) glycoprotein B does not affect oligomerization, heparin-binding activity, or its ability to protect against I-ISV challenge. *Arch Virol*, 1966, vol. 141, 1153-1165 [0052]
- 50 • **Lupas, A.** Coiled coils: new structures and new functions. *TIBS*, 1966, vol. 21, 375-382 [0052]
- **Neirynck, S.; Deroo, T.; Saelens, X.; Vanlandschoot, P.; Min Jou, W.; Fiers, W.** A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nature Medicine*, 1999, vol. 5, 1157-1163 [0052]
- 55 • **Norrandner, J.; Kempe, T.; Messing, J.** Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*, 1993, vol. 26, 101-106 [0052]
- **O'Shea, E.K.; Rutkowski, R.; Kim, P.S.** Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science*, 1989, vol. 243, 538-542 [0052]
- 60 • **Ross, T.M.; Xu, Y.; Bright, R.A.; Robinson, H.L.** C3d enhancement of antibodies to hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge. *Nature Immunology*, 2000, vol. 1 (2), 127-131 [0052]
- **Sanchez, J.; Johansson, S.; Lowenadler, B; Svennerholm, A.M.; Holmgren, J.** Recombinant cholera toxin B subunit and gene fusion proteins for oral vaccination. *Res Microbiol*, 1990, vol. 141, 971-979 [0052]
- 65 • **Skinner, R.H.; Bradley, S; Brown, A. L.; Johnson, N.J.E.; Rhodes, S.; Stammers, D.K.; Lowe, P.N.** Use of the Glu-Glu-Phe C-terminal epitope for rapid purification of the catalytic domain of normal and mutant ras GTPase-activating proteins. *J. Biol. Chem.* 1991, vol. 266, 14163-14166 [0052]

ES 2 327 719 T3

• **Sugrue, R.J.; Hay, A.J.** Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology*, 1991, vol. 180, 617-624 [0052]

• **Varghese, J.N.; Laver, W.G.; Colman, P.M.** Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2,9 Å resolution. *Nature*, 1983, vol. 303, 35-40[0052]

• **Ward, C.W.; Colman, P.M.; Laver, W.G.** The disulphide bonds of an Asian influenza virus neuraminidase. *FEBS Lett*, 1983, vol. 153, 29-30 [0052]

• **Winckler, G.; Randolph, V.B.; Cleaves, G.R.; Ryan, T.E.; Stollar, V.** Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology*, 1988, vol. 162, 187-196 [0052]

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Complejo de proteína oligomérica recombinante que comprende:

- un antígeno de influenza oligomérico que puede generar una respuesta inmune contra un virus influenza, y
- un dominio de oligomerización de cremallera de leucinas

en el que cada subunidad de dicho antígeno de influenza oligomérico está unida al dominio de oligomerización de cremallera de leucinas y

en el que dicho complejo de proteína oligomérica recombinante es un di-, tri- o tetramero.

2. Complejo de proteína oligomérica recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho dominio de oligomerización de cremallera de leucinas es la cremallera de leucinas GCN4.

3. Complejo de proteína oligomérica recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho antígeno de influenza es neuraminidasa de influenza, la M2 de influenza A, o la NB de influenza B, o un fragmento de cualquiera de los mismos.

4. Ácido nucleico que codifica una subunidad de un antígeno de influenza oligomérico y un dominio de oligomerización de cremallera de leucinas de acuerdo con las reivindicaciones 1-3.

5. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende la secuencia presentada en la SEC ID N° 1, SEC ID N° 3, o SEC ID N° 5.

6. Vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 4-5.

7. Célula hospedadora que comprende un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6.

8. Uso de un complejo de proteínas de acuerdo con la reivindicación 1-3 o un ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 4-5 para la preparación de una vacuna de influenza.

9. Vacuna de influenza que comprende un complejo de proteínas de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 o un ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 4-5.

Fig. 1

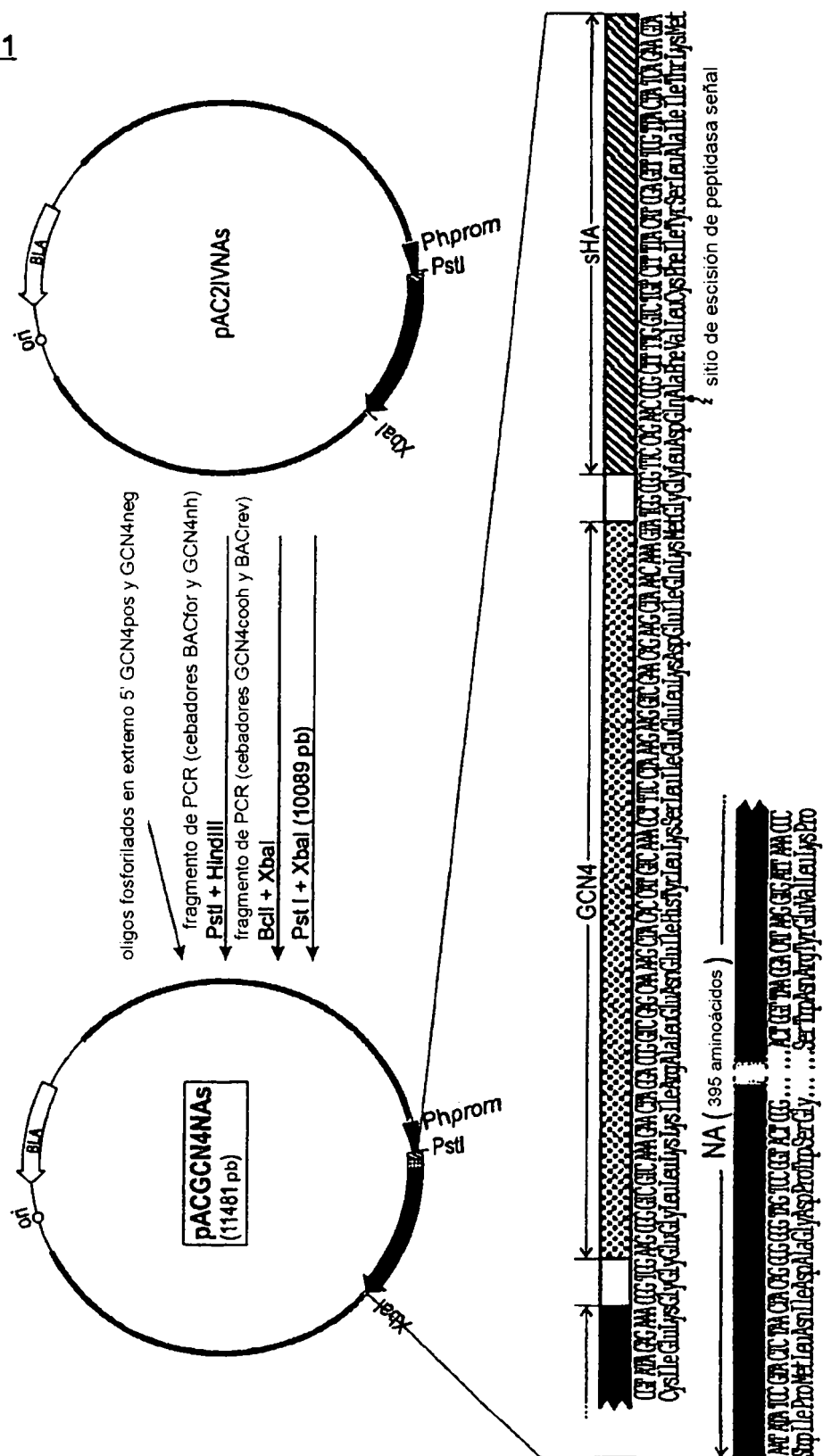


Fig. 2

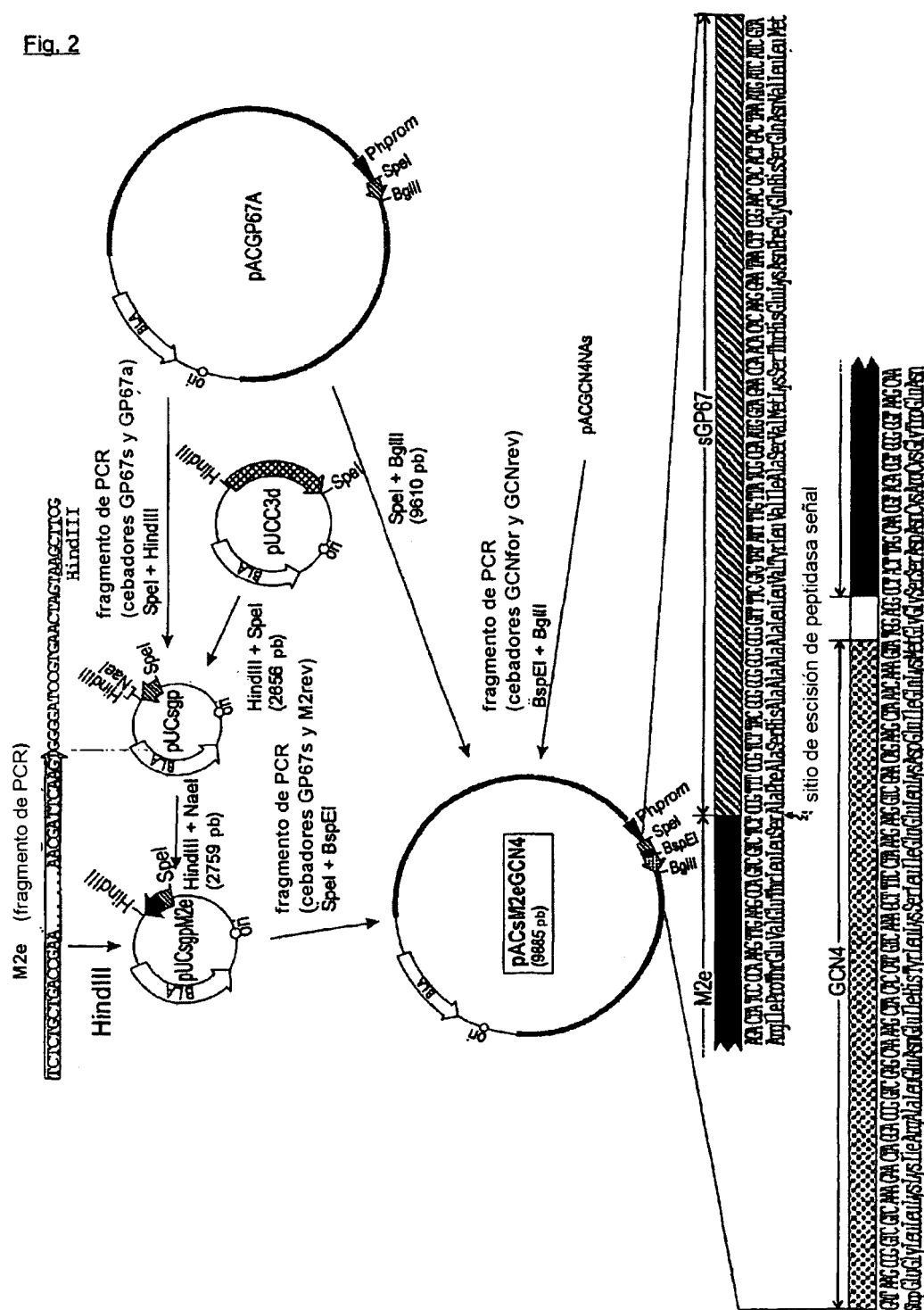


Fig. 3

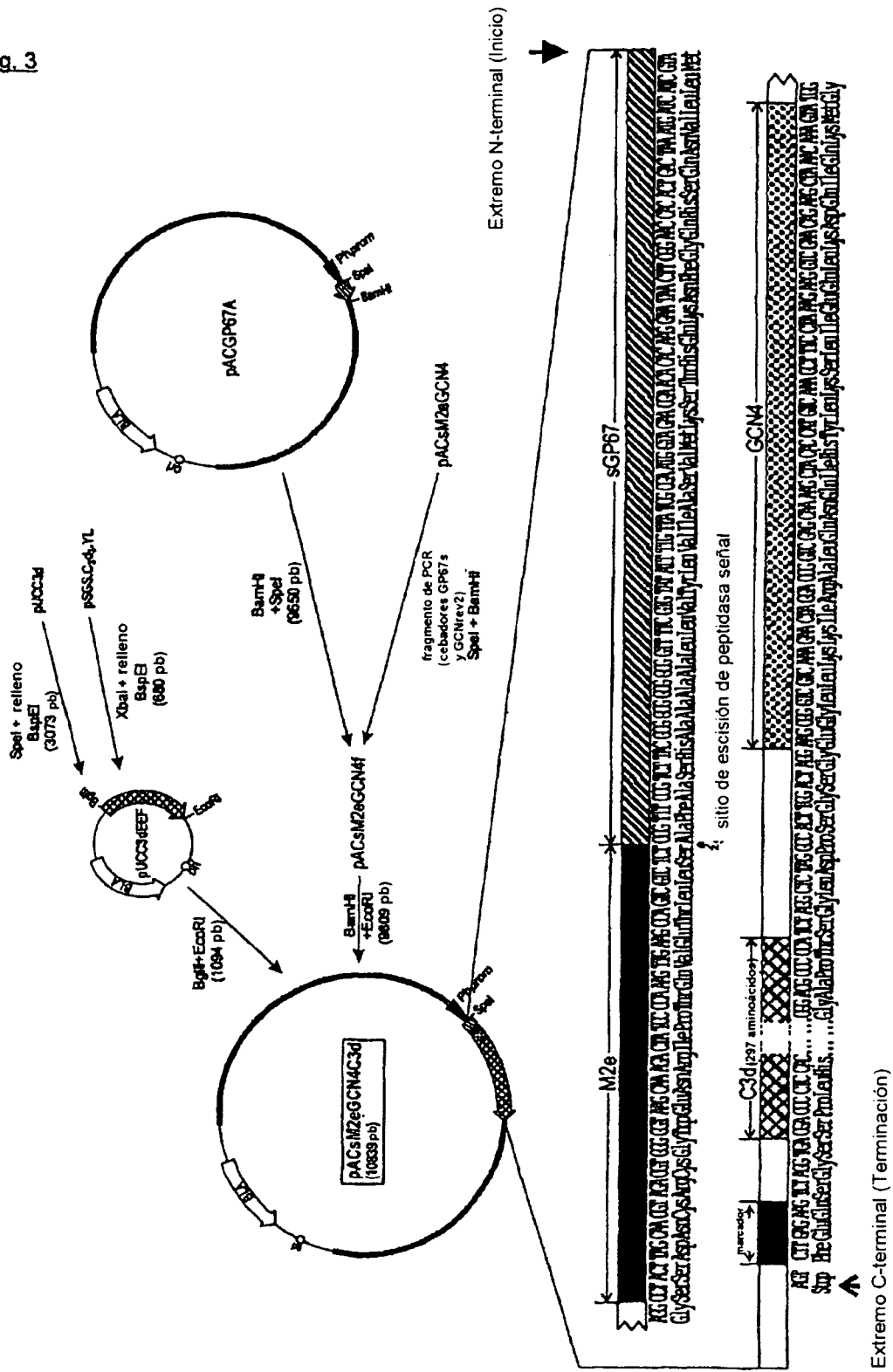


Fig. 4

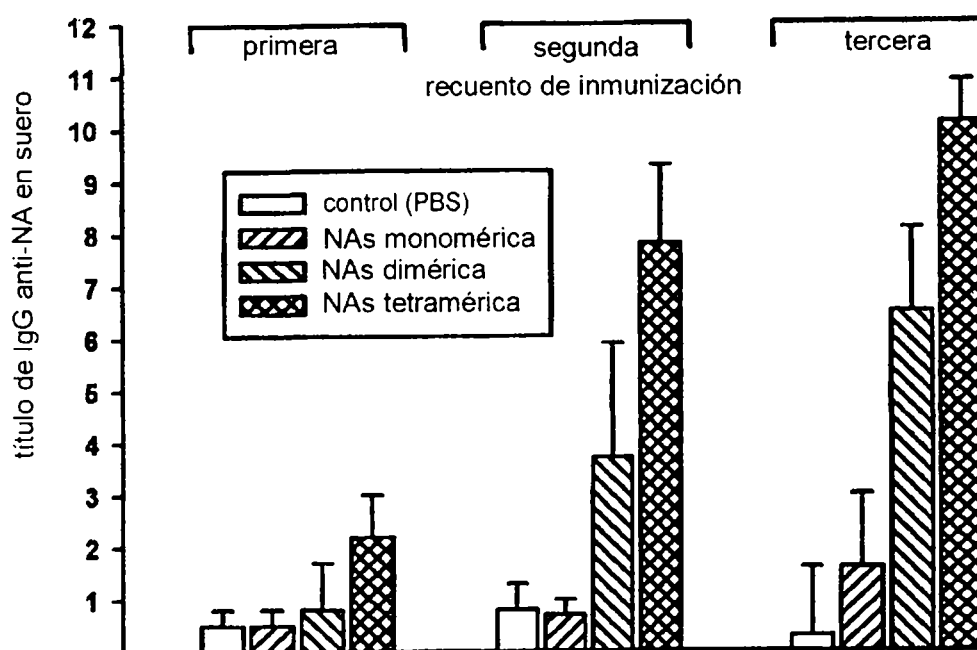


Fig. 5

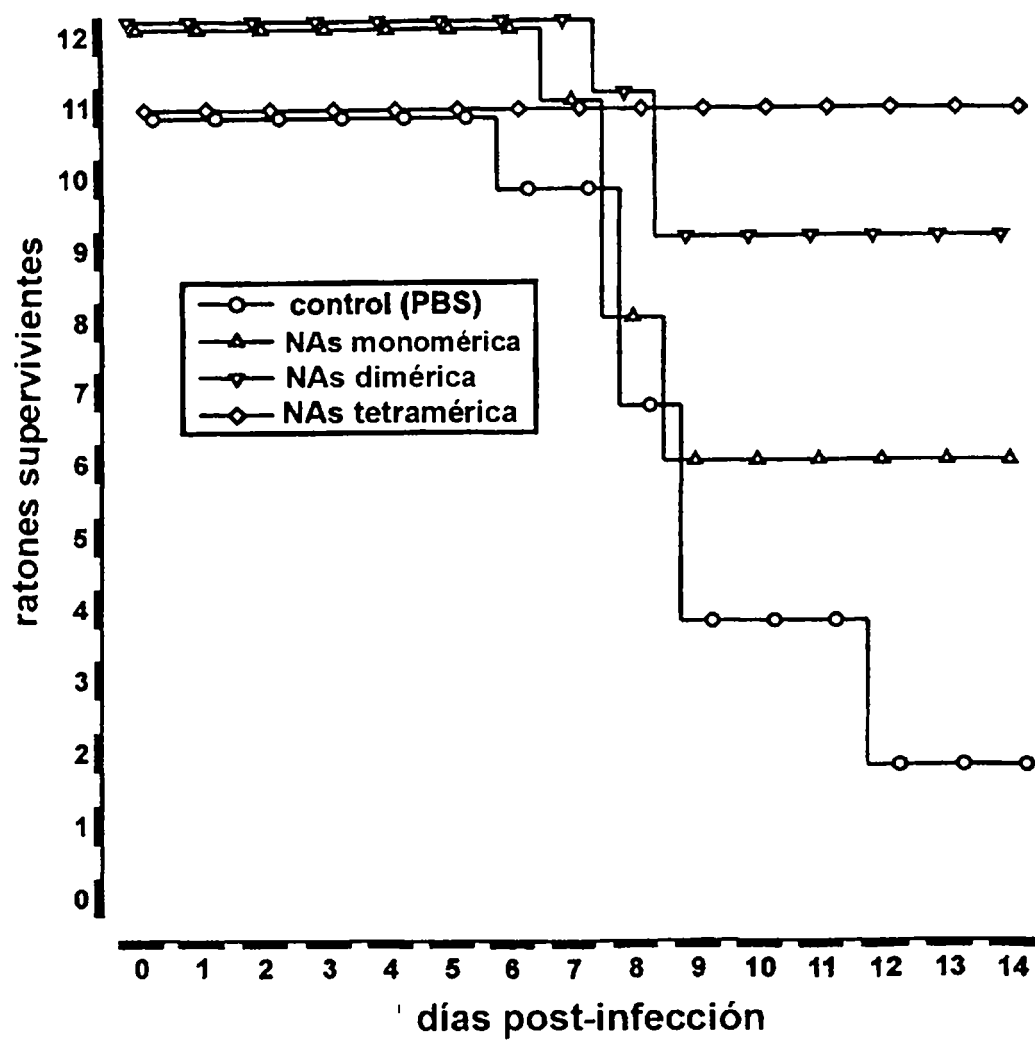


Fig. 6

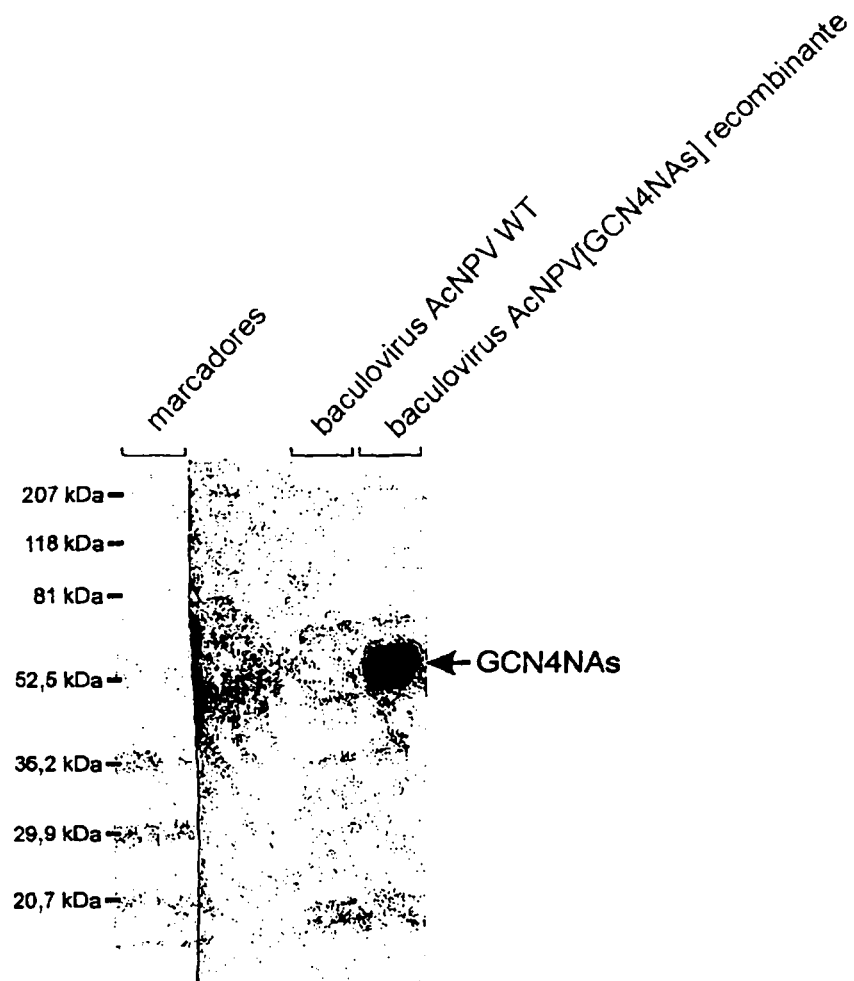


Fig. 7

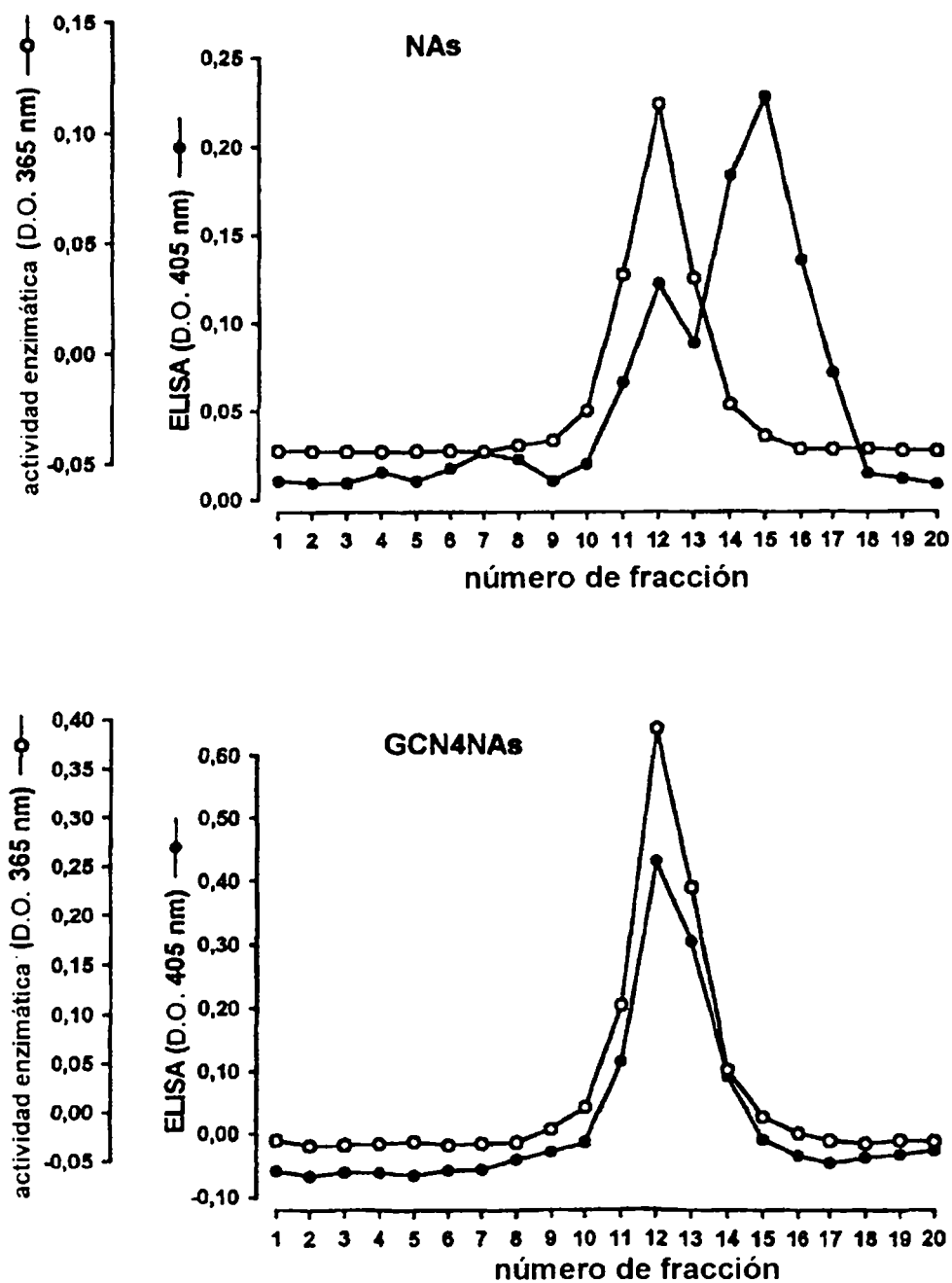


Fig. 8

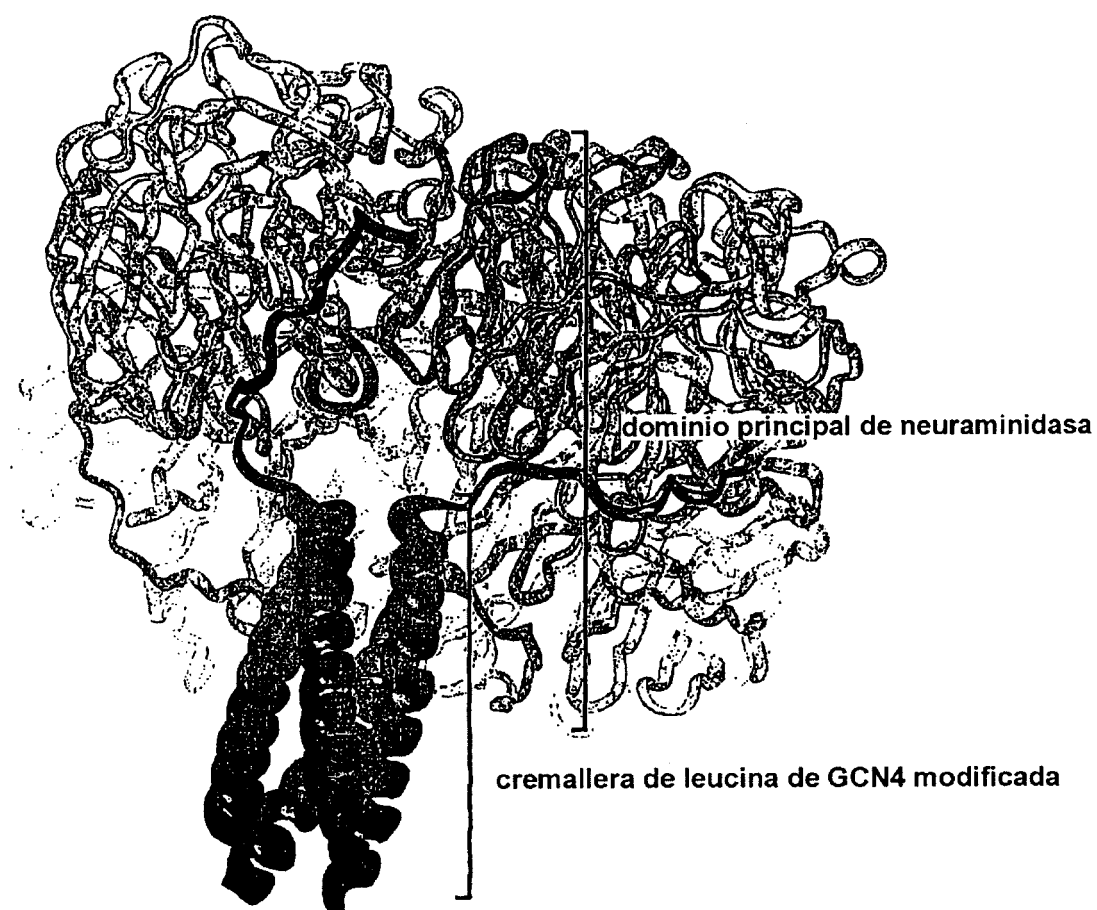


Fig. 9



Fig. 11

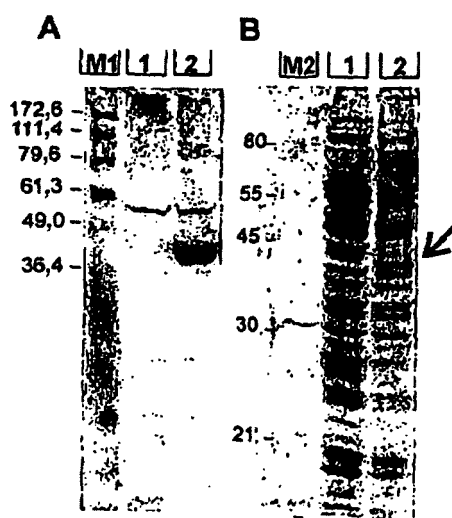


Fig. 10

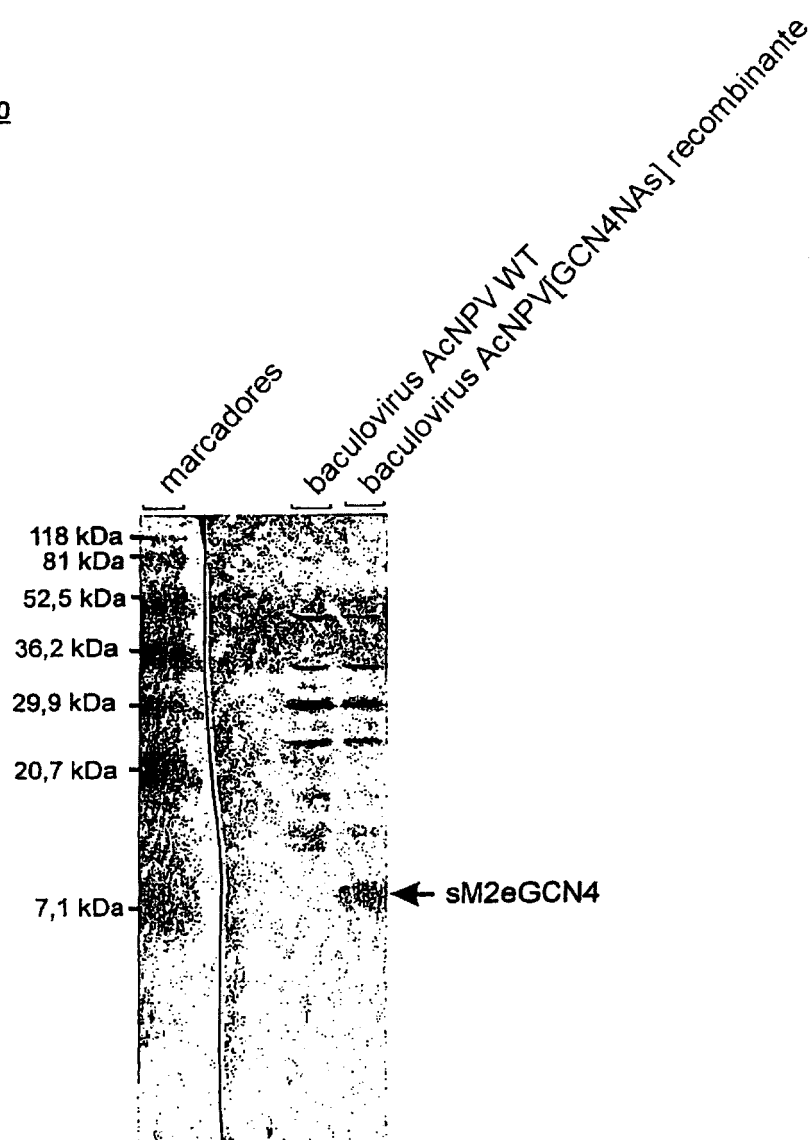


Fig. 12

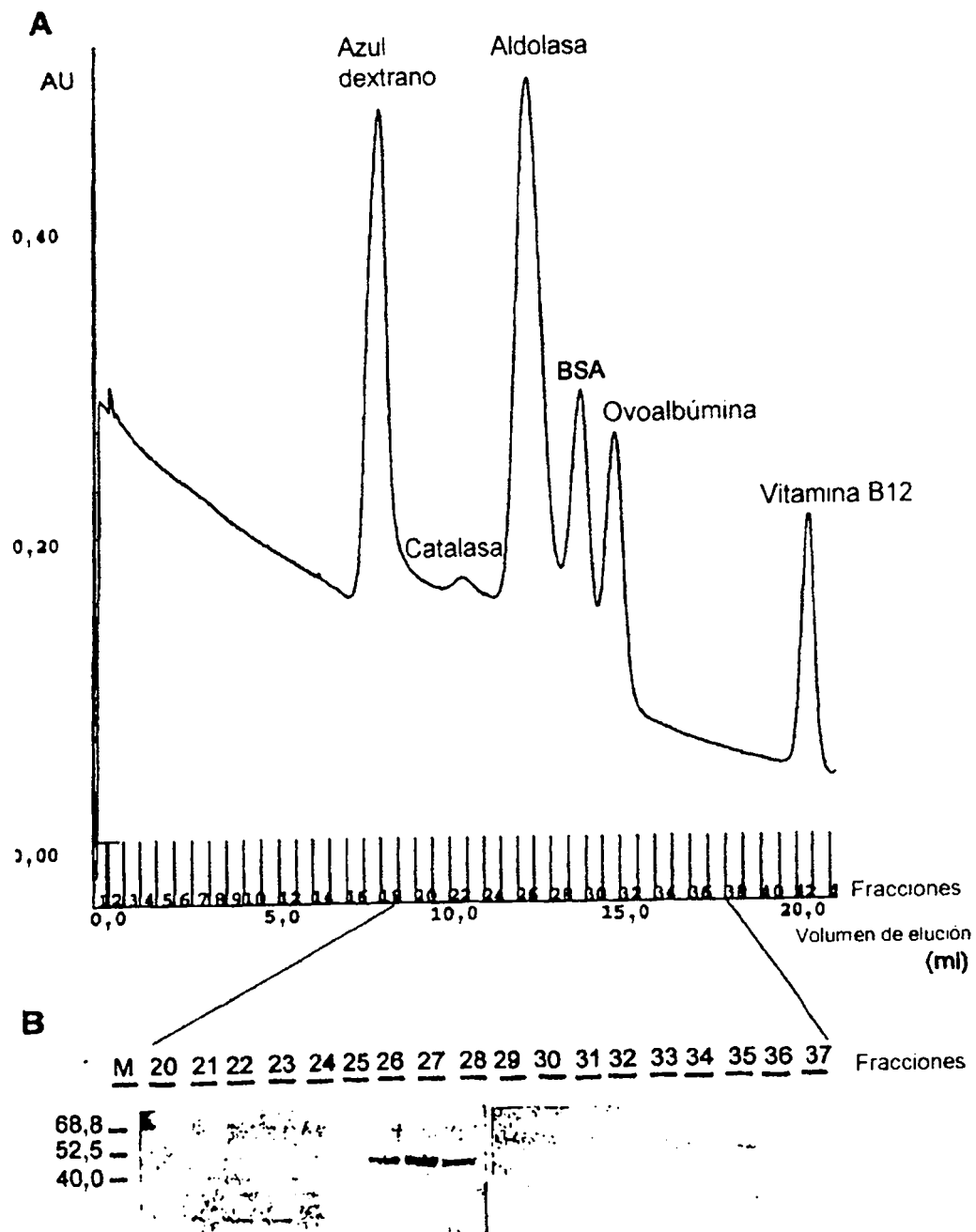


Fig. 13

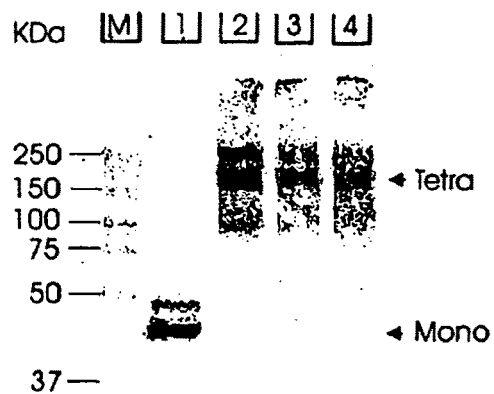


Fig. 15

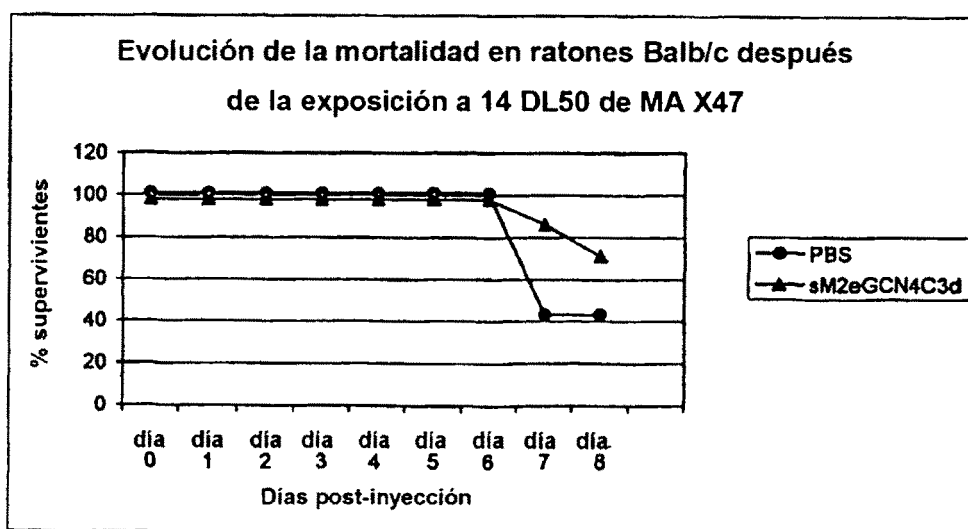


Fig. 14

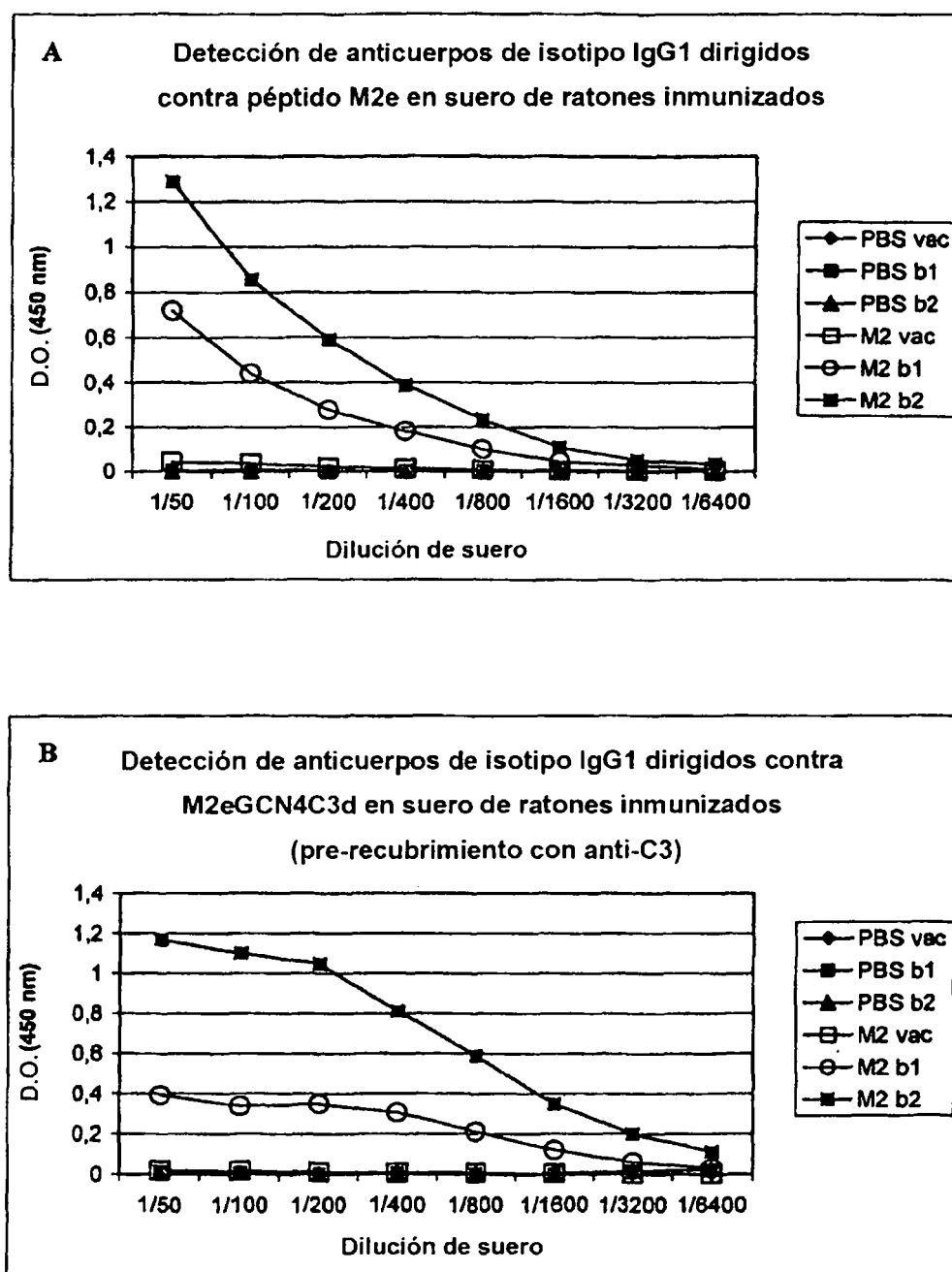
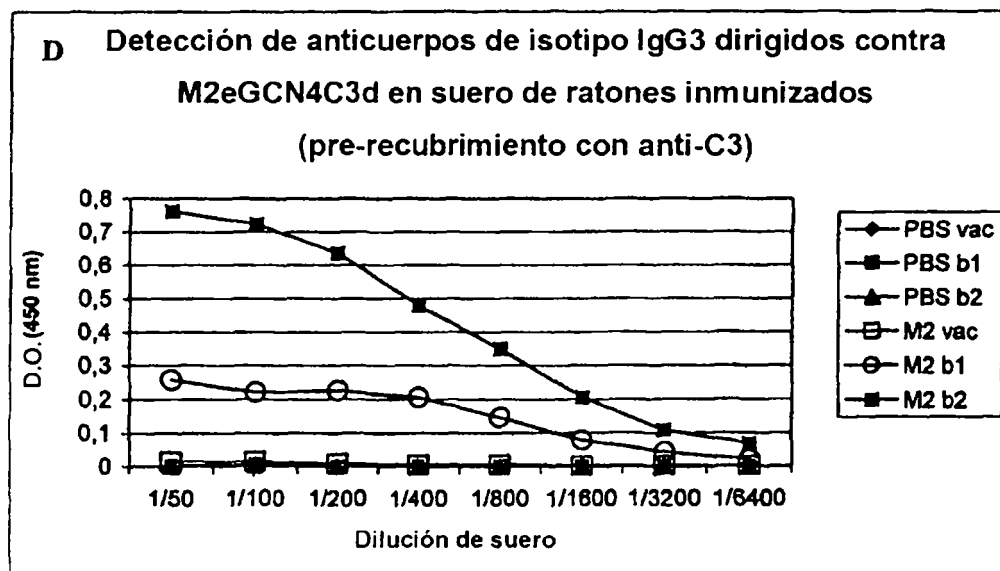
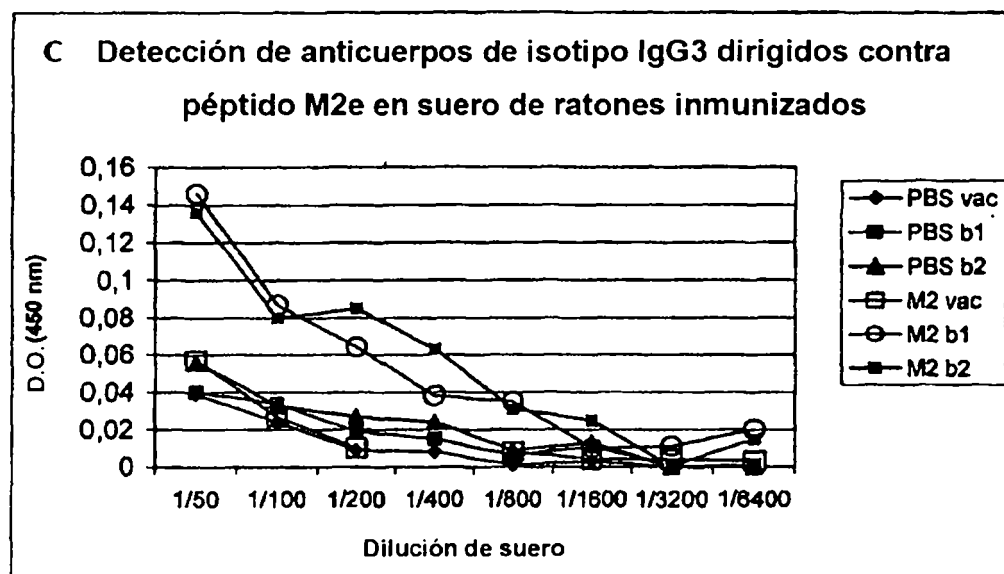


Fig. 14 (cont.)



ES 2 327 719 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<100> VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INSTITUUT VOOR BIOTECHNOLOGIE VZW															
5	<120> Complejos de proteínas oligoméricas recombinantes con un potencial inmunógeno aumentado															
	<130> TDR/Tet/V078															
10	<160> 22															
	<170> PatentIn versión 3.1															
15	<210> 1															
	<211> 1350															
	<212> ADN															
	<213> Secuencia Artificial															
20	<220>															
	<223> parte de pACGCN4Nas															
25	<220>															
	<221> CDS															
	<222> (1)..(1350)															
30	<223>															
	<400> 1															
35	atg aag act atc att gct ttg agc tac att ttc tgt ctg gtt ttc gcc											48				
	Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Ala															
	1 5 10 15															
	caa gac ctt ggc ggt atg aaa caa atc gaa gac aag ctg gaa gaa atc											96				
	Gln Asp Leu Gly Gly Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Leu Glu Glu Ile															
	20 25 30															
40	ctt tcg aaa ctg tac cac atc gaa aac gag ctg gcc agg atc aag aaa											144				
	Leu Ser Lys Leu Tyr His Ile Glu Asn Glu Leu Ala Arg Ile Lys Lys															
	35 40 45															
	ctg ctg ggc gaa ggt ggc aaa gag ata tgc ccc aaa tta gtg gaa tac											192				
45	Leu Leu Gly Glu Gly Gly Lys Glu Ile Cys Pro Lys Leu Val Glu Tyr															
	50 55 60															
	agg aat tgg tca aag cca caa tgt aaa att aca gga ttt gca cct ttc											240				
	Arg Asn Trp Ser Lys Pro Gln Cys Lys Ile Thr Gly Phe Ala Pro Phe															
	65 70 75 80															
50	tct aag gac aat tca att cgg ctt tct gct ggt ggg gac att tgg gtg											288				
	Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Leu Ser Ala Gly Gly Asp Ile Trp Val															
	85 90 95															
	acg aga gaa cct tat gtg tca tgc gat cct ggc aaa tgt tat caa ttt											336				
55	Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Pro Gly Lys Cys Tyr Gln Phe															
	100 105 110															
	gca ctc ggg cag ggg acc aca cta gaa aac aaa cat tca aat gac aca											384				
60	Ala Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Glu Asn Lys His Ser Asn Asp Thr															
	115 120 125															
	ata cat gat aga acc cct cat cga acc cta ttg atg aat gag ttg ggt											432				
	Ile His Asp Arg Thr Pro His Arg Thr Leu Leu Met Asn Glu Leu Gly															
	130 135 140															
65	gtt cca ttt cac ttg gga acc agg caa gtg tgt ata gca tgg tcc agc											480				
	Val Pro Phe His Leu Gly Thr Arg Gln Val Cys Ile Ala Trp Ser Ser															
	145 150 155 160															

ES 2 327 719 T3

	tca agt tgt cac gat gga aaa gca tgg ctg cat gtt tgt gtc act ggg	528
	Ser Ser Cys His Asp Gly Lys Ala Trp Leu His Val Cys Val Thr Gly	
	165 170 175	
5	tat gat aaa aat gca act gct agc ttc att tac gat ggg agg ctt gta	576
	Tyr Asp Lys Asn Ala Thr Ala Ser Phe Ile Tyr Asp Gly Arg Leu Val	
	180 185 190	
10	gac agc att ggt tca tgg tct caa aat atc ctc agg acc cag gag tcg	624
	Asp Ser Ile Gly Ser Trp Ser Gln Asn Ile Leu Arg Thr Gln Glu Ser	
	195 200 205	
15	gaa tgt gtt tgt atc aat ggg act tgt aca gta gta atg act gat gga	672
	Glu Cys Val Cys Ile Asn Gly Thr Cys Thr Val Val Met Thr Asp Gly	
	210 215 220	
	agt gct tca gga aga gct gat act aaa ata cta ttc att gaa gag ggg	720
	Ser Ala Ser Gly Arg Ala Asp Thr Lys Ile Leu Phe Ile Glu Glu Gly	
	225 230 235 240	
20	aaa att gtt cat att agc cca ttg tca gga agt gct cag cat gta gag	768
	Lys Ile Val His Ile Ser Pro Leu Ser Gly Ser Ala Gln His Val Glu	
	245 250 255	
25	gag tgt tcc tgt tat cct cga tat cct ggt gtc aga tgt atc tgc aga	816
	Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Tyr Pro Gly Val Arg Cys Ile Cys Arg	
	260 265 270	
	gac aac tgg aaa ggc tct aat agg cca gtc gta gat ata aat gtg aaa	864
	Asp Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Val Val Asp Ile Asn Val Lys	
	275 280 285	
30	gat tat agc att gat tcc agt tat gtg tgc tca ggg ctt gtt ggc gac	912
	Asp Tyr Ser Ile Asp Ser Ser Tyr Val Cys Ser Gly Leu Val Gly Asp	
	290 295 300	
35	aca ccc aga aaa aac gac aga tct agc agt agc tat tgc cgg aat cct	960
	Thr Pro Arg Lys Asn Asp Arg Ser Ser Ser Tyr Cys Arg Asn Pro	
	305 310 315 320	
	aac aat gaa aaa ggg aat cac gga gtg aaa ggc tgg gcc ttt gac gat	1008
	Asn Asn Glu Lys Gly Asn His Gly Val Lys Gly Trp Ala Phe Asp Asp	
	325 330 335	
40	gga aat gac gtg tgg atg gga aga acg atc agc gag gat tca cgc tca	1056
	Gly Asn Asp Val Trp Met Gly Arg Thr Ile Ser Glu Asp Ser Arg Ser	
	340 345 350	
45	ggt tat gaa acc ttc aaa gtc att ggt ggt tgg tcc aca cct aat tcc	1104
	Gly Tyr Glu Thr Phe Lys Val Ile Gly Gly Trp Ser Thr Pro Asn Ser	
	355 360 365	
	aaa ttg cag ata aat agg caa gtc ata gtt gac agc gct aat agg tca	1152
	Lys Leu Gln Ile Asn Arg Gln Val Ile Val Asp Ser Ala Asn Arg Ser	
	370 375 380	
50	ggt tat tct ggt att ttc tct gtt gag ggc aaa agc tgc atc aat agg	1200
	Gly Tyr Ser Gly Ile Phe Ser Val Glu Gly Lys Ser Cys Ile Asn Arg	
	385 390 395 400	
55	tgc ttt tat gtg gag ttg ata agg gga agg gaa cag gaa act aga gta	1248
	Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Glu Gln Glu Thr Arg Val	
	405 410 415	
60	tgg tgg acc tca aac agt att gtt gtg ttt tgt ggc act tca ggt acc	1296
	Trp Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Phe Cys Gly Thr Ser Gly Thr	
	420 425 430	
65	tat ggg aca ggc tca tgg cct gat ggg gcg gac atc aat ctc atg cct	1344
	Tyr Gly Thr Gly Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asp Ile Asn Leu Met Pro	
	435 440 445	
	ata taa	1350
	Ile	

ES 2 327 719 T3

<210> 2

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> parte de pACGCN4Nas

10

<400> 2

15

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Ala
1 5 10 15

20

Gln Asp Leu Gly Gly Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Leu Glu Glu Ile
20 25 30

Leu Ser Lys Leu Tyr His Ile Glu Asn Glu Leu Ala Arg Ile Lys Lys
35 40 45

25

Leu Leu Gly Glu Gly Gly Lys Glu Ile Cys Pro Lys Leu Val Glu Tyr
50 55 60

30

Arg Asn Trp Ser Lys Pro Gln Cys Lys Ile Thr Gly Phe Ala Pro Phe
65 70 75 80

Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Leu Ser Ala Gly Gly Asp Ile Trp Val
85 90 95

35

Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Pro Gly Lys Cys Tyr Gln Phe
100 105 110

40

Ala Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Glu Asn Lys His Ser Asn Asp Thr
115 120 125

Ile His Asp Arg Thr Pro His Arg Thr Leu Leu Met Asn Glu Leu Gly
130 135 140

45

Val Pro Phe His Leu Gly Thr Arg Gln Val Cys Ile Ala Trp Ser Ser
145 150 155 160

50

Ser Ser Cys His Asp Gly Lys Ala Trp Leu His Val Cys Val Thr Gly
165 170 175

55

Tyr Asp Lys Asn Ala Thr Ala Ser Phe Ile Tyr Asp Gly Arg Leu Val
180 185 190

Asp Ser Ile Gly Ser Trp Ser Gln Asn Ile Leu Arg Thr Gln Glu Ser

60

65

ES 2 327 719 T3

	195	200	205
5	Glu Cys Val Cys Ile Asn Gly Thr Cys Thr Val Val Met Thr Asp Gly 210 215 220		
10	Ser Ala Ser Gly Arg Ala Asp Thr Lys Ile Leu Phe Ile Glu Glu Gly 225 230 235 240		
15	Lys Ile Val His Ile Ser Pro Leu Ser Gly Ser Ala Gln His Val Glu 245 250 255		
20	Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Tyr Pro Gly Val Arg Cys Ile Cys Arg 260 265 270		
25	Asp Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Val Val Asp Ile Asn Val Lys 275 280 285		
30	Asp Tyr Ser Ile Asp Ser Ser Tyr Val Cys Ser Gly Leu Val Gly Asp 290 295 300		
35	Thr Pro Arg Lys Asn Asp Arg Ser Ser Ser Tyr Cys Arg Asn Pro 305 310 315 320		
40	Asn Asn Glu Lys Gly Asn His Gly Val Lys Gly Trp Ala Phe Asp Asp 325 330 335		
45	Gly Asn Asp Val Trp Met Gly Arg Thr Ile Ser Glu Asp Ser Arg Ser 340 345 350		
50	Gly Tyr Glu Thr Phe Lys Val Ile Gly Gly Trp Ser Thr Pro Asn Ser 355 360 365		
55	Lys Leu Gln Ile Asn Arg Gln Val Ile Val Asp Ser Ala Asn Arg Ser 370 375 380		
60	Gly Tyr Ser Gly Ile Phe Ser Val Glu Gly Lys Ser Cys Ile Asn Arg 385 390 395 400		
65	Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Glu Gln Glu Thr Arg Val 405 410 415		
	Trp Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Val Phe Cys Gly Thr Ser Gly Thr 420 425 430		
	Tyr Gly Thr Gly Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asp Ile Asn Leu Met Pro 435 440 445		
	Ile		
	<210> 3		
	<211> 282		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		

ES 2 327 719 T3

<220>

<223> parte de pACsM2eGCN4

5 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(282)

<223>

10

<400> 3

```

15      atg cta cta gta aat cag tca cac caa ggc ttc aat aag gaa cac aca      48
      Met Leu Leu Val Asn Gln Ser His Gln Gly Phe Asn Lys Glu His Thr
      1          5          10          15

      agc aag atg gta agc gct att gtt tta tat gtg ctt ttg gcg gcg gcg      96
      Ser Lys Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala
      20          25          30

      gcg cat tct gcc ttt gcc tct ctg ctg acc gaa gtt gaa acc cct atc      144
      Ala His Ser Ala Phe Ala Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile
      35          40          45

      aga aac gaa tgg ggg tgc aga tgc aac gat tca tcc gga ggt atg aaa      192
      Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Gly Gly Met Lys
      50          55          60

      caa atc gaa gac aag ctg gaa gaa atc ctt tcg aaa ctg tac cac atc      240
      Gln Ile Glu Asp Lys Leu Glu Glu Ile Leu Ser Lys Leu Tyr His Ile
      65          70          75          80

30      gaa aac gag ctg gcc agg atc aag aaa ctg ctg ggc gaa tag      282
      Glu Asn Glu Leu Ala Arg Ile Lys Lys Leu Leu Gly Glu
      85          90

```

35 <210> 4

<211> 93

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> parte de pACsM2eGCN4

45

<400> 4

```

50      Met Leu Leu Val Asn Gln Ser His Gln Gly Phe Asn Lys Glu His Thr
      1          5          10          15

      Ser Lys Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala
      20          25          30

      Ala His Ser Ala Phe Ala Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile
      35          40          45

      Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Gly Gly Met Lys
      50          55          60

      Gln Ile Glu Asp Lys Leu Glu Glu Ile Leu Ser Lys Leu Tyr His Ile
      65          70          75          80

65      Glu Asn Glu Leu Ala Arg Ile Lys Lys Leu Leu Gly Glu
      85          90

```

ES 2 327 719 T3

<210> 5

<211> 1230

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> parte de pACsM2eGCN4C3d

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1230)

15

<223>

<400> 5

20	atg cta cta gta aat cag tca cac caa ggc ttc aat aag gaa cac aca	48
	Met Leu Leu Val Asn Gln Ser His Gln Gly Phe Asn Lys Glu His Thr	
	1 5 10 15	
25	agc aag atg gta agc gct att gtt tta tat gtg ctt ttg gcg gcg gcg	96
	Ser Lys Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala	
	20 25 30	
30	gcg cat tct gcc ttt gcc tct ctg ctg acc gaa gtt gaa acc cct atc	144
	Ala His Ser Ala Phe Ala Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile	
	35 40 45	
35	aga aac gaa tgg ggg tgc aga tgc aac gat tca tcc gga ggt atg aaa	192
	Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Gly Gly Met Lys	
	50 55 60	
40	caa atc gaa gac aag ctg gaa gaa atc ctt tcg aaa ctg tac cac atc	240
	Gln Ile Glu Asp Lys Leu Glu Glu Ile Leu Ser Lys Leu Tyr His Ile	
	65 70 75 80	
45	gaa aac gag ctg gcc agg atc aag aaa ctg ctg ggc gaa gga tca ggt	288
	Glu Asn Glu Leu Ala Arg Ile Lys Lys Leu Leu Gly Glu Gly Ser Gly	
	85 90 95	
50	tca ccg gat ctc gga tct acc ccc gca ggc tct ggg gaa cag aac atg	336
	Ser Pro Asp Leu Gly Ser Thr Pro Ala Gly Ser Gly Glu Gln Asn Met	
	100 105 110	
55	att ggc atg aca cca aca gtc att gcg gta cac tac ctg gac cag acc	384
	Ile Gly Met Thr Pro Thr Val Ile Ala Val His Tyr Leu Asp Gln Thr	
	115 120 125	
60	gaa cag tgg gag aag ttc ggc ata gag aag agg caa gag gcc ctg gag	432
	Glu Gln Trp Glu Lys Phe Gly Ile Glu Lys Arg Gln Glu Ala Leu Glu	
	130 135 140	
65	ctc atc aag aaa ggg tac acc cag cag ctg gcc ttc aaa cag ccc agc	480
	Leu Ile Lys Lys Gly Tyr Thr Gln Gln Leu Ala Phe Lys Gln Pro Ser	
	145 150 155 160	
70	tct gcc tat gct gcc ttc aac aac cgg ccc ccc agc acc tgg ctg aca	528
	Ser Ala Tyr Ala Ala Phe Asn Asn Arg Pro Pro Ser Thr Trp Leu Thr	
	165 170 175	
75	gcc tac gtg gtc aag gtc ttc tct cta gct gcc aac ctc atc gcc atc	576
	Ala Tyr Val Val Lys Val Phe Ser Leu Ala Ala Asn Leu Ile Ala Ile	
	180 185 190	

ES 2 327 719 T3

5 gac tct cac gtc ctg tgt ggg gct gtt aaa tgg ttg att ctg gag aaa 624
 Asp Ser His Val Leu Cys Gly Ala Val Lys Trp Leu Ile Leu Glu Lys
 195 200 205
 10 cag aag ccg gat ggt gtc ttt cag gag gat ggg ccc gtg att cac caa 672
 Gln Lys Pro Asp Gly Val Phe Gln Glu Asp Gly Pro Val Ile His Gln
 210 215 220
 15 gaa atg att ggt ggc ttc cgg aac gcc aag gag gca gat gtg tca ctc 720
 Glu Met Ile Gly Gly Phe Arg Asn Ala Lys Glu Ala Asp Val Ser Leu
 225 230 235 240
 20 aca gcc ttc gtc ctc atc gca ctg cag gaa gcc agg gac atc tgt gag 768
 Thr Ala Phe Val Leu Ile Ala Leu Gln Glu Ala Arg Asp Ile Cys Glu
 245 250 255
 25 ggg cag gtc aat agc ctt cct ggg agc atc aac aag gca ggg gag tat 816
 Gly Gln Val Asn Ser Leu Pro Gly Ser Ile Asn Lys Ala Gly Glu Tyr
 260 265 270
 30 att gaa gcc agt tac atg aac ctg cag aga cca tac aca gtg gcc att 864
 Ile Glu Ala Ser Tyr Met Asn Leu Gln Arg Pro Tyr Thr Val Ala Ile
 275 280 285
 35 gct ggg tat gcc ctg gcc ctg atg aac aaa ctg gag gaa cct tac ctc 912
 Ala Gly Tyr Ala Leu Ala Leu Met Asn Lys Leu Glu Glu Pro Tyr Leu
 290 295 300
 40 ggc aag ttt ctg aac aca gcc aaa gat cgg aac cgc tgg gag gag cct 960
 Gly Lys Phe Leu Asn Thr Ala Lys Asp Arg Asn Arg Trp Glu Glu Pro
 305 310 315 320
 45 gac cag cag ctc tac aac gta gag gcc aca tcc tac gcc ctc ctg gcc 1008
 Asp Gln Gln Leu Tyr Asn Val Glu Ala Thr Ser Tyr Ala Leu Leu Ala
 325 330 335
 50 ctg ctg ctg ctg aaa gac ttt gac tct gtg ccc cct gta gtg cgc tgg 1056
 Leu Leu Leu Leu Lys Asp Phe Asp Ser Val Pro Pro Val Val Arg Trp
 340 345 350
 55 ctc aat gag caa aga tac tac gga ggc ggc tat ggc tcc acc cag gct 1104
 Leu Asn Glu Gln Arg Tyr Tyr gga ggc ggc tat ggc tcc acc cag gct
 355 360 365
 60 acc ttc atg gta ttc caa gcc ttg gcc caa tat caa aca gat gtc cct 1152
 Thr Phe Met Val Phe Gln Ala Leu Ala Gln Tyr Gln Thr Asp Val Pro
 370 375 380
 65 gac cat aag gac ttg aac atg gat gtg tcc ttc cac ctc ccc agc agt 1200
 Asp His Lys Asp Leu Asn Met Asp Val Ser Phe His Leu Pro Ser Ser
 385 390 395 400
 70 gga tct gaa gag ttc gga tgc gat cct tga 1230
 Gly Ser Glu Glu Phe Gly Ser Asp Pro
 405

<210> 6

<211> 409

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> parte de pACsM2eGCN4C3d

<400> 6

Met Leu Leu Val Asn Gln Ser His Gln Gly Phe Asn Lys Glu His Thr

ES 2 327 719 T3

	1		5		10		15									
5	Ser	Lys	Met	Val	Ser	Ala	Ile	Val	Leu	Tyr	Val	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala
				20					25					30		
10	Ala	His	Ser	Ala	Phe	Ala	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Ile
			35					40					45			
15	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly	Cys	Arg	Cys	Asn	Asp	Ser	Ser	Gly	Gly	Met	Lys
		50					55					60				
20	Gln	Ile	Glu	Asp	Lys	Leu	Glu	Glu	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Tyr	His	Ile
	65					70					75				80	
25	Glu	Asn	Glu	Leu	Ala	Arg	Ile	Lys	Lys	Leu	Leu	Gly	Glu	Gly	Ser	Gly
					85					90					95	
30	Ser	Pro	Asp	Leu	Gly	Ser	Thr	Pro	Ala	Gly	Ser	Gly	Glu	Gln	Asn	Met
				100					105					110		
35	Ile	Gly	Met	Thr	Pro	Thr	Val	Ile	Ala	Val	His	Tyr	Leu	Asp	Gln	Thr
			115					120					125			
40	Glu	Gln	Trp	Glu	Lys	Phe	Gly	Ile	Glu	Lys	Arg	Gln	Glu	Ala	Leu	Glu
		130					135					140				
45	Leu	Ile	Lys	Lys	Gly	Tyr	Thr	Gln	Gln	Leu	Ala	Phe	Lys	Gln	Pro	Ser
	145					150					155				160	
50	Ser	Ala	Tyr	Ala	Ala	Phe	Asn	Asn	Arg	Pro	Pro	Ser	Thr	Trp	Leu	Thr
				165						170					175	
55	Ala	Tyr	Val	Val	Lys	Val	Phe	Ser	Leu	Ala	Ala	Asn	Leu	Ile	Ala	Ile
				180					185					190		
60	Asp	Ser	His	Val	Leu	Cys	Gly	Ala	Val	Lys	Trp	Leu	Ile	Leu	Glu	Lys
		195						200					205			
65	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Val	Phe	Gln	Glu	Asp	Gly	Pro	Val	Ile	His	Gln
		210					215					220				
70	Glu	Met	Ile	Gly	Gly	Phe	Arg	Asn	Ala	Lys	Glu	Ala	Asp	Val	Ser	Leu
	225					230					235					240
75	Thr	Ala	Phe	Val	Leu	Ile	Ala	Leu	Gln	Glu	Ala	Arg	Asp	Ile	Cys	Glu
				245						250					255	
80	Gly	Gln	Val	Asn	Ser	Leu	Pro	Gly	Ser	Ile	Asn	Lys	Ala	Gly	Glu	Tyr
				260					265					270		
85	Ile	Glu	Ala	Ser	Tyr	Met	Asn	Leu	Gln	Arg	Pro	Tyr	Thr	Val	Ala	Ile

ES 2 327 719 T3

	275	280	285
5	Ala Gly Tyr Ala Leu Ala Leu Met Asn Lys Leu Glu Glu Pro Tyr Leu 290 295 300		
10	Gly Lys Phe Leu Asn Thr Ala Lys Asp Arg Asn Arg Trp Glu Glu Pro 305 310 315 320		
15	Asp Gln Gln Leu Tyr Asn Val Glu Ala Thr Ser Tyr Ala Leu Leu Ala 325 330 335		
20	Leu Leu Leu Leu Lys Asp Phe Asp Ser Val Pro Pro Val Val Arg Trp 340 345 350		
25	Leu Asn Glu Gln Arg Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Ala 355 360 365		
30	Thr Phe Met Val Phe Gln Ala Leu Ala Gln Tyr Gln Thr Asp Val Pro 370 375 380		
35	Asp His Lys Asp Leu Asn Met Asp Val Ser Phe His Leu Pro Ser Ser 385 390 395 400		
40	Gly Ser Glu Glu Phe Gly Ser Asp Pro 405		

<210> 7
 35 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> cebador BACfor

<400> 7
 45 ttactgttt tcgtaacagt ttg 24

<210> 8
 <211> 54
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 55 <223> parte de GCN4nh

<400> 8
 60 tacagaagct tgtctcgat ttgttcata ccgccaaggt ctgggcgaa aacc 54

<210> 9
 <211> 54
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 327 719 T3

<220>

<223> cebador GCN4cooh

5 <400> 9

atctgatcaa gaaactgctg ggcgaagggtg gcaaagagat atgccccaaa ttag 54

<210> 10

10 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> cebador BACrev

<400> 10

20 cattttatgt ttcaggttca ggg 23

<210> 11

<211> 25

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> cebador GP67s

<400> 11

35 gctactagta aatcagtcac accaa 25

<210> 12

<211> 33

40 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> cebador GP67a

<400> 12

50 cgaagcttgc cggcaaaggc agaatgcgcc gcc 33

<210> 13

<211> 30

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> cebador M2rev

<400> 13

accattccgg atgaatcggt gcattgcac 30

65 <210> 14

<211> 23

ES 2 327 719 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> cebador M2Ss

<400> 14

10 tctctgctga ccgaagttga aac 23

<210> 15
 <211> 50

15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> cebador UM2ECa

<400> 15

25 cgaagcttac tagttcacgg atccccactt gaatcgttgc atctgcaccc 50

<210> 16
 <211> 32

30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 35 <223> cebador GCN4for

<400> 16

40 agatttccgg aggtatgaaa caaatcgaag ac 32

<210> 17
 <211> 31

45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> cebador GCN4rev

<400> 17

ataggagatc tattcgccca gcagtttctt g 31

55 <210> 18
 <211> 43

60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 65 <223> cebador GCNrev2

ES 2 327 719 T3

<400> 18

tattggatcc ggtgaacctg atccttcgcc cagcagttc ttg 43

5 <210> 19

<211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> cebador GCN4pos

15 <400> 19

agctggaaga aatccttcg aaactgtacc acatcgaaaa cgagctggcc ag 52

20 <210> 20

<211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> cebador GCN4neg

30 <400> 20

gatcctggcc agctcgttt cgatgtgga cagttcgaa aggattctt cc 52

<210> 21

35 <211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> cebador C3ds

<400> 21

45

ccgcgcccac ccgacgagat ctcgatcta ccccc 35

<210> 22

<211> 38

50

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

55

<223> cebador C3da

<400> 22

60

gcactagttc aaggatccga tccgaactct tcagatcc 38

65