



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica

**DESARROLLO DE VACUNAS DE NUEVA GENERACIÓN CONTRA EL
VIRUS DE INFLUENZA**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área Virología.

Bioq. Lorena Analía Boado

Directora de tesis: Dra. Nora Mattion

Directora Adjunta: Dra Paula Alvarez

Consejera de Estudios: Dra. Lucía Cavallaro

Lugar de trabajo: Centro de Virología Animal, Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein-

CONICET

Buenos Aires, 2014

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos aquellos que de alguna manera formaron parte de este proyecto, dentro y fuera del laboratorio. En particular, quiero darle mi agradecimiento a la Dra Nora Mattion quien confió en mí para la realización de este trabajo y quien perseveró para que pudiera concluirlo dándome todo su apoyo.

A la Dra. Paula Alvarez quien además de darme su apoyo, dirección e instrucción en el área técnica me brindó su amistad a lo largo de estos años.

Al Dr. José La Torre por haberme abierto las puertas de este instituto y por haberme dado la oportunidad de permanecer y trabajar con él.

A mis compañeras de laboratorio que se han transformado en amigas, Carina, Marina, Alejandra y Leticia con quienes he compartido éxitos y frustraciones tanto en lo profesional como en lo personal; su compañía y consejos me aportaron mucho a lo largo de este camino.

A Osvaldo Periolo, a quien conozco desde antes de comenzar este proyecto, quien siempre me apoyó y trató de buscar mi permanencia en este instituto, aprecio mucho sus consejos y disfruto compartir el trabajo con él.

A Nora Baro, quien fue la primera persona que me dirigió en lo profesional, de quien aprendí mucho; aunque hayan pasado muchos años desde que trabajamos juntas guardo un cariño y recuerdos entrañables.

A todo el personal técnico de apoyo del CEVAN que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en lo que necesitara (Carmen, María, Margarita).

A mi familia, que amo profundamente, mi marido Nahuel, mis hijos Santiago e Iñaki y a quien está por llegar (Benjamín); si bien fue difícil compatibilizar la maternidad con mi trabajo, ellos fueron y serán siempre mis mejores experimentos; a vos Nahuel te agradezco por ser mi compañero durante todo este tiempo y ser el coautor de los ya mencionados "mejores experimentos".

A vos mamá que siempre estás al pie del cañón cuando te necesito, sé que este logro va a ser un orgullo más para vos, aunque no te lo diga a menudo, te quiero mucho.

A mi hermana Laura y su familia, tus hijos fueron mis primeros hijos, gracias por hacerme tía, por tus consejos, tu apoyo y tu cariño, nunca te apartes de mí, me hacés mucha falta.

A mis ángeles, papá y abuela Amelia que siempre los llevo conmigo.

Y a mis amigas de siempre, Tati, Caro, Sil y Jime con quien he compartido momentos divertidos, momentos difíciles, risas y llantos, las quiero chicas.

A todos gracias, todos dejaron su huella en mí de una u otra forma y contribuyeron a ser quien soy y a haber llegado a poder concluir con este trabajo.

INDICE

INDICE

INDICE	4
CONSIDERACIONES GENERALES.....	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCION	10
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	38
3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. Ácidos Nucleicos.....	41
3.2. Amplificación y clonado del gen completo de la HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1) (HA _{NC}).....	44
3.3. Amplificación y clonado del gen completo de la HA de la cepa A/Panamá/2007/99 (H3N2) (HA _P)	50
3.4. Amplificación y clonado del gen completo de la HA de la cepa B/Yamanashi/166/98 (HA _{B/Y})	58
3.5. Amplificación y clonado del gen de HA (subtipo H1) de influenza sin porción transmembrana y con secuencia señal del gen gp64 de Bv (Δ HA _{gp})	60
3.6. Amplificación y clonado del dominio HA ₁ del gen HA de la cepa A/Viet Nam/1203/2004 (Δ HA ₅).....	65
3.7. Clonado del gen sintético HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 optimizado para su expresión en células de insecto	69
3.8. Clonado del gen NP fusionado al gen que codifica la proteína VP39 de Bv (NP-VP39)..	70
3.9. Construcciones de ADN con el ectodominio de la proteína Matriz 2 (M2e)	74
3.9.1. Clonado de M2e fusionado al gen que codifica para la glicoproteína de membrana gp64 de Baculovirus	74
3.9.2. Clonado del péptido M2e como fusión a la proteína lumasina sintasa de Brucella spp (BLS)	78
3.10. Células de insecto	80
3.11. Obtención de sueros específicos. Protocolos de inmunización	80
3.12. Análisis de sueros por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	81
3.13. Ensayos de Western blot.....	82
3.14. Inmunización de animales.....	82
3.15. Producción de virus en huevos embrionados.....	83
3.16. Análisis estadísticos	83
4. RESULTADOS	85

4.1. Obtención de los baculovirus recombinantes (rBv) que expresan el gen HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 (rHA_{NC}).	85
4.2 .Obtención de los rBv que expresan el gen HA de la cepa A/Panamá/2007/99 (rHA_P) ..	89
4.3. Obtención de los baculovirus recombinantes que expresan el gen HA de la cepa B/Yamanashi (rHA_{BY})	92
4.4. Ensayos de purificación de las rHA	94
4.5. Obtención de los rBv recombinantes que expresan la HA sin dominio transmembrana y con secuencia señal de gp64 de Bv (rΔHA_{gp}).....	99
4.6. Expresión de la subunidad HA1 (rΔHA5) de la cepa A/VietNam/1203/2004 (H5N1) ..	106
4.7. Expresión de HA₀ de la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1) con secuencia de nucleótidos optimizada (rHA_{op})	114
4.8. Evaluación de la expresión de rHA_T	115
4.9. Expresión de distintas versiones de rHA de la cepa A/New Caledonia/20/99 en células High Five™	116
4.10. Expresión de la NP fusionada a VP39 de Bv	119
4.11. Expresión de M2e fusionada a la proteína gp64 de Bv.	123
4.12. Expresión de las quimeras de BLS y BLS-M2e	128
4.13. Pruebas de inmunogenicidad y protección de las vacunas basadas en el péptido M2e	135
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	143
6. ANEXOS.....	150
7. BIBLIOGRAFIA.....	159

CONSIDERACIONES GENERALES

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a una beca del PID 2004-23112 (FONCyT) que luego continuó con una beca tipo II de CONICET.

Las cepas virales de influenza, huevos SPF y reactivos de referencia fueron adquiridos en el marco de un proyecto Institucional de desarrollo de una vacuna convencional contra Influenza a través de un Convenio de CEVAN-CONICET con una empresa nacional.

El proyecto de Hemaglutininas recombinantes fue realizado en el marco del PID 2004-23112 financiado por FONCyT, la empresa Monte Verde S. A. y CONICET.

El desarrollo de antígenos de cobertura universal fue financiado con recursos de CONICET, y se contó con la colaboración del Dr. Oscar Taboga (INTA Castelar) y del Dr. Fernando Goldbaum (Fundación Leloir).

Agradecimiento a: Dr. Carlos Mammarella, Dr. Jose La Torre, MV Osvaldo Periolo, MV Marcela Iglesias, Lic. Flavia Musallo.

RESUMEN

El virus de influenza, que causa infecciones epidémicas en el hombre y diversas especies de animales susceptibles, evoluciona continuamente por la acumulación de mutaciones puntuales, así como por el intercambio de segmentos genómicos entre distintas cepas. Las vacunas antigripales estacionales en uso actualmente para la prevención son eficaces para neutralizar una infección con cepas homólogas, pero su capacidad de cobertura heterosubtípica es variable o nula. El presente trabajo está orientado a desarrollar, por un lado, vacunas antigripales de nueva generación, a través de la expresión de la proteína inmunodominante hemaglutinina por tecnología de ADN recombinante, en un sistema de expresión eucariota (baculovirus/ células de insectos). Por otro lado, se propone la generación de una vacuna "universal" de amplio espectro de protección a través de dirigir la respuesta inmune del huésped hacia regiones más conservadas del virus. En este sentido, se ha buscado en la segunda parte de este trabajo lograr una vacuna de más amplia cobertura basada en las proteínas internas del virus, en particular en la proteína de matriz M2 y en la nucleoproteína (NP). Se demuestra que las vacunas experimentales basadas en el ectodominio de M2 pueden inducir inmunidad humoral o celular capaces de proteger animales vacunados de una descarga con dosis letal de virus de influenza.

ABSTRACT

Influenza virus, which causes epidemic infections in man and various species of susceptible animals, continually evolves by exchange of gene segments between different strains, as well as incorporation of point mutations. Seasonal influenza vaccines currently in use for prevention are effective in neutralizing infection with homologous strains, but their ability to cover heterologous strains is very low or none. This work is aimed to develop, in the first part, new generation influenza vaccines through the expression of the immunodominant protein hemagglutinin through recombinant DNA technology in a eukaryotic expression system (baculovirus / insect cells). In the second part of this work, the generation of an "universal" vaccine with broad spectrum of protection is pursued by means of directing the host immune response to more conserved regions of the virus. In this sense, it has been sought to achieve a vaccine based on the internal proteins of the virus, particularly in the Matrix 2 protein and the viral Nucleoprotein (NP). We demonstrate that experimental vaccines based on the ectodomain of the M2 protein can induce humoral or cellular immunity capable of protecting mice from challenge with a lethal dose of influenza virus.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCION

Influenza humana

La gripe, producida por el virus de influenza humana, es una de las enfermedades virales respiratorias agudas con mayor impacto sobre la población humana mundial. Anualmente ocurren epidemias estacionales, principalmente durante los meses fríos, que son causa de morbilidad y mortalidad significativas en todo el mundo. Se estima que el virus es responsable de 250.000 a 500.000 muertes al año en todo el mundo (Poland y col., 2007). Esta enfermedad es altamente contagiosa debido a la fácil transmisión del virus de individuo a individuo (Hilleman, 2002).

La infección con el virus de influenza afecta a individuos de todas las edades. Los síntomas de la gripe son similares a los del resfrío común pero más severos, incluyendo fiebre alta, dolor de cabeza, fatiga, debilidad, dolor muscular, dolor de garganta, diarrea, tos seca y congestión nasal (Cox y Hollister, 2009; Hilleman, 2002). El impacto de la enfermedad es particularmente severo en individuos mayores de 65 años, niños menores de 5 años e individuos con enfermedades crónicas y/o inmuno-comprometidos, en los cuales la infección de las vías respiratorias puede dar lugar a neumonía primaria y conducir a infecciones con graves complicaciones pulmonares y muerte. También pueden producirse eventualmente complicaciones cardíacas, musculares (miositis), del sistema nervioso central (síndrome de Reye, síndrome de Guillain-Barré, encefalitis) y renales, aunque con poca frecuencia. Luego de la enfermedad aguda puede ocurrir la aparición de neurastenia y fatiga de duración variable, acompañado de inmunodeficiencia transitoria (Hilleman, 2002). Particularmente en Argentina, en los últimos años, la mayoría de las muertes asociadas a gripe estacional han ocurrido en personas mayores de 65 años (Imaz y col., 2006).

El virus de influenza tiene la capacidad de provocar epidemias anuales recurrentes (estacionales) y pandemias. El término pandemia, representa un número anormalmente alto de individuos infectados debido al surgimiento de una nueva cepa viral. En ese caso, la escasa o nula inmunidad protectora presente en la mayor parte de la población, determina una rápida propagación del nuevo virus a través de muchos países o continentes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido un sistema de clasificación dependiente de la gravedad del evento pandémico, con una escala que va desde 1 (bajo riesgo) a 6 (alto riesgo). El número de muertes que ocurren durante una pandemia es el resultado directo del carácter de la variación antigénica del virus, la magnitud de la inmunidad protectora de las poblaciones, la virulencia relativa de los virus y la efectividad de los tratamientos preventivos (WHO, 2005).

Históricamente, se sabe que durante la Edad Media, la gripe azotó cruelmente a la población mundial. Se han hallado registros de al menos 3 pandemias en el siglo XVII. En el siglo XX se produjeron

tres eventos importantes considerados como pandemias: la gripe española en 1918, con los mayores índices de mortalidad de ese siglo, la gripe asiática de 1957 y la gripe de Hong Kong de 1968 (Tabla 1).

En el siglo XXI, en junio del 2009, la OMS declaró una pandemia de nivel de alerta 6 sobre la base de las características epidemiológicas y transmisión de un nuevo virus de influenza A/H1N1, resultante de una combinación de segmentos genómicos de virus de origen aviar, porcino y humano (McCaughey, 2010). En nuestro país, el nuevo virus comenzó a circular en mayo del 2009 y generó 11.978 casos confirmados y 617 defunciones notificadas a enero del 2010. El grupo etario mayormente afectado entre los casos graves confirmados, fueron los niños menores de 5 años (76 por 100.000, Ministerio de Salud, 2012).

Tabla 1. Pandemias ocurridas en los siglos XX y XXI

Año de emergencia	Tipo de Influenza A	Casos de muertes
1918	H1N1	20-100 millones
1957	H2N2	1-1,5 millones
1968	H3N2	0,75 -1 millón
2009	H1N1	Estimado, mayor a 100.000

El virus de influenza

Los virus que causan la gripe o influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* y se distribuyen en tres tipos: A, B y C. Los virus de influenza A (Fig. 1) fueron descritos por primera vez en 1933 (Smith y col., 1933). Su reservorio natural son las aves acuáticas pero también infecta y/o causa enfermedad en aves de corral y mamíferos, incluyendo al hombre (Subbarao y Joseph, 2007). Los virus de influenza B se identificaron en 1940 (Francis, 1940) y afectan a los humanos, causando epidemias moderadas. Los virus de influenza C se describieron en 1950 (Francis y col., 1950) e infectan de manera limitada a la población humana.

El virus de influenza A es el de mayor importancia en Salud Pública ya que es el causante de las epidemias estacionales y de las pandemias identificadas hasta la fecha. Los virus de influenza A del subtipo H1N1 fueron responsables de las pandemias de 1918 y 2009 y de la epidemia de 1977; los del tipo A/H2N2 de la pandemia de 1957; y los del tipo A/H3N2 de la pandemia de 1968 (Gamblin y Skehel, 2010).

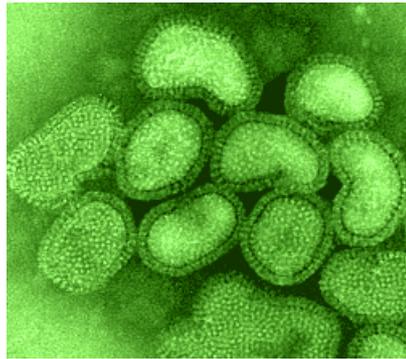


Figura 1. Microscopía electrónica del virus de influenza A

Estructura y organización

La partícula viral tiene un tamaño de 80 a 120 nm de diámetro, con estructura esférica o filamentosa. La envoltura viral es lipídica y deriva de la membrana plasmática de la célula infectada de la cual emergió. El virus presenta espículas en toda su superficie, representadas por las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), en una proporción de aproximadamente cuatro a uno (Fig. 2). Existen canales iónicos compuestos por la proteína Matriz 2 (M2) que atraviesan la envoltura lipídica, en una relación de una molécula de M2 por cada 101-102 moléculas de HA.

La proteína Matriz 1 (M1) se encuentra debajo de la envoltura y forma una capa que rodea la nucleocápside del virión. Interna a M1, se encuentran los complejos de ribonucleoproteína (RNP), que consisten en la asociación de los segmentos de ARN genómicos con la nucleoproteína (NP) y el complejo de la ARN polimerasa, un heterotrímero compuesto por las subunidades de la polimerasa, PB1, PB2 y PA. También se encuentran presentes pequeñas cantidades de la proteína no estructural NS2 (Bouvier y Palese, 2008; Medina y Garcia-Sastre, 2011) (Fig. 2).

La caracterización de los virus en los tres **tipos** citados (A, B y C), se basa en las variaciones antigénicas de la proteína de la matriz (M) y de la nucleoproteína (NP).

Los virus de influenza tipo A se clasifican en **subtipos**. Esta sub-tipificación depende de la combinación entre las proteínas de superficie HA y NA. Existen 18 subtipos de HA y 11 subtipos de NA descubiertos hasta el momento (Tong y col., 2013; www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm). La mayoría de las combinaciones sólo se encuentran en diversas especies de aves, especialmente aves acuáticas. Las combinaciones de subtipos de HA y NA que originaron las pandemias están indicados en la Tabla 1. El virus de influenza B posee un solo subtipo.

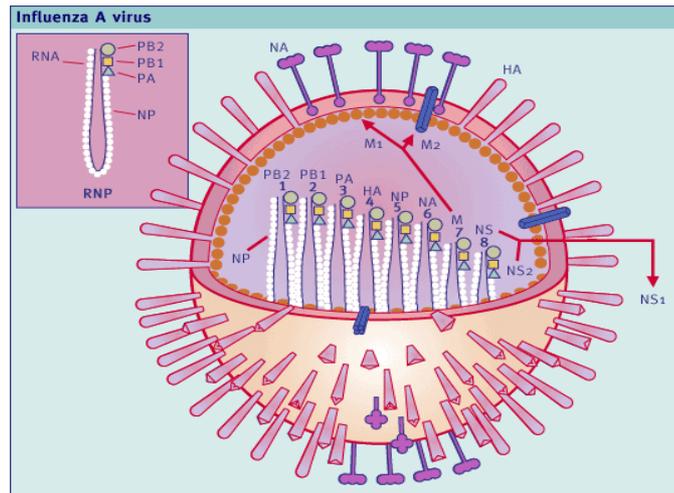


Figura 2. Esquema de la partícula del virus de influenza A. Se indican las distintas proteínas que la conforman

Existe una nomenclatura internacional para los virus de influenza aceptada por la OMS en 1979, que utiliza los siguientes componentes: el tipo antigénico (A, B, o C), el hospedador de origen (para los virus de origen humano, se omite la denominación de origen), el origen geográfico, el número de aislamiento, el año de aislamiento, y por último la descripción de los subtipos de HA y NA. Por ejemplo, A/New Caledonia/20/99 (H1N1) (www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm).

En la naturaleza, los virus de influenza A tienen la capacidad de sobrevivir evadiendo el sistema inmune, evolucionando por dos mecanismos diferentes: (i) la deriva antigénica o "*antigenic drift*", acumulación de mutaciones que facilitan la evasión de la respuesta inmune; y (ii) el cambio antigénico o "*antigenic shift*", determinado por la redistribución de segmentos genómicos entre virus de la misma o distinta especie (Subbarao y Joseph, 2007).

La deriva antigénica es la causa más común de las epidemias anuales (cepas estacionales). Debido a la falta de actividad de corrección de la ARN polimerasa durante la transcripción viral, las mutaciones puntuales son incorporadas en el genoma, principalmente en el dominio globular de la HA. Los anticuerpos inducidos durante la vacunación o infección previa, no son capaces de identificar los nuevos sitios antigénicos, lo que favorece al escape del sistema inmune.

El cambio antigénico se produce por el resultado del intercambio de segmentos genómicos entre distintos virus circulantes que infectan simultáneamente un huésped (*gene reassortment*). Cuando este intercambio se produce entre virus de origen humano y animal (fundamentalmente aviar o porcino), se genera una nueva variante muy distinta, que puede derivar en una pandemia en caso que el virus adquiera la propiedad de transmitirse entre humanos.

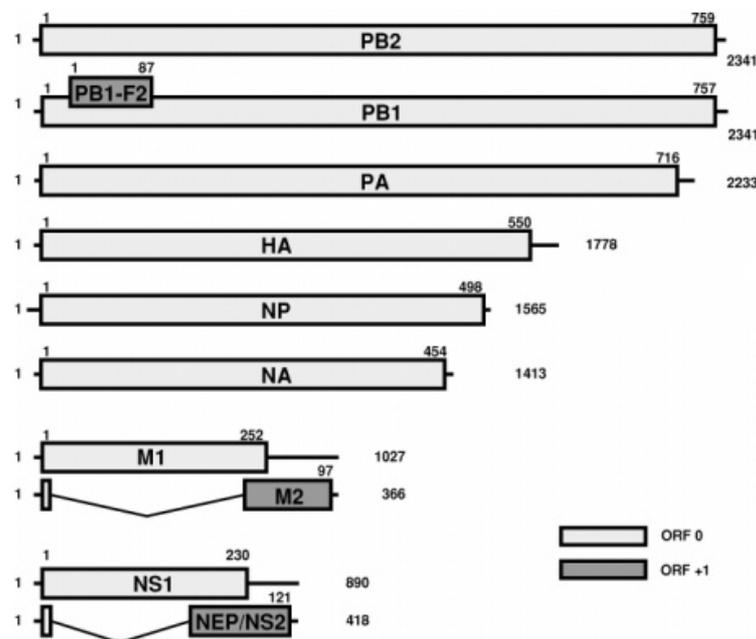
Este intercambio de segmentos genómicos también ocurre cuando una célula en cultivo se infecta simultáneamente con virus de distintas especies, aviar, porcino o humano, produciéndose una

descendencia con una redistribución de segmentos que origina nuevos virus. Las combinaciones de segmentos genómicos de virus de distintas especies producen virus desconocidos para el sistema inmune, lo que puede provocar una pandemia (cepas pandémicas) (Cheng y Deng, 2009).

El genoma viral

El genoma del virus de influenza A consiste en 8 segmentos ARN de cadena simple que codifican para 11 proteínas. La HA (codificada por el segmento genómico 4) y la NA (codificada por el segmento genómico 6) son las proteínas más abundantes del virus y están localizadas en su envoltura. De acuerdo a las características antigénicas de estas glicoproteínas, el virus es clasificado como se dijo anteriormente en subtipos.

Los segmentos 1 a 3 codifican para el complejo viral de polimerasas (polimerasa básica 1, PB1, polimerasa básica 2, PB2 y polimerasa ácida, PA). El segmento 2 contiene un segundo marco de lectura en +1, que codifica la proteína PB1-F2. Los segmentos 4 y 6 codifican la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) respectivamente. El segmento 5 codifica la Nucleoproteína (NP), el segmento 7 las proteínas Matriz 1 y Matriz 2 y el segmento 8 las proteína NS1 y NEP/NS2. Las proteínas M2 y NEP/NS2 están codificadas por ARNm splicing (Figura 3).



Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business.

Field's Virology, Fifth Edition, by David E. Knipe, Peter M. Howley, Diane E. Griffin, Malcom A. Martin, etc.

Figura 3: Estructura genómica del virus de influenza A/Puerto Rico/8/34. Los segmentos de ARN se muestran en el sentido positivo y las proteínas en aminoácidos. Las líneas en los extremos 5' y 3' representan regiones no codificantes. El segmento PB1 contiene un segundo marco de lectura en +1,

que codifica la proteína PB1-F2. Las proteínas M2 y NEP/NS2 están codificadas por ARNm splicing (los intrones están indicados).

En la Figura 2 se indicó la ubicación de estas proteínas en la partícula viral. El virus está envuelto por una membrana lipídica derivada de la célula huésped.

A continuación, en la Tabla 2, se describen los segmentos genómicos, su codificación y las funciones de las proteínas codificadas por los mismos.

Tabla 2. Características generales de los segmentos genómicos del virus de influenza A

Segmento	Proteína	Longitud (nt)	Peso Molecular (KDa)	Nº de moléculas por virión	Funciones identificadas
1	PB2	2320	85,7	30/60	RpdR: unión del cap
2	PB1	2341	86,5	30/60	RpdR: actividad en elongación
3	PA	2211	84,0	30/60	RpdR: actividad proteolítica
4	HA	1757	61,0	500	Hemaglutinina, reconocimiento del receptor
5	NP	1540	56,0	1000	Unión al RNA; parte del complejo transcripción; transporte nuclear/citoplasmático del RNA viral
6	NA	1392	50,0	100	Neuraminidasa, liberación de la partícula viral
7	M1	1005	28,0	3000	Proteína de matriz
	M2	315	11,0	20/60	Proteína integral de membrana, canal iónico
8	NS1	868	27,0	-	Proteína no estructural: splicing y traducción, anti-interferón.
	NS2	395	14,0	130/200	Proteína no estructural. Facilita el transporte del RNP desde el núcleo hacia el citoplasma

Ciclo de replicación viral

En las etapas iniciales de la replicación del virus de influenza A, la HA viral se une a los receptores celulares que contienen α -2,6 o α -2-3- ácido siálico, y el virus entra a la célula por un proceso de endocitosis mediada por el receptor. La HA sufre un clivaje en dos subunidades (HA₁ y HA₂) por proteasas celulares, exponiendo un dominio proteico que es responsable de la fusión de la envoltura vírica con la membrana endosomal. La acidificación de la vesícula endocítica abre el canal de iones M2 y

como resultado de la acidificación viral, se produce la pérdida de la envoltura y la liberación de los complejos de RNPs que contienen el genoma viral. Estos complejos se translocan al núcleo, donde la ARN polimerasa, transcribe y replica el ARN viral de sentido negativo [ARNv (-)], dando lugar a tres tipos de moléculas de ARN: ARN complementario de sentido positivo [ARNc (+)], que se utiliza como una plantilla para generar más ARNv; pequeños ARNs virales de sentido negativo (ARNvs), que se cree que regulan la interrupción de la transcripción a la replicación y los ARNm virales, que se exportan al citoplasma para su traducción.

Las proteínas virales que son necesarias en la replicación y transcripción son trasladadas de nuevo al núcleo, y los RNPs nuevos se exportan al citoplasma para ser envueltos, con la asistencia de M1 y NEP. Las proteínas virales HA, NA y M2, son transportados por la vía secretora trans-Golgi, y las proteínas maduras llegan a la membrana plasmática, donde M1 ayuda para la formación de las nuevas partículas virales. A continuación, se produce la evaginación de la partícula y la liberación mediada por la actividad de la NA (Medina & García-Sastre, 2011) (Figura 4).

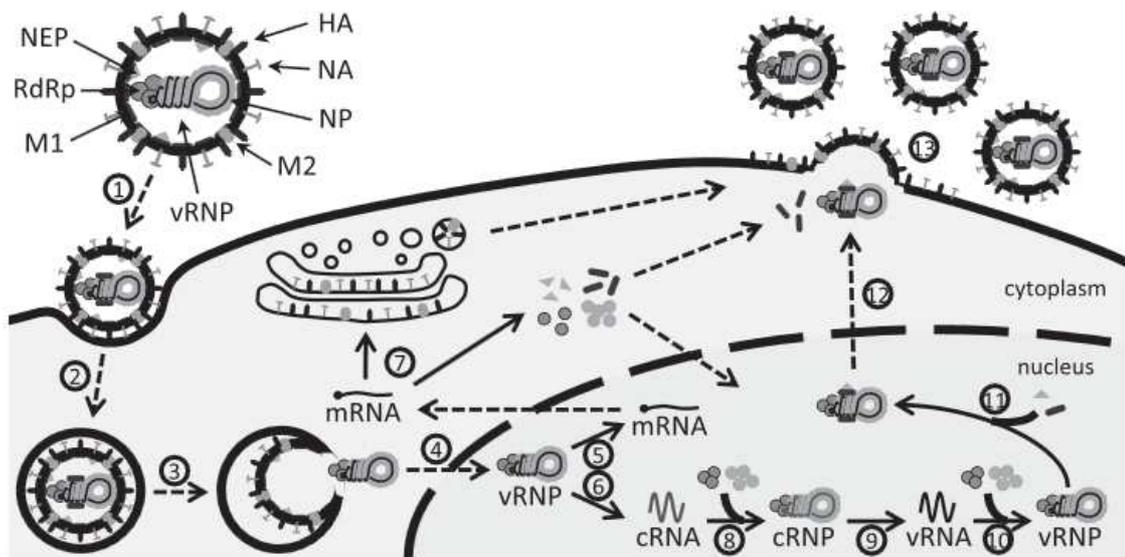


Figura 4. Esquema del ciclo de replicación del virus de influenza A.

Para facilitar la comprensión se simplifica el esquema representando sólo una partícula viral vRNP y se omiten las proteínas no estructurales. Las flechas continuas representan síntesis o unión de proteínas. Las flechas discontinuas indican los procesos de transporte. Se indican los diferentes pasos con números: 1: unión mediada por receptor; 2: endocitosis; 3: fusión con endosomas tardíos; 4: importación nuclear; 5: transcripción; 6: replicación (síntesis del cARN); 7: traducción de proteínas; 8: encapsidación del cARN; 9: replicación (síntesis de vARN); 10: encapsidación del vARN; 11: unión de M1 y NEP; 12: exportación nuclear y 13: ensamble y liberación de partículas virales. (Heldt y col., 2012).

Las proteínas Hemaglutinina y Neuraminidasa

La HA y la NA viral son el blanco principal de la respuesta inmune al virus de influenza. La HA viral se asocia formando trímeros y es primariamente sintetizada como un precursor denominado HA₀, permite la unión entre el virus y la célula huésped mediante la interacción con residuos de ácido siálico unidos a glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular (Gamblin y Skehel, 2010). Para que ocurra la activación de HA es necesaria la escisión proteolítica del precursor HA₀ en las subunidades HA₁ y HA₂ (Gamblin y Skehel, 2010). El clivaje ocurre en la superficie celular y ambas subunidades quedan unidas a través de puentes di-sulfuro (Cox y Anderson, 2007). La subunidad HA₁ es un dominio mayormente globular y contiene el sitio de unión al receptor celular y es reconocida por los anticuerpos neutralizantes. La subunidad HA₂, más pequeña, forma una estructura de tallo que ancla el dominio globular a la membrana viral o celular y posee un dominio (péptido de fusión) conservado que juega un papel esencial en la fusión de membranas (Gamblin y Skehel, 2010) (Figura 5).

El clivaje del precursor es esencial para la activación de la fusión de membranas y por lo tanto para la infectividad. Para la mayoría de los subtipos de HA, el sitio de clivaje está constituido por un único residuo de Arginina, sin embargo algunas cepas de los subtipos H5 y H7 han adquirido en esta zona, múltiples residuos básicos. Esto posibilita que el sitio sea reconocido por proteasas ubicuas del organismo y no solamente por las proteasas del tracto respiratorio. Por esta razón, en estos casos el clivaje de HA₀ es altamente eficiente y conlleva a una infección sistémica (Hilleman, 2002) y a cepas de una elevada patogenicidad.

La unión del virus a la célula huésped es específica de especie. Los virus aviares y equinos se unen al ácido siálico que está unido a la galactosa mediante enlaces del tipo α -2,3; los virus humanos reconocen los enlaces del tipo α -2,6 y en el caso de los virus porcinos se reconocen ambos tipos de enlaces (Subbarao y Joseph, 2007). Esto último favorecería la posible reorganización en cerdos de nuevas cepas luego de una co-infección con virus de otras especies. Estos receptores se unen a una zona de depresión en la estructura de la HA, la cual está compuesta por residuos conservados en todos los subtipos de influenza (Skehel y Wiley, 2000). Sin embargo, por mutaciones en aminoácidos cercanos al sitio de unión al receptor y en algunos casos por impedimento estérico (por ejemplo, al generar nuevos sitios de glicosilación), se puede modificar la afinidad y especificidad de esta interacción (Gamblin y Skehel, 2010). Al examinar la sustitución aminoacídica mediante selección natural se observa que estos aminoácidos están en la superficie del dominio HA₁, principalmente rodeando el sitio de unión al receptor (Skehel y Wiley, 2000); esto hace que el dominio HA₁ sea considerablemente más variable que HA₂.

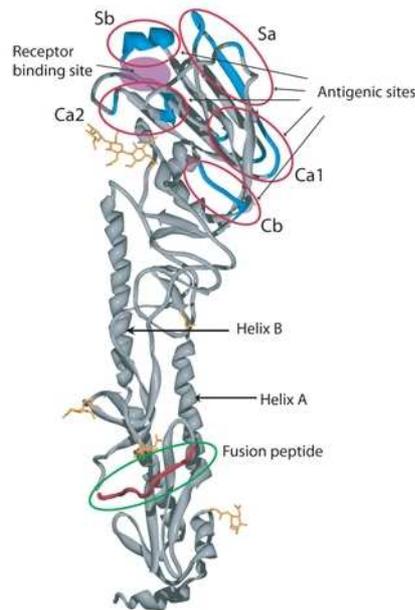


Figura 5: Representación del monómero de la proteína HA no clivada del virus de influenza de 1918 basado en análisis de difracción de rayos X. Se indican los sitios antigénicos Sa, Sb, Ca1, Ca2 y Cb alrededor del receptor de ácido siálico (púrpura). En la zona proximal a la membrana (abajo) se muestra en rojo el péptido de fusión y las hélices A y B.

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business.

Field's Virology, Fifth Edition, by David E. Knipe, Peter M. Howley, Diane E. Griffin, Malcolm A. Martin, etc.

La NA es un homotetrámero cuya función es remover los residuos de ácido siálico de glicoproteínas y glicolípidos de la superficie de la célula infectada y de las glicoproteínas del virus para permitir la liberación de nuevos viriones, facilitando así la diseminación del virus.

Anticuerpos anti-NA así como los antivirales comerciales oseltamivir (Tamiflu®), zanamivir (Relenza®, entre otros) y peramivir (Rapiacta®) bloquean esta actividad y, en consecuencia, restringen la infección (Subbarao y Joseph, 2007).

La Nucleoproteína viral

La nucleoproteína es el principal componente del complejo ribonucleoproteico (RNP), formado por el ARN viral, la nucleoproteína (NP) y el complejo de la ARN polimerasa (Hilleman, 2002) (Figura 6). La NP se encuentra codificada en el segmento 5 del genoma viral como ya se mencionó anteriormente. Análisis filogenéticos de distintas cepas de virus de influenza A aisladas de diferentes huéspedes, revelan que la secuencia de la NP presenta una estructura altamente conservada, con una diferencia en la secuencia de aminoácidos menor al 11% (Noda y col., 2006; www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm).

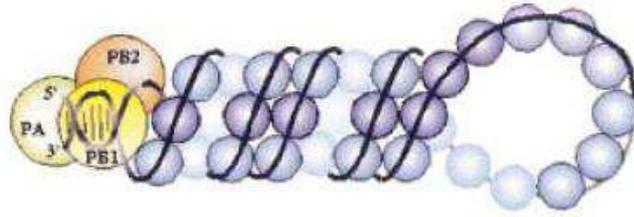


Figura 6: Representación esquemática de la RNP. Las esferas azules representan los monómeros de la NP con un segmento de ARN viral asociado (línea negra), y el complejo de la ARN polimerasa (Portela and Digard, 2002).

La principal función de la NP es encapsidar el genoma del virus de influenza formando el complejo RNP. Sin embargo, la NP es capaz de interactuar con una variedad de macromoléculas, tanto virales como de las células huésped infectadas.

La NP se une al ARN viral con una alta afinidad pero con baja especificidad de secuencia, con una estequiometría de interacción estimada en 1 molécula de NP por 24 nucleótidos de ARN (Ortega y col., 2000). La función principal de esta interacción es la estructural (Pons y col., 1969). En esta interacción, para la formación de la RNP, también intervienen PB1 y PB2, que interactúan directamente con la NP, pero no con la PA. Esta interacción se ha observado tanto en las células infectadas por el virus como en sistemas recombinantes (Medcalf y col., 1999). Las proteínas PB1 y PB2 están involucradas en la iniciación y elongación durante la transcripción del ARNm, mientras que la PA es responsable de la replicación del ARN.

Otras de las proteínas virales que interactúan con la NP, es la proteína M1. Esta proteína interactúa mediante una unión NP-M1 con la RNP (Ye y col., 1999).

Estudios de co-localización sugieren que, en las etapas finales de la infección, la NP se acumula en el citoplasma de las células infectadas, asociándose con elementos del citoesqueleto (Avalos y col., 1997).

Proteínas NS1/NS2

Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 son codificadas por el segmento 8 del genoma del virus de influenza. En las células infectadas, NS1 se localiza en el núcleo, mientras que la proteína NS2 se encuentra en el citoplasma.

La proteína NS1 posee funciones reguladoras post-transcripcionales y también actúa como un factor de virulencia al inhibir la producción de $\text{INF-}\alpha/\beta$. Por lo tanto, NS1 juega un papel crucial en la protección de los virus gripales contra la respuesta inmune celular del huésped (Salahuddin y Khan, 2010).

La proteína NS2 posee una secuencia de 121 aminoácidos, con un peso molecular de 15 KDa. Esta proteína facilita el transporte de los nuevos complejos de RNP sintetizados desde el núcleo hacia el citoplasma (Salahuddin y Khan, 2010).

Proteínas de Matriz

El segmento genómico 7 del virus de la influenza A codifica dos proteínas altamente conservadas: la proteína de la cápside M1 y la proteína M2 que es parte constituyente de un canal iónico.

Situada por debajo de la envoltura lipídica del virus de influenza, se halla una cubierta proteica muy abundante, compuesta por la proteína matriz o proteína M1 (peso molecular 27 KDa). Al igual que la NP, es un antígeno específico de tipo. Confiere estabilidad al virión interaccionando con la RNP, la cubierta lipídica y con las espículas de la cubierta. En las etapas tardías del ciclo de replicación viral, la proteína M1 actúa transfiriendo la RNP viral desde el núcleo de la célula hospedadora hacia el citosol, impidiendo además la recaptación de la RNP viral hacia el núcleo (Bui y col., 2000).

Por fuera de la proteína de la matriz M1, se dispone una envoltura de naturaleza fosfolipídica, que deriva de la membrana citoplasmática de la célula huésped. En los virus de influenza A, dicha membrana incluye a la proteína M2. Esta proteína forma un tetrámero que actúa como canal iónico (Sugrue y Hay, 1991). Después del ingreso, vía endocitosis, de la partícula viral a la célula infectada, el canal iónico formado por la proteína M2 se abre en respuesta al bajo pH del endosoma, permitiendo el ingreso de protones al interior del virus, lo que provoca la disociación del ARN viral de la matriz M1 y genera la fusión de las membranas viral y endosomal. Estos eventos permiten la liberación del ARN viral al citoplasma para iniciar el proceso de replicación en la célula huésped (Holsinger y col., 1994). En las etapas posteriores a la replicación del virus, la proteína M2 mantiene un pH alto en el trans-Golgi, evitando de esta forma cambios prematuros en la conformación de la HA (Sugrue y col., 1990).

La proteína M2

La proteína M2 es una proteína de canal iónico de protones selectiva e integral en la envoltura viral del virus de la gripe (Lamb y col., 1985; Zebedee y col., 1985). El canal en sí es un homotetrámero, donde las unidades son hélices estabilizadas por dos enlaces disulfuro. Se activa por un pH bajo. La conductancia de protones por la proteína M2 de la gripe A es esencial para la replicación viral.

En la gripe tipo A, la proteína M2 del virus comprende 97 residuos de aminoácidos y consta de tres regiones: un dominio N-terminal extracelular, un dominio transmembrana (TM) y un dominio C-terminal intracelular. El ectodominio, denominado M2e, está altamente conservado entre distintas cepas virales. El dominio TM forma el poro del canal iónico. Los residuos importantes son el imidazol de His37 y el

indol del Trp41. Este dominio es el blanco de los fármacos anti-influenza, la amantadina y su derivado rimantadina metilo.

Los primeros 17 residuos forman la cola citoplasmática de M2, una hélice anfipática altamente conservada (Kovacs y col., 2000). El virus de la gripe utiliza estas hélices anfipáticas en M2 para alterar la curvatura de la membrana en el cuello de gemación del virus en una forma dependiente de colesterol. Los residuos 70-77 de la cola citoplásmica son importantes para la unión a M1 y para la producción eficiente de partículas virales infecciosas (Lamb y col., 1985).

El extremo C-terminal del canal se extiende en un bucle que conecta el dominio transmembrana de la hélice anfipática C-terminal. De acuerdo con la estructura cristalina a pH bajo, una sola molécula de amantadina se une en el medio del poro, rodeado por los residuos Val27, Ala30, Ser31 y Gly34. Por el contrario, la estructura de RMN mostró que cuatro moléculas de rimantadina se unen a los lípidos frente a la superficie exterior del poro, interactuando con los residuos Arg45 y Asp44.

Sin embargo, una estructura de espectroscopía de RMN en estado sólido reciente muestra que el canal M2 tiene dos sitios de unión para amantadina, un sitio de alta afinidad que se encuentra en el N terminal de lumen, y un segundo sitio de baja afinidad que se halla en el C terminal de la superficie de la proteína. La proteína M2 de la gripe B es homo tetrámero de 109 residuos de largo y es un homólogo funcional de la proteína de la gripe A (Horvath y col., 1990).

El canal iónico M2 de la gripe A y B son altamente selectivos para los protones (Pinto y col., 1997). Residuos de Histidina en la posición 37 son responsables de esta selectividad y de la modulación de pH. Cuando His37 se sustituye con Glicina, Alanina, Acido glutámico, Serina o Treonina, la actividad selectiva de protones se pierde y el mutante puede transportar iones de Na⁺ y K⁺ también. La selectividad de iones puede ser restaurada parcialmente cuando se añade tampón de imidazol a las células que expresan las proteínas mutantes.

La proteína M2 tiene un papel importante tanto en el ciclo de replicación temprana como tardía del virus de la gripe. El canal de protones M2 mantiene el pH a través de la membrana viral durante la entrada en la célula y a través de la membrana de trans-Golgi de las células infectadas durante la maduración del virus (Holsinger y col., 1995). Luego de que el virus entra en la célula huésped por endocitosis mediada por receptor, se produce la acidificación del endosoma. Este bajo pH activa el canal M2, que trae protones en el núcleo del virión. La acidificación del interior virus, conduce a un debilitamiento de la interacción electrostática y a la disociación entre la M1 y los complejos RNP. La fusión de membranas subsiguiente libera las RNPs no recubiertas en el citoplasma que se importan al núcleo para iniciar la replicación viral. Después de su síntesis dentro de la célula huésped infectada, M2 se inserta en el retículo endoplásmico y se transporta a la superficie celular a través de la red trans-Golgi (Zebedee y col., 1988).

Otras funciones importantes de M2 son: su papel en la formación de cepas filamentosas de la influenza, la escisión de la membrana y la liberación del virión en ciernes. M2 estabiliza el sitio de gemación del virus, y las mutaciones de M2 que impiden su unión a M1 pueden interferir con la formación de filamentos en el sitio de gemación (Roberts y col., 1998).

La inhibición y la resistencia

La función del canal M2 puede ser inhibida por fármacos antivirales amantadina y rimantadina (Wharton y col., 1994; Davies y col., 1964; Oxford y col., 1980; Hay y col., 1985). La molécula del fármaco se une a la región transmembrana, bloqueando estéricamente el canal. Esto evita que los protones entren en el virión, que luego no se desintegra. Se han propuesto dos sitios diferentes para la interacción del fármaco. Uno de ellos es un lípido orientado al bolsillo entre 2 hélices transmembrana adyacente, en el que el fármaco se une e inhibe la conductancia de protones alostéricamente. El otro es en el interior del poro, donde el fármaco bloquea directamente el paso de protones. Sin embargo, el gen M2 es susceptible a mutaciones. Cuando uno de los cinco aminoácidos en la región TM es sustituido, el virus se vuelve resistente a los inhibidores. La mutación S31N es responsable de más del 90% de resistencia a los fármacos amantadina y rimantadina (Hay y col., 1985). Como las mutaciones son relativamente frecuentes, la presencia de los factores de selección puede conducir a la aparición de una cepa resistente. Existe evidencia (publicado por CDC, USA) que indica que una gran cantidad de cepas virales se han convertido en resistentes a estos medicamentos, y su uso podría ser discontinuado.

Dominio M2e

La proteína M2 se expresa en la membrana plasmática de las células infectadas y se incorpora en pequeñas cantidades en los viriones que brotan de la misma. El ectodominio de M2 (23 aminoácidos) está altamente conservado en muchas cepas humanas circulantes de influenza (Tabla 3). En numerosos trabajos se ha demostrado que la inmunización con este péptido genera una respuesta inmune protectora contra el desafío con dosis letales de cepas homólogas o heterólogas del virus de influenza A (Fiers, 2004; Ernst WA, 2006; Fan J y col., 2004; De Filette y col., 2005, Neiryck y col., 1999; Treanor y col., 1990). También ha sido demostrado que la administración pasiva de un anticuerpo monoclonal dirigido a M2e inhibe la replicación del virus en ratones (Treanor y col., 1990).

Tabla 3: Secuencia de aminoácidos del ectodominio de M2 de distintas cepas

Cepas de Influenza A humanas	Secuencia de M2e*
A/Brevig_Mission/1/1918 H1N1	SLLTEVET PTRNEWGCRCNDSS D
A/Puerto Rico/8/1934 H1N1	SLLTEVET PIRNEWGCRCNGSS D
A/Chile/13/1957 H2N2	SLLTEVET PIRNEWGCRCNDSS D
A/Japan/170/1962 H2N2	SLLTEVET PIRSEWGCRCNDSS D
A/An Arbor/7/1967 H2N2	SLLTEVET PIRNEWGCRCNDSS N
A/Aichi/2/68 H3N2	SLLTEVET PIRNEWGCRCNDSS D
A/England/878/1969 H3N2	SLLTEVET PIRNEWGCRCNDSS N
A/Caracas/1/1971 H3N2	SLLTEVET PIRKEWGCRCNDSS D
A/Taiwan/3/71 H3N2	SFLTEVET PIRNEWGCRCNDSS D
A/Aichi/69/1994 H3N2	SLLTEVET PIRNEWECRCNGSS D
A/Wuhan/359/95 H3N2	SLPTEVET PIRSEWGCRCNDSS D
A/Wisconsin/10/98 H1N1	SLLTEVET PIRNGWECKCNDSS D
A/New York/497/2003 H1N1	SLLTEVET PIRNEWGCRCNDSS D
A/New York/378/2005 H3N2	SLLTEVET PIRNEWGCRCNDSS D

Secuencia consenso de M2e	SLLTEVET PIRNEWGCRCNDSS D
----------------------------------	----------------------------------

*Las variaciones se indican en negritas

La secuencia de M2e difiere además de acuerdo al huésped (aa variables indicados en rojo):

PIRNEWGCRCN (influenza humana)

PTRNGWECKCS (influenza aviar)

PTRNGWECCN (influenza porcina)

Respuesta inmune al virus de influenza

El virus de la gripe causa una infección aguda en el huésped, e inicia una cascada de activación en la mayoría los componentes del sistema inmunológico innato y adaptativo. Rara vez se ha observado una respuesta inmune cruzada entre los subtipos del virus de la gripe y las infecciones no inducen protección heterotípica entre los tipos A y B (Treanor y col., 2005). La infección por influenza induce tanto anticuerpos sistémicos y locales en la zona de infección (inmunidad humoral), así como respuestas de células T citotóxicas (inmunidad celular), siendo cada una de estas respuestas importantes en la recuperación de la infección aguda y la resistencia a la reinfección.

Respuesta inmune humoral a la infección viral

La infección por influenza resulta en la producción de anticuerpos sistémicos, tanto contra las glicoproteínas de superficie de virus, HA y NA, como contra las proteínas M y NP. Por ejemplo, las inmunoglobulinas anti-HA, incluyendo IgM, IgA e IgG, aparecen dentro de las 2 semanas posteriores a la infección viral, en forma paralela con las inmunoglobulinas anti-NA. El pico en el título de anticuerpos se puede observar entre las 4 y 7 semanas después de la infección viral, y son seguidos por un descenso constante. Los anticuerpos permanecen detectables durante años después de la infección, incluso sin una nueva exposición. Los anticuerpos anti-HA, principalmente IgG, protegen contra enfermedad e infección ante una nueva exposición del huésped frente a un virus homólogo. Títulos inhibidores de hemaglutinación, IgG anti-HA, iguales o mayores 1:40 protegen a los organismos inmunizados frente a una nueva infección contra un virus homólogo (Treanor y col., 2005). La inducción de anticuerpos neutralizantes es uno de los principales objetivos de las inmunizaciones con las vacunas actuales.

En contraste con los anticuerpos anti-HA, los anticuerpos anti-NA no son neutralizantes, por lo que no inhiben la infección con virus de influenza, sino que reducen la liberación de nuevos virus desde células infectada (Shors y McFadden, 2009). Esto se debe a que la NA escinde las partículas virales recién formadas del receptor celular de ácido siálico. Los anticuerpos anti-NA ayudan a proteger contra la enfermedad al disminuir la liberación de nuevos virus. Efectos similares se han propuesto para los anticuerpos contra la proteína M2 dado que los anticuerpos contra los antígenos internos no son neutralizantes, pero facilitan el *clearance* del virus en los organismos infectados, disminuyendo los índices de morbilidad y mortalidad. En el caso de la NP, de estructura altamente conservada (Portela y Digard, 2002, Shu y col., 1993), se induce una respuesta inmune humoral longeva, con títulos de IgG anti-NP que facilita la eliminación del virus de los organismos infectados (Lamere y col., 2011; Carragher y col., 2008).

Respuesta inmune celular a la infección viral

Se ha demostrado que las células dendríticas, juegan un papel central en la iniciación y conducción de la respuesta de los linfocitos T frente a la infección de Influenza. Las células dendríticas residentes a nivel pulmonar, adquieren los antígenos virales, se activan y posteriormente migran a los ganglios linfáticos regionales (Legge y Braciale, 2003). Los antígenos virales son procesados y fijados en la superficie de las células dendríticas como péptidos en el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). En los ganglios linfáticos, las células dendríticas maduras, presentan el péptido viral a los linfocitos T, desencadenando una respuesta inmune antígeno específica. Los antígenos internos, como la NP, son procesados por las células dendríticas y presentados en los CMH de clase I a los linfocitos T

CD8⁺, mientras que los antígenos externos son presentados mediante moléculas de CMH de clase II a los linfocitos T CD4⁺. Las células infectadas por Influenza, pueden ser ingeridas por las células dendríticas, y los antígenos virales son procesados y presentados a los linfocitos T CD8⁺ asociados a moléculas de CMH de clase I; de esta forma las células dendríticas son capaces de presentar los antígenos vesiculares endocitados por la vía de la clase I. La misma CPA que realiza la presentación cruzada puede presentar antígenos virales asociados al CMH de clase II para su reconocimiento por los linfocitos Th CD4⁺ (Flinsenbergl y col., 2011). Las células T activas adquieren funcionalidades efectoras y migran al sitio de la infección en el pulmón, donde median la respuesta antiviral.

La activación inicial de los linfocitos genera células de memoria capaces de sobrevivir durante años después de la infección. Los linfocitos T colaboradores (Th) pueden ser de los grupos Th1, Th2 y Th17 según los perfiles de citoquinas secretados. En los ratones, la infección por influenza induce una respuesta celular del tipo Th1 (INF- γ), pero también se observan citoquinas del perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) en los pulmones de los animales infectados, aunque la inmunidad protectora frente a la infección por influenza es marcadamente del tipo Th1 (Tamura y col., 1996; Tamura y Kurata, 2004; Liang y col., 1994)

El INF- γ sintetizado por los linfocitos Th1 estimula las actividades microbicidas de los macrófagos, favoreciendo de esta forma la destrucción intracelular de los virus fagocitados. El INF- γ también actúa sobre los linfocitos B para estimular la síntesis de anticuerpos IgG opsonizadores y fijadores del complemento.

Vacunas contra influenza

La vacunación es el método más efectivo para prevenir la infección por influenza así como también para reducir la severidad de sus complicaciones en individuos infectados, por lo que adquiere categoría prioritaria en cuestiones de salud pública a fin de prevenir una importante morbilidad y mortalidad en la población.

Actualmente existen tres tipos de vacunas contra influenza en el mercado: (1) vacuna a virus completo inactivado purificado, (2) vacuna *split* o a subunidades purificadas a partir de virus inactivados y (3) vacuna a virus vivos atenuados (*FluMist*®, utilizada como *spray* nasal en USA). La producción de la mayoría se basa en el cultivo del virus en huevos embrionados y solo una pequeña proporción ha comenzado a producirse en cultivo de células de mamífero. La tecnología de producción en huevos se utiliza desde hace 45 años (Tosh y Poland, 2008, Fig. 7) y presenta varias limitaciones: (i) las vacunas producidas son poco efectivas en la protección de individuos mayores de 65 años y en niños; (ii) el tiempo de producción a partir de la identificación de las cepas circulantes es de aproximadamente 6-9 meses (Subbarao y col., 2007); (iii) la capacidad de producción es limitada a la capacidad de provisión de

huevos (se obtiene aprox. 1-2 dosis por unidad), con lo cual la producción requiere de una gran capacidad instalada; (iv) las variantes seleccionadas requieren ser adaptadas a la producción en huevos por "re-organización" de segmentos genómicos con una cepa de alta producción; (v) los productos residuales de huevo pueden causar efectos adversos en individuos alérgicos; (vi) la eventual producción de cepas de alta patogenicidad requeriría instalaciones de alto nivel de bioseguridad para el manejo de las cepas, modificación genética de las mismas para reducir patogenicidad y evitar que maten rápidamente los embriones y se reduzcan los niveles de producción (De Jong y Hien, 2006).

Cabe destacar que, dada la constante evolución del virus (*drift* antigénico), las vacunas actualmente disponibles en el mercado deben ser reformuladas cada año. El riesgo de emergencia de una pandemia de influenza agravaría las limitaciones del sistema de producción, ya que en la actualidad no existe capacidad instalada para producir suficiente vacuna para una cobertura global.



Figura. 7. Producción en huevos embrionados. Proceso de inoculación.

Existen antivirales disponibles en el mercado (por ejemplo: amantadina, oseltamivir y zanamivir) sin embargo, debido a que suelen ocasionar efectos adversos severos (MMWR, 2008), el uso de estas drogas sólo ha sido aprobado en pacientes en los cuales la vacuna está contraindicada y/o en alto riesgo poblacional (Cox, 2005). Otra desventaja importante del uso de estas drogas es que deben ser usadas entre las 24-48 hs siguientes a la exposición al virus, lo que es muy difícil de lograr a nivel poblacional, y ya hay reportes de generación de resistencia por mutaciones en cepas virales.

Nuevas vacunas contra influenza

Los nuevos escenarios en la producción de vacunas de influenza incluyen en primer lugar la producción del virus en cultivo de células de mamíferos. En este sentido, compañías como Solvay (Brands y col., 1999), Novartis, Nobilon y GSK (Percheson y col., 1999) trabajan en el desarrollo de vacunas usando células MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*), Baxter utiliza las células VERO (*African Green Monkey Kidney*) (Barrett y col., 2009) y Sanofi Pasteur una línea celular de retina humana (Per.C6) (Becker, 2004). De las empresas mencionadas, hasta la fecha solo Solvay, Novartis y Baxter han obtenido

la aprobación de los mecanismos de regulación para la comercialización de la vacuna en Europa (Cox y Hollister, 2009).

El principal inconveniente de este sistema es el bajo rendimiento de la producción viral, hasta el momento, que podría ser superado en el futuro, por lo cual solo un porcentaje muy pequeño de vacunas es producido por esta metodología.

Vacunas de nueva generación

En relación al desarrollo de vacunas de nueva generación contra influenza, se han realizado numerosos trabajos experimentales con resultados muy interesantes. Entre ellos cabe mencionar, la producción de proteínas virales (por ej, HA y NA) mediante técnicas de ADN recombinante, vacunas del tipo VLPs (*virus-like particles*), vacunas basadas en vectores virales replicativos o no replicativos, vacunas a ADN, entre otros (Tosh y Poland, 2008). Respecto de las vacunas a ADN se ha logrado una inmunización genética utilizando tanto los genes de HA, NP y/o M1 con diferentes sistemas de *delivery*. Utilizando este tipo de vacunas se ha demostrado protección total en ensayos de desafío con dosis letales del virus. A pesar de que los resultados son muy promisorios, este tipo de vacunas puede tardar mucho en llegar al mercado debido a las complicaciones de aprobación por los organismos reguladores sanitarios.

Como desafío final, se ha investigado y se continúa investigando, en el desarrollo de una vacuna de tipo “universal”, que pueda cubrir la mayor cantidad de cepas posible y que no requiera una actualización periódica, o bien que complemente las vacunas que están disponibles en la actualidad ampliando el espectro de protección (inmunidad heterosubtípica). Estas vacunas universales están basadas principalmente en proteínas internas del virus o regiones altamente conservadas de éstas (Tosh y Poland, 2008).

Vacuna “universal” basada en la proteína M2: Control de la infección de múltiples cepas de influenza mediada por anticuerpos anti-M2e

La proteína M2 es parte constituyente de un canal iónico, y como ya se mencionó, contiene un pequeño ectodominio (M2e) que está altamente conservado entre distintas cepas virales y se expone limitadamente en la superficie viral. Esta parte de la molécula es extremadamente interesante dado que se ha demostrado que anticuerpos monoclonales contra esta porción de la molécula reducen significativamente la infección viral (Liu W y col., 2004). En años recientes se publicaron numerosos trabajos donde se demuestra que formulando vacunas experimentales con el dominio M2e se protege ratones de la descarga con virus homólogos y heterólogos (Adler-Moore y col., 2011; Thueng-in y col.,

2010; Song y col., 2011). Recientemente esta estrategia ha comenzado a participar en pruebas clínicas en humanos (Turley y col., 2011)

Uno de los problemas que existen en relación a la aprobación de estas vacunas de tipo universal es contar con una metodología confiable para medir correlatos de protección en humanos. Para las vacunas basadas en la HA viral, la farmacopea habilita la buena correlación entre potencia y nivel de anticuerpos inhibidores de la actividad hemoaglutinante (IHA). En este caso, la potencia de las vacunas universales no puede medirse de esta manera y se utilizan en parte pruebas de desafío viral en ratones o hurones, sin correlación aún con protección en humanos.

Varios grupos han comenzado a estudiar ensayos la inmunidad humoral y celular, que puedan jugar rol importante en la protección contra virus pandémicos (células CD4+ y B de memoria) y se han comenzado a medir parámetros de este tipo en algunas pruebas de vacunas.

Otro aspecto interesante de este tipo de vacunas universales es la posibilidad de ser utilizadas en los períodos interpandémicos, como complemento a la vacunación estacional, para ir estableciendo en la población un cierto nivel de inmunidad heterosubtípica.

Vacunas basadas en HA recombinante producida en el sistema baculovirus/células de insecto

En abril del 2004, la compañía americana Protein Sciences Corporation (Connecticut, USA) anunció la finalización de un ensayo clínico en humanos (Fase II) destinados a probar la eficiencia de la vacuna antigripal estacional (denominada FluBlok®) que contiene como único inmunógeno HA de influenza de tres cepas circulantes producida en baculovirus (Cox MMJ, 2005). En este ensayo se utilizaron dosis de 45 µg o 135 µg y se alcanzaron títulos protectores en el 77% y 97% de los casos respectivamente. Así también, los resultados clínicos demostraron que la vacuna administrada en las dosis mencionadas genera una mayor protección en las poblaciones de alto riesgo en relación a la vacuna convencional contra influenza (Cox y Hollister, 2009).

Como se mencionó anteriormente, esta vacuna es producida en el sistema Bv y se utilizan particularmente células *expresSF+*®, una línea celular no transgénica derivada de la línea Sf9. Esta línea celular está patentada; es de uso exclusivo de la compañía y posibilita su cultivo en medios libres de suero con altos rendimientos de producción (Cox y Hollister, 2009). Cada dosis de vacuna contiene en total 135 µg de antígeno (45 µg de cada rHA de las 3 cepas recomendadas por el *US Public Health Service* para la elaboración de la vacuna estacional).

Se han completado exitosamente los ensayos clínicos de Fase III a partir de los cuales se ha demostrado que la vacuna es bien tolerada e inmunogénica en más de 3000 adultos mayores de 18 años (Cox y Hollister, 2009). Así también los resultados clínicos demostraron que la vacuna trivalente administrada en la mayor dosis mencionada, además de ser bien tolerada, genera una mayor protección

en adultos mayores a 50 años (población de riesgo) en relación a la vacuna convencional contra influenza (Keitel y col., 2009; Cox y Hollister, 2009; Baxter y col., 2011). También se ha evaluado en niños de 6 a 59 meses en donde la vacuna fue segura y de igual reactividad que la convencional (King y col., 2009). Además, ha demostrado ser protectora contra virus de influenza heterólogos (Cox y Anderson, 2007; Treanor y col. 2006). Particularmente, en el año 2009, la compañía ha recibido el apoyo del gobierno norteamericano para producir una vacuna con la HA de la cepa pandémica A/H1N1 del 2009 (vacuna PanBlok®) (King y col., 2009). Actualmente, ha sido aprobada por la FDA para la inmunización activa contra enfermedad causada por los virus de influenza de los subtipos A y B contenidos en la vacuna, para uso en personas de 18 a 49 años de edad.

Cabe destacar que este tipo de vacunas presenta importantes ventajas respecto de la producción convencional de la vacuna antigripal: 1) no se manipula virus vivo, lo que constituye un problema importante de seguridad sobretodo en el caso de cepas de alta virulencia; 2) permite actualizar rápidamente la cepa vacunal en caso del surgimiento de una nueva cepa circulante, sin necesidad de un proceso de adaptación de éstas en huevos embrionados o en cultivos celulares; 3) el tiempo de producción se reduce a 2 meses, esto permite eliminar la posibilidad de mutaciones generadas por la adaptación así como también la rápida incorporación de nuevas cepas circulantes; 4) el escalado del sistema es relativamente sencillo en reactores controlados ya que las células de insecto pueden crecer en suspensión; 5) se elimina la posibilidad de efectos secundarios por residuos de huevo y/o productos de la inactivación del virus (FDA, Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting, 2009).

Producción de antígenos de influenza en el sistema baculovirus/células de insecto

Los Bv presentan un amplio rango de huéspedes invertebrados y han sido ampliamente utilizados para la producción de numerosas proteínas recombinantes en larvas y en líneas estables de células de insecto (Jarvis, 2003). Este sistema eucariota de expresión posee varias ventajas en relación a otros: (i) permite obtener proteínas recombinantes con las adecuadas modificaciones post-traduccionales (*N* y *O*-glicosilaciones, puentes di-sulfuro y fosforilación, (Cox y Anderson, 2007); (ii) es un sistema de fácil utilización ya que los Bv recombinantes son relativamente fáciles de obtener y producir con título elevado; (iii) es un sistema bioseguro (Kost y col., 2005) ya que los Bv no infectan humanos (Hu, 2005); (iv) el escalado es relativamente sencillo (Kost y col., 2005) y de menor costo en comparación con el cultivo de células de mamífero (Cox y Hollister, 2009), dos aspectos relevantes para la posterior transferencia a la industria; y (v) permite clonar genes de gran tamaño así como también varios genes en un mismo vector, gracias a la flexibilidad del genoma de Bv (≈ 130 kb). El gen de interés puede ser clonado en reemplazo del gen que codifica para la polihedrina, que no es necesaria para la supervivencia

del virus en cultivo de células y se pueden utilizar promotores virales fuertes como el de la polihedrina o p10 (Cox y Anderson, 2007).

El Bv más estudiado y utilizado es el virus de la Polihedrosis Nuclear *Autographa californica* (AcNPV) (Hu, 2005). Este virus puede ser propagado en líneas celulares de insectos *Sf9* y *Sf21* que derivan del tejido ovárico de *Spodoptera frugiperda*. Estas líneas celulares pueden crecer también en suspensión, característica que permite cultivar las células en fermentadores facilitando el escalado de la producción (Cox y Anderson, 2007).

En relación a las desventajas del sistema, cabe mencionar que la glicosilación llevada a cabo en las células de insecto difiere en algunos aspectos de la glicosilación en células de mamífero (Hu, 2005). En este sentido, en células de insecto la vía de N-glicosilación de proteínas no tiene todas las enzimas involucradas en la elongación de N-glicanos de mamíferos. Por eso, el sistema falla en la producción de glicoproteínas con extremos terminados en galactosa o ácido siálico. Otra desventaja es que la infección con Bv resulta en la muerte celular y lisis a los pocos días post-infección. Dado que el sistema de expresión utiliza promotores tardíos como el de la polihedrina o p10, usualmente la producción máxima se alcanza en un momento cercano a la muerte de la célula infectada, por lo que las cantidades de proteínas procesadas pueden ser sub-óptima al momento de cosecha.

Sin embargo, a pesar de estas desventajas, el sistema ha demostrado ser de gran utilidad para la expresión de proteínas recombinantes. Particularmente en relación a la generación de vacunas contra influenza, este sistema ha demostrado ser muy eficiente en la producción de la HA del virus (USA patente Nº 6.245.532). Se ha demostrado que una vacuna basada en HA producida en el sistema Bv/células de insecto es segura y capaz de generar inmunidad homóloga tanto en animales (Lin y col., 2008) como en humanos (Treanor y col., 2007; Cox y Hollister, 2009).

Existen diferentes sistemas disponibles comercialmente para la expresión de antígenos en células de insectos por medio de Bv recombinantes, de los cuales se detallarán dos a continuación.

Sistema de expresión BD BaculoGold™

Uno de los sistemas utilizados para la expresión de las proteínas recombinantes en células de insecto *Sf9*, es el de BD BaculoGold™ comercializado por BD Biosciences. El sistema BaculoGold™ consiste en el ADN linealizado de Bv AcNPV con una delección letal de 1,7 Kb río abajo del gen de polihedrina (Kost y col., 2005) que elimina una proteína esencial para la replicación viral. Por ende, para obtener Bv viables, es necesario co-transfectar el genoma BaculoGold™ con un vector de transferencia complementario (que lleva el gen de interés clonado) el cual contiene regiones del locus de polihedrina flanqueantes al mismo promotor. Esto rescata la delección mediante recombinación homóloga y de esta

manera, se obtienen Bv viables, que expresan la proteína heteróloga, con una eficiencia mayor al 99 % (Manual BD, Baculovirus Expression System Innovative Solutions for Proteomics, Biosciences) (Fig. 8).

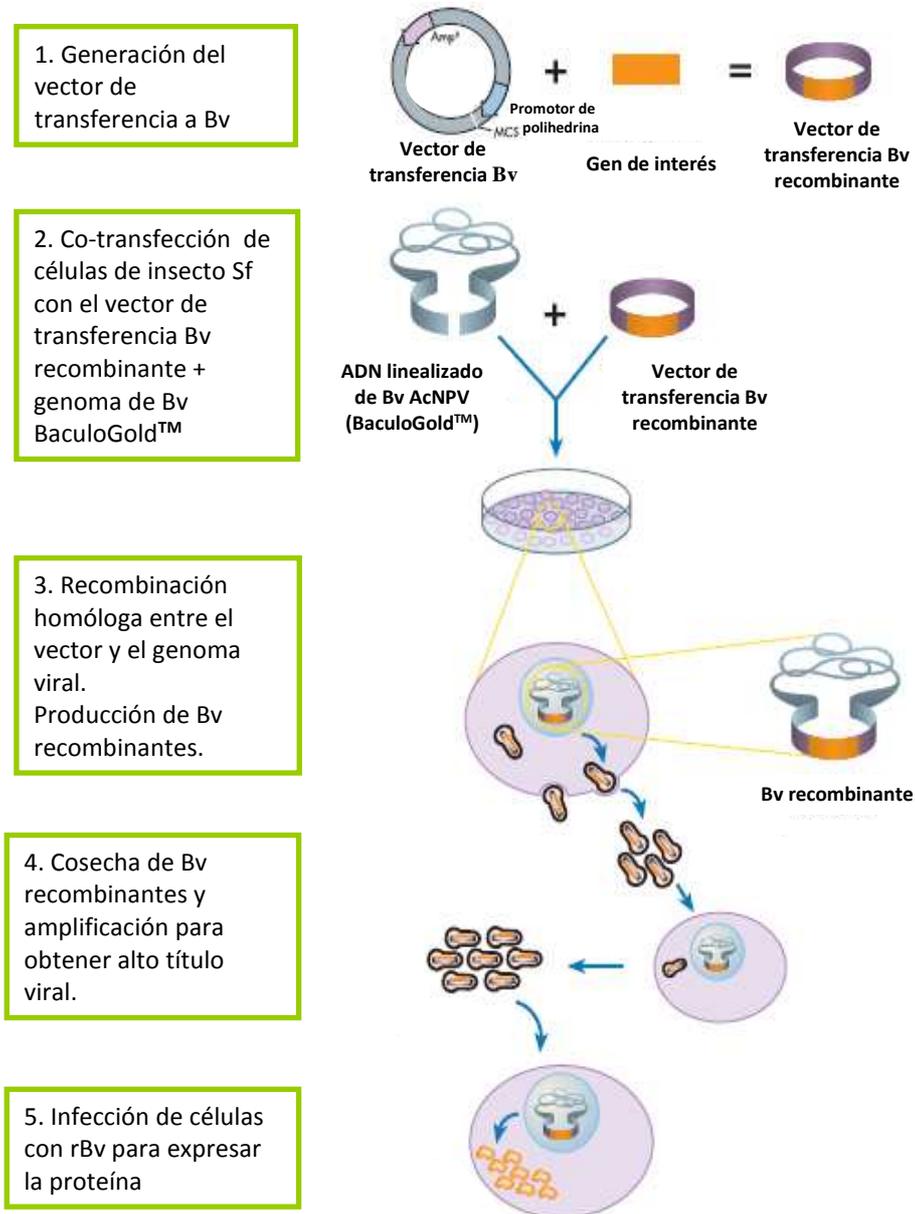


Figura 8. Esquema de los pasos necesarios para obtener Bv recombinantes que expresan una proteína heteróloga utilizando el sistema BaculoGold™ (Baculovirus Expression System Innovative Solutions for Proteomics, BD, 2003).

Sistema Bac-to-Bac

El Sistema de expresión de Bv Bac-to-Bac[®] se basa en el método desarrollado por Luckow (Luckow, 1993) en donde se utilizan las propiedades del trasposon Tn7 para simplificar y mejorar el proceso de generación de b́acmidos recombinantes.

El principal componente del sistema, es el vector pFastBac[™], en donde se clona el gen de interés. Dependiendo del vector pFastBac[™] seleccionado, la expresión del gen de interés es controlada por el promotor de la polihedrina (PH) o el promotor p10 para obtener un alto nivel de expresión en células de insecto. El cassette de expresión se encuentra flanqueado por los brazos derecho e izquierdo del Tn7 y contiene el gen de resistencia a la gentamicina y una señal de poliadenilación SV40 para formar un mini Tn7.

El segundo componente en importancia es la cepa *E.coli* DH10Bac[™] que se utiliza como huésped del vector pFastBac[™]. Las células DH10Bac[™] contienen un b́acmido con un sitio target para un mini-*att*Tn7 y un plásmido helper. Cuando se transforman las células DH10Bac[™] con el plásmido de expresión pFastBac[™], ocurre una transposición entre el elemento mini-Tn7 del vector pFastBac[™] y el sitio target en el b́acmido para generar un b́acmido recombinante. La transposición ocurre en presencia de las proteínas de transposición codificadas por el plásmido helper. Una vez realizada la reacción de transposición, se puede aislar el ADN del b́acmido recombinante para transfectar células de insecto y generar Bv recombinantes. Posteriormente se amplifican para obtener un stock de Bv recombinantes de alto título que se utilizará para producir la proteína de interés en células de insecto.

A continuación se muestra un esquema del sistema:

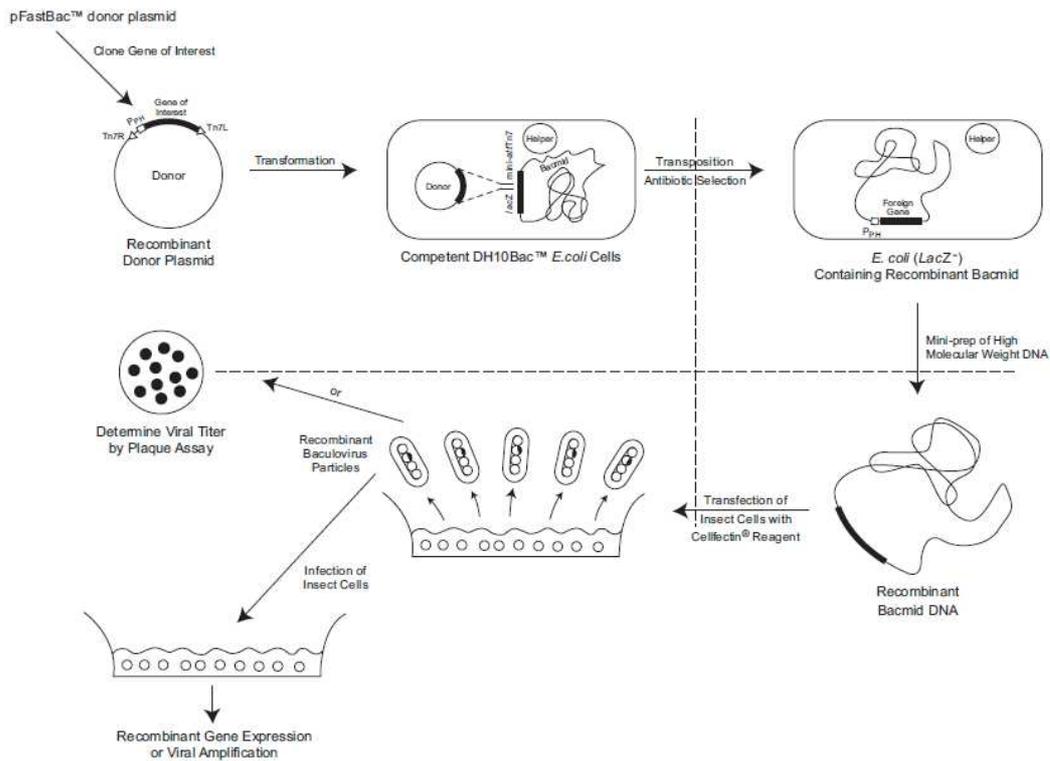


Figura 9. Esquema del sistema Bac-to-bac

Antecedentes y fundamentos del presente trabajo

Mejorar la calidad y los métodos de producción de las vacunas contra influenza es considerado un tema de alta prioridad. Los nuevos escenarios incluyen el reemplazo del sistema de huevos embrionados por células en cultivo, así como la producción de proteínas virales recombinantes. En este sentido, el principal candidato es la HA viral, ya que es la proteína donde residen los epítopes neutralizantes más importantes del virus (Nayak y col., 1985), y el componente esencial de las vacunas estacionales de influenza. Se ha demostrado que la HA recombinante (rHA) se produce eficientemente en el sistema Bv/células de insecto (USA patente Nº 6.245.532), un sistema seguro, que puede ser de fácil manipulación y escalado (Kost y col., 2005). Este tipo de vacunas ya ha demostrado ser inmunogénica y bien tolerada en humanos (Cox y Hollister, 2009) y presenta numerosas ventajas ya mencionadas en esta Introducción respecto de la vacuna convencional inactivada.

El Centro de Virología Animal (actualmente ICT Milstein) inició en el año 2003 un convenio con el Laboratorio Monte Verde S.A. para el desarrollo de una vacuna convencional de influenza basada en virus inactivado. Como resultado del mismo se pusieron a punto los procesos de producción viral en huevos embrionados, purificación, cuantificación de contaminación residual por ovoalbúmina y

cuantificación del antígeno. Se generaron los bancos maestros de semillas virales en huevos SPF de las cepas virales provistas por la OMS desde el año 2003 hasta el 2008.

Este fue el punto de partida para continuar trabajando en el desarrollo de vacunas de nueva generación contra influenza humana, obteniéndose un financiamiento público-privado (PID 2004-23112, MINCyT y Laboratorio Monte Verde SA), para desarrollar una vacuna recombinante trivalente tipo FluBlock, basada en las HAs expresadas en Bv/células de insecto, proyecto con el cual la autora de esta tesis comenzó su beca doctoral.

En primera instancia se propuso el desarrollo de una vacuna trivalente basada en tres HAs recombinantes y posteriormente se planteó la posibilidad de generar un inmunógeno que actuara como vacuna universal.

En este sentido la segunda parte del trabajo se destina a desarrollar una vacuna universal basada en las proteínas NP y en M2e, expuestas al sistema inmune por *carriers* diversos.

Display de proteínas en Baculovirus

Los Bv han sido usados ampliamente para el desarrollo de estrategias de *display* de proteínas foráneas (o heterólogas) en la superficie del Bv o de su cápside o para transducción de células mamíferas con *cassettes* de expresión (Pidre y col., 2013). La expresión en superficie se logra a través de la fusión de proteínas o péptidos a la proteína principal de superficie gp64, lo que resulta en la ubicación de la proteína quimérica en la membrana viral y en la membrana plasmática de las células de insecto infectadas (Fig. 10). Gp64 se expresa en forma temprana y tardía en la infección de las células de insecto y tiene un tamaño de 64 kDa, formando trímeros que se ubican en forma polarizada en la membrana (Grabherr & Ernst, 2010). Por otro lado los Bv no pueden replicarse en células de mamíferos (Pidre y col., 2013), lo que aporta a su seguridad como *carrier*.

Estudios recientes reportan que los Bv tienen propiedades adyuvantes fuertes en ratones inoculados, promoviendo una potente respuesta humoral y una respuesta celular adaptativa CD8+ T (Abe y col., 2003; Gronowski y col., 1999). Además, Bv induce la producción de citoquinas inflamatorias por la maduración in vivo de células dendríticas. También ha sido evaluado el efecto de administración de Bv en la respuesta innata de pollos (Chimeno Zoth y col., 2012).

En la segunda parte de este trabajo se utilizaron estas propiedades de los Bv para generar vacunas de tipo universal.

En el caso de la NP, se desarrolló un sistema donde esta proteína conservada del virus de influenza se encuentra fusionada a la proteína VP39 de Bv, utilizando a éste como *carrier* para la presentación de NP en la cápside.

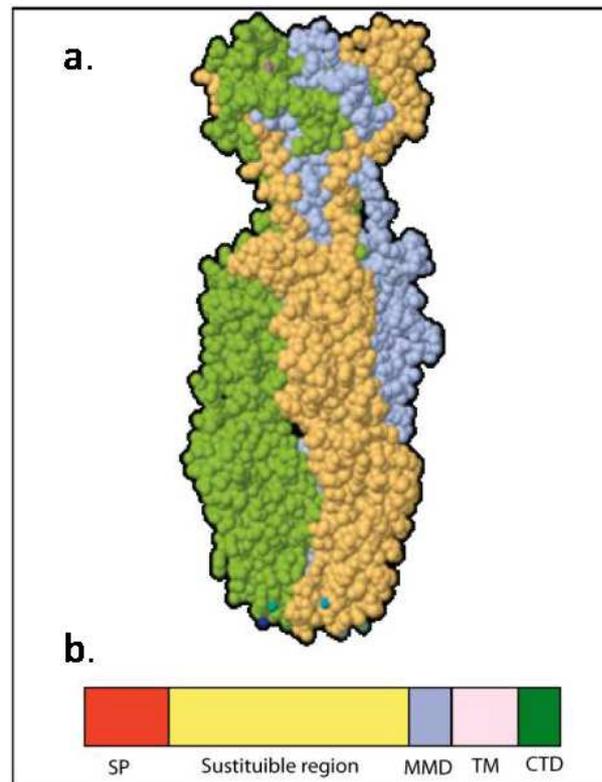


Figura 10. Estructura de gp64. a) Estructura trimérica de la glicoproteína de superficie gp64 obtenida utilizando ExPasy tool *Make multimer.py* in www.expasy.org. b) Esquema del polipéptido gp64 mostrando los dominios funcionales útiles para el *display* en superficie de antígenos foráneos. (De: Pidre y col., 2013)

En el segundo prototipo se utiliza a la partícula viral de Bv como *carrier* del péptido M2e fusionado a la glicoproteína de membrana de gp64. En el presente trabajo se utiliza una secuencia de 23 aa conocida en la bibliografía como "secuencia universal M2e" ya que consiste en la secuencia encontrada con mayor frecuencia en las distintas cepas de influenza A y es la que se ha utilizado en los trabajos donde se demuestra tanto protección homóloga como heteróloga.

Lumazina sintetasa de *Brucella abortus* (BLS) como carrier

En este trabajo se utiliza además otro sistema *carrier*, la proteína decamérica lumazina sintetasa de *Brucella abortus* (BLS) como molécula presentadora del péptido M2e al sistema inmune. Este sistema se generó en base a una colaboración con el grupo de investigación del Dr. Fernando Goldbaum del Instituto Leloir, que fueron los que generaron y patentaron la plataforma BLS (Alvarez y col., 2013).

La proteína BLS es un antígeno inmunodominante derivado de *Brucella abortus* capaz de generar una potente inmunidad humoral y celular (Velikovskiy y col., 2002; Velikovskiy y col., 2003). La proteína se configura como un dímero estable de pentámeros (decámero) y se ha reportado que permite incorporar fusiones amino terminales de péptidos o proteínas sin alterar su conformación y estabilidad.

La presentación de BLS al sistema inmune en una matriz tridimensional altamente ordenada mejora la inmunogenicidad de los péptidos heterólogos (Laplagne y col., 2004; Zylberman y col., 2004).

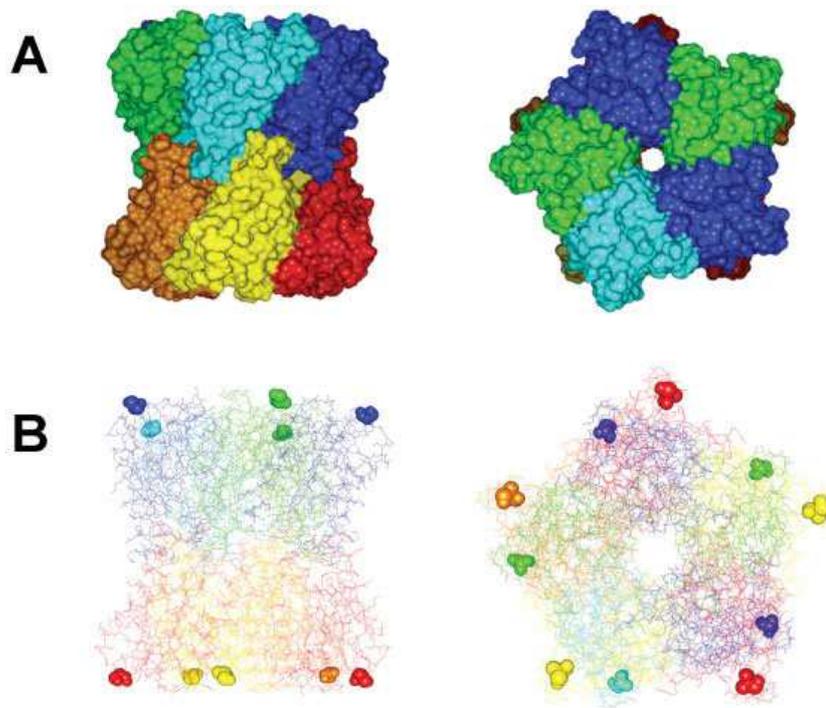


Figura 11. Disposición espacial de los péptidos foráneos insertados en BLS. Se muestra la estructura cristalográfica de la BLS. Cada monómero del homodecámero se muestra en un color diferente.

A: Representación de la vista lateral y frontal, destacando la forma compacta, tipo carrete de BLS.

B: Representación de BLS en la misma orientación que en A. Se representa el residuo N-terminal de cada monómero, indicando los diez puntos de inserción de péptidos foráneos en la proteína decamérica (De: Laplagne y col., 2004)

En la última parte de este trabajo se evalúa el uso de BLS como *carrier* para presentar el péptido M2e en una copia única o en repeticiones en tándem.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Una de las herramientas fundamentales para la prevención de la influenza humana es la vacunación. El diseño y expresión de antígenos recombinantes derivados tanto de proteínas inmunodominantes como conservadas del virus de influenza humana permitirá contar con inmunógenos aptos para su utilización en vacunas estacionales o pandémicas.

Desde el punto de vista de las vacunas estacionales permitiría evitar el uso de huevos embrionados que es aun el método principal de generación de las vacunas antigripales en todo el mundo. La producción de las hemaglutininas virales en células de insecto en cultivo (sistema baculovirus recombinantes /células de insecto) es apto para este propósito y podrían expresarse las hemaglutininas recombinantes de las cepas estacionales, y eventualmente pandémicas, que determine la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la producción de vacunas en el país. Las estrategias que se proponen en este trabajo apuntan a optimizar la expresión de estas proteínas. Se utilizarán las cepas recomendadas por la OMS para la campaña de vacunación para el hemisferio sur del año 2004: A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Panamá/2007/99 (H3N2) y B/Yamanashi/166/98.

Complementariamente la expresión de proteínas virales conservadas como la nucleoproteína y la porción extracitoplasmática de la proteína Matriz 2 del virus de influenza permitirá contar con inmunógenos que amplíen el espectro de protección de las vacunas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Diseño y expresión de antígenos recombinantes derivados de proteínas inmunodominantes o conservadas del virus de influenza humana, aptos para su utilización en vacunas estacionales y/o pandémicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A. Expresión de la hemaglutinina (HA) viral en cultivos de células de insecto

- **A.1.** Expresión en el sistema Baculovirus/células de insecto del gen codificante para la HA completa (HA₀) del virus de influenza tipo A (subtipos A/H1 Y A/H3) y del virus de influenza B.

- **A.2.** Expresión de la HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1) sin el dominio trans-membrana y reemplazando la secuencia señal propia del gen HA por la de la proteína gp64 de Bv (r Δ HA_{gp}).
- **A.3.** Expresión de la subunidad HA₁ de HA de la cepa pandémica A/VietNam/1203/2004 (H5N1) en cultivos de células de insecto (r Δ HA₅).
- **A.4.** Expresión de la HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1) con su secuencia de nucleótidos optimizada para expresión en Bv/células de insecto (rHA_{op}).
- **A.5.** Expresión de una molécula basada en la HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1) con secuencia optimizada, sin el dominio trans-membrana y adicionando un dominio de trimerización heterólogo (rHA_T).

Nota: para una mejor comprensión de las distintas construcciones consultar esquemas en Anexo nº 1.

B. Generación de una vacuna del tipo “universal” contra el virus de influenza. Obtención de inmunógenos de amplio espectro de protección contra influenza tipo A basados en la expresión de los antígenos derivados de las proteínas conservadas nucleoproteína (NP) y matriz 2 (M2)

- **B.1.** Expresión de la NP de influenza fusionada a la proteína VP39 de Bv, utilizando Bv como carrier para la presentación de NP en la cápside del virus.
- **B.2.** Expresión de la porción extra-citoplasmática de la proteína Matriz 2 (M2e), fusionada a la proteína gp64 de Bv, utilizando al Bv como carrier para la presentación de M2e en la membrana del virus.
- **B.3.** Utilización de la proteína decamérica lumazina sintetasa de *Brucella abortus* (BLS) como carrier presentador del péptido M2e.
- **B.4.** Evaluación de la inmunogenicidad y protección de las vacunas basadas en M2e en el modelo ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ácidos Nucleicos

3.1.1. Electroforesis en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN fueron resueltos en geles de agarosa de distintos porcentajes (0.8 % - 2 %) según el tamaño a resolver. El buffer de electroforesis utilizado fue TBE (90 mM Tris-borato, 90 mM ácido bórico, 2,5 mM EDTA pH 8.3) suplementado con bromuro de etidio (0,5 µg/ ml).

3.1.2. Digestiones de ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones de ADN se realizaron con endonucleasas de restricción comerciales, siguiendo las indicaciones del fabricante (New England Biolabs). En general se utilizaron 5 unidades enzimáticas/µg de ADN durante 2-12 h.

3.1.3. Plásmidos

Para el clonado y amplificación de ADN se utilizó el vector comercial *pGEM[®]-T Easy* (Promega) y como vectores específicos, según se especifica en cada caso, se utilizaron los vectores: *pVL1393* (Baculogold, BD Biosciences) o *pFastBac[™]1* (Bac-to-Bac, BD Biosciences). Para *display* en membrana o cápside de Baculovirus se utilizaron los vectores *pVLSup1* y *pFBcap*, respectivamente; los que fueron gentilmente cedidos por el Laboratorio del Dr. Taboga (INTA, Castelar). En las secciones siguientes estos vectores se describen detalladamente.

3.1.4. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se obtuvo por lisis alcalina y precipitación con alcohol, se lo purificó según las técnicas tradicionales (Sambrook y col., 1989). Alternativamente se utilizaron columnas de purificación Qiagen tip 100 y tip 500 (Qiagen Inc.) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para aislar los plásmidos recombinantes se siguió la técnica descrita para tal fin en el manual Bac-to-Bac (Bac-to-Bac Baculovirus Expression System, 2004).

3.1.5. Extracción y purificación de ARN y Retrotranscripción (RT) a ADNc

Se extrajo ARN viral a partir de virus purificado proveniente de líquido corioalantoideo por el método del Trizol[®] (Invitrogen). Brevemente, se mezclaron 200 µl de virus con 200 µl de Trizol[®] y se homogeneizó, luego se agregaron 700 µl más de reactivo y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 200 µl de cloroformo frío y se centrifugó 15 minutos a 10.000

rpm. Luego de pasar la fase acuosa a un nuevo tubo se agregaron 500 μ l de isopropanol frío para precipitar el ARN, seguidamente se centrifugó 30 minutos a 10.000 rpm a 4°C. Se realizaron dos lavados con etanol al 75% y se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente. La resuspensión se realizó en 50 μ l de agua (libre de RNAsas) y para favorecer la disolución se incubó la muestra a 55°C durante 10-15 minutos. Las muestras se guardaron a -80°C hasta su utilización en las reacciones de RT-PCR.

Para realizar la RT, se incubaron 5 μ l del ARN obtenido anteriormente con el correspondiente *primer* sentido tal que su concentración final resultara 0,5 μ M y se incubó la mezcla a 90°C durante 5 minutos e inmediatamente se pasó a hielo durante 1 minuto. A continuación se agregaron: 2 μ l de buffer 5X, 1 μ l de dNTPs (2mM); 0,5 μ l de DTT (0,1 M); 0,5 μ l de RNase OUT (40 U/ μ l) y 0,5 μ l de SuperScript®II Reverse Transcriptase (200 U/ μ l); (volumen final: 10 μ l). La mezcla resultante se incubó a 42°C durante 1 hora; la inactivación posterior se realizó a 70° C durante 15 minutos; finalmente se agregaron 0,25 μ l de RNAsa H (2U/ μ l) y se incubó 20 minutos a 37°C (todos los reactivos utilizados fueron de Invitrogen™).

3.1.6. Purificación de moléculas de ADN a partir de geles de agarosa

Luego de resolver por electroforesis los fragmentos de ADN (obtenidos a partir de PCR o bien liberados por digestión enzimática), se escindió la banda conteniendo el fragmento de interés y se lo purificó por el método de QIAEX (Qiagen Inc) siguiendo las indicaciones del fabricante. Este método se basa en la propiedad de adsorción del ADN al vidrio en soluciones altamente salinas. Cuando se requirió la purificación de fragmentos muy pequeños, la misma se realizó a partir de geles de poliacrilamida, escindiendo la banda y siguiendo los métodos antes mencionados.

3.1.7. Ligación de fragmentos de ADN

Las reacciones de ligación se realizaron en un volumen final de 10 μ l y una concentración de terminales libres de ADN de 0.1-1 μ M en presencia de cantidades variables de la enzima T4 ADN ligasa (New England Biolabs) de acuerdo al tipo de extremos de las moléculas de ADN a unir. De esta manera, según el tipo de extremos a ligar se utilizaron distintas condiciones de ensayo: **1.** Para la ligación de extremos cohesivos las reacciones se incubaron ON (*overnight*) a 16 °C en condiciones estándares, es decir, 1 mM ATP y 40 unidades de ligasa por ensayo. **2.** Para la ligación de extremos romos el ensayo se llevó a cabo a 25 °C en presencia de 75 μ M ATP y 1,000 unidades de ligasa por ensayo. En el caso de las ligaciones de amplicones provenientes de PCR al vector pGEM® –T Easy se utilizaron las siguientes condiciones: se utilizaron 10 ng del vector pGEM® –T Easy, buffer 2X, ligasa T4 (3 UN), cantidad de ADN tal que la relación inserto:vector resultara 3:1 y agua (csp 10 ul). La incubación se realizó ON a 4°C.

3.1.8. Bacterias

Se utilizaron bacterias *E. coli* de las cepas DH5 α F'IQ o DH10 β , competentes por el método de CaCl₂ para la captación de ADN (Inoue, 1990). Los cultivos bacterianos obtenidos fueron sembrados en placas de Petri con medio LB (Luria-Bertani) agar 1,5 % + ampicilina (50 μ g/ml) y crecidos ON a 37 °C. En el caso de la obtención de b α cmidos recombinantes por el método Bac-to-Bac se transformaron bacterias *E. coli* DH10Bac competentes por el mismo método.

Para la preparación de proteínas recombinantes, se utilizó la cepa BL21(DE3) pLysS (Stratagene, La Jolla, CA). Las bacterias se crecieron de rutina en medio LB (Sambrook y col., 1989), salvo cuando se indique la utilización de otro medio.

3.1.9. Screening de colonias transformadas por detección de actividad β galactosidasa

El vector pGEM[®] –T Easy posee el sitio de clonado múltiple (SCM) dentro de la región codificante para el péptido α de la enzima β -galactosidasa, por lo tanto el clonado exitoso de un inserto interrumpe la secuencia codificante de la enzima. Esto permite un *screening* de transformantes basado en la presencia o ausencia de actividad de β -galactosidasa. Así, para detectar actividad enzimática, a las placas de LB agar se les adicionó isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG, Sigma) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactosido (X-gal, Sigma) como sustrato. De esta manera, los cultivos bacterianos obtenidos luego del proceso de transformación con el vector pGEM[®] –T Easy fueron sembrados en placas de Petri con medio LB agar 1,5% + ampicilina (50 μ g/ml) + IPTG (35 μ g/ml) + X-gal (80 μ g/ml) y crecidos ON a 37 °C. Para los subsiguientes ensayos se seleccionaron las colonias blancas frente a las colonias azules. El b α cmido bMON14272 presente en las bacterias DH10Bac también posee una región codificante para el péptido *lacZ* α en la cual se halla inserto un sitio de unión para el transposón bacteriano Tn7 (mini *att*Tn7) que no interrumpe el marco de lectura del péptido *lacZ* α . Para la generación de un b α cmido recombinante, debe ocurrir la transposición de un elemento mini-Tn7 a partir de un plásmido donante (*pFastBac*) al sitio de unión mini-*att* Tn7 en el b α cmido. Las funciones de transposición Tn7 son proporcionadas por un plásmido auxiliar. Si este es el caso, en presencia de un sustrato cromogénico como Bluo-gal o X-gal, se obtendrán colonias blancas. Para realizar el *screening* luego de la transformación de las bacterias *E. coli* DH10 Bac con los vectores recombinantes pFastBac, éstas se sembraron en placas con medio LB agar 1,5% + kanamicina (50 μ g/ml) + gentamicina (7 μ g/ml) + tetraciclina (10 μ g/ml) + Bluo-gal (100 μ g/ml) + IPTG (40 μ g/ml). Se incubaron las placas a 37°C durante 48 horas y se re-estriaron alrededor de 10 colonias blancas en nuevas placas para evitar la obtención de mezcla de b α cmidos recombinantes con b α cmidos vacíos.

3.1.10. Secuenciación de ADN

Se utilizó el servicio de secuenciación automático de la empresa MacroGen Inc. Los datos de secuencia se analizaron con los programas DNA Strider, Edit View y LaserGene (DNASTAR Inc.).

3.1.11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las amplificaciones de ADN por el método de PCR se realizaron en presencia de 0,2 mM de cada uno de los 4 deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 100 ng de cada oligonucleótido, 1,5 mM Mg₂Cl, 1 Unidad enzimática de Taq ADN polimerasa (Invitrogen) y aproximadamente 1 ng de ADN molde en un volumen final de 30 µl. Estas reacciones fueron llevadas a cabo en termocicladores (Eppendorf o Thermo).

En los ensayos de *colony*-PCR se procedió de la misma manera pero utilizando como fuente de ADN directamente la colonia bacteriana.

Todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, Argentina.

3.1.12. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las muestras de proteínas se calentaron a 100°C durante 2 min en presencia de 0,1 % SDS y 1mM DTT como agente reductor y se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida de distintos porcentajes (7,5-12,5 %) de acuerdo al rango de resolución deseado (Sambrook y col., 1989). Para visualizar las bandas proteicas de los geles, se realizó una tinción por Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma). La estimación de las Mr se realizó por referencia a un patrón corrido en paralelo.

3.2. Amplificación y clonado del gen completo de la HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1) (HA_{NC})

3.2.1. Amplificación del gen de HA_{NC}

Primeramente se realizó la extracción de ARN viral y la retrotranscripción a ADNc como se indica en 3.1.5. Posteriormente se realizó una reacción de PCR con *primers* específicos siguiendo lo descrito en el ítem 3.1.10.

El gen se amplificó en dos fragmentos denominados *frag 1* (922 pb) y *frag 2* (805 pb) aprovechando un sitio de restricción único para la enzima *Bsu36I* presente en la secuencia del gen. Debido a la disparidad en la temperatura de *melting* (T_m) de los *primers* sentido y antisentido, se realizó un ensayo de PCR con gradiente de temperatura (50°C a 59,2°C) a fin de determinar la temperatura óptima de amplificación. Para todas las temperaturas se obtuvieron productos de amplificación del tamaño

esperado (922 pb y 805 pb, Figura 3.1). Los fragmentos seleccionados se clonaron en el vector pGEM®-T Easy (Promega) como se indica en 3.1.7.

Se utilizaron los siguientes pares de *primers*:

Fragmento 1:

Primer sentido: 5'-CCCTCGCGAAGCAAAAGCAGGGGAAAATAA-3'; (se subraya el sitio *Nru*I)

Primer antisentido: 5'-ACTGGGTGTACATTCTGG-3';

Fragmento 2:

Primer sentido: 5'-CCTCAAATGCACCAATGG-3'

Primer antisentido: 5'-CCCTCGCGAAGTAGAAACAAGGGTGTT-3'; (se subraya el sitio *Nru*I)

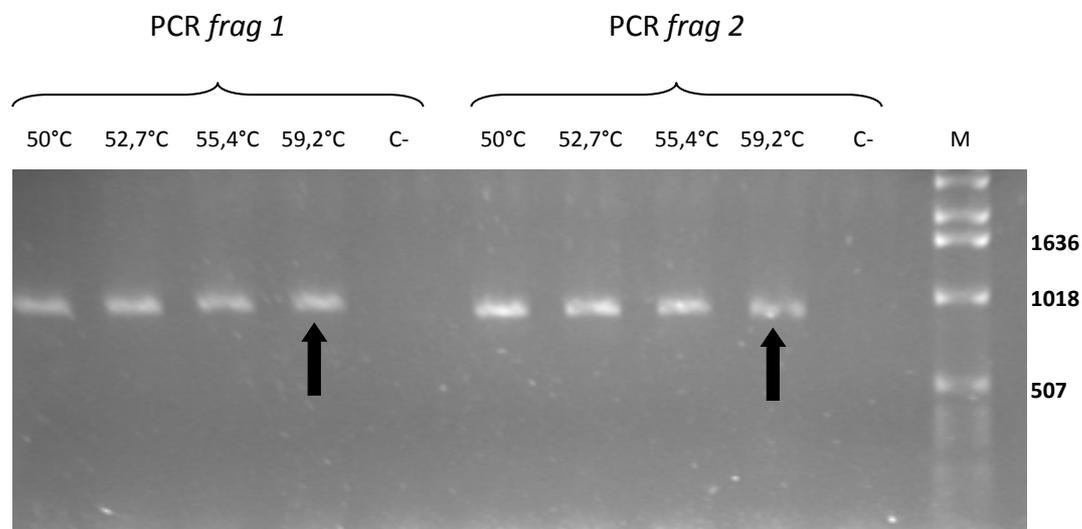


Figura 3.1. Productos de amplificación por PCR de *frag 1* y *frag 2* del gen de HA de la cepa A/New Caledonia/20/99. Se muestran los resultados de un ensayo de PCR con gradiente de temperatura analizados en un gel de agarosa 1%. **M**: marcador 1 Kb (Promega®); **C-**: control negativo de la reacción de PCR (*mix* completa sin templado). Las flechas indican los productos seleccionados para el paso de subclonado siguiente.

3.2.2. Selección de los clones recombinantes

A fin de seleccionar los clones de bacterias transformadas con el plásmido recombinante, los cultivos de *E. coli* se sembraron en placas LB + ampicilina + X-Gal + IPTG. A partir de las colonias blancas obtenidas, se realizó una preparación de ADN plasmídico para realizar un segundo *screening* que permitiera identificar los clones que contenían el *frag 1* y el *frag 2* del gen HA (clones pGEM-*frag 1* y pGEM-*frag 2*). Para ello, el ADN plasmídico fue digerido con las enzimas de restricción *Bsu*36I y *Nru*I cuya secuencia target (sólo *Nru*I) se incluyó en el diseño de los *primers* para liberar los insertos. Luego de la digestión se esperaba obtener lo siguiente:

pGEM-frag 1: 922 pb + 3000 pb ; pGEM-frag 2: 805 pb + 3000 pb

Como puede observarse, todos los clones analizados presentaron el patrón de restricción esperado (Fig. 3.2).

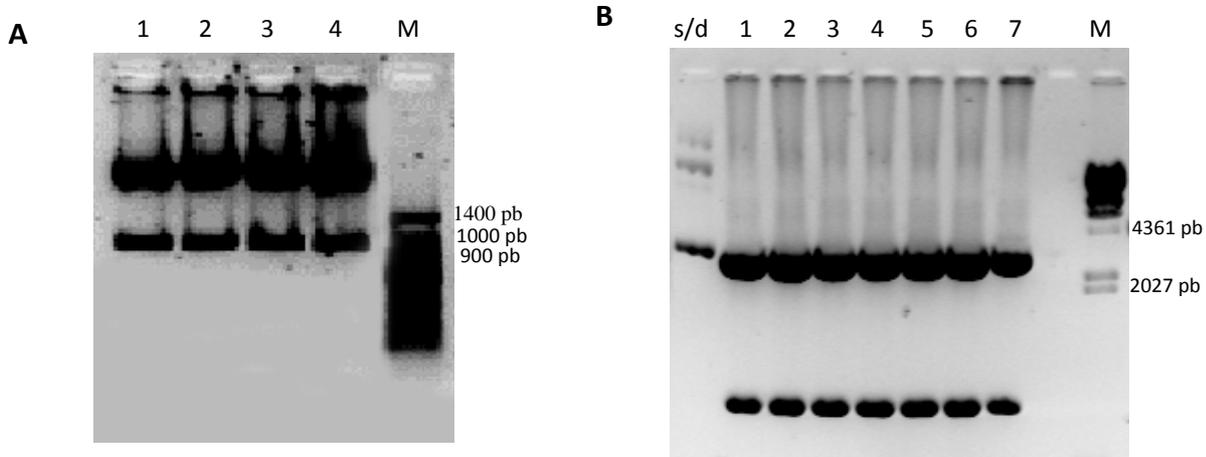


Figura 3.2. Análisis por restricción de los clones pGEM-T Easy seleccionados. El ADN plasmídico fue digerido con las enzimas *Nru*I y *Bsu*36I. **A.** Digestión de los clones *pGEM frag 1* (calles 1 a 4); M: marcador, 100 pb (Productos Bio-Lógicos®). **B.** Digestión de los clones *pGEM-frag 2* (calles 1 a 7); s/d: clon 1 sin digerir; M: marcador λHindIII (Productos Bio-Lógicos®). Los fragmentos de ADN fueron resueltos en un gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio.

Con el objetivo de confirmar si los fragmentos de ADN clonados correspondían al gen de HA de la cepa A/New Caledonia/20/99, se enviaron a secuenciar los clones 1 a 4 de pGEM-frag 1 y los clones 1, 2, 4 y 6 de pGEM-frag 2 en forma completa. Las secuencias correspondientes a los insertos fueron alineadas con las secuencias publicadas en GenBank (Nº de acceso: AY289929). A partir de este análisis, se eligieron los clones # 4 de cada construcción ya que, para el caso del *frag 1* presentaba la menor cantidad de cambios aminoacídicos fuera de los sitios antigénicos y en el caso del *frag 2* no se encontraron cambios aminoacídicos respecto de la secuencia de referencia. En la Sección Anexos se puede encontrar el alineamiento de *frag 1*+ *frag 2* (clon 4) con la cepa de referencia, en ese esquema se pueden distinguir los sitios antigénicos descritos para las HAs del subtipo H1 [Sriwilaijaroen y col. (2012); Caton y col., 1983]] y los cambios aminoacídicos detectados.

En esta etapa del trabajo se utilizó como vector de transferencia a baculovirus (Bv), el vector comercial pVL1393 (BD Sciences). El vector posee un *cassette* de resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli*, el promotor fuerte del gen de polihedrina de Bv (Hu, 2005) y, río abajo de éste, un SCM (Fig. 3.3).

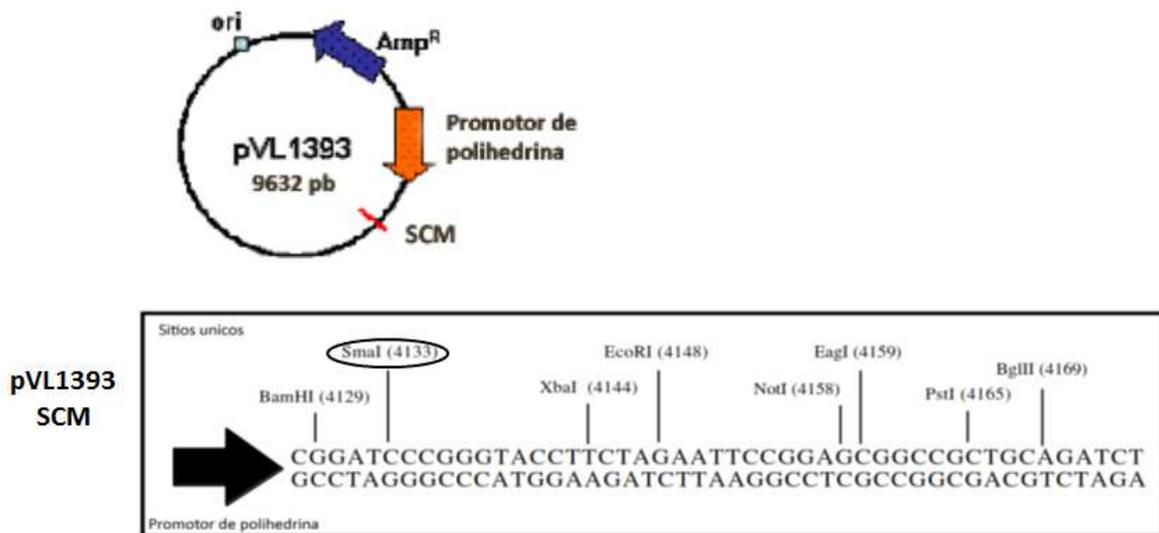


Figura 3.3. Representación esquemática del vector comercial pVL1393 (BD Sciences). Se muestran los elementos genéticos principales presentes en el vector: **ori**: origen de replicación en bacterias *E. coli*; **Amp^R**: gen de resistencia a ampicilina; **SCM**: sitio de clonación múltiple (debajo se detallan los sitios de restricción presentes).

3.2.3. Preparación del vector de transferencia pVL1393 para la inserción de los fragmentos frag 1 y frag 2 del gen HA

Para realizar la inserción del gen HA en el vector pVL1393 se procedió a digerir el vector de transferencia con la enzima *SmaI*. Para ello se realizó una maxipreparación de ADN plasmídico con un kit de Qiagen (columna tip 500). Luego de la digestión ON a 25°C con la enzima *SmaI* (New England, Biolabs) se incubó la preparación con la enzima fosfatasa alcalina (CIP, New England, Biolabs) para evitar la religación del vector digerido (Fig. 3.4). A continuación se purificó el vector digerido por Qiaex a partir de solución y a partir de gel de agarosa.

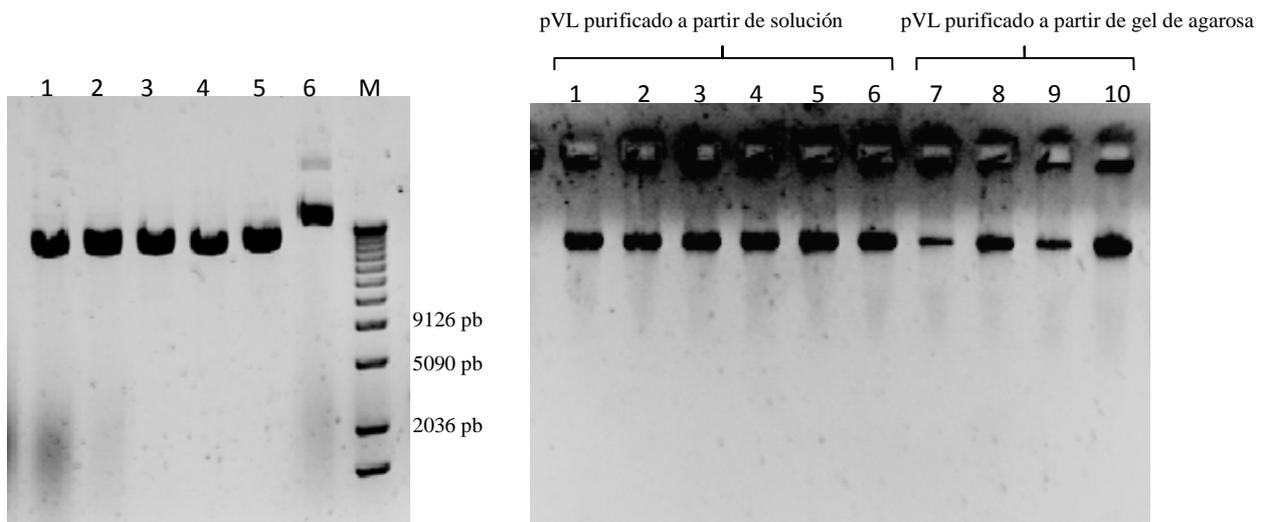


Figura 3.4. Preparación del vector de transferencia pVL1393.

A. Digestión de una maxi-preparación del vector y posterior tratamiento con fosfatasa alcalina. **Calles 1 a 5:** Se sembró 1 μ l de cada digestión en gel de agarosa 0,7%, para corroborar linealización. **Calle 6:** se sembró vector sin digerir (pVL sin digerir). **M:** marcador 1Kb (Promega). **B.** Purificación por Qiaex (Qiagen Inc.) del vector a partir de solución (**calles 1 a 6**) y a partir de gel de agarosa (**calles 7 a 10**). Siembra: 1 μ l por calle.

3.2.4. Inserción de los fragmentos *frag 1* y *frag 2* en el vector de transferencia pVL1393

Como se explicó antes, para el clonado de los fragmentos *frag 1* y *frag 2* en el vector pVL1393 se utilizaron los sitios de restricción *Nru*I y *Bsu*36I. Para ello, los insertos fueron liberados de pGEM-T utilizando estas enzimas, por lo que se obtuvieron fragmentos con un extremo romo (proveniente de *Nru*I) y el otro cohesivo (proveniente de *Bsu*36I) y clonados en el sitio *Sma*I presente en el SCM del vector pVL1393 (Fig. 3.3), que también genera extremos romos. La construcción final fue denominada pVL1393-HA_{NC}.

Para esto se procedió como sigue:

1- A fin de contar con material suficiente para realizar el paso de sub-clonado, se realizó una midi-preparación de ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* transformados con los clones seleccionados en el Item 3.2.2 (pGEM-frag 1: clon 4 y pGEM-frag 2: clon 4) utilizando el kit Qiagen (Qiagen Inc).

2- Se digirieron 2 μ g de las preparaciones anteriores utilizando las enzimas *Nru*I y *Bsu*36I y se evaluaron que las digestiones fueran completas en un gel de agarosa.

3- Se purificaron los insertos *frag 1* y *frag 2* (922 pb y 805 pb respectivamente) liberados a partir del gel de agarosa utilizando el kit Qiaex (Qiagen Inc) (Fig. 3.5).

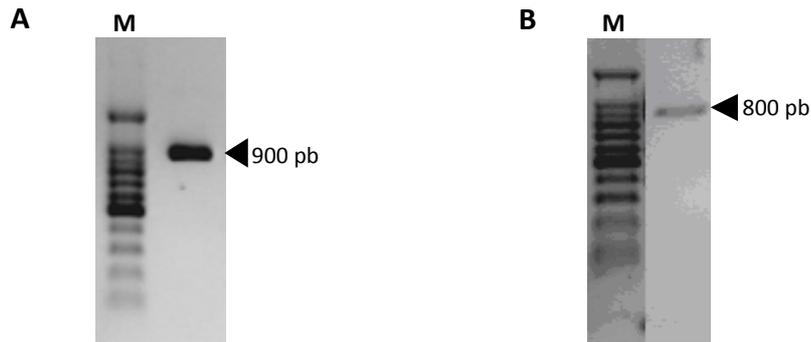


Figura 3.5 Purificación de los insertos *frag 1* y *frag 2* para su posterior clonado en el vector pVL1393. **A.** Purificación del inserto *frag 1* por digestión del vector pGEM-*frag 1* (clon 4) por Qiaex. **B.** Purificación del inserto *frag 2* del vector pGEM-*frag 2* (clon 4) por Qiaex luego de la digestión con *NruI* y *Bsu36I*; **M:** marcador 100 bp (Productos Bio-Lógicos®). Gel de agarosa 1%. Las flechas indican la posición del fragmento de interés.

4- Se realizó la ligación del vector pVL1393 y los fragmentos (*frag 1* y *frag 2*) digeridos y purificados. Se ensayaron las relaciones molares inserto:vector 1:1, 1:3 y 1:10.

Los productos obtenidos de las ligaciones se utilizaron para transformar células *E.coli* DH10 β competentes y se realizó un *screening* de los clones recombinantes en placas LB + Ampicilina. A partir de las colonias se realizó la técnica de *colony-PCR* para realizar una preselección de los clones a digerir (Fig. 3.6).

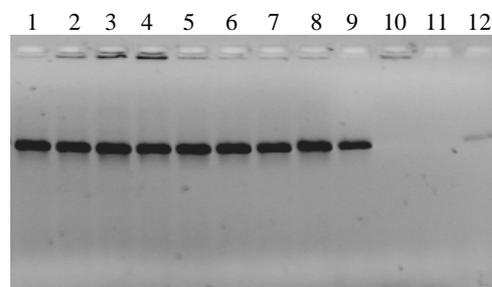


Figura 3.6 Colony-PCR de las colonias obtenidas luego de la transformación con la reacción de ligación. Calles 1 a 9: clones 1 a 9. Calle 10: control negativo (vector vacío sin digerir). Calle 11: control negativo de la reacción de PCR (H₂O). Calle 12: HA de la cepa A/Panamá/2007/99 obtenida por RT-PCR a partir de cultivo en huevos embrionados purificada utilizada como marcador (1768 pb). Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Luego se realizó un mapeo por restricción que permitiera identificar los clones que contenían el gen HA_{NC} (gen de la hemaglutinina de la cepa A/New Caledonia/20/99) en la orientación correcta, ya que la estrategia utilizada para el clonado no permitía direccionar el inserto. Para ello se utilizó la enzima *XbaI*, la cual posee un sitio único en el gen HA_{NC} y otro en el vector pVL1393. Así, el plásmido pVL1393-HA_{NC}, con el inserto en la orientación correcta, generaba un fragmento de 462 pb y otro de

10897 pb, en el caso de que el inserto tuviera la orientación contraria, se hubieran generado dos fragmentos de 1339 pb y de 10020 pb. Como puede observarse en la Fig.3.7, a partir de este ensayo se identificaron 6 clones positivos (clones 2, 3, 5, 6, 8 y 9) de los 9 analizados. Estos clones fueron secuenciados para verificar la composición nucleotídica del inserto. A partir de estos resultados, se confirmó que no se habían generado mutaciones en el paso de subclonado y que el gen había sido correctamente insertado en el vector. Para continuar el trabajo se eligió el clon número 8.

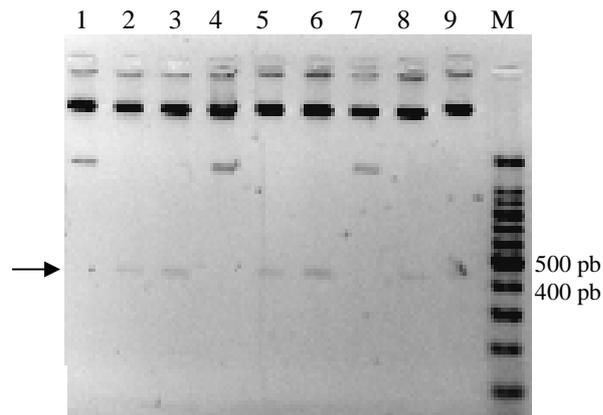


Figura 3.7 Identificación de los clones pVL1393-HA_{NC} que contienen el inserto en la orientación correcta. El ADN plasmídico de los clones obtenidos a partir de la ligación pVL1393 + insertos frag 1 y frag 2 fueron seleccionados primero según la técnica de *colony*-PCR y luego por digestión con la enzima XbaI. Los fragmentos de ADN se analizaron en un gel de agarosa al 1%. M: marcador, 100 pb (Productos Bio-Lógicos®). Las flechas indican la posición de los fragmentos del tamaño esperado. Calles 1 a 9: clones 1 a 9.

Para realizar las transfecciones subsiguientes se realizó una midi-preparación de ADN plasmídico, a partir de cultivos de *E. coli* transformados con el clon seleccionado (clon 8), utilizando la técnica de Qiagen Inc y posterior precipitación con PEG 8000 (13%).

3.3. Amplificación y clonado del gen completo de la HA de la cepa A/Panamá/2007/99 (H3N2) (HA_p)

3.3.1. Amplificación del gen completo de HA_p adicionando un tag de histidinas

Como se detalló en la Sección 3.1.5; se extrajo ARN viral a partir de virus purificado con la técnica del Trizol® (Invitrogen). A partir de este material con el primer sentido se obtuvo el ADNc y posteriormente se realizó una PCR anidada. Se utilizaron dos temperaturas de *annealing* distintas, inicialmente se realizaron 6 ciclos a 44°C y luego 29 ciclos más a 72°C, esto se realizó así debido a que el *primer* antisentido presentaba una cola de histidinas. De esta manera, al iniciar la reacción a baja temperatura se favorecía el *annealing* del *primer* antisentido con una gran proporción de bases no

complementarias al ADN molde. Una vez obtenido cierto número de copias, se aumentó la temperatura para favorecer la especificidad de la reacción.

Se obtuvo una banda del tamaño esperado (aproximadamente 1760 pb) y otro producto de amplificación inespecífico de aproximadamente 400 pb. En esta oportunidad el gen se clonó completo con el agregado de una secuencia codificante para 6 histidinas (*His-tag*) en el extremo 3' como ya se mencionó. En los *primers* se agregaron sitios para *Nru*I para realizar el clonado posterior por el sitio para la enzima *Stu*I incluido en el vector donante que también deja extremos romos.

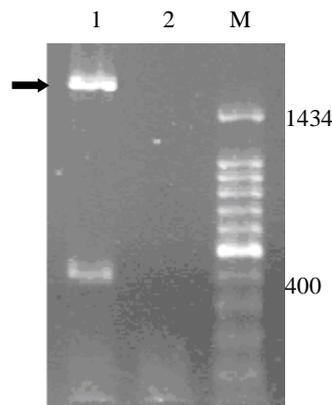


Figura 3.8. Productos de amplificación por PCR del gen HA de la cepa A/Panamá/2007/99. Se muestran los resultados de una PCR anidada. **A. Calle 1.** Producto de amplificación del gen completo. **Calle 2.** Control negativo de la reacción de PCR (*mix* completa utilizada para la reacción sin agregado de templado). **M:** marcador, 100 bp (Productos BioLogicos®). La flecha indica el producto seleccionado para el paso de clonado siguiente. Los números indican el tamaño en pares de bases. Los productos fueron resueltos geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio.

Se detalla la secuencia de los *primers* utilizados para la amplificación (se subraya el sitio *Nru*I):

Primer sentido: 5' - CCCTCGCGAAGCAAAGCAGGGGATAATTC-3'

Primer antisentido: 5' TCGCGATTAATGATGATGATGATGAATGCAAATGTTGCACCTAATG-3'

Se purificó el producto de amplificación por PCR de mayor tamaño (correspondiente a HA_P) a partir de un gel de agarosa al 1% por QIAEXII para clonar en pGEM®-T easy (Promega). Se realizaron dos eluciones a partir de la sílica-gel.

Con el producto purificado correspondiente al primer eluido (Fig. 3.9) se realizó una reacción de ligación al vector pGEM®-T Easy como se detalla en 3.1.7.

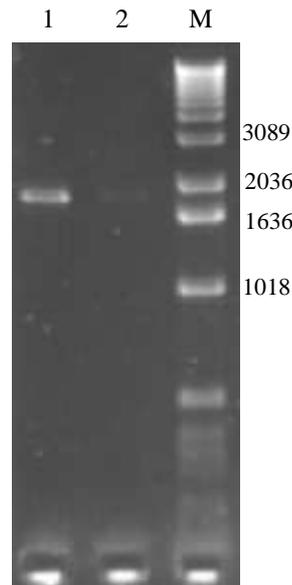


Figura 3.9. Purificación de banda correspondiente a HA_P a partir de gel por Qiaex II. Referencias: 1. Producto de amplificación purificado (primer eluido). **2.** Producto de amplificación purificado (segundo eluido) **M:** marcador, 1 Kb (Invitrogen™). Los números indican el tamaño en pares de bases. Las muestras fueron resueltas en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

3.3.2. Selección de los clones recombinantes

Para seleccionar los clones de bacterias transformadas con el plásmido recombinante, los cultivos de *E. coli* se sembraron en placas LB-ampicilina XGal-IPTG. A partir de las colonias blancas obtenidas, se realizó una preparación de ADN plasmídico para realizar un segundo *screening* que permitiera identificar los clones que contenían el gen de HA_P. Para ello, el ADN plasmídico fue digerido con la enzima de restricción *Nru*I. Dado que el vector pGEM® T-Easy no presenta sitios para esta enzima y que éstos se utilizaron en el diseño de los *primers* para liberar el inserto, luego de la digestión se esperaba obtener la liberación del gen de la HA_P de 1768 pb.

Como puede observarse, todos los clones analizados presentaron el patrón de restricción esperado (Fig. 3.10).

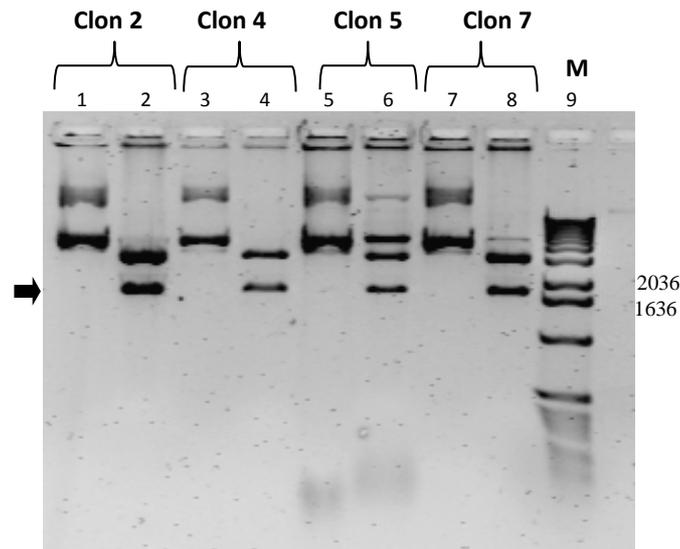


Figura 3.10. Análisis por restricción de los clones pGEM-T Easy seleccionados. El ADN plasmídico obtenido a partir de las colonias blancas del primer *screening* fue digerido con la enzima *NruI*. Digestión de los clones pGEM HA_P 2, 4, 5 y 7; patrón esperado: 1768 y 3000 pb aprox. **Calles 1, 3, 5 y 7:** ADN plasmídico sin digerir; **Calles 2, 4, 6 y 8:** ADN plasmídico digerido. **M:** marcador, 1 Kb (Invitrogen™), los números indican el tamaño en pares de bases. Los fragmentos de ADN fueron resueltos en un gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio.

Con el objetivo de confirmar si los fragmentos de ADN clonados correspondían al gen de HA_P, se enviaron a secuenciar los clones 2, 4, 5 y 7 en forma completa; las secuencias correspondientes a los insertos fueron alineadas con la secuencia publicada en GenBank (número de acceso DQ487340.1).

A partir de este análisis, se eligió el clon 7 ya que presentaba el menor número de cambios aminoacídicos.

En la Sección Anexos (ver Anexo nº 3) se puede encontrar el alineamiento de la secuencia aminoacídica de HA_P (clon 7) con la cepa de referencia, en ese esquema se pueden distinguir los sitios antigénicos descritos para las HAs del subtipo H3 (Wilson y col., 1990) y los cambios aminoacídicos detectados. Ningún cambio se encontró en los sitios antigénicos descritos, por lo tanto se continuó trabajando con esta construcción.

3.3.3. Preparación del vector donante *pFastBac1* para la ligación

En este caso se utilizó el sistema Bac-to-Bac (Invitrogen), por lo tanto, como primera medida se realizó una maxipreparación de ADN plasmídico del vector donante (*pFastBac1*) con un kit de Qiagen (columna tip 500).

Luego se procedió a digerir el vector con la enzima *StuI* (New England, Biolabs) que deja extremos romos. A continuación de la digestión ON se incubaron las muestras con la enzima fosfatasa alcalina (CIP, New England, Biolabs) durante 1 hora a 37°C para evitar una futura religación del vector digerido. Finalmente se sembró el volumen completo de la digestión del vector en gel de agarosa (Fig. 3.11) y se purificó la banda a partir de gel utilizando el kit de QiaexII.

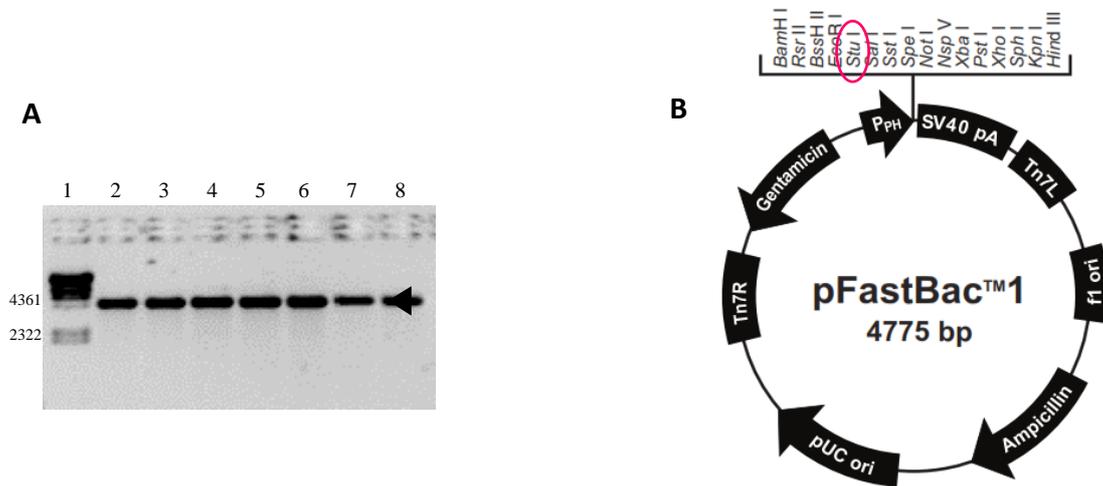


Figura 3.11. A. Preparación del vector donante *pFastbac 1*. Calle 1. Marcador λ HindIII (Productos Bio-Lógicos®). Calles 2 a 8. Digestiones de *pFastBac1* con *StuI*. Tamaño de *pFastBac1*: 4775 pb. **B. Esquema del vector donante *pFastBac1*.** Se muestran los elementos genéticos principales presentes en el vector. En el sitio de clonado múltiple(SCM) se detallan los sitios de restricción presentes y se marca el utilizado (*StuI*).

3.3.4. Inserción del gen HA_p en el vector donante *pFastBac1*

Para el clonado del gen HA_p en el vector *pFastBac1* se utilizaron los sitios de restricción *NruI* incluidos en los oligonucleótidos utilizados en la amplificación del gen. El inserto fue liberado de pGEM-T por digestión con *NruI* y subclonado en el vector *pFastBac1* preparado en 3.3.3, obteniéndose el vector *pFastBac- HA_p* .

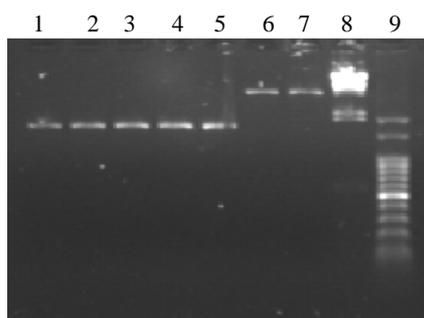


Figura 3.12. Purificación por Qiaex de HA_p y *pFastBac1*.
 1 a 5. Inserto HA_p purificado
 6 a 7. *pFastBac1* linealizado y purificado
 8. Marcador λ HindIII (Productos Bio-Lógicos®)
 9. Marcador, 100 bp (Productos Bio-Lógicos®)

Para la ligación del inserto codificando para el gen HA_P a pFastbac1 se realizó una reacción de ligación con la T4 DNA ligasa (Biolabs), ON a 16°C, como se describió previamente y se ensayaron las siguientes relaciones inserto: vector: 1:1; 3:1; 7:1 y 20:1. Se transformaron células *E. coli* DH10β y la relación a partir de la cual se obtuvo un mayor número de colonias fue: 7:1 (ver sección 3.1.8 y 3.1.9).

Para analizar la presencia del inserto en el vector *pFastBac1* se realizó *colony PCR* como método de *screening* de las colonias obtenidas; se utilizaron los *primers* mencionados en 3.3.1.

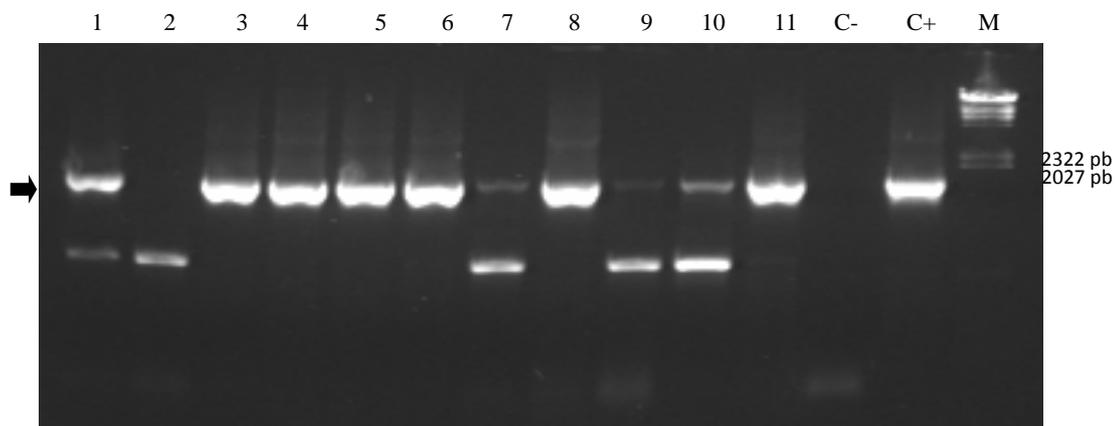


Figura 3.13. Análisis de colonias bacterianas transformadas con el vector pFastBac-HA_P. *Colony PCR* de algunas colonias obtenidas con la transformación de células *E. coli* DH10β con la ligación HA_P-pFastBac1. Calles 1 a 11 Clones 1 a 11. C-: *mix* completa utilizada para la reacción sin agregado de templado. C+ PCR de pGEM HA_P clon 7 M: marcadores 100 bp + λHindII (Productos Bio-Lógicos).

A fin de analizar la orientación del gen insertado, las colonias conteniendo el inserto del tamaño esperado, en adelante denominadas **pFastBac-HA_P** se digirieron con la enzima *SpeI*. De los 4 clones positivos mostrados en las figura 3.14, (C19, C20, C21 y C22) sólo el clon 22 (C22) presentó la orientación correcta.

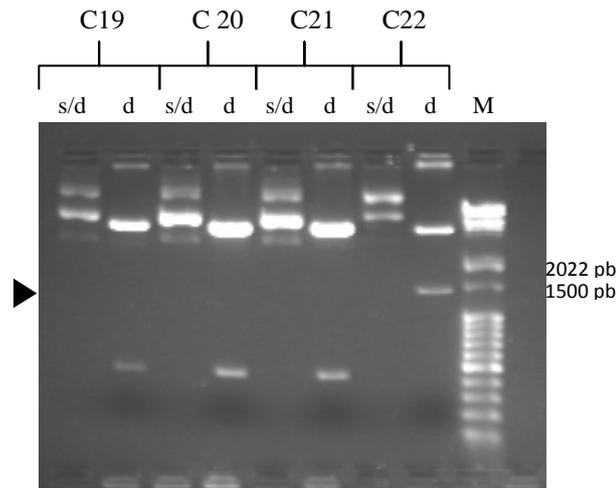


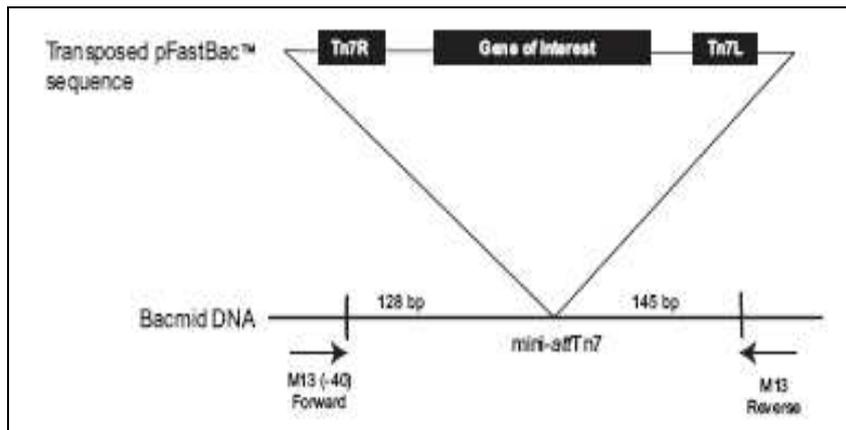
Figura 3.14. Determinación de la orientación del inserto HAp en FastBac-HA_P. En todos los casos se muestra el plásmido sin digerir (s/d) y digerido (d) con *SpeI*. El clon 22 (C22) que posee el inserto en la orientación deseada liberó un fragmento de 1358 pb mientras que los clones con inserto orientado incorrectamente liberaron un fragmento de 428 pb (C19, C20 y C21). **M.** Marcadores, 100 pb y λ HindII (Productos Bio-Lógicos®).

Para corroborar que no se hubieran introducido cambios en el inserto, el clon 22 se envió a secuenciar y se analizó su secuencia respecto del clon 7 (pGEM-HA_P); no se introdujeron cambios por lo que se continuó trabajando con esta construcción.

3.3.5. Obtención de b́acmidos recombinantes y análisis por PCR

Para obtener los b́acmidos recombinantes de acuerdo al sistema Bac-to-Bac (Invitrogen), se transformaron bacterias DH10bac competentes con el clon 22 seleccionado en la etapa anterior, y se sembraron placas conteniendo LB + gentamicina + kanamicina + tetraciclina + Bluo-gal + IPTG (ver sección 3.1.9.). Se escogieron las colonias blancas y para corroborar si contenían b́acmidos recombinantes se realizaron dos PCR con distintos set de *primers*. Por un lado se utilizaron los *primers* *M13 Forward* (-40) y *M13 Reverse* y por el otro, un *primer* que hibrida en una zona del gen de interés y un *primer* M13. En este sistema, cuando no ocurre la transposición y se realiza una PCR con el set de *primers* M13, se obtiene una banda de amplificación de aproximadamente 300 pb (ver esquema a continuación, Figura 3.15 A); en cambio si la transposición tuvo lugar en el b́acmido se espera una banda de amplificación de 2300 pb + el tamaño del inserto (Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, 2004). En este caso, cuando se realizó la PCR con el set de *primers* M13 se esperaba una banda de amplificación de aproximadamente 4.093pb (2.300 pb + 1.793 pb = 4.093 pb)

A



B

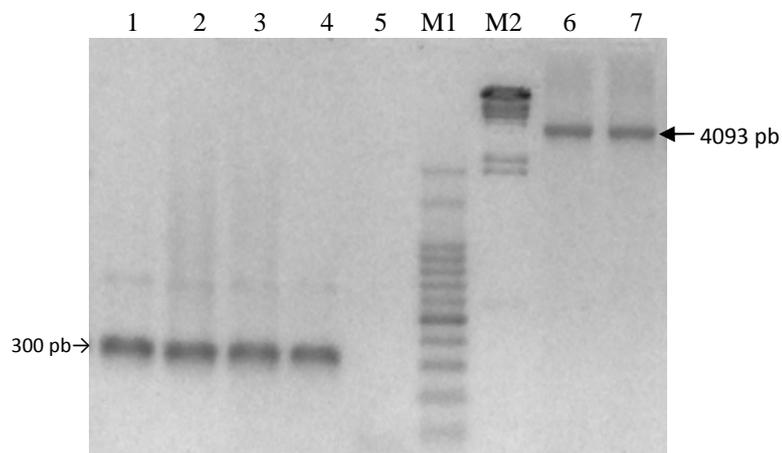


Figura 3.15. Screening por PCR de los b́acmidos con set de primers M13. (A)

Esquema representando la transposici3n esperada entre el vector FastBac-HA_P y el b́acmido del sistema Bac to Bac **(B) Calles 1 a 4, 6 y 7.** Productos de amplificaci3n de b́acmidos aislados de colonias blancas. **Calle 5.** Control de reacci3n de PCR (mix sin templado). **M1.** Marcador, 100 bp. **M2.** Marcador λ HindII (Productos Bio-L3gicos[®]).

Como puede observarse en la Fig.3.15, los b́acmidos 6 y 7 presentaron productos de amplificaci3n compatibles con la incorporaci3n de HA_P en el b́acmido y se seleccion3 el b́acmido # 6 (calle 6 de la figura 3.15) para transfectar. Para ello se realiz3 una maxi preparaci3n de ADN y posterior precipitaci3n con PEG8000 al 13%.

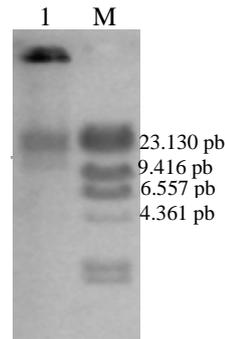


Figura 3.16. Maxipreparación de Báculo # 6. Calle 1 .

Maxipreparación del Báculo #6.
M. Marcador λ *HindIII* (Productos Bio-Lógicos®). Las muestras fueron resueltas en gel de agarosa al 0,6% teñido con bromuro de etidio.
 báculo: 136 Kb
 pFast-bac-HA_{B/Y}: 6,568 kb
 Vector helper: 13,2 Kb

3.4. Amplificación y clonado del gen completo de la HA de la cepa B/Yamanashi/166/98 (HA_{B/Y})

3.4.1. Amplificación del gen HA_{B/Y}

Siguiendo la metodología ya descrita para las otras cepas, se amplificó la secuencia de la HA_{B/Y} (1887 pb) con el siguiente set de *primers*:

Primer sentido: 5'-CCCTCGCGAAGCAGAGCATTCTAATATC-3' (se subraya el sitio *NruI*)

Primer antisentido: 5'-CCCTCGCGAAGTAGTAACAAGAGCATTCTT-3' (se subraya el sitio *NruI*)

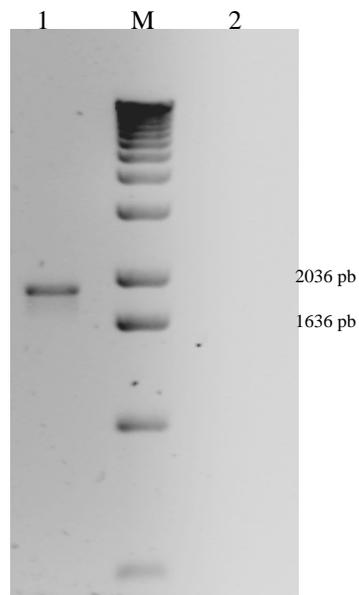


Figura 3.17. Amplificación de HA_{B/Y} por PCR.

1. Producto de amplificación.
M. Marcador, 1Kb (Invitrogen™).
2. Control negativo de la reacción de PCR (sin templado).

Como se describió para las construcciones anteriores, el producto de PCR HA_{B/Y} se clonó en el vector pGEM®-T easy (Promega). Se seleccionaron algunos clones para enviar a secuenciar previa confirmación de la presencia del inserto por restricción con la enzima *NruI*. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con la secuencia publicada en GenBank (número de acceso CY019531.1). A partir de estos resultados se eligió el clon 2 de pGEM-T-HA_{B/Y} por presentar la menor cantidad de cambios

aminoacídicos y que además resultaran estar alejados de los sitios antigénicos descritos (Pechirra y col., 2005). Ver en la Sección Anexos el alineamiento del clon 2 con la secuencia de referencia de la HA de la cepa B/Yamanashi/2007/99 (Anexo nº 4).

3.4.2. Clonado de $HA_{B/Y}$ en el vector pVL1393

A continuación el inserto se liberó por digestión del clon 2 de pGEM-T- $HA_{B/Y}$ con la enzima de restricción *Nru*I y se subclonó en el vector de transferencia pVL1393 preparado en 3.1.3. Para conocer la orientación de $HA_{B/Y}$ dentro del vector de transferencia recombinante se realizó una digestión de los clones obtenidos con las enzimas *Not*I y *Bsu*36I. En el caso de que el inserto presentara orientación correcta se esperaban dos bandas de 219 pb y 1413 pb. Para los clones que presentaran el inserto en la orientación incorrecta se esperaban dos bandas de 303 pb y 219 pb. Como se puede observar en la figura 3.18, los clones C6, C7, C8 y C12 presentaban la $HA_{B/Y}$ orientada correctamente; se seleccionó el clon 6 para el siguiente paso de transfección.

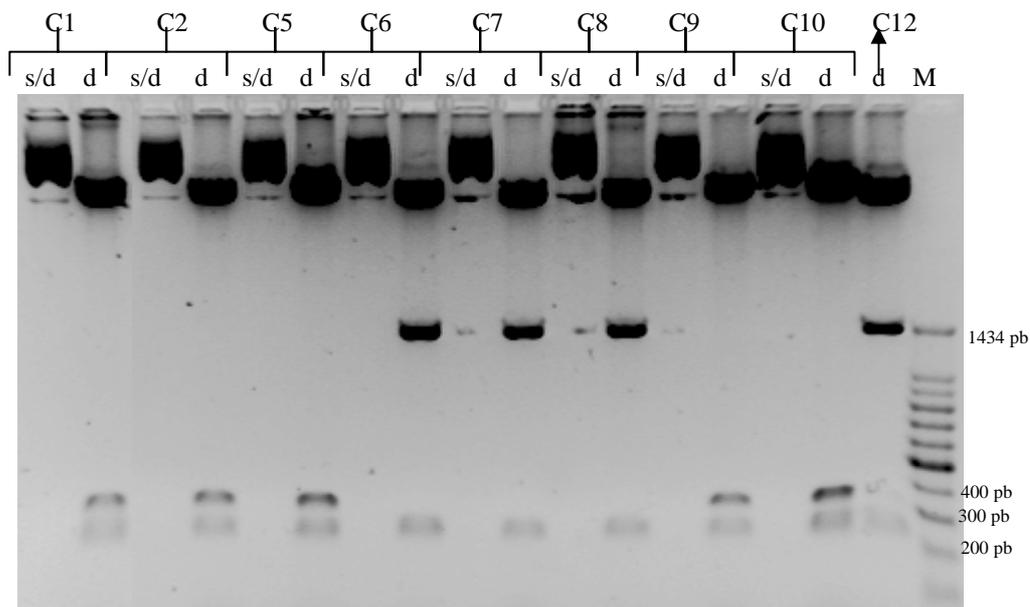


Figura 3.18. Análisis de la orientación del gen $HA_{B/Y}$ en pVL- $HA_{B/Y}$ por digestión con *Not*I y *Bsu*36I. Se muestran los clones 1, 2, 5, 6 a 10 y 12 sin digerir (s/d) y digeridos (d) con ambas enzimas. **M.** Marcador, 100 pb (Productos Bio-Lógicos®).

3.5. Amplificación y clonado del gen de HA (subtipo H1) de influenza sin porción transmembrana y con secuencia señal del gen gp64 de Bv (Δ HA_{gp})

3.5.1. Amplificación de Δ HA

Se amplificó por PCR el gen que codifica para la proteína HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1) utilizando oligonucleótidos especialmente diseñados para amplificar el gen HA omitiendo el dominio transmembrana y la señal de secreción propia del gen. Como molde se utilizó el ADN copia (ADNc) del gen, previamente obtenido en el ítem 3.2. Se utilizó el siguiente set de primers:

Primer sentido: 5'-CCCGGGCACAATATGTATAGGCTACC-3' (se subraya el sitio para *SmaI/XmaI*)

Primer antisentido: 5'-AGATCTTCACTGATAGACTCCCATTGAT-3' (se subraya el sitio para *BglII*)

A fin de determinar la temperatura óptima de amplificación, se ensayó un rango de temperaturas de 45°C a 54.1°C (T_m *primer sentido*: 52 °C; T_m *primer anti-sentido*: 54 °C). Como se observa en la Figura 8, en todas las temperaturas (excepto a 45°C) se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado (1546 pb) y no se detectaron amplificaciones inespecíficas, ni aún a la menor temperatura ensayada.

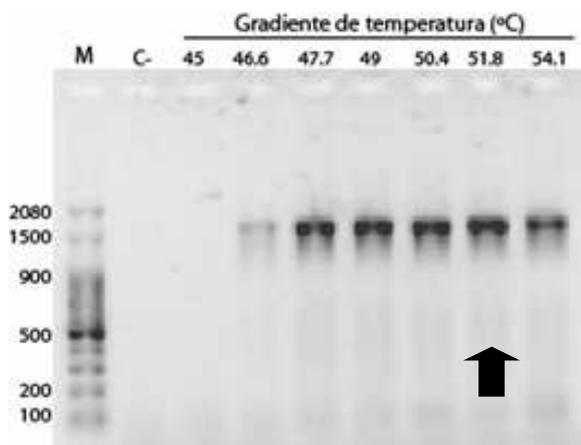


Figura 3.19. Amplificación del dominio Δ HA (cepa A/New Caledonia/20/99). Se muestran los resultados de un ensayo de PCR con gradiente de temperatura, resueltos en un gel de agarosa 1%. Se indica con una flecha el producto utilizado para el paso de subclonado. **M:** Marcador, 100pb (Productos BioLógicos®). La flecha indica el producto seleccionado para el paso de subclonado siguiente. **C-:** control negativo de la reacción de PCR (*mix* completa utilizada para la reacción sin agregado de templado).

Como siguiente paso se subclonó el dominio Δ HA en el vector pGEM-T Easy (Promega). Para ello, se utilizó el producto obtenido a 51,8°C ya que fue la condición que, a mayor temperatura, permitió obtener una adecuada cantidad de producto amplificado para el paso de subclonado. La banda correspondiente se extrajo y purificó a partir de gel de agarosa y se realizó el ensayo de ligación al vector pGEM-T Easy.

3.5.2. Selección de los clones recombinantes que contienen el dominio Δ HA

Los cultivos de *E. coli* se sembraron en placas LB + ampicilina + XGal + IPTG. A partir de las colonias blancas obtenidas, se realizó una preparación de ADN plasmídico para realizar un *screening* por restricción que permitiera identificar los clones que contenían el dominio Δ HA (en adelante denominado: pGEM- Δ HA).

Para ello, los clones fueron digeridos con las enzimas restricción *Xma*I y *Bgl*II, cuyos sitios fueron incluidos en el diseño de los oligonucleótidos usados en la amplificación del fragmento. El producto de digestión fue analizado en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Como se observa en la Fig. 3.20, a partir de este ensayo, se identificaron 5 clones (números 1, 3, 5, 6 y 7) que presentaron el patrón de restricción esperado, es decir, un fragmento de 3008 pb, correspondiente al vector linealizado y uno de 1538 pb correspondientes al dominio Δ HA (se indica con una flecha).

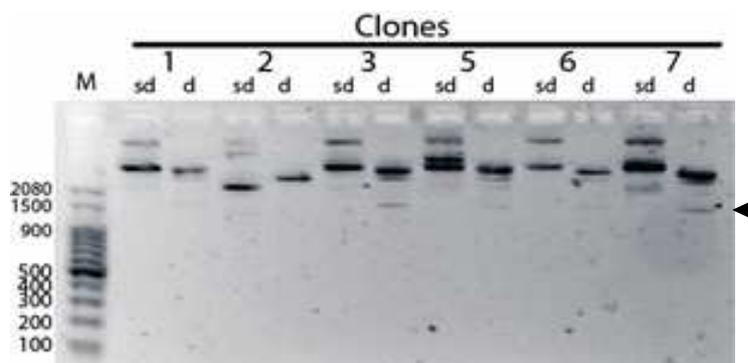


Figura 3.20. Análisis por restricción de los clones pGEM-T Easy obtenidos. El ADN plasmídico fue digerido utilizando las enzimas *Xma*I y *Bgl*II (se indica con una flecha el fragmento de tamaño esperado). Los fragmentos de ADN fueron resueltos en un gel de agarosa 1%. **Sd:** ADN plasmídico sin digerir; **d:** ADN plasmídico digerido. **M:** Marcador, 100 pb (Productos Bio-Lógicos®), los números indican el tamaño en pares de bases.

A fin de confirmar si estos fragmentos de ADN clonados correspondían al dominio Δ HA, los clones 1, 3, 5, 6 y 7 fueron secuenciados en forma completa y la secuencia correspondiente al inserto fue alineada con la secuencia publicada en GenBank.

A partir de este análisis se eligió el clon 1, que presentaba los mismos cambios de nucleótidos presentes en el ADNc utilizado como molde. En la Sección Anexos se muestra el alineamiento de aminoácidos de la secuencia traducida de este clon y la secuencia publicada del gen HA traducida (número de acceso: AY289929). Si bien los cambios de nucleótidos presentes en el clon seleccionado,

resultan en 4 cambios no conservativos de aminoácidos, todos se encuentran fuera de los sitios antigénicos descriptos para el subtipo H1 de HA (ver anexo nº 5).

3.5.3. Descripción del vector de transferencia a baculovirus *pVLSup1*

De acuerdo a la estrategia propuesta, para lograr la fusión del gen Δ HA amplificado a la señal de secreción de la proteína gp64 de Bv se utilizó el vector *pVLSup1* (Tami y col., 2000) gentilmente cedido por el Dr. Oscar Taboga (INTA-Castelar). Este vector, construido sobre la base del vector comercial de transferencia a Bv pVL1393 ya descripto (BD Sciences), contiene el gen completo de la proteína gp64 de Bv. Como se esquematiza en la Fig.3.21, el vector posee además un *cassette* de resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli*, el gen gp64 clonado río abajo del promotor poliedrina de Bv y un sitio de clonado múltiple río abajo del péptido señal de gp64.

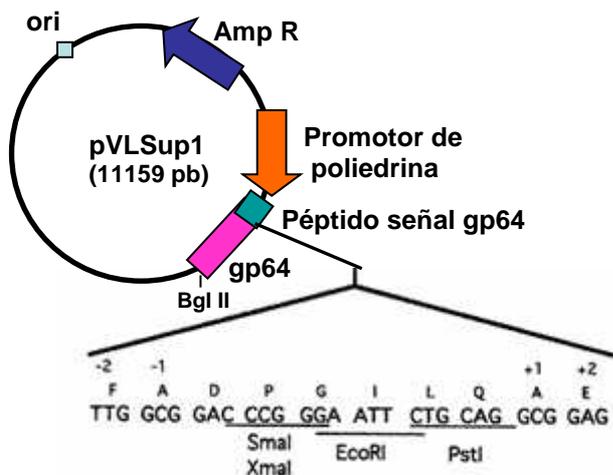


Figura 3.21. Representación esquemática del vector *pVLSup1*.

En el esquema se muestran los elementos genéticos principales presentes en el vector: **ori**: origen de replicación en bacterias *E. coli*, **Amp R**: gen de resistencia a ampicilina, **gp64**: gen completo codificando para la proteína madura gp64 de Bv. Se detallan los sitios de restricción presentes en el SCM del vector.

3.5.4. Inserción del dominio Δ HA en el vector *pVLSup1*

El paso siguiente en esta etapa, consistió en reemplazar en el vector *pVLSup1* (Fig. 3.21) el gen de la proteína gp64 por el dominio Δ HA amplificado en el Item 3.5.1, de manera que éste quedara posicionado río abajo y en fase con el péptido señal de gp64. Esta construcción fue denominada *pVLSup1- Δ HA_{gp}*.

Como primer paso para la construcción del vector y, a fin de contar con material suficiente para hacer el paso de sub-clonado, se realizó una midi-preparación de ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* transformados con el clon seleccionado previamente (*pGEM- Δ HA_{gp}*, clon 1). Luego, se liberó el inserto clonado por medio de una digestión secuencial, como sigue:

- 1-Se digirieron 10 µg de la midi-preparación utilizando la enzima *Xma*I. Se evaluó la digestión completa en un gel de agarosa (Fig. 3.23 A).
- 2-Se purificó el fragmento de ADN linealizado a partir de gel de agarosa.
- 3-Se digirió el ADN purificado en 2 utilizando la enzima *Bgl*II (Fig. 3.23 B).
- 4-Una vez asegurada la digestión completa se purificó la banda correspondiente al inserto (1538 pb) a partir de gel de agarosa (Fig. 3.22 C).

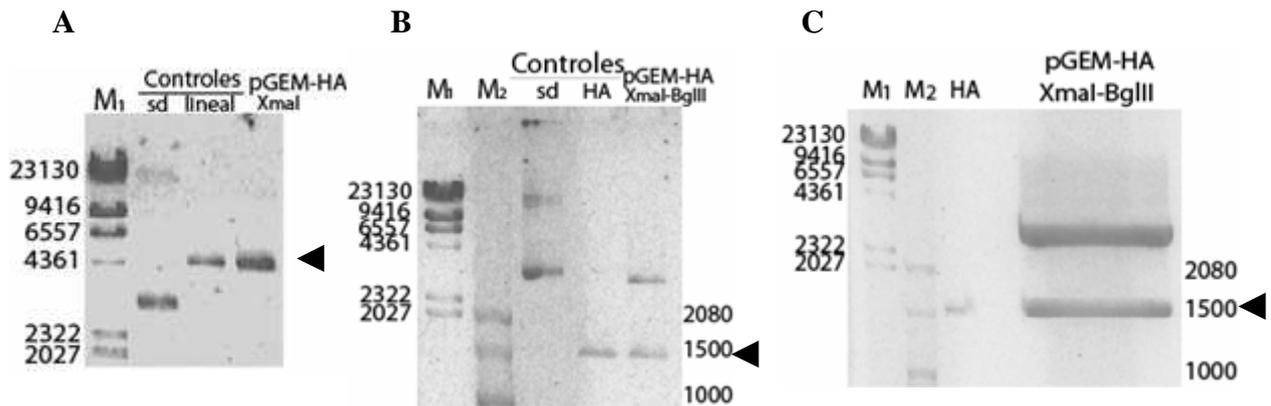


Figura 3.22. Obtención y purificación del inserto que contiene el gen Δ HA para su clonado en el vector pVLSup1. **A.** Digestión del vector pGEM- Δ HA_{gp} (clon 1) utilizando la enzima *Xma*I (gel de agarosa 0.6 %). **B.** Digestión del vector pGEM- Δ HA_{gp} (clon 1) con las enzimas *Xma*I y *Bgl*II (gel de agarosa 0.6 %). **C.** Gel preparativo para la obtención y purificación del inserto que contiene el dominio Δ HA (gel de agarosa 0.8 %). **M**₁: Marcador λ *Hind*III. **M**₂: Marcador, 100bp (Productos Bio-Lógicos®). Los números indican el tamaño en pares de bases: a la izquierda para **M**₁ y a la derecha para **M**₂; **sd**: pGEM- Δ HA sin digerir; **lineal**: pGEM- Δ HA linealizado previamente para utilizar como control de digestión; **HA**: fragmento de HA amplificado previamente. Las flechas indican la posición en el gel de la banda del tamaño esperado en cada caso.

Para preparar al vector *pVLSup1* para el clonado del gen Δ HA_{gp} se digirieron secuencialmente 8 µg del vector *pVLSup1* utilizando las enzimas *Xma*I/*Bgl*II, de manera tal de eliminar el gen codificando de la proteína gp64 y dejar solamente su péptido señal. Se evaluó la digestión en un gel de agarosa (Fig. 3.23A) y el plásmido linealizado (9669 pb) fue purificado a partir de gel de agarosa (Fig. 3.23B). Como se observa, la liberación de la banda de 1490 pb correspondiente al gen de gp64 asegura la digestión completa del vector y su correcta preparación para el subclonado del dominio Δ HA.

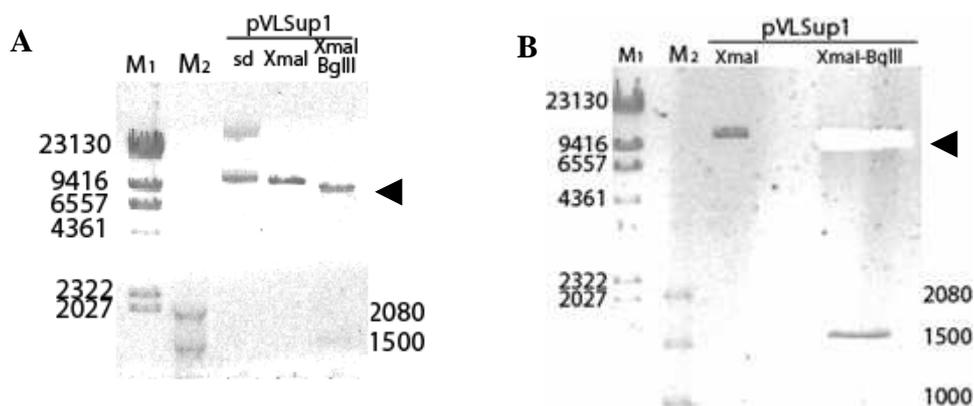


Figura 3.23. Preparación del vector *pVLSup1*. A. Digestión del vector *pVLSup1* utilizando las enzimas *XmaI* y *BglII*. B. Extracción a partir del gel de agarosa del vector digerido en forma completa. En ambos casos se utilizaron geles de agarosa 0.6 %. **M₁**: Marcador λ *HindIII*; **M₂**: Marcador, 100pb (Productos Bio-Lógicos®). Los números indican el tamaño en pares de bases: a la izquierda para M₁ y a la derecha para M₂; **sd**: *pVLSup1* sin digerir; **Xmal**: *pVLSup1* linealizado con la enzima *XmaI*; **Xmal-BglII**: *pVLSup1* digerido con las dos enzimas. Las flechas indican la posición en el gel de la banda del tamaño esperado.

Una vez obtenidos el vector *pVLSup1* linealizado y el inserto del gen Δ HA purificado, se realizó un ensayo de ligación utilizando las siguientes relaciones molares vector:inserto: 1:1; 1:3 y 1:9. El producto de ligación se utilizó para transformar células *E. coli* 10 β competentes y se realizó un primer *screening* de los clones recombinantes en placas de LB conteniendo ampicilina. A partir del ADN plasmídico de clones seleccionados, se realizó un mapeo por restricción que permitiera identificar los clones que contenían el dominio Δ HA. Para ello se utilizó la enzima *Bsu36I* ya que Δ HA posee un único sitio de corte para esta enzima mientras que el vector *pVLSup1* no posee ninguno (Fig. 3.25). Como puede observarse en la figura, se obtuvo una elevada proporción de clones recombinantes conteniendo el dominio Δ HA a partir de la ligación (\approx 80 %). Algunos de estos clones (clones 1, 2, 3 y 4) fueron secuenciados para verificar la secuencia de nucleótidos del inserto. A partir de estos resultados, se confirmó que no se habían generado mutaciones en el paso de sub-clonado y que el gen había sido insertado correctamente en el vector.

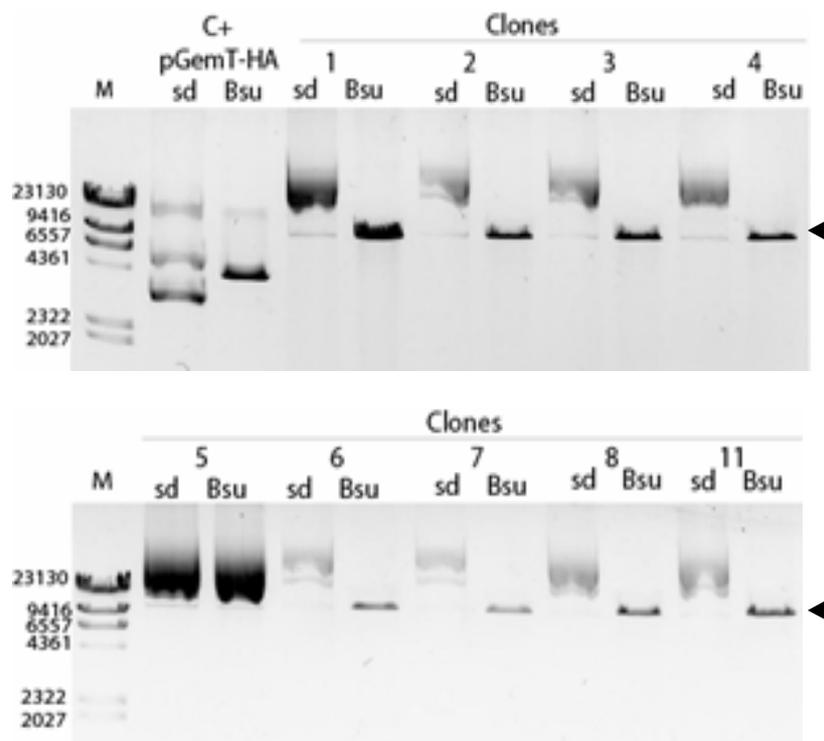


Figura 3.24. Identificación de los clones de *E. coli* transformados con el plásmido *pVLSup1*- Δ HA. El ADN plasmídico de los clones obtenidos a partir de la ligación *pVLSup1* + inserto Δ HA fueron digeridos con la enzima *Bsu36I* y analizados en un gel de agarosa 0,7 % teñido con bromuro de etidio. **C+**: Control positivo de la digestión: plásmido *pGEM*- Δ HA; **sd**: ADN plasmídico sin digerir; **Bsu**: ADN plasmídico digerido con la

enzima *Bsu36I*. **M:** Marcador λ HindIII. Los números a la izquierda indican el tamaño en pares de base. Las flechas indican la posición en el gel de la banda del tamaño esperado.

De acuerdo a los resultados de secuenciación, se eligió el clon nº 2 para continuar el trabajo y se realizó una midi-preparación de ADN plasmídico utilizando el *kit* Qiagen (Qiagen Inc) y posterior precipitación con PEG (13%) a partir de cultivos de *E. coli* transformados con el clon seleccionado.

3.6. Amplificación y clonado del dominio HA₁ del gen HA de la cepa A/Viet Nam/1203/2004 (Δ HA₅)

3.6.1. Amplificación de la región Δ HA₅

Se amplificó por RT-PCR el gen que codifica para el dominio HA₁ del gen HA de la cepa A/Viet Nam/1203/2004 (H5N1) obtenida del CDC (Atlanta, Georgia), utilizando *primers* específicos. Se adjuntan las secuencias a continuación (se subraya el sitio para *Nrul*):

Primer sentido: 5'-ATCGCGACTGTCAAAATGGAGAAAATA-3'

Primer antisentido: 5'-TCGCGATTATCGCGTCTCTCGTTGAGGGC-3'

Debido a la disparidad en la temperatura de melting (T_m) del *primer* sentido (52°C) y el *primer* antisentido (66°C), se realizó un ensayo de PCR con gradiente de temperatura a fin de determinar la temperatura óptima de amplificación. De esta manera se ensayó un rango de temperaturas de 62°C a 68,4°C. Como se observa en la Fig.3.25, para todas las temperaturas se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado (1050 pb) y no se detectaron amplificaciones inespecíficas ni en el control de la reacción (C-) ni aún a la menor temperatura ensayada.

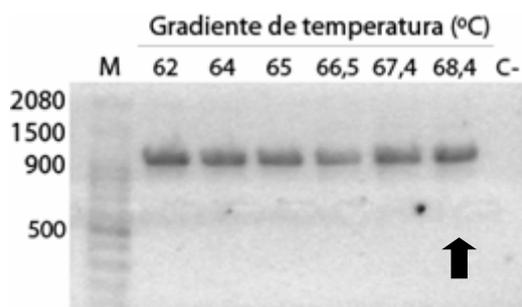


Figura 3.25. Amplificación del dominio HA₁ del gen HA (cepa A/Viet Nam/1203/2004). PCR con gradiente de temperatura. Los productos fueron resueltos en un gel de agarosa 0,7%. **M:** marcador, 100 pb (Productos Bio-Lógicos®), los números indican el tamaño en pares de bases; **C-:** control negativo de la reacción de PCR (*mix* completa utilizada para la reacción sin agregado de templado). La flecha indica el producto seleccionado para el paso de subclonado siguiente.

Como siguiente paso, se subclonó el dominio, que llamamos Δ HA₅ en el vector pGEM-T Easy (Promega). Para ello, en el ensayo de ligación se utilizó el producto obtenido a 68,4°C ya que fue la

condición que, a mayor temperatura, permitió obtener una adecuada cantidad de producto amplificado.

3.6.2. Selección de los clones recombinantes que contienen el dominio ΔHA_5

El ADN plasmídico (pGEMT- ΔHA_5) fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI*. Dado que el vector pGEM T-Easy presenta dos sitios para esta enzima y que el fragmento ΔHA_5 presenta un solo sitio, se esperaban los siguientes fragmentos luego de la digestión:

Orientación #1: 276 pb, 794 pb y 2996 pb; orientación #2: 280 pb, 790 pb y 2996 pb.

La diferencia generada en el patrón de restricción en un caso u otro es indistinguible en un gel de agarosa, por lo tanto, esperábamos el mismo patrón para ambas orientaciones. El producto de esta digestión fue analizado en gel de agarosa 2 % teñido con bromuro de etidio (Fig. 3.26). Como puede observarse, todos los clones analizados, excepto el número 5, presentaron el patrón de restricción esperado (para una u otra orientación).

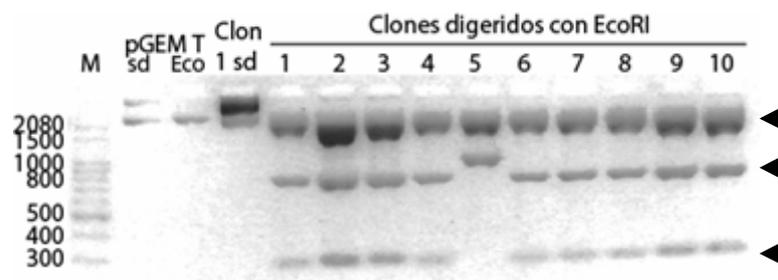


Figura 3.26. Análisis por restricción de los clones pGEMT- ΔHA_5 seleccionados. El ADN plasmídico obtenido fue digerido con la enzima *EcoRI*. El patrón esperado para los clones positivos es 280pb; 790pb y 3000pb aprox. Los fragmentos de ADN fueron resueltos en un gel de agarosa 2 %. **pGEM T:** vector pGEM T-Easy re-ligado; **sd:** vector sin digerir; **Eco:** vector digerido con *EcoRI* (control positivo de la digestión); **Clon 1 sd:** clon 1 del primer *screening* sin digerir; **M:** marcador, 100 pb (Productos Bio-Lógicos®), los números indican el tamaño en pares de bases. Las flechas indican los fragmentos del tamaño esperado.

Con el objetivo de confirmar si los fragmentos de ADN clonados correspondían al dominio ΔHA_5 , los clones 2, 3, 9 y 10 fueron secuenciados en forma completa y la secuencia correspondiente al inserto fue alineada con las secuencias publicadas en GenBank.

A partir de este análisis, se eligió el clon 9 ya que presentaba los mismos cambios de nucleótidos presentes en el ADNc utilizado como molde. En la Sección Anexos se muestra el alineamiento de la secuencia traducida a aminoácidos de este clon con la secuencia publicada (número

de acceso: ABP51977.1). Cabe aclarar que, si bien los cambios de nucleótidos encontrados en la secuencia redundan en 3 cambios no conservativos de aminoácidos, todos se encuentran fuera de los sitios antigénicos descritos para el subtipo H5 (Philpott y col., 1990, Kaverin y col., 2002; Kaverin y col., 2007) y no alteraron las regiones conservadas descritas para este subtipo (región VIN1; Velikovic y col., 2010) ni tampoco el epítopo conservado (QNPTTYI; Wang y col., 2009); ver anexo nº 6.

3.6.3. Inserción del dominio ΔHA_5 en el vector de transferencia pVL1393

Para el clonado del dominio ΔHA_5 en el vector pVL1393 se utilizó el sitio de restricción *NruI* incluido en los oligonucleótidos usados en la amplificación del fragmento. De esta manera, el inserto fue liberado del vector pGEM- ΔHA_5 utilizando esta enzima, que genera extremos romos. Por otro lado, se utilizó el sitio *SmaI* presente en el SCM del vector pVL1393, que también genera extremos romos. La construcción final fue denominada pVL1393- ΔHA_5 .

Como primer paso para la construcción del vector pVL1393- ΔHA_5 se realizó una midipreparación de ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* del clon seleccionado en el ítem anterior (pGEM- ΔHA_5 , clon 9) utilizando el kit Qiagen (Qiagen Inc). Como segundo paso se liberó el inserto clonado como sigue:

1- Se digirieron 2 μ g de la preparación anterior utilizando la enzima *NruI* y se evaluó la digestión completa en un gel de agarosa (Fig. 3.27 A).

2- Se purificó el inserto ΔHA_5 (tamaño 1043 pb) liberado a partir del gel de agarosa utilizando el kit Qiaex (Qiagen Inc) (Fig. 3.27 B).

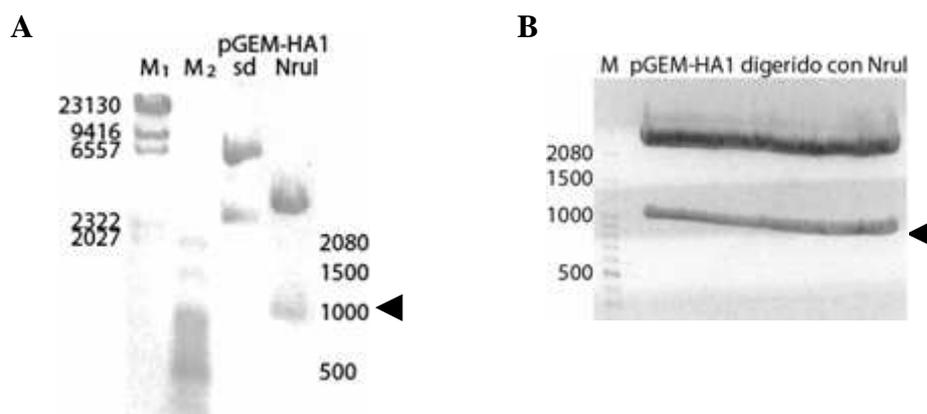


Figura 3.27. Obtención y purificación del inserto que contiene el dominio ΔHA_5 para su clonado en pVL1393. A. Liberación del inserto HA₁ del vector pGEM- ΔHA_5 (clon 9) por digestión con *NruI*; M₁: marcador λ HindIII. M₂: marcador, 100 pb (Productos Bio-Lógicos[®]); los números indican el tamaño en pares de bases: a la izquierda para M₁ y a la derecha para M₂; sd: pGEM-HA1 sin digerir; NruI: pGEM- ΔHA_5 digerido con la enzima *NruI*. B. Gel preparativo para la extracción del inserto HA₁ (flecha) a partir

del gel de agarosa; **M**: marcador, 100 pb. Los geles de agarosa (0,7 %) fueron teñidos con bromuro de etidio. Las flechas indican la posición del fragmento de interés.

Una vez purificado el fragmento ΔHA_5 , se realizó la reacción de ligación al vector de transferencia pVL1393. Para esto se utilizó una preparación del vector digerido con la enzima *SmaI* realizada anteriormente (en el ítem 3.2.3). Para la ligación de extremos romos requerida en este ensayo se utilizaron las relaciones molares vector: inserto: 1:1; 1:3 y 1:9. A continuación el producto de ligación se utilizó para transformar células *E. coli* DH10 β competentes y se realizó un primer *screening* de los clones recombinantes en placas de LB + Ampicilina. A partir del ADN plasmídico preparado se realizó una pre-selección por tamaño en un gel de agarosa 0,7% (dato no mostrado).

Luego se realizó un mapeo por restricción que permitiera identificar los clones que contenían el dominio HA₁ en la orientación correcta, ya que la estrategia utilizada para el clonado no permitía direccionar el inserto. De esta manera, se utilizó la enzima *EcoRI*, la cual posee un sitio único en el dominio HA₁ y otro en el vector pVL1393. De esta manera, el plásmido pVL1393- ΔHA_5 , con el inserto en la orientación correcta, generaba un fragmento de 794 pb y otro de 9881 pb. Como puede observarse en la Fig.3.28, a partir de este ensayo se identificaron 4 clones positivos (clones 3, 8, 9 y 10) de los 6 analizados. Estos clones fueron secuenciados para verificar la composición nucleotídica del inserto. A partir de estos resultados, se confirmó que no se habían generado mutaciones en el paso de sub-clonado y que el gen había sido correctamente insertado en el vector. Para continuar el trabajo se eligió el clon número 9.

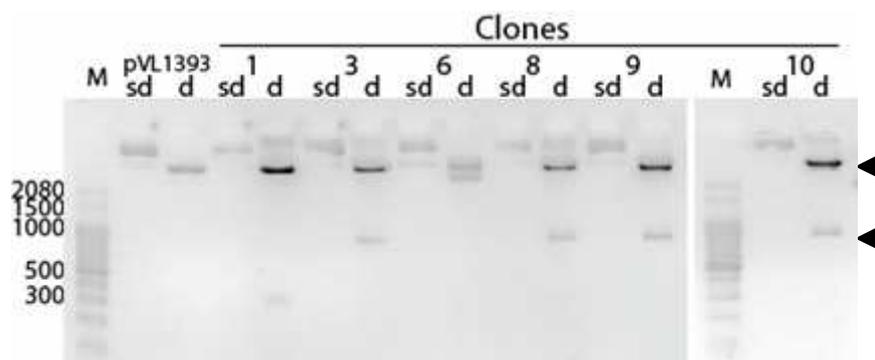


Figura 3.28. Identificación de los clones pVL1393- ΔHA_5 que contienen el inserto en la orientación correcta. El ADN plasmídico de los clones obtenidos a partir de la ligación pVL1393 + inserto ΔHA_5 fueron seleccionados primero según su tamaño y luego por digestión con la enzima *EcoRI*. Los fragmentos de ADN se analizaron en un gel de agarosa 1.2 % teñido con bromuro de etidio. **sd**: ADN plasmídico sin digerir; **d**: ADN plasmídico digerido con *EcoRI*; **M**: Marcador, 100 pb (Productos Bio-Lógicos®), los números indican el tamaño en pares de bases. Las flechas indican la posición de los fragmentos del tamaño esperado.

3.7. Clonado del gen sintético HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 optimizado para su expresión en células de insecto

3.7.1 Clonado del gen completo HA₀ de la cepa A/New Caledonia/20/99 optimizado para su expresión en células de insecto

Dado que los niveles de expresión de HA recombinante en el sistema elegido (Bv/células de insecto), tanto para la estrategia original como para las estrategias alternativas iniciadas posteriormente, fueron significativamente menores de lo esperado se decidió iniciar una nueva estrategia a fin de cumplir con los objetivos planteados originalmente. Numerosos trabajos señalan la importancia de utilizar secuencias de nucleótidos diseñadas de acuerdo al uso preferencial de codones de la especie ("codon optimization sequences") para mejorar los niveles de expresión de las proteínas recombinantes (Mossadegh N y col., 2004; Steitz J y col., 2010). Por esta razón en esta etapa se adquirió en la empresa GenScript Corporation (Piscataway, USA), un gen sintético codificando para la HA (cepa A/New Caledonia/20/99) con secuencia optimizada para la expresión en células de insecto. Cabe aclarar que esta estrategia implicó re-iniciar las tareas ya desarrolladas al comenzar la Tesis.

El gen fue clonado en el vector de transferencia pVL1393 utilizando el sistema BaculoGold, como se detalló previamente, y empleando los sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Not*I incluidos en la secuencia del gen sintético. La construcción fue denominada pVL-HA_{op}. La secuencia optimizada se adjunta en la sección Anexos (ver anexo nº 7).

3.7.2. Clonado del gen sintético HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 optimizado para su expresión en células de insecto sin la región transmembrana, con "tag" de histidinas y el complejo de trimerización GCN4pII

En este caso, además de optimizar la secuencia para su expresión en células de insecto, se adquirió el gen sintético codificando para la proteína HA sin el dominio transmembrana y adicionando al extremo 3' un "tag" de 6 Histinas y una secuencia codificando para el dominio de trimerización "GCN4" identificado en *Salmonella enterica* y utilizado en la bibliografía a fin de obtener proteínas recombinantes capaces de formar multímeros (Bosch BJ y col., 2010; Weldon W y col., 2010; Hernandez Alvarez B y col., 2008). Como se mencionó arriba estos genes fueron diseñados y adquiridos en GenScript. La secuencia se adjunta en la Sección Anexos (ver anexo nº 8).

Se utilizó también la estrategia del sistema BaculoGold, pero en este caso se agregaron al gen sintético los sitios de restricción para las enzimas *Not*I y *Bg*III para los pasos posteriores de clonado. La construcción fue denominada pVLHA_T.

3.8. Clonado del gen NP fusionado al gen que codifica la proteína VP39 de Bv (NP-VP39)

3.8.1 Amplificación del gen NP por PCR

Se amplificó la secuencia codificante del gen de la nucleoproteína de la cepa de influenza A/New Caledonia/20/99 (A/NC). Por tratarse de una cepa vacunal, es producto de un *reassortment* de segmentos de la cepa A/Puerto Rico/8/34 (PR8), está constituida por 6 segmentos de PR8 y los genes de HA y NA de la cepa A/NC, por lo que el gen de la nucleoproteína pertenece a esta última cepa (PR8).

En el diseño de los *primers* se incluyeron sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *XbaI* en los *primers forward* y *reverse*, respectivamente. En el caso del *primer reverse* además se eliminó la secuencia que codifica la señal de *stop*.

Primer sentido: 5'-TCGAATTCATCATGGCGTCTCAAGGCAC-3' (subrayado, sitio para *EcoRI*)

Primer antisentido: 5'-ATCTAGAATTGTCGTA CTCTCTGCATTG-3' (subrayado, sitio para *XbaI*)

La reacción de PCR se realizó en un termociclador marca Eppendorf realizando 36 ciclos a 68°C con la enzima Platinum[®]Pfx DNA Polymerase (Invitrogen[®]).

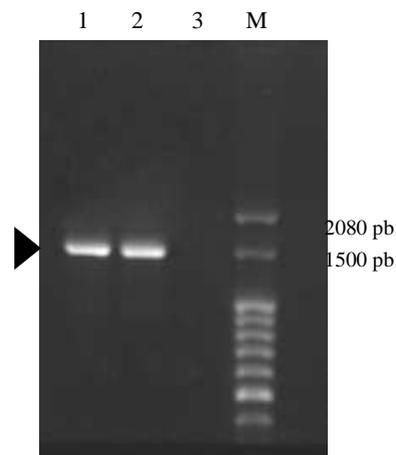


Figura 3.29. Amplificación por PCR de la secuencia codificando para la proteína NP. Se muestran los resultados de un ensayo de PCR para la NP (1540 pb). Los productos fueron resueltos en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. **Calles 1 y 2.** Se sembraron 2 µl de la reacción de amplificación (50 µl) provenientes de dos tubos de reacción independientes. **Calle 3.** Control negativo de la reacción de PCR (*mix* utilizada para la reacción sin el agregado de templado). **M.** Marcador, 100 pb (Productos Bio-Lógicos[®]).

A continuación se realizó un gel de agarosa preparativo al 1% para sembrar toda la reacción de amplificación y purificar la banda de interés con el kit de extracción de gel (QiaexII; Qiagen Inc). El fragmento purificado se utilizó en una reacción de ligación al vector pGEM[®]-T Easy (Promega).

3.8.2 Selección de los clones recombinantes

Se transformaron bacterias *E. coli* competentes con la reacción de ligación realizada y se sembraron en placas LB + ampicilina + X-gal + IPTG. Se preparó ADN plasmídico a partir de cultivos provenientes de colonias blancas para ser digerido por las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*. Como se puede observar en la Fig 3.30, excepto los clones 3 y 12, todos liberaron el inserto del tamaño esperado (1540pb).

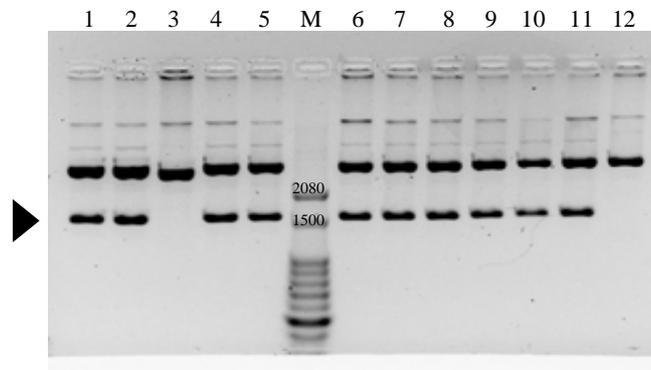


Figura 3.30. Análisis por restricción de los clones pGEMT-NP seleccionados. El ADN obtenido de cada clon fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*. Calles 1 a 12. Corresponde a los clones 1 a 12. M. Marcador, 100 pb (Productos Bio-Lógicos®).

A partir de los resultados obtenidos, se eligió el clon 4 para continuar trabajando y se realizó una digestión preparativa para liberar el gen NP y continuar con el sub-clonado en el vector donante.

3.8.3 Descripción del vector donante pFBcap

El vector donante *pFBcap* consiste en el vector pFastBac1 comercial conteniendo el gen de la proteína de la cápside de baculovirus VP39. Como puede observarse en la Fig. 3.31, este vector contiene la secuencia de la proteína madura VP39 clonada río abajo del sitio de clonado múltiple (sin el ATG). De esta manera, al clonar la secuencia de interés se obtendrá una proteína de fusión.

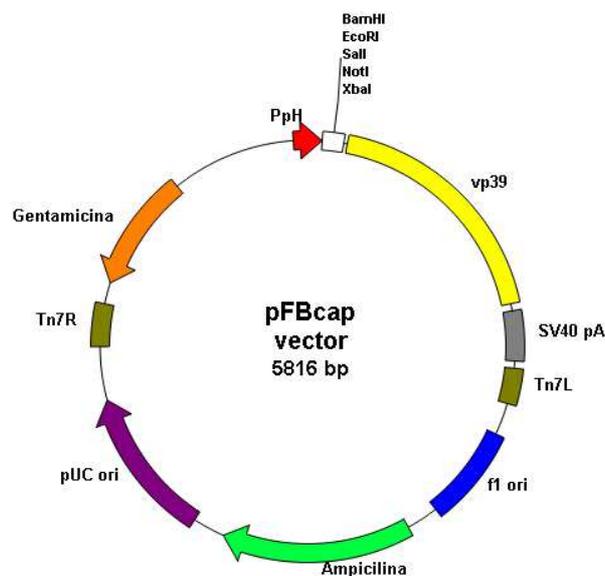


Figura 3.31. Esquema vector pFBcap. La secuencia de la proteína madura VP39 se halla inserta río abajo del SCM, sin el ATG.

3.8.4 Inserción del gen NP en el vector donante pFBcap

El gen de la NP liberado por digestión enzimática del vector pGEM-T, fue clonado en el vector pFBcap mediante los sitios de restricción para *EcoRI* y *XbaI*, previa linealización del vector.

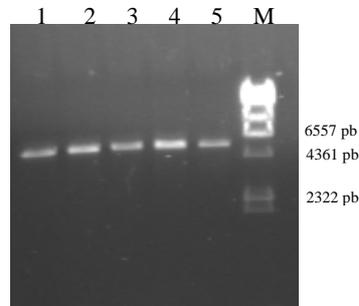


Figura 3.32. Vector pFBcap linealizado. Calles 1 a 5. Preparaciones del vector digerido con *EcoRI* y *XbaI* purificado por Qiaex. M. Marcadores λ HindIII (Productos Bio-Lógicos®).

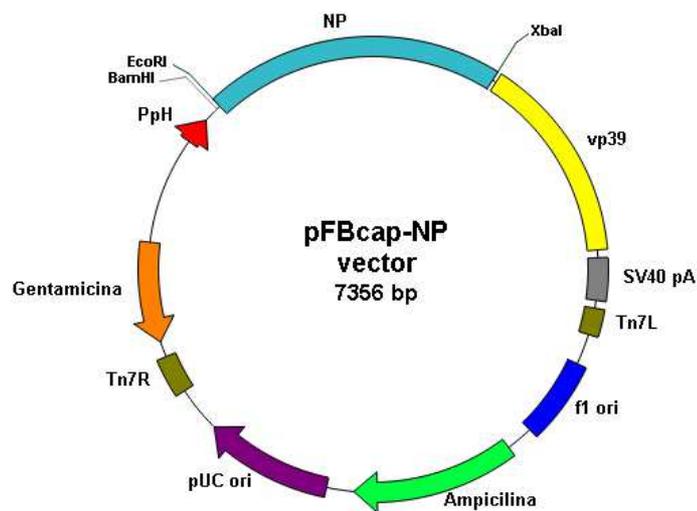


Figura 3.33. Esquema del vector pFBcap-NP. Se muestra una representación esquemática del vector pFBcap con la NP clonada fusionada a la secuencia de la proteína VP39 de Bv (total: 7356 pb)

Los clones obtenidos fueron analizados por digestiones con *BamHI*, en cuyo caso se esperaba obtener la liberación de un fragmento de 535 pb en los clones positivos.

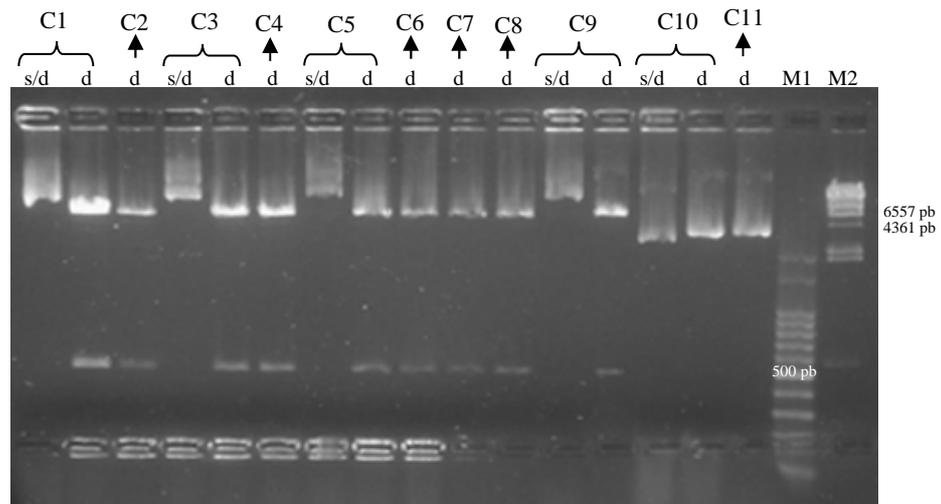


Figura 3.34. Análisis por restricción de los clones pFBcap-NP. Se analizaron los clones por digestión con la enzima de restricción *Bam*HI. Se muestran los clones 1 a 9 (C1 a C9) sin digerir (s/d) y digeridos (d). Se incluyeron dos clones (C10 y C11) negativos.

3.8.5. Obtención de b́acmidos recombinantes y ańalisis por PCR

A partir del ensayo anterior, se seleccionó el clon 1 para la obtención del b́acmido recombinante. Para ello se transformaron bacterias DH10bac competentes con el clon seleccionado y se sembraron en placas LB+gentamicina+kanamicina+tetraciclina con Bluo-gal e IPTG. Luego de la selecci3n de las colonias blancas, se sigui3 la misma metodoloǵa que en 3.3.5, realizando un *screening* por PCR.

En el caso de la utilizaci3n del set de *primers* M13, la banda esperada deb́a tener un tama3o de alrededor de 5515 pb [2300 pb + VP39 (1765) + NP (1450)]. Ver explicaci3n en ítem 3.3.5. Se seleccion3 el b́acmido #1 para continuar trabajando.

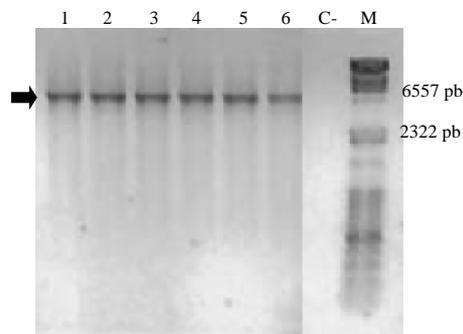


Figura 3.35. Screening por PCR de los b́acmidos con set de primers M13. Se muestran en las calles 1 a 6 productos de amplificaci3n de b́acmidos recombinantes. C-: control negativo de la reacci3n. M: marcadores λ HindIII + 100 bp (Productos Bio-L3gicos®).

3.9. Construcciones de ADN con el ectodominio de la proteína Matriz 2 (M2e)

3.9.1. Clonado de M2e fusionado al gen que codifica para la glicoproteína de membrana gp64 de *Baculovirus*

3.9.1.1. Amplificación y clonado de M2e de influenza

Se amplificó por PCR la secuencia del péptido M2e a partir de un gen sintético. Esta secuencia, denominada M2e "universal", fue reportada como consenso entre distintas cepas de virus de influenza

A (*A universal human influenza A vaccine. Fiers y col. Virus Research 103 (2004) 173–176*):

TAGCCTGCTGACCGAAGTTGAAACCCCTATCCGTAACGAATGGGGCTGTAGGTGTAACGATAGCAGCGATC

La secuencia de aminoácidos es: MSLLTEVETPIRNEWGCRCDSSD

Para la amplificación, se diseñaron *primers* con sitios de restricción específicos para facilitar su posterior clonado incorporando un sitio para la enzima *SmaI* en el *primer* sentido y un sitio para la enzima *PstI* en el *primer* antisentido. Las secuencias de los primers son:

Primer sentido: 5'-CCCGGGTAGCCTGCTGACCGAAGTTGAA-3'

Primer antisentido: 5'- CTGCAGATCGCTGCTATCGTTACACCT-3'

Para determinar la temperatura óptima de amplificación, se ensayó un rango de temperaturas de 55,3°C a 66,0°C. Como se observa en la Figura 3.36, en todas las temperaturas se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado (~83 pb) y no se detectaron amplificaciones inespecíficas, aún a la menor temperatura ensayada.

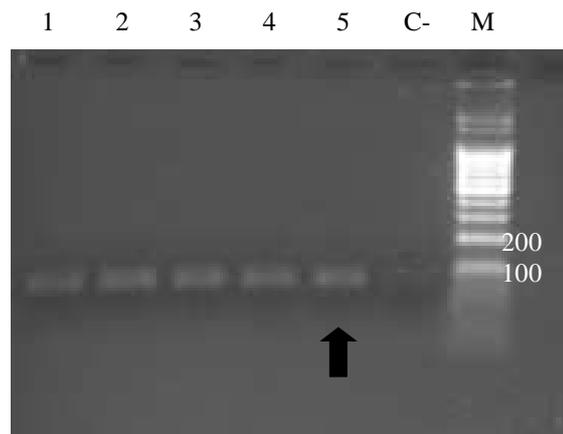


Figura 3.36. Amplificación por PCR de la secuencia del péptido M2e. Se muestran los resultados de un ensayo de PCR con gradiente de temperatura. Los productos fueron resueltos en un gel de poliacrilamida 2,5% teñido con bromuro de etidio. Se indica con una flecha el producto utilizado para el paso de sub-clonado. **Calles 1 a 5:** productos de amplificación correspondientes a las siguientes temperaturas: 55,3°C, 57,5°C, 60,5°C, 63,2°C y 66,0°C respectivamente. **M:** Marcador, 100 pb (Productos Bio-Lógicos®), los números indican el tamaño en pares de bases. **C-:** control negativo de la reacción de PCR (reacción sin agregado de templado).

Como siguiente paso se subclonó el producto de amplificación del gen M2e en el vector pGEM®-T Easy (Promega). Para ello, se utilizó el producto obtenido a 66,0°C ya que fue la condición que, a mayor temperatura, permitió obtener una adecuada cantidad de producto amplificado para el paso de subclonado. La banda correspondiente se extrajo y purificó a partir de gel de poliacrilamida y se realizó el ensayo de ligación al vector pGEM®-T Easy.

3.9.1.2 Selección de los clones recombinantes que contienen M2e

A fin de seleccionar los clones de bacterias transformadas con el plásmido recombinante, los cultivos de *E. coli* se sembraron en placas LB-ampicilina XGal-IPTG. A partir de las colonias blancas obtenidas, se realizó una preparación de ADN plasmídico para realizar un *screening* por restricción que permitiera identificar los clones que contenían la secuencia del péptido M2e (en adelante denominado: pGEM-M2e).

Para ello, los clones fueron digeridos con la enzima restricción *NotI*, este sitio se encuentra en el plásmido pGEM-T río abajo y río arriba del sitio de clonado y no se encuentra en el inserto.

El producto de digestión fue analizado en gel de agarosa 2,5% teñido con bromuro de etidio. Como puede observarse en la figura 3.38, partir de este ensayo se identificaron 6 clones (números 1 a 6) que presentaron el patrón de restricción esperado, es decir, la liberación de un fragmento de 3008 pb, correspondiente al vector linealizado y uno de 115 pb correspondientes a la secuencia completa de M2e y una mínima porción del vector.

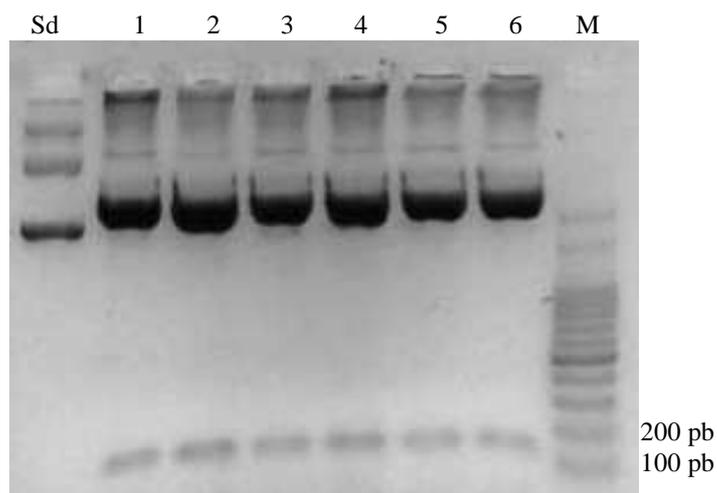


Figura 3.37. Análisis por restricción de los clones seleccionados. El ADN plasmídico obtenido a partir de las colonias blancas del primer *screening* fue digerido utilizando la enzima *NotI* (se indica con una flecha el fragmento de tamaño esperado). Los fragmentos de ADN fueron resueltos en un gel de agarosa 2,5 % teñido con bromuro de etidio. **Sd:** ADN plasmídico sin digerir (clon1); **Calles 1 a 6:** clones 1 a 6 digeridos. **M:** Marcador, 100 pb (Productos Bio-Lógicos®), los números indican el tamaño en pares de bases.

Para confirmar si estos fragmentos de ADN clonados correspondían a la secuencia de M2e los clones 1, 3 y 6 fueron secuenciados en forma completa y la secuencia correspondiente al inserto fue alineada con la secuencia publicada (Fiers y col., 2004).

Todos los clones presentaron la secuencia nucleotídica correcta. Se seleccionó el clon 3 para continuar trabajando.

3.9.1.3. Preparación del vector de transferencia *pVLSup1* para la ligación

De acuerdo a la estrategia propuesta, para lograr la fusión de M2e a la glicoproteína de superficie gp64 de Bv se utilizó el vector *pVLSup1* descrito oportunamente en el ítem 3.5.3.

Para realizar la reacción de ligación se procedió a digerir el vector de transferencia con la enzima *SmaI* y luego con la enzima *PstI*. Como primera medida se realizó una preparación de ADN plasmídico con un kit de Qiagen (columna tip 500). Luego de la digestión ON con la enzima *SmaI* se precipitó el ADN plasmídico con acetato de sodio para cambiar el buffer de la mezcla de reacción. A continuación se resuspendió el ADN en una mezcla que contenía el buffer recomendado por el fabricante y se procedió a digerir con la enzima *PstI*. Por último el vector digerido se purificó a partir de solución utilizando el kit de Qiaex (Qiagen Inc., Fig. 3.38).

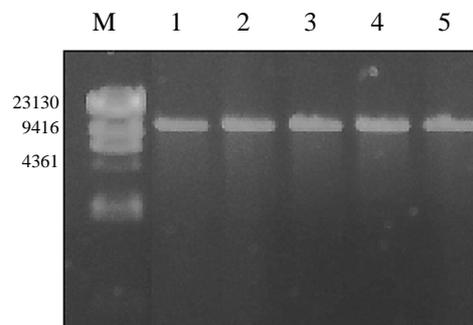


Figura 3.38. Purificación del vector de transferencia *pVLSUP1* por Qiaex. Se purificaron por Qiaex cinco digestiones del vector. Las muestras fueron resueltas en un gel 0,7% de agarosa teñido con bromuro de etidio. **M:** Marcador λ *HindIII* (Productos Bio-Lógicos®). Los números indican el tamaño en pares de bases. **Calles 1 a 5:** preparaciones 1 a 5 purificadas del vector digerido.

3.9.1.4. Inserción de M2e en el vector *pVLSup1*

Para el clonado de M2e en el vector *pVLSup1* se utilizaron los sitios de restricción *SmaI* y *PstI* incluidos en los oligonucleótidos usados en la amplificación del fragmento. De esta manera, el inserto

fue liberado de pGEM-T utilizando estas enzimas, y subclonado en el vector *pVLSup1* preparado previamente. La construcción final fue denominada pVLSup1-M2e.

Para el paso de subclonado se siguió la metodología descrita en los ítems anteriores.

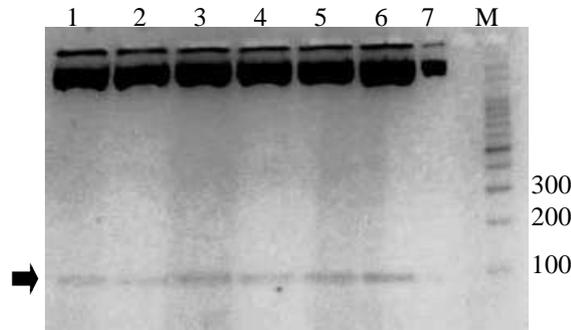


Figura 3.39. Digestión preparativa del plásmido pGEM-M2 para liberar el inserto M2e. Digestión de ADN plasmídico del clon 3 de pGEM-M2e con las enzimas *SmaI* y *PstI*. **M:** Marcador, 100 pb (Productos Bio-Lógicos®). Los números indican el tamaño en pares de bases. La flecha indica la posición en el gel de la banda del tamaño esperado.

Una vez purificado el inserto M2e, se realizó la reacción de ligación al vector de transferencia *pVLSup1*. Para esto se utilizó la preparación del vector digerido descrita anteriormente con las enzimas *SmaI* y *PstI*. Para la ligación se utilizaron las relaciones molares vector: inserto: 1:10; 1:50 y 1:100. A continuación el producto de ligación se utilizó para transformar células *E. coli* 10β competentes y se realizó un primer *screening* de los clones recombinantes en placas de LB + Ampicilina. A partir de las colonias se realizó la técnica de *colony*-PCR para realizar una preselección de los clones a digerir (dato no mostrado). Luego de esta preselección se preparó ADN plasmídico de cada clon positivo y se digirió con las enzimas *PstI* y *EcoRV* para corroborar presencia del inserto de interés. Al realizar esta digestión, si el inserto estaba presente en el vector se obtendrían dos fragmentos, de 10.916 pb y de 331 pb; en cambio si el vector estaba vacío, se obtendrían dos fragmentos, de 10.982 pb y de 265 pb.

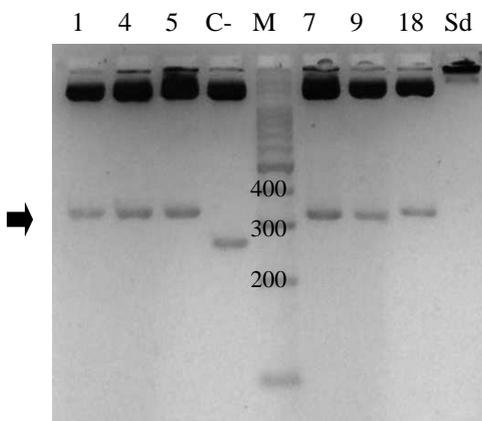


Figura 3.40. Digestión de los clones putativos pVLSup1-M2e con *PstI* y *EcoRV*. Los números se corresponden con la denominación de los clones positivos por *colony* PCR. **Sd:** clon 1 sin digerir. **C-:** vector pVLSup1 vacío digerido. **M:** Marcador, 100 pb (Productos Bio-Lógicos®). Los números indican el tamaño en pares de bases. La flecha indica la posición en el gel de la banda del tamaño esperado.

Como puede observarse en la Fig. 3.40 todos los clones testeados resultaron positivos. Para corroborar que la secuencia nucleotídica no se hubiera alterado en el paso de sub-clonado se enviaron a secuenciar. Las secuencias de todos los clones evidenciaron que el fragmento había sido insertado correctamente en el vector por lo que se seleccionó un clon al azar para continuar trabajando

Se seleccionó el clon pVLSup1-M2e N° 5 y a partir de este clon se realizó una midi-preparación de ADN plasmídico y posterior precipitación con PEG (13%) para continuar con la transfección como se detalla en las secciones subsiguientes.

3.9.2. Clonado del péptido M2e como fusión a la proteína lumasina sintasa de *Brucella spp* (BLS)

3.9.2.1. Construcción de quimeras y expresión en *Escherichia coli*

La secuencia aminoacídica citada previamente en 3.9.1.1 fue utilizada como monómero o en un tándem de cuatro copias sintetizadas químicamente para la construcción de las quimeras. Se clonaron los oligonucleótidos sintéticos (GenScript Corporation) en un vector pET11a que contiene el marco abierto de lectura para la proteína BLS. Las proteínas recombinantes rBLS, rBLS-M2e y rBLS-4M2e fueron expresadas en células competentes *E.coli* cepa BL21 (DE3) (Stratagene, La Jolla, CA) y purificadas con una columna Mono-Q seguida de una columna Superdex-200. La pureza de las preparaciones fue determinada por SDS-PAGE 12% y la identidad de las bandas fue analizada por *Western Blot* utilizando un anticuerpo monoclonal anti-BLS o suero de conejo anti-M2e (obtenido por inmunización de los conejos con el péptido M2e conjugado a ovoalbúmina). Las proteínas recombinantes fueron adsorbidas con Sepharosa-polymyxina para eliminar la contaminación con LPS. El contenido de endotoxinas en cada preparación fue valorado con el kit de análisis Limulus Amebocyte Lysate (Sigma, St Louis, Mo), resultando ser menor a 0,05 unidades por mg de proteína. Ver detalles en Alvarez y col., 2013.

3.9.2.2. Producción y purificación de BLS y quimeras recombinantes

Se utilizaron cultivos de 5 ml de bacterias previamente transformadas con el plásmido correspondiente, crecidos ON a 37 °C con agitación (250 rpm) en TB + ampicilina 100 µg/ml. Estos cultivos fueron diluidos 1:50 en el mismo medio y crecidos con agitación durante 3-4 hs a 37 °C hasta DO a 600 nm de 1-1.2. Una vez alcanzada esta DO, se agregó 0,5 mM de IPTG para iniciar la inducción. El cultivo se creció durante toda la noche a 37 °C, las células se cosecharon por centrifugación a 4°C y los *pellets* bacterianos se conservaron a -70 °C hasta su utilización.

Los *pellets* de bacterias se resuspendieron en buffer de lisis: 50 mM Tris-HCl pH 8 (Sigma), 5 mM EDTA, 1 mM fluoruro de fenilmetilsufonilo (PMSF). La muestra fue posteriormente sometida a sonicación (con 3 pulsos de 30 seg y pausas de 20 seg). La suspensión se dializó contra PBS durante

24hs y luego contra Tris-HCl pH 8.5 (Buffer A) durante 2hs. Luego de filtrarla por membranas de 0.45 μm , la muestra fue sometida a cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharosa HP de 5 ml, Amersham Pharmacia) conectada a una bomba peristáltica, previamente equilibrada en Buffer A. Una vez sembrada la muestra, la columna fue lavada con 10 volúmenes del mismo buffer y, luego eluída implementando un gradiente lineal de 0 a 1M de NaCl en 30 ml, formulado en buffer A. Se trabajó con un flujo de 3ml/min. Se tomaron fracciones de 1 ml y se analizó el perfil de elución por SDS-PAGE. El eluído en la proteína de interés fue purificado utilizando un tamiz molecular (Superdex-200, Amersham Biosciencias) equilibrada en buffer PBS, pH 7,0 y conectada a un equipo de HPLC. El grado de pureza de la preparación se determinó por un SDS-PAGE al 15% teñido con Coomassie-blue. La proteína purificada fue concentrada utilizando un centriprep y se cuantificó mediante medición de absorbancia a 280 nm. La cuantificación fue confirmada utilizando el reactivo de Bradford (BIO-RAD) utilizando como estándar también BSA. Se fraccionó la proteína en tubos de 1,5 ml rotulados con la fecha de preparación y el número de tubo, los cuales se sumergieron en N_2 líquido hasta el congelamiento total y luego se almacenaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización.

3.9.2.3. Estudios de estabilidad de las proteínas rBLS quiméricas

Fueron realizados en el Instituto Leloir por el grupo del Dr. Fernando Goldbaum. Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron con un espectropolarímetro (JASCO J-810) utilizando una celda de cuarzo de 0,1 cm de longitud. Se incubaron BLS y las quimeras de BLS en 50 mM de fosfato de sodio, 1 mM DTT, pH 7.0 y se monitorearon en el UV lejano (260-200 nm). El correcto plegamiento de las proteínas fue monitoreado por el cambio en la elipticidad molar a 220 nm en función de la temperatura. La desnaturalización térmica se realizó con pequeños incrementos de las temperaturas con un sistema Peltier (JASCO). El rango de temperaturas escaneadas fue de 20 a 100 $^\circ\text{C}$ a una velocidad de 4 $^\circ\text{C}/\text{min}$. La elipticidad molar a 222 nm fue medida cada 0,2 $^\circ\text{C}$. El enfriamiento rápido o lento a 20 $^\circ\text{C}$ (de 100 $^\circ\text{C}$ a 20 $^\circ\text{C}$ a una velocidad de 18 $^\circ\text{C}/\text{min}$) no mostró la recuperación de la elipticidad demostrando lo irreversible del proceso de desnaturalización térmica. Por lo tanto, la temperatura media de transición térmica se consideró como una T_m aparente. El PM de las proteínas fue determinado con un detector de dispersión de luz PD2010 conectado en tándem a un sistema de cromatografía de alta performance incluyendo un detector UV Waters 486 y un refractómetro diferencial LKB 2142. Cada proteína (BLS-4M2e, BLS-M2e y BLS) fue sembrada en una columna Superdex 200 (GE Healthcare Bio-Sciences) y eluída en buffer fosfatos conteniendo 0,15M de NaCl. La elución fue monitoreada por dispersión de luz estática a 90 $^\circ\text{C}$, absorción UV a 280 nm e índice refractivo (RI) y analizada con el software Discovery32 suministrado por los detectores de precisión. Se calculó el PM de cada proteína.

3.10. Células de insecto

3.10.1. Células de insecto utilizadas

Se utilizó la línea celular *Sf9* derivada del tejido ovárico de *Spodoptera frugiperda* (GIBCO). Las células de cultivaron a 27 °C en medio de cultivo SF900II (GIBCO) suplementado con 5 % suero fetal bovino (SFB) (GIBCO), Fungizona® (0,25 µg/ml) y los antibióticos penicilina (100 unidades/ml) y estreptomicina (100 µg/ml).

3.10.2. Recuento de células

Las células de insecto *Sf9* se cuantificaron realizando recuentos en cámara de Neubauer en microscopio óptico de campo claro. Se utilizó el colorante vital Tripan Blue (GIBCO).

3.10.3 Cultivo de células en monocapa o suspensión

Los cultivos de células *Sf9* en monocapa fueron crecidos en botellas de cultivo de 25, 75 o 175 cm² (CellStar, Greiner bio-one) aproximadamente 100 % de confluencia (aprox. 3 días) en estufa a 27 °C en medio de cultivo SF900II. Los repiques se realizaron aprox. cada 3 días en una dilución al cuarto por desprendimiento golpeando suavemente la botella.

Los cultivos de células *Sf9* en suspensión se llevaron a cabo en spinners de 250 ml (Wheaton) en medio SF900II suplementado. Los mismos eran mantenidos en estufa a 27 °C con una agitación de entre 60 – 80 rpm. Cuando los cultivos alcanzaban una densidad de 2x10⁶ células/ml, se realizaba una dilución del medio hasta obtener una densidad de aprox. 5x10⁵ células/ml. Finalmente, se suplementó el medio de cultivo como se explicó en el ítem 3.10.1.

3.10.4. Titulación por placas de lisis en células *Sf9*

Se utilizaron células en monocapa en placas individuales de 60 mm (9x10⁵ células por placa en un volumen final de 4 ml: 20 - 30 % de confluencia). Luego de lavar cada placa con PBS o medio base, se infectaron con diluciones de la semilla de trabajo (10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷) por duplicado y se incubaron durante 2 hs a 27 °C con agitación suave, siempre protegidas de la luz. Posteriormente, se retiró el SN de cada placa y se agregaron muy suavemente 4 ml de una solución de agarosa (Seakem) 0,5 % en medio suplementado a aproximadamente 42 °C de temperatura para realizar el overlay. Se dejó en reposo a temperatura ambiente y luego se incubó a 27 °C. Al 5º día, se realizó el revelado utilizando una solución de agarosa 0,5 % realizada en medio suplementado con rojo neutro como colorante (concentración final: 50 µg/ml). Se agregaron 2 ml de esta mezcla a cada pocillo formando así una segunda capa de agarosa que permite la difusión del colorante sin perturbar la monocapa celular ni las placas virales. Por último, las placas se incubaron a 27 °C y al día siguiente se contaron las placas de lisis.

3.11. Obtención de sueros específicos. Protocolos de inmunización

Los virus purificados de las cepas A/New Caledonia/20/99, A/Panamá/2007/99 y B/Yamanashi/166/98 ó la proteína rBLS y sus respectivas quimeras rBLS-M2e y rBLS-4M2e así como

también el péptido M2e conjugado a ovoalbúmina bovina fueron utilizados para inocular ratones y conejos.

Para la obtención de antisueros policlonales se siguieron los esquemas de inmunización descritos en Harlow y col. (1988) con 3 dosis sucesivas del inmunógeno previamente emulsionado en adyuvante de Freund (Sigma). Las dosis utilizadas en cada inoculación fueron de 200, 50 y 50 μg en el caso de los conejos y de 25, 10 y 10 μg en el caso de los ratones.

3.12. Análisis de sueros por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Se utilizaron placas de ELISA de 96 pocillos (Maxisorp, NUNC) las cuales se cubrieron con 100 μl de una solución 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del péptido sintético M2e o con 0,3 μg de la proteína rBLS (según se indica en cada caso) en buffer PBS o carbonato 50 mM pH 9.5 y se incubaron a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche.

En el caso de M2e, se utilizaron péptidos con la secuencia M2e descrita previamente preparados en el International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste, Italia (cortesía del Dr. Sergio Tisminetzky). Al día siguiente, después de realizar 3 lavados rápidos con PBS, las placas se bloquearon durante 1 h utilizando PBS-leche descremada 3% ó PBS-BSA 3% (solución de bloqueo) a temp ambiente. Seguidamente se realizaron otros 3 lavados rápidos con PBS y se agregaron diluciones seriadas de los sueros correspondientes en solución de bloqueo (100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$) incubando la placa durante 1 h a temp ambiente sin agitación. Luego de varios lavados rápidos con PBS, se agregó una dilución apropiada (1/2,000-1/5,000) del anticuerpo comercial [se utilizaron inmunoglobulinas preparadas en cabra anti-IgG de ratón (DAKO)] acoplado a peroxidasa y se incubó por 60 min a temp ambiente. Al término de esta incubación se realizaron nuevamente lavados con PBS y se procedió a su revelado. El sustrato usado fue 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico (ABTS; Sigma) suplementado con 1% (v/v) de H_2O_2 . La reacción colorimétrica se incubó por 30 min a temp ambiente y se midió la $\text{DO}_{405\text{nm}}$ en un espectrofotómetro de microplacas (BIO-RAD) tomando como valor de referencia la $\text{DO}_{650\text{nm}}$ de la misma muestra. En algunos casos se utilizó como sustrato 3,3'-5,5' tetrametil benzidina (TMB, Sigma) suplementado con 1% (v/v) de H_2O_2 y la reacción se determinó midiendo $\text{DO}_{655\text{nm}}$. Cada suero se ensayó por triplicado ó duplicado, según se indica, y como control negativo se ensayó la reactividad de sueros de animales *naïve* en la misma placa.

La titulación de los sueros por ELISA se realizó por determinación de la DO obtenida a diluciones seriadas de los mismos. Se tomó como título la máxima dilución capaz de rendir un valor mayor a la media aritmética + 3 desvíos estándar (SD) del obtenido para los sueros de animales *naïve* ensayados en paralelo.

3.13. Ensayos de *Western blot*

Las proteínas resueltas por SDS-PAGE fueron electrotransferidas a filtros de nitrocelulosa (Amersham) durante 1.5 h a 0,8 mA por cm² de membrana en una cuba de transferencia semi-seca (Hoeffer, Pharmacia). Los filtros se bloquearon durante 40 min con TBS-leche descremada 3% y se procesaron con anticuerpos específicos seguidos de anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (Harlow y col., 1988).

3.14. Inmunización de animales

Todos los experimentos en animales fueron realizados de acuerdo a las normativas de bienestar animal vigentes en la Institución.

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c de 60-90 días criados en el bioterio del laboratorio Pablo Cassará S.R.L. Los animales fueron mantenidos en condiciones de comida y agua *ad libitum*.

Para los ensayos de inmunogenicidad y protección, los ratones fueron inoculados por vía subcutánea (sc), intramuscular (im) o intraperitoneal (ip) según se indicará en cada caso.

Las muestras de sangre (20-40 µl) se obtuvieron a través de un corte en la punta de la cola de los ratones y fueron colectadas en capilares heparinizados para la posterior preparación de suero por centrifugación a 4,000 rpm durante 15 min. El sangrado total de los animales se realizó a través del plexo venoso retro-ocular. En este caso, la sangre se incubó durante 30 min a 37 °C para permitir la formación y retracción del coágulo y luego se centrifugó durante 30 min a 4,000 rpm para la obtención del suero.

3.14.1. Determinación de la Dosis Letal 50% (DL₅₀) en ratones

Para la determinación de la DL₅₀ se anestesiaron e inocularon grupos de 3 a 4 ratones machos BALB/c por vía intranasal con un virus de influenza de la cepa A/PR/8/34 adaptado a ratón. Se utilizaron 20 µl por animal con cada dilución de virus (puro, diluído 1/10 y diluído 1/100, título del virus: 2,94 x10⁷ DICT_{50%/ml}). Se registraron los pesos diariamente durante 10 días y se consideraron positivos ya sea a aquellos animales muertos como a los que presentaran una disminución del peso mayor al 25%, en cuyo caso se procedía al sacrificio. La DL₅₀ se calculó por el método de Reed&Muench arrojando un resultado de 3,75 x 10² DL₅₀/ml.

3.14.2. Ensayos de protección luego de la inmunización con Bv con display de M2e en membrana

Se inmunizaron grupos de 5 ratones con 200 µl de las siguientes preparaciones: rBv-gp64-M2e, rBV-gp64-M2e formulado con hidróxido de aluminio por vía sc, o rBV-gp64-M2e formulado en adyuvante de Freund por vía ip. Como controles se inmunizaron grupos de 3 ratones con las mismas

dosis y vías con las siguientes preparaciones: Bv-wt, Bv-wt formulado con hidróxido de aluminio, Bv-wt formulado en adyuvante de Freund ó BLS-M2e. Cada grupo recibió 3 dosis de cada preparación a intervalos de 21 días. A los 15 días de la tercera dosis, los animales fueron anestesiados con una combinación de xilacina (10 mg/kg) y ketamina (100 mg/kg) y desafiados por inoculación intranasal con 5 DL₅₀ del virus de influenza A/PR/8/34 adaptado a ratón.

3.14.3. Ensayos de protección luego de la inmunización con las quimeras BLS-M2e

Los ratones (5 animales por grupo) fueron inmunizados por vía subcutánea con 10 µg de BLS-4M2e, 10 µg de BLS-4M2e formulada con IMX® (ISCOMATRIX), 10 µg de BLS-4M2e formulada con hidróxido de aluminio o con PBS. Dos semanas después de la segunda dosis, los ratones fueron anestesiados como se explicó arriba y desafiados por inoculación intranasal de 15 µl de PBS conteniendo 5 DL₅₀ del virus de influenza A/PR/8/34. Se monitoreó el peso de los animales diariamente y los ratones que perdieron más del 25% de su peso inicial fueron sacrificados y marcados como muertos.

3.15. Producción de virus en huevos embrionados

Se utilizaron huevos de gallina embrionados de 9 a 12 días de gestación para ser inoculados con dilución 1/100 de los virus de referencia originales (procedencia: NIBSC, UK). Se utilizaron huevos fértiles SPF (libres de patógenos específicos) provenientes de Charles River (USA), se incubaron a 37°C en una incubadora (Marca Lyon Electric Company, Inc; USA) con 50-70% de humedad y volteo a 45°C cada 1 hora. Llegados los 9-12 días de gestación se inocularon 0,2 ml de la respectiva dilución viral en cavidad alantoidea con jeringa de tuberculina con aguja 21 G de 1'' (previo calado con punzón en cámara de aire). El sellado del orificio se realizó con esmalte de uñas. Los huevos inoculados se incubaron 48 hs más en las mismas condiciones descriptas para luego ser pasados a 4°C durante 18-24 hs para efectuar la cosecha. Para ello, se decaparon los huevos descontaminados con etanol al 70% con tijera, se retiraron las membranas alantoideas con pinza y se empujaron los sacos de las yemas con bajalenguas para aspirar los LCAs (líquidos corioalantoideos). Las producciones virales se clarificaron por centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

3.16. Análisis estadísticos

Las diferencias entre los resultados obtenidos en cada grupo experimental fueron sometidas al test *t* de Student (Forthofer y col., 1995). Los valores de *P* < 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos. En las curvas de Kaplan-Meier los valores de *P* fueron determinados usando el test log-rank (GraphPad Prism version 4.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA; www.graphpad.com). Los *P*-values < 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

A. EXPRESIÓN DE LA HEMAGLUTININA RECOMBINANTE DEL VIRUS DE INFLUENZA HUMANA EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE INSECTO

Objetivo A.1. Expresión en el sistema Bv/células de insecto del gen codificante para la HA completa (HA₀) del virus de influenza tipo A (subtipos A/H1, A/H3) y tipo B.

La hipótesis de trabajo es generar inmunógenos vacunales estacionales recombinantes utilizando como modelo las cepas recomendadas por la OMS para la campaña de vacunación para el hemisferio sur del año 2004: A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Panamá/2007/99 (H3N2) y B/Yamanashi/166/98 en el sistema Bv/células de insecto, tanto en cultivos celulares en monocapa como en suspensión. Esta estrategia, basada en el trabajo reportado por otros investigadores, contribuiría a la obtención de una vacuna trivalente basada en la HA viral (Wang y col., 2006).

4.1. Obtención de los baculovirus recombinantes (rBv) que expresan el gen HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 (rHA_{NC}).

4.1.1. Transfección de células de insecto Sf9.

El gen codificante de HA₀ de NC clonado en el vector de transferencia pVL1393-HA_{NC} (Baculogold, BD Bioscience, Item 3.2, Sección M y M) fue transfectado en células de insecto Sf9 junto al ADN genómico del AcNPV. Se incorporaron como controles negativos cultivo de células sin transfectar con y sin el reactivo Cellfectin® (Invitrogen™).

Si bien, en las células transfectadas no se observó efecto citopático (ecp), siguiendo las indicaciones del fabricante, se realizó al 5º día un 1º pasaje ciego utilizando 1/3 del sobrenadante (SN) de cada ensayo. En este caso, se detectó ecp a las 72 hs post-infección sólo en el cultivo que recibió el SN de células transfectadas con el plásmido pVL1393-HA_{NC} (Fig. 4.1, A y B). Como se observa en la figura, la monocapa celular presentó gran proporción de células en suspensión en relación a los cultivos control (Fig. 4.1, C y D), con las células más redondeadas y en ciertos casos, presentaban una forma ahusada.

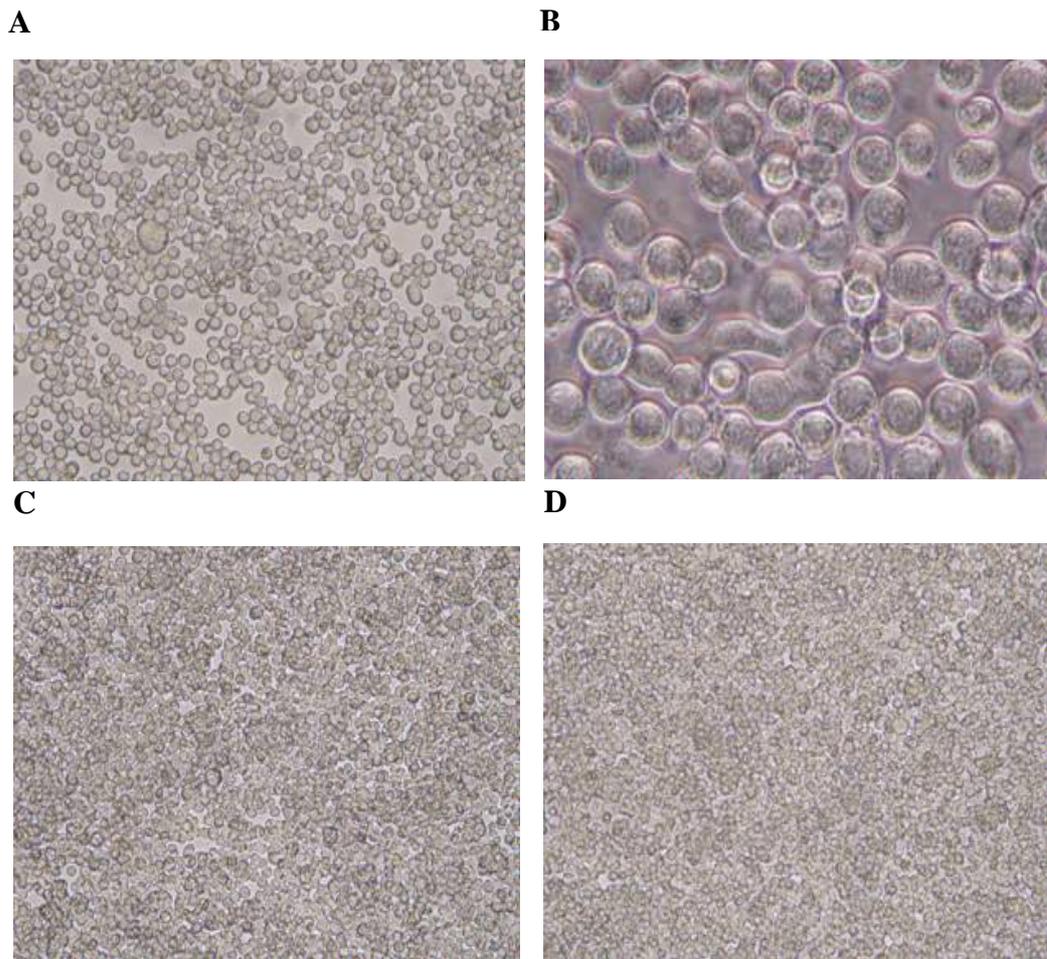


Figura 4.1. Transfección de células Sf9 con el vector pVL1393-HA_{NC}. Monocapas celulares observadas al microscopio óptico de campo claro a las 72 hs post-infección (1^º pasaje ciego). **A:** Cultivo de células Sf9 incubadas con el SN de cultivo de la transfección con el vector pVL1393-HA_{NC} (100X); **B:** *Idem* A (400X); **C:** Cultivo de células incubadas con el SN del cultivo sin transfectar (100X). **D:** Cultivo de células incubadas con el SN del cultivo sin transfectar + el reactivo de transfección Cellfectin[®] (100X).

4.1.2. Análisis de la expresión de rHA_{NC} en los cultivos de células transfectadas.

Se analizaron muestras de los cultivos obtenidos previamente en un ensayo de *Western blot* revelado con un suero policlonal de referencia, específico para HA de la cepa A/New Caledonia/20/99. Como se observa en la Figura 4.2, se detectó una banda de peso molecular (PM) aparente de 80 KDa y otra de aproximadamente 66 KDa a partir de las muestras derivadas del pasaje ciego de la transfección con pVL1393-HA_{NC}.

4.1.3 Enriquecimiento en rBv que expresan rHA_{NC} por la técnica de dilución y selección de los cultivos más productores de proteína recombinante.

Se realizó un nuevo pasaje de la transfección del vector pVL1393-HA_{NC} (dilución 1/1000) sobre una monocapa celular al 70% de confluencia en una placa de 12 pocillos. A los 5 días se realizó un segundo pasaje, observándose ecp a los 4 días post infección en el 50% de los pocillos infectados. Con el objetivo de comparar los niveles de producción de rHA_{NC}, se realizaron ensayos de WB a partir de muestras de *pellet* celular de los cultivos (Fig. 4.3).

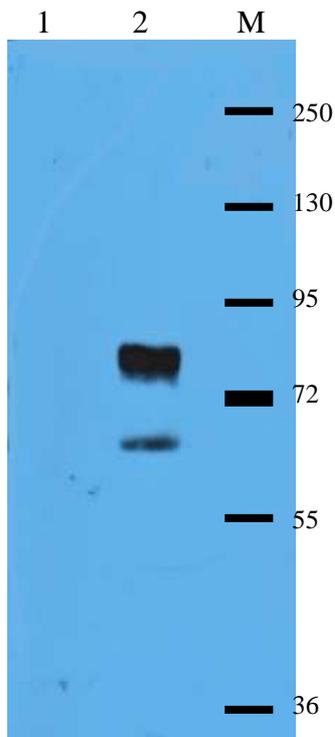


Figura 4.2. Análisis de la expresión de rHANc en los cultivos obtenidos a partir de la transfección. Se muestra un ensayo de *Western blot* utilizando un suero policlonal generado contra HA del virus homólogo inactivado (dilución 1/2000). Relevado con sustrato quimioluminiscente de la enzima peroxidasa (SuperSignal®, Pierce). **1.** Pellet proveniente de células incubadas con SN de cultivo sin transfectar ($\approx 3 \times 10^5$ céls). **2.** Pellet proveniente de células incubadas con SN de cultivo de rBv ($\approx 3 \times 10^5$ céls) **M:** marcador de PM (Fermentas), se indica la posición en kDa. Gel de poliacrilamida 8%.

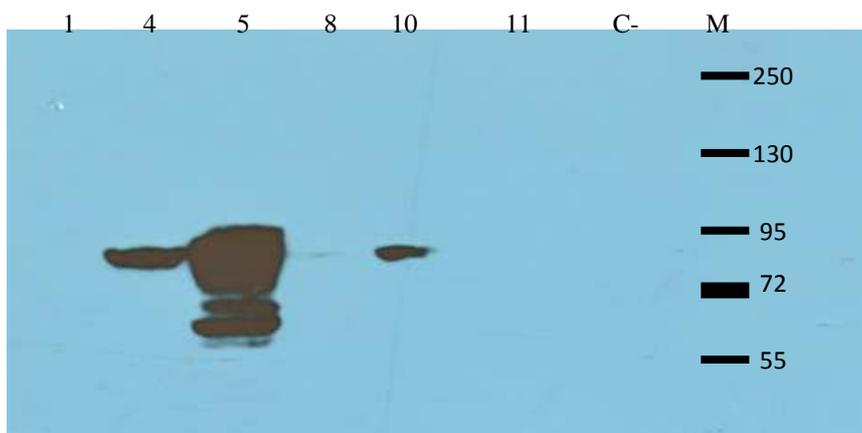


Figura 4.3. Análisis por *Western blot* de los niveles de expresión de rHANc en los cultivos inoculados con rBv. Una alicuota de *pellet* celular ($\approx 1,5 \times 10^5$ células) de los pocillos con mayor ecp fue sembrada en las calles que se indican con el número asignado a cada cultivo. **C-: Control negativo:** *pellet* celular de cultivos no infectados ($\approx 1,5 \times 10^5$ células); **M:** marcador de PM (Fermentas), se indica la posición de cada marcador en kDa. Para la detección de la proteína recombinante se utilizó un antisuero policlonal generado contra HA del virus homólogo (dilución 1/2000). Revelado con sustrato quimioluminiscente de la enzima peroxidasa. Gel de poliacrilamida 8%.

Como puede observarse en la Figura 4.3, de acuerdo a la señal obtenida, los pocillos infectados presentaron diferencias significativas en los niveles de expresión de rHA_{NC}. A partir de este ensayo, se eligió el cultivo nº 5 (en adelante denominado: clon 5) como el mejor productor de la proteína recombinante y fue el utilizado en los ensayos subsiguientes. Estos resultados indican la importancia del paso de enriquecimiento cuando se utiliza este sistema Bv/células de insecto (*BaculoGold*) para la expresión de proteínas heterólogas.

4.1.4. Obtención de una semilla de trabajo a partir del clon seleccionado.

A fin de estandarizar la herramienta de trabajo para futuros ensayos, se generó una semilla de trabajo a partir del clon 5 de rBv. Para ello, se infectó una monocapa de células Sf9 al 70% de confluencia con una dilución 1/50 del SN de cultivo. En este caso se detectó ecp a los 4 días post-infección y se cosecharon tanto las células como el SN de cultivo (35 ml).

Luego, se analizó la expresión de la proteína recombinante a partir de muestras de pellet de la semilla obtenida (Fig. 4.4). El sobrenadante fue clarificado por centrifugación a 3000 rpm para eliminar restos celulares.

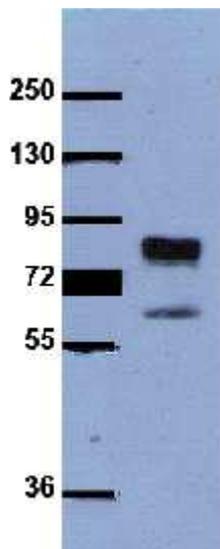


Figura 4.4. Semilla de trabajo del clon 5 de rBv. Análisis de la expresión de rHA_{NC}. Se analizó por *Western blot* la expresión de la proteína recombinante a partir de muestras de *pellet* celular ($\approx 2,5 \times 10^5$ células). **M**: marcador de PM (Fermentas); se indica la posición en kDa. Para la detección de la proteína recombinante se utilizó un antisuero policlonal generado contra HA del virus homólogo inactivado (dilución 1/2000). Gel de poliacrilamida 8%.

La semilla de trabajo fue titulada por placas de lisis, determinándose un título de $1,65 \times 10^8$ UFP/ml (Fig. 4.5).

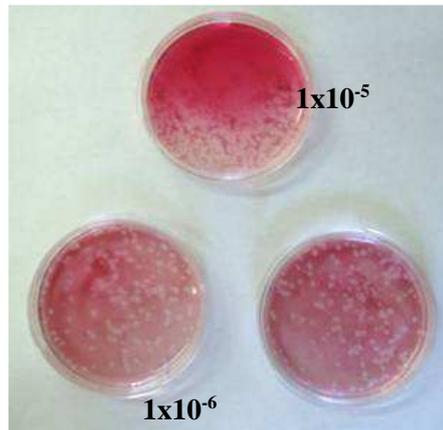


Figura 4.5. Titulación de la semilla de trabajo por placas de lisis. Se sembraron 9×10^5 células por placa. Los números indican la dilución de la semilla de trabajo que se utilizó para infectar la monocapa celular.

4.1.5. Producción de rHA_{NC} en cultivos en monocapa.

Se produjeron varios lotes de rHA_{NC} a fin de poner a punto la purificación de la proteína recombinante, usualmente en lotes de 8 botellas de cultivo de 175 cm^2 infectadas a una multiplicidad de 1 UFP/célula cuando la monocapa se hallaba en un 70% de confluencia. Se dejó avanzar el ecp hasta aproximadamente un 80-90% para decidir la cosecha ya que el gen clonado se hallaba bajo el control del promotor de la polihedrina que es tardío. Se cosecharon las células infectadas por centrifugación a 2000 rpm, y se congelaron hasta su procesamiento.

4.2 .Obtención de los rBv que expresan el gen HA de la cepa A/Panamá/2007/99 (rHA_P)

4.2.1. Transfección de células de insecto Sf9.

El cADN del gen codificante de la proteína HA_P clonado el vector pFastBac1- HA_P (sistema *Bac-to-Bac*), Invitrogen fue transfectado en células de insecto Sf9 junto al ADN genómico del AcNPV. Se incorporaron como controles negativos cultivo de células sin transfectar con y sin el reactivo Cellfectin® (Invitrogen™). En ninguno de los tres cultivos se observó ecp post-transfección al cabo de cinco días de incubación. Con el SN cosechado, se realizaron dos pasajes consecutivos en botellas de cultivo de 25 cm^2 con una densidad celular aproximada del 70%. Al término del quinto día del segundo pasaje se observó ecp (Figura 4.6) y se cosecharon tanto el SN como el *pellet* de células de todos los tratamientos ensayados.

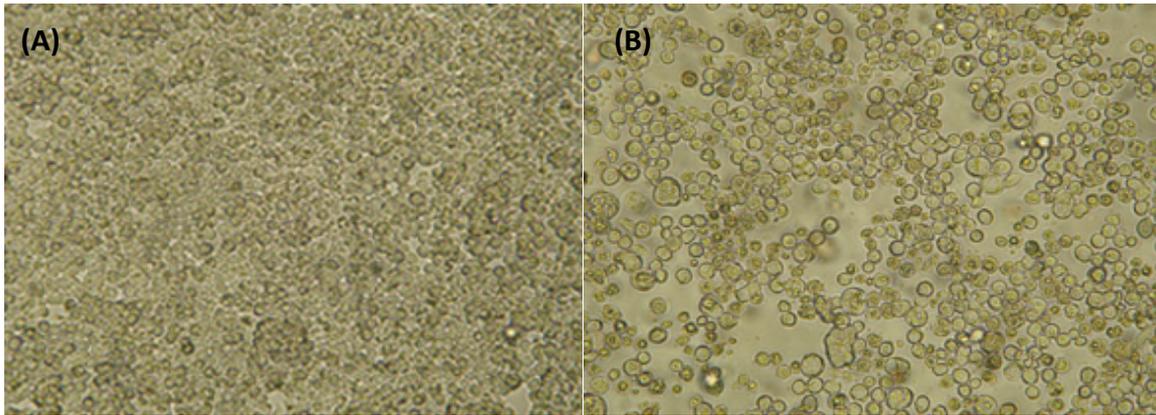


Figura 4.6 Cultivos de células *Sf9* a los 5 días post-infección con el segundo pasaje a partir del sobrenadante de transfección (100X). **A.** Cultivo control (sin inocular). **B.** Cultivo infectado con 100 µl del SN del primer pasaje a partir de la transfección con el báculo pFastBac1-HA_P (#6).

4.2.2. Análisis de la expresión de rHA_P en los cultivos de células transfectadas

Las muestras de células infectadas obtenidas a partir del segundo pasaje se analizaron por WB, utilizando dos sueros distintos para el revelado: un suero de conejo hiperinmune anti- virus total A/Panamá/2007/99 preparado en el laboratorio y un suero referencia anti -HA_P (*Reference sheep antiserum S-7558 L1*, Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Rockville, MD). Al igual que para la rHA_{NC} se detectaron dos bandas de PM aparente de 80 KDa y otra de aproximadamente 66 KDa (Fig. 4.7).

4.2.3. Obtención de una semilla de trabajo a partir del clon seleccionado.

Una vez corroborada la expresión de la HA_P por parte de los rBv, se procedió a realizar la semilla de trabajo; en este caso por haber utilizado el sistema Bac-to-bac no hizo falta hacer el paso de enriquecimiento. Con el sobrenadante del segundo pasaje se infectó una botella de cultivo de 175 cm² cuyo sobrenadante fue cosechado a los 3 días post-infección y titulado como se describió previamente (resultado: 6 x 10⁶ UFP/ml).

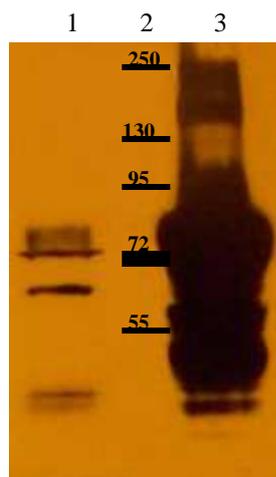


Figura 4.7. Análisis por Western Blot de las células infectadas obtenidas a partir del segundo pasaje post-transfección. 1. *Pellet* de células infectadas revelado con suero de conejo anti virus A/Panamá/2007/99 y conjugado anti-conejo. 2. Marcador de PM (Fermentas). 3. *Pellet* de células infectadas revelado con suero de referencia anti HA de la cepa A/Panamá/2007/99. Membrana proveniente de gel de poliacrilamida al 8%.

4.2.4. Producción de rHA_P en cultivos en monocapa.

Se realizaron tres producciones de HA_P en botellas de cultivo de 175 cm². Se infectaron los cultivos a una multiplicidad de 1 UFP/célula. A los 4 días post-infección se cosecharon tanto las células infectadas como el SN de cultivo, y se guardaron para su posterior evaluación y/o purificación de la proteína recombinante.

4.2.5. Producción de rHA_P en cultivos en suspensión.

Además de las producciones en monocapa, se realizó una producción de HA_P en células suspensión. Para ello se utilizó un frasco *spinner* de 250 ml en donde se infectaron 110 ml de suspensión celular con una multiplicidad de 1,4 UFP/célula. Para poder determinar el momento de óptimo de cosecha se siguió la progresión de la expresión de la HA utilizando la técnica de hemadsorción. Para ello, se tomaron muestras de 0,5 ml del cultivo celular en *spinner* a distintos tiempos post-infección y se incubaron con 0,1 ml de una suspensión de glóbulos rojos de pollo (GR_P) al 5% a temperatura ambiente en agitación suave (60-70 rpm) durante 10 minutos. A continuación, se realizó un recuento de células positivas en cámara de Neubauer. Se consideraron positivas aquellas células que presentaban por lo menos tres GR_P adheridos a su membrana (Fig. 4.8). Los resultados se expresaron como porcentajes de células positivas respecto del total de células presentes. A las 72 hs post-infección se observó un 8% de células positivas, que ascendió a 16,5% a las 96 hs y que luego disminuyó a un 3,6% a las 120 hs. Se cosecharon 40 ml de suspensión celular a las 96 hs y el resto de cultivo se cosechó a las 120 hs.

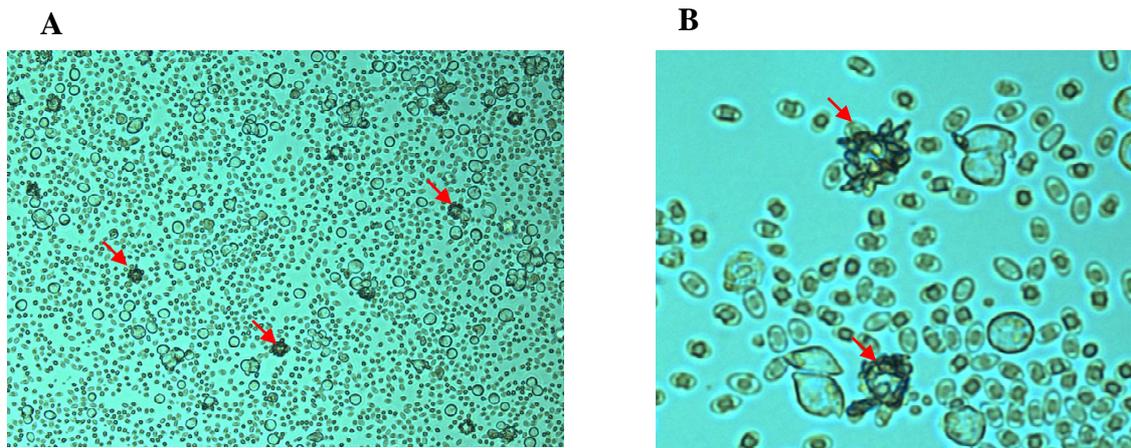


Figura 4.8 .Ensayo de hemadsorción. Se muestran fotografías tomadas de la observación en cámara de Neubauer al microscopio óptico. Se marcan algunas células positivas con una flecha. **A.** Observación con aumento 10X. **B.** Observación con aumento 40X.

4.3. Obtención de los baculovirus recombinantes que expresan el gen HA de la cepa B/Yamanashi (rHA_{BY})

4.3.1. Transfección de células de insecto Sf9

Se co-transfectaron células de insecto Sf9 con el ADN genómico de AcNPV y el vector de transferencia pVL1393- HA_{BY} . Se procedió como se detalló en 4.1.1 para rHA_{NC} (realizando un pasaje a partir del sobrenadante de transfección, al término del cual se observó ecp).

4.3.2. Análisis de la expresión de rHA_{BY} en los cultivos de células transfectadas.

A partir del *pellet* celular obtenido en 4.3.1 se realizó un ensayo de WB, utilizando un suero de oveja hiperinmune específico para la HA de la cepa B/Yamanashi/166/98 (NIBSC, 00/442) y conjugado de conejo anti-oveja (Dako, P0163) (Fig. 4.9).

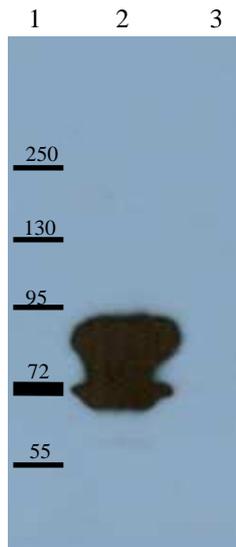


Figura 4.9 .Análisis por Western blot de las células infectadas con rBv expresando rHA_{B/γ}. **1.** Marcador de PM (Fermentas), se indica el PM en kDa. **2.** *Pellet* de células infectadas con rBv que expresa HA_{B/γ} ($\approx 2 \times 10^5$ células). **3.** *Pellet* de células infectadas con Bv wild type ($\approx 2 \times 10^5$ células). Membrana proveniente de gel de poliacrilamida al 8%.

4.3.3. Enriquecimiento en rBv que expresan rHA_{B/γ} por la técnica de dilución y selección de los cultivos más productores de proteína recombinante.

Como se explicó en la Sección 4.1.3 para rHAN_C, se realizó un enriquecimiento de los cultivos que expresaron mayores niveles de rHA_{B/γ}, por la técnica de dilución. El análisis de los niveles de expresión de los distintos cultivos se muestra en la Fig. 4.10 en donde se sembraron aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células por calle.

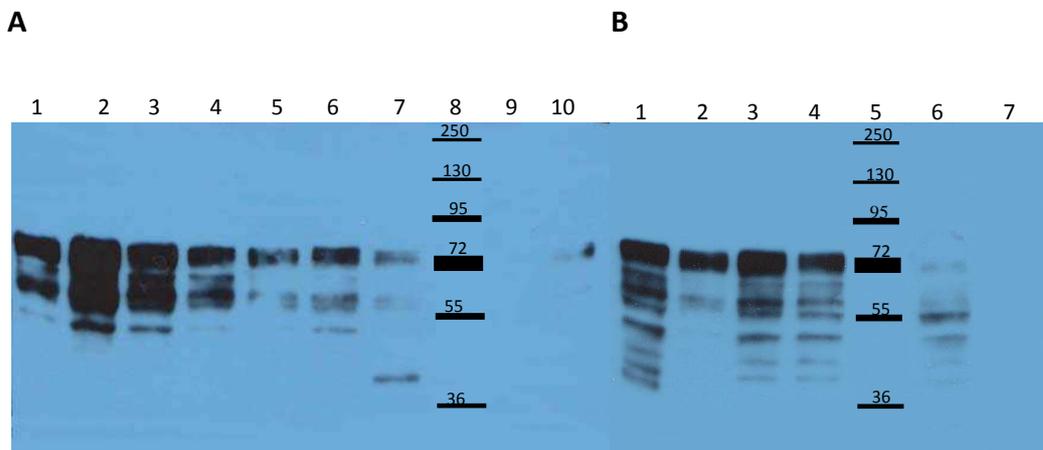


Figura 4.10. Análisis por Western blot de los niveles de expresión de rHA_{B/γ} en los cultivos infectados con rBv. Se analizaron muestras de *pellet* celular obtenidas a partir de los 11 pocillos infectados con rBv. **A. Calles 1 a 7.** Número de los cultivos enriquecidos ensayados, **Calle 8.** Marcador de peso molecular (Fermentas). **Calle 9.** Control negativo (*pellet* de células sin infectar). **Calle 10.** Control positivo (1er pasaje) **B. Calles 1 a 4.** Cultivos enriquecidos ensayados n° 8 a 11. **Calle 5.** Marcadores de PM (Fermentas) **Calle 6.** Control positivo (3er pasaje) **Calle 7.** Control negativo (*pellet* de células sin infectar).

4.3.4. Obtención de una semilla de trabajo a partir del cultivo seleccionado

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo anterior se seleccionó el cultivo n° 2 que fue el que expresó mayores niveles de la proteína recombinante (Fig 4.14). A partir de este cultivo se realizó la semilla de trabajo, como se detalló previamente para el cultivo expresando HA_{NC}. La semilla fue titulada por unidades formadoras de placas, obteniéndose un título de $4,3 \times 10^7$ UFP/ml.

4.4. Ensayos de purificación de las rHA

4.4.1. Purificación de rHA_{NC}

El pellet celular infectado fue resuspendido en buffer de lisis A incrementando la concentración del detergente no iónico tergitol al 1%. La muestra se mantuvo en agitación durante 40 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm y el sobrenadante se filtró con el objetivo de ser aplicado en dos columnas colocadas en tándem: una Hitrap Q HP y una Hitrap SP XL (GE Healthcare) en un HPLC (ÄKTA) para su purificación (se siguió el protocolo descrito según Wang y col. 2006).

Sin embargo, el análisis por WB de las muestras a ser inyectadas en la columna, mostró que luego de la centrifugación y el filtrado la proteína no estaba presente (Fig. 4.11).

Estos resultados estarían indicando que una alta proporción de la rHA queda retenida en las membranas de las células de insecto infectadas. A raíz de esta experiencia y otras sucesivas en las que se observaba poca o casi nula liberación de la proteína de las membranas, se decidió realizar un ensayo en donde se testearon distintas condiciones que facilitarían la solubilización de la rHA_{NC} a partir de membranas.

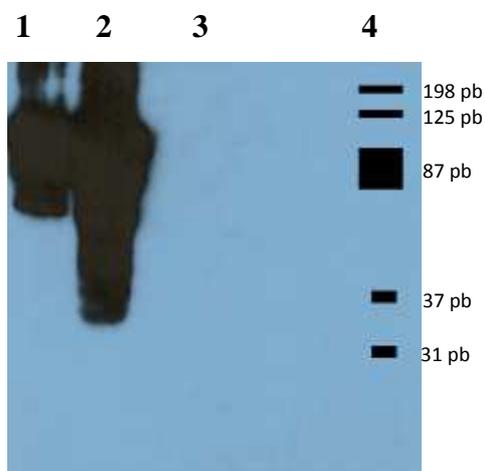


Fig. 4.11. Ensayo de WB previo a la purificación por intercambio iónico. Calle 1. Lisado celular total. **Calle 2.** *Pellet* celular luego de la centrifugación. **Calle 3.** Sobrenadante. **4.** Marcador de PM (Kaleidoscope, BIO-RAD).

4.4.2. Evaluación de la utilización de distintos buffers de lisis para liberar rH_ANC a partir de las membranas celulares.

Se tomaron muestras de pellet de células infectadas en las condiciones detalladas en el Item 4.1.5 y se procesaron 35 mg de muestra de pellet por cada 1 ml de buffer a los que se les agregó TLCK y PMSF como inhibidores de proteasas. Los buffers derivados del buffer A evaluado previamente y las condiciones de lisis se seleccionaron de acuerdo a la bibliografía de referencia consultada:

1. Buffer A + tergitol al 1%, en agitación suave durante 20 minutos.
2. Buffer A + tergitol al 1% , sometido a sonicación (3 ciclos de 30 segundos)
3. Buffer A, sometido a sonicación (3 ciclos de 30 segundos)
4. Buffer de lisis recomendado en Manual *BaculoGold* (10 mM Tris, 130 mM NaCl, 1% tritón X-100, 10 mM NaF, 10 mM NaPi, 10 mM NaPPi), sometido a sonicación (3 ciclos de 30 segundos).

Luego del tratamiento, todas las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se analizaron tanto muestras de *pellet* como de sobrenadante de cada caso.

Como puede observarse en la Fig 4.12, el único tratamiento que posibilitó la solubilización de la proteína recombinante fue el tratamiento # 4, donde se separa la banda de mayor PM en el SN.

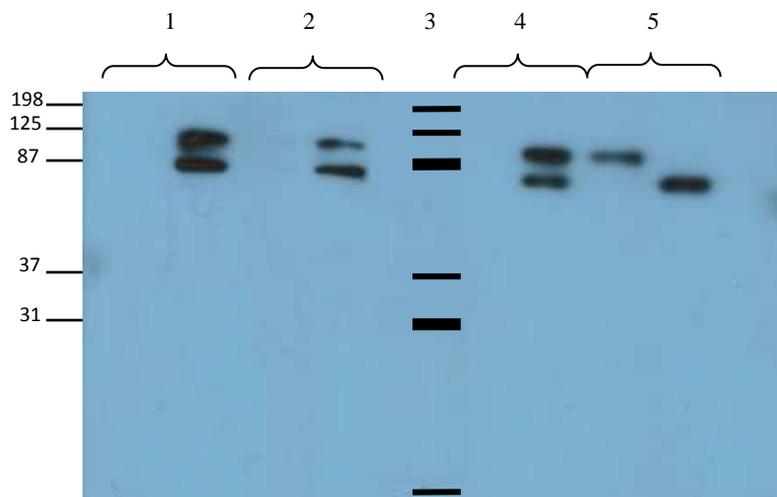


Fig. 4.12. Análisis por WB de las muestras de pellets y SNs obtenidas luego de los distintos tratamientos. 1. Tratamiento #3; **2.** Tratamiento #2; **3.** Marcador de PM (Kaleidoscope, Bio-Rad); **4.** Tratamiento # 1; **5.** Tratamiento # 4. En cada par de calles, la primera corresponde al SN y la segunda al pellet correspondiente. En cada caso se sembró el equivalente a 175 µg de muestra. A la izquierda de la figura aparecen los tamaños del marcador en pb.

4.4.3. Evaluación de la purificación de rHA_{NC} por columnas de afinidad

La preparación con el procedimiento #4 se intentó purificar en una columna de afinidad utilizando IgGs purificadas a partir de un suero específico preparado contra la HA de referencia de la cepa A/New Caledonia. La muestra se dializó contra buffer de fosfato pH 7 y se incubó con la columna de afinidad preparada en *batch* a 4°C ON. Posteriormente se empaquetó la resina en columna y se realizaron lavados con buffer fosfato pH 7. Finalmente la muestra se eluyó con buffer carbonato/bicarbonato pH 11 recolectando las alícuotas en solución de Hepes 1M para neutralizar rápidamente el pH alcalino. El procedimiento se monitoreó realizando determinación de proteínas por el método de Bradford y por ELISA para cada fracción recolectada.

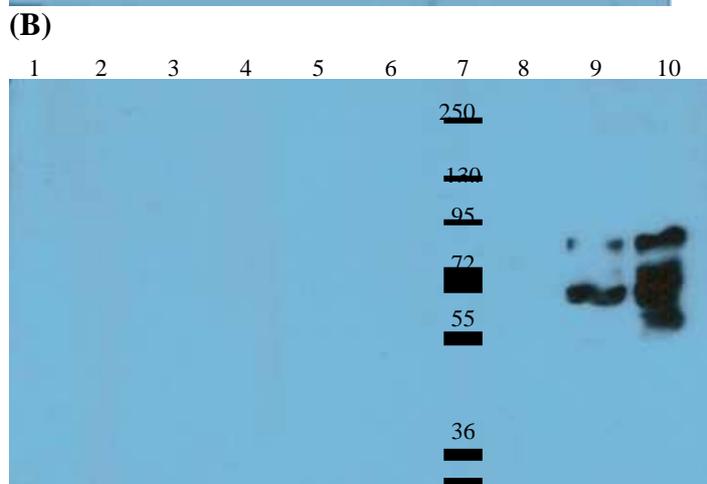
Como puede verse en el gráfico (Fig 4.13), se obtuvo un pico de señal por ELISA entre las fracciones 53 a 58. Estas fracciones se recolectaron y juntaron formando un *pool* que posteriormente se concentró 4 veces por diálisis. Las fracciones se analizaron por WB (Fig 4.14 A y B).



Figura 4.13 Monitoreo por Bradford y ELISA de proteínas en cada fracción recolectada

**Fig. 4.14 A .Calles**

1. Control positivo rHA_{NC} producida en Bv
2. Muestra original (previo a la lisis)
3. Muestra precolumna
4. Marcador de PM
5. Fracción 54 previa concentración
6. Concentrado 4X (tubos 53 a 58)
7. Lavado de la membrana de diálisis

**Fig 4.14.B. Calles**

1. a 3. Fracciones 1 a 3 correspondientes al lavado de la columna y a un pico de proteínas medido por Bradford
4. a 6. Fracciones 15 a 17 correspondientes a lavado de la columna y coincidentes con pico por ELISA
7. Marcador de peso molecular (Fermentas)
8. Lavado de la columna con buffer fosfato.
9. Percolado
10. Precolumna

Figura 4.14 (A) y (B). Análisis por WB de las muestras obtenidas del ensayo de purificación de HA_{NC} por afinidad

En este experimento, la proteína HA_{NC} estaba presente en la muestra pre-columna, no se pudo detectar la misma en ninguna de las fracciones recolectadas de la columna, y se detectó parte en el percolado. Aparentemente la proteína no fue retenida apropiadamente o por su escasa cantidad se perdió en el proceso de elución.

4.4.4. Ensayos de purificación de la proteína recombinante rHA_P por columnas de Níquel

La proteína rHA_P tiene incorporada 6 Histidinas por lo que se procedió a realizar ensayos de purificación por cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC). Para ello se disolvieron 0,87 g de pellet en 10 ml de Buffer A en presencia de tergitol NP-9 al 1% y se sometió a agitación suave durante 40 minutos a 4°C. A continuación se centrifugó la preparación a 10.000 rpm durante 25 minutos y se recolectó el SN.

Seguidamente el SN fue sometido a diálisis contra buffer Tris 20 mM pH 7.98 y luego fue sembrado en una columna Hitrap Chelating HP (GE, Healthcare Life Sciences) equilibrada en el mismo buffer más NiSO₄ y conectada a un equipo de HPLC ÄKTA purifier (GE, Healthcare Life Sciences). Los lavados se realizaron con buffer Tris 20 mM pH 7.98 con Imidazol 25 mM y la elución se realizó con buffer Tris 20 mM pH 7.98 con Imidazol 100 mM. Se recolectaron fracciones de 1 ml para ser analizadas por Western Blot. Al igual que en el caso de rHA_{NC}, no se pudo detectar proteína rHA_P purificada. Este ensayo fue repetido varias veces con igual resultado. La Fig. 4.15 muestra el WB realizado con las muestras pre y post purificación.

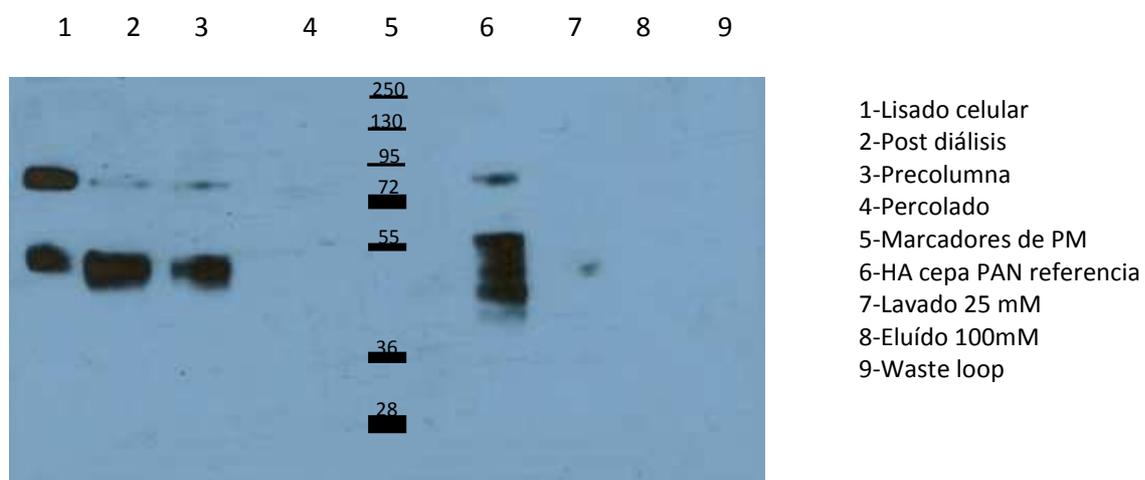


Figura 4. 15. Análisis de muestras de las etapas de purificación de rHA_P por WB. Gel de poliacrilamida al 10%.

Los distintos ensayos de purificación de las proteínas rHA no dieron resultados positivos, muy probablemente porque el material de partida no contenía suficiente cantidad de proteína, lo que es consistente con el hecho de que ninguna de las tres HA fueran detectadas en geles teñidos con *Coomasie blue* (datos no mostrados).

Objetivo A.2: Expresión de la HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1) sin el dominio trans-membrana y reemplazando la secuencia señal propia del gen HA por la de la proteína gp64 de Bv (r Δ HA_{gp}).

Como se explicó en las secciones anteriores, la proteína rHA producida en Bv no es liberada al sobrenadante de cultivo y además, una considerable proporción queda retenida en asociación con las membranas celulares a pesar de los distintos tratamientos ensayados. Esto dificultó enormemente su extracción y purificación a partir de extractos celulares. Por esta razón se decidió evaluar una nueva estrategia.

La hipótesis de trabajo es que se podrían mejorar los rendimientos de proteína recombinante, en especial en el sobrenadante de cultivo, eliminando la región trans-membrana del gen y reemplazando la señal de secreción de la HA viral por la señal de secreción de la glicoproteína mayoritaria de superficie de Bv, la gp64. Se utilizó como modelo la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1).

4.5. Obtención de los rBv recombinantes que expresan la HA sin dominio transmembrana y con secuencia señal de gp64 de Bv (r Δ HA_{gp})

4.5.1. Transfección de células de insecto Sf9

A fin de obtener los rBv que expresen la proteína r Δ HA_{gp} de influenza se utilizó el sistema *Baculogold* (BD Bioscience). El ADN del vector: pVLSup1- Δ HA_{gp} (MyM, *Item* 3.5.4) y el ADN genómico de AcNPV se co-transfectaron en células Sf9. Se procedió como se detalló en 4.1.1 para rHA_{NC} realizando un pasaje a partir del sobrenadante de transfección, al término del cual se observó ecp.

En la figura 4.15 se pueden apreciar las diferencias observadas entre los cultivos controles y los que recibieron el SN de la transfección.

Como se explicó anteriormente, se cosechó tanto el *pellet* celular como el SN de cultivo de este 1° pasaje ciego a las 48 hs post-infección del cultivo transfectado con el vector pVLSup1- Δ HA_{gp} para analizar la producción de proteína recombinante.

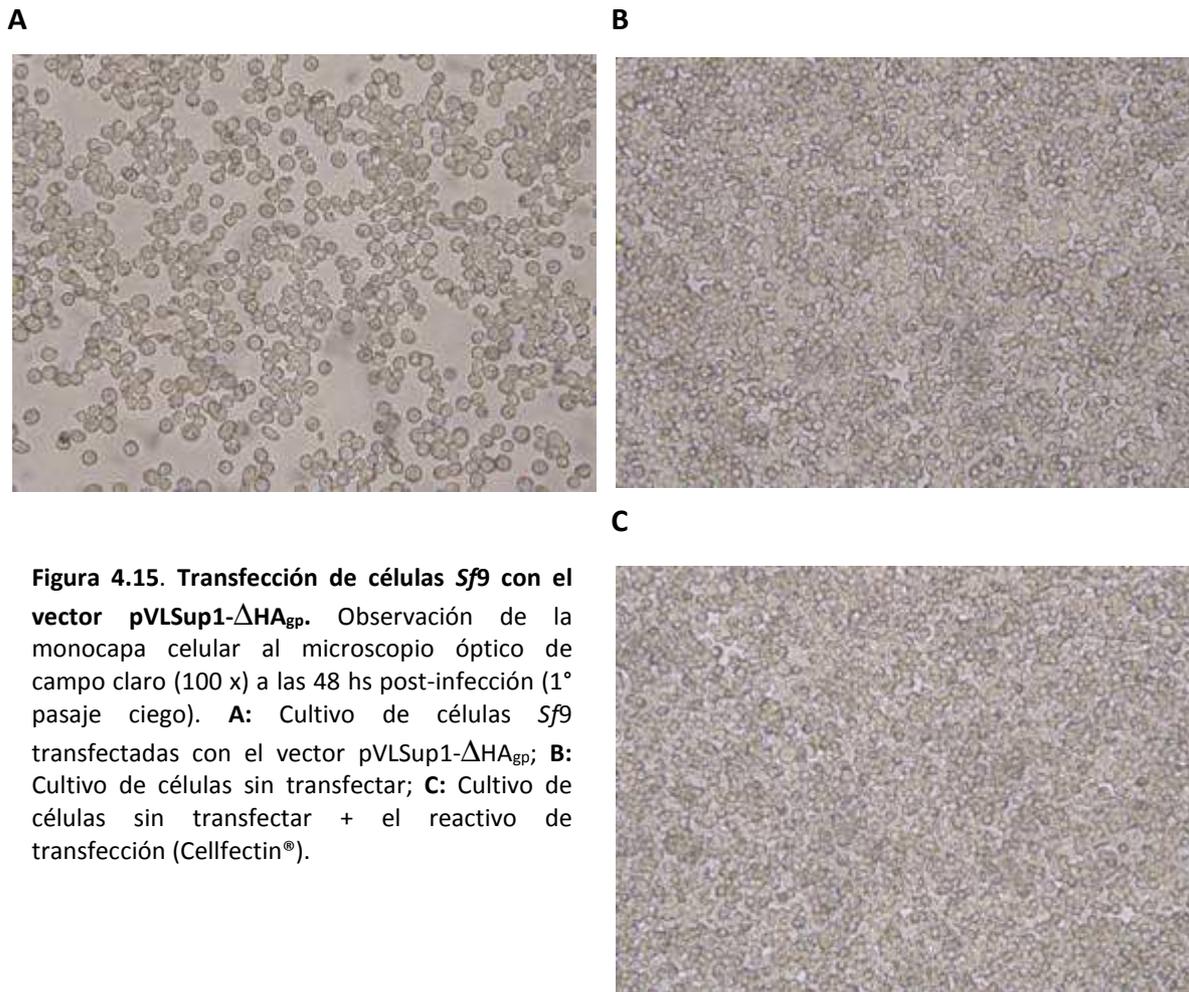


Figura 4.15. Transfección de células Sf9 con el vector pVLSup1- Δ HA_{gp}. Observación de la monocapa celular al microscopio óptico de campo claro (100 x) a las 48 hs post-infección (1° pasaje ciego). **A:** Cultivo de células Sf9 transfectadas con el vector pVLSup1- Δ HA_{gp}; **B:** Cultivo de células sin transfectar; **C:** Cultivo de células sin transfectar + el reactivo de transfección (Cellfectin®).

4.5.2. Análisis de la expresión de r Δ HA_{gp} en los cultivos de células transfectadas.

Con el objetivo de analizar la producción de proteína recombinante, se analizaron las muestras del cultivo cosechado en la etapa anterior en ensayos de SDS-PAGE (dato no mostrado) y WB (Fig. 4.16). Como se observa en la figura, a partir de las muestras obtenidas del primer pasaje ciego de la transfección con el plásmido pVLSup1- Δ HA_{gp}, se detectó una banda específica y del PM esperado (PM aparente: 79 KDa). Por lo tanto, estos ensayos permitieron confirmar la expresión de r Δ HA_{gp} en los cultivos procedentes de la transfección con pVLSup1- Δ HA_{gp}.

Sin embargo, solo se detectó proteína recombinante en el precipitado celular (*pellet*) y no en el SN de cultivo. Este resultado estaría indicando que, contrariamente a lo esperado, la proteína recombinante no está siendo secretada al medio o es secretada en muy baja proporción.

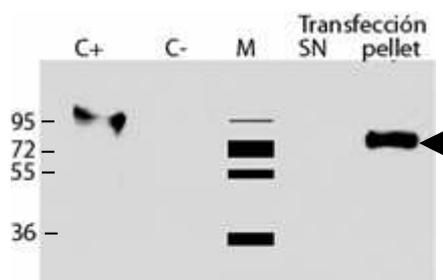


Figura 4.16. Análisis de la expresión de $r\Delta HA_{gp}$ en los cultivos transfectados con el plásmido pVLSup1- ΔHA_{gp} . Se muestra un ensayo de *western blot* utilizando un anticuerpo policlonal anti-HA A/New Caledonia/20/99 de referencia (dilución 1/1000). Se analizan muestras obtenidas a partir del 1º pasaje de los cultivos transfectados con pVLSup1- ΔHA_{gp} . Revelado utilizando un sustrato quimioluminiscente de la enzima peroxidasa. (SuperSignal®, Pierce); **SN**: Sobrenadante (30 μ l); **pellet**: precipitado de células ($\approx 5,8 \times 10^4$ células). **C-**: **Control negativo**: *Pellet* celular de un cultivo de células sin infectar ($\approx 5,2 \times 10^4$ células); **C+**: **Control positivo**: HA completa de la cepa A/New Caledonia/20/99 producida previamente en el sistema Bv (Item 4.1). **M**: Marcador de PM (Fermentas), se indica la posición en kDa. La flecha indica la posición de la banda de PM esperado. Gel de poliacrilamida 10%.

4.5.3. Clonado de los rBv que expresan $r\Delta HA_{gp}$ por la técnica de dilución y selección de los cultivos más productores de proteína recombinante.

Con el objetivo de obtener preparaciones enriquecidas en los rBv que expresan altos niveles de $r\Delta HA_{gp}$ se utilizó la técnica de dilución en una placa de 12 pocillos. Para ello, se infectó la monocapa celular al 20% de confluencia con una dilución 1/1000 del SN de la transfección con el plásmido pVLSup1- ΔHA_{gp} (Item 4.5.1). A los 5 días se infectó una nueva monocapa celular al 60% de confluencia (placa de 12 pocillos) utilizando el sobrenadante sin diluir de los cultivos infectados previamente. A los 4 días de esta última infección se observó ecp de similar magnitud en todos los pocillos infectados.

Para comparar los niveles de producción de $r\Delta HA_{gp}$ en cada pocillo infectado, se realizaron ensayos de WB a partir de muestras de *pellet* celular a los 4 días siguientes a la última infección. Como puede observarse en la figura 4.17, de acuerdo a la señal obtenida en las placas menos expuestas al sustrato quimioluminiscente (Fig 4.17, A), los cultivos infectados presentaron una elevada heterogeneidad en relación a los niveles de expresión de $r\Delta HA_{gp}$. Cabe aclarar que también se analizaron los SN de cultivo de cada cultivo pero en ningún caso se detectó expresión de la proteína recombinante (dato no mostrado).

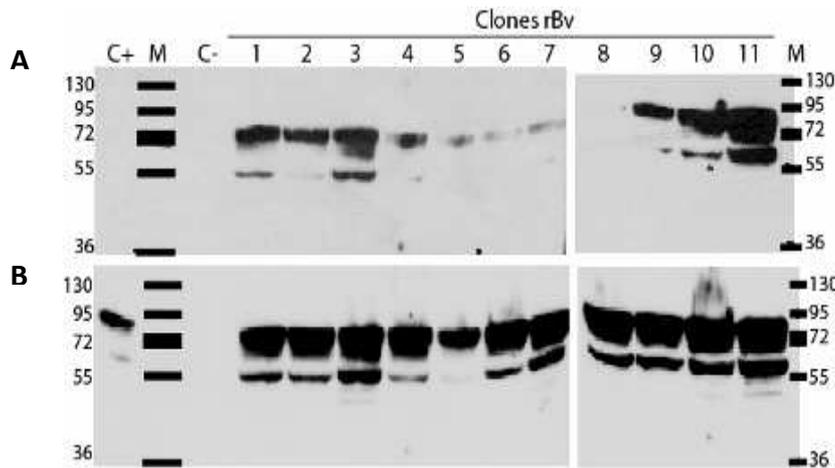


Figura 4.17 Análisis por *Western blot* de los niveles de expresión de rΔHA_{gp} en los pocillos infectados.

Se analizaron los niveles de expresión de la proteína recombinante por WB a partir de muestras de *pellet* celular ($\approx 2,5 \times 10^5$ células) obtenidas a partir de los 11 pocillos infectados con rBv como se explicó arriba. Se muestran 2 placas expuestas distinto tiempo al sustrato quimioluminiscente: **A.** Exposición: 30'. **B.** Exposición: ON. **C-: Control negativo:** *Pellet* celular de cultivos no infectados ($\approx 2,5 \times 10^5$ células); **C+: Control positivo:** HA completa de la cepa A/New Caledonia/20/99. **M:** Marcador de peso molecular (Fermentas), se indica la posición en kDa. Para la detección se utilizó un anticuerpo policlonal anti-HA A/New Caledonia/20/99 de referencia (dilución 1/1000). Geles de poliacrilamida 10%.

A partir de estos ensayos se eligió el cultivo nº 11 (en adelante denominado clon 11) como el mejor productor de la proteína rΔHA_{gp} y fue el utilizado en los ensayos subsiguientes.

4.5.4. Obtención de una semilla de trabajo a partir del clon de rBv seleccionado.

Se generó una semilla a partir del cultivo de rBv seleccionado en el paso anterior (clon 11). Para ello, se infectaron células *Sf9* en monocapa al 70% de confluencia en un frasco de 175 cm² con una dilución 1/50 del SN de cultivo obtenido (*Item* 4.5.2). En este caso se detectó ecp a las 48 hs post-infección y se cosecharon tanto las células como el SN de cultivo (35 ml).

Seguidamente, se analizó la expresión de la proteína recombinante a partir de muestras de cultivo de la semilla obtenida por SDS-PAGE y WB. En el primer caso (Fig. 4.18.A), luego de teñir el gel con *Coomasie blue*, se observó una banda diferencial en la muestra correspondiente al *pellet* celular del cultivo infectado con la semilla de trabajo (se indica con una flecha) respecto al control que expresa una proteína heteróloga. Como puede observarse el PM de esta banda se corresponde con el PM de la señal obtenida en los ensayos por WB (Fig. 4.18.B). Cabe destacar que, al igual que en los ensayos anteriores, solo se detectó expresión de la proteína recombinante en el *pellet* celular.

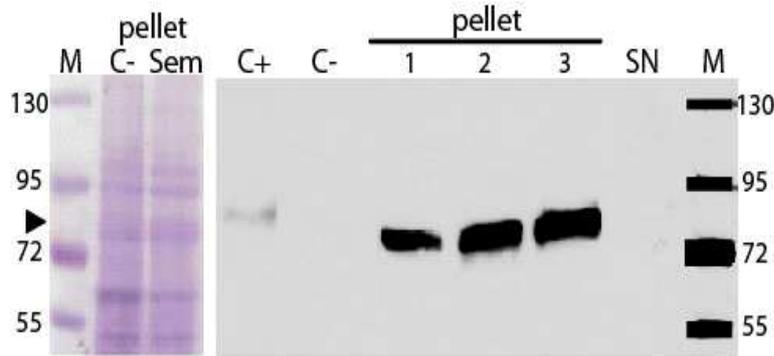


Figura 4.18. Semilla de trabajo (Sem). Análisis por SDS-PAGE de la expresión de proteína recombinante. Se analizó el patrón de proteínas obtenido a partir del *pellet* de células infectadas en comparación con un rBv heterólogo (C-). En ambos casos se sembró el *pellet* correspondiente a $\approx 1 \times 10^5$ células totales. **B. Análisis por Western blot de la expresión de $r\Delta HA_{gp}$.** Se analizó el SN de cultivo (30 μ l) y diferentes cantidades de *pellet* celular a 48 hs p.i. (**calle 1:** $\approx 0,62 \times 10^5$; **calle 2:** $\approx 1,25 \times 10^5$ y **calle 3:** $\approx 1,8 \times 10^5$ células). **C-: Control negativo:** *Pellet* celular a partir de cultivos no infectados ($\approx 1,8 \times 10^5$ células); **C+: Control positivo:** HA completa de la cepa A/New Caledonia/20/99 producida anteriormente; **M:** Marcador de PM (Fermentas), se indica la posición en kDa. Para la detección se utilizó el suero policlonal anti-HA descrito arriba (dilución 1/1000). Geles de poliacrilamida 8%.

Finalmente, la semilla de trabajo fue titulada por Unidades Formadoras de Placas de Lisis (UFP) determinándose un título de $4 \cdot 10^7$ UFP/ml (Fig. 4.19).

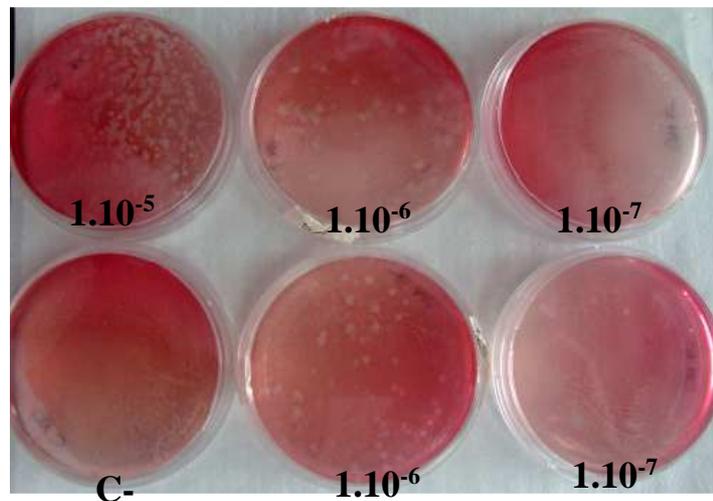


Figura 4.19. Titulación de la semilla de trabajo por unidades formadoras de placas de lisis. C-: Control negativo: células sin infectar. Se sembraron 9×10^5 células por placa. Los números indican la dilución de la semilla de trabajo que se utilizó para infectar la monocapa celular.

4.5.5. Efecto de los factores de cultivo e infección en los niveles de producción de la proteína recombinante en cultivos en monocapa.

A fin de optimizar la producción de la $r\Delta HA_{gp}$ en cultivos de células Sf9 en monocapa, se evaluaron los niveles de expresión variando distintos factores de cultivo e infección como el tiempo de cosecha y la multiplicidad de infección (MOI).

Se infectaron monocapas de células Sf9 utilizando diferentes MOI (1; 3; 5 y 7) y se tomaron muestras tanto de *pellet* celular como de SN de cultivo a distintos tiempos post-infección (48; 72; 96 y 120 hs). Como puede observarse en la figura 4.20, en todas las condiciones evaluadas se detectó $r\Delta HA_{gp}$ solo en el *pellet* celular. Este resultado se corresponde con lo observado hasta el momento para el sistema.

En relación a los niveles de expresión, en la condición MOI = 1 se observa mayor expresión de la proteína recombinante y el tiempo óptimo de cosecha en este caso fue de 120 hs post-infección (Fig. 4.20). Así también, se observa que a mayor MOI disminuyen los niveles de expresión de la proteína recombinante así como también se observa que el tiempo óptimo de cosecha varía de acuerdo a la MOI utilizada para la infección (120 hs para MOI = 1; 5 y 7; 72 hs para MOI = 3).

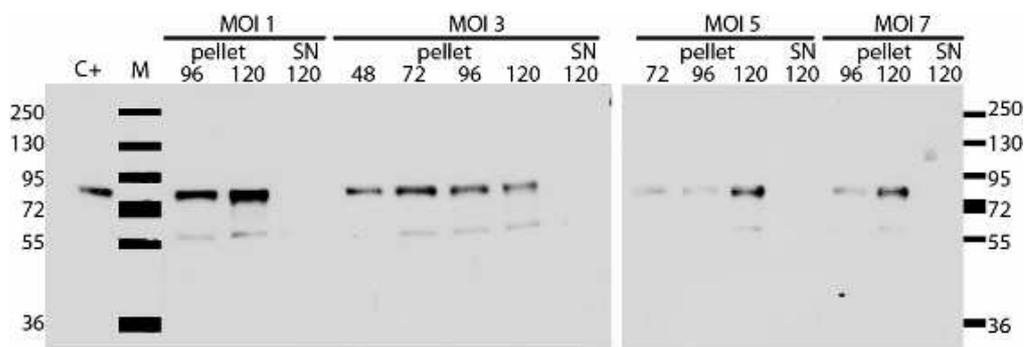


Figura 4.20. Efecto de los factores de cultivo e infección en los niveles de expresión de $r\Delta HA_{gp}$ en cultivos en monocapa. Se analizó por *western blot* la expresión de $r\Delta HA_{gp}$ en *pellet* celular ($\approx 8,4 \times 10^4$ células) a distintos tiempos post-infección y en SN de cultivo (30 μ l) a 120 h p.i. **C+:** Control positivo: *Pellet* celular de semilla de trabajo ($\approx 6,2 \times 10^4$ células). **M:** Marcador de PM (Fermentas), se indica la posición en kDa. Para la detección se utilizó el suero policlonal anti-HA utilizado en los ensayos anteriores (dilución 1/1000). Geles poliacrilamida 8 %.

4.5.6. Lisis de células Sf9 infectadas con rBv que expresan $r\Delta HA_{gp}$.

A partir de los ensayos realizados (Fig. 4.17, 4.18 y 4.20) se observó que la $r\Delta HA_{gp}$ producida no era secretada al medio de cultivo, sino que quedaba retenida en el *pellet* celular. Por lo tanto, se analizaron distintas condiciones de extracción proteica a partir del *pellet* celular. En este caso, se evaluó la lisis del *pellet* celular de un cultivo en monocapa infectado a MOI = 1 con la semilla de trabajo y cosechado a 120 hs post-infección (condiciones determinadas como óptimas en el Item anterior). Se ensayaron diferentes *buffers* de lisis (elegidos de acuerdo a la información bibliográfica consultada (Wang y col., 2006;

Baculovirus Expression Vector System Manual, 1999) y se utilizó la sonicación como método de disruptión (Tabla 4). La presencia de r Δ HA_{gp} en las distintas fracciones se evaluó mediante WB (Fig. 4.21).

Tabla 4. Condiciones evaluadas para lisar las células Sf9 infectadas con rBv

Buffer de lisis	Método disruptivo
Buffer 1: 50 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl, 1,5 % Tritón X-100	Sonicación (3 pulsos de 10 segundos)
Buffer 2: 50 mM Fosfato de sodio pH 8, 300 mM NaCl, 1% Igepal (Nonidet P40)	
Buffer 3: 20 mM Fosfato de sodio pH 5,89, 1 M EDTA, 1% Tergitol, 5% Glicerol, 10 mM DTT	
Buffer 4: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 130 mM NaCl, 1% Tritón X-100, 10 mM NaF, 10 mM NaPi, 10 mM NaPPi	

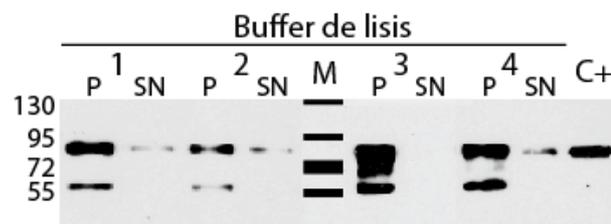


Figura 4.21. Ensayo de lisis de células Sf9 infectadas con rBv que expresan r Δ HA_{gp}. Se analizó por WB la extracción de r Δ HA_{gp} a partir del *pellet* celular con diferentes *buffers* de lisis (Tabla 4). **P:** *Pellet* post-lisis ($\approx 2,7 \times 10^4$ células). **SN:** Sobrenadante de lisis celular (10 μ l); **C+:** **Control positivo:** *pellet* celular de la semilla de trabajo ($\approx 3,75 \times 10^4$ células). Los marcadores de PM se indican en kDa. Para la detección de la proteína recombinante se utilizó el suero policlonal anti-HA que se utilizó en los ensayos anteriores (dilución 1/1000). Gel de poliacrilamida 8%.

Como se observa en la figura 4.21, los tratamientos evaluados solo permitieron extraer una mínima proporción de la proteína recombinante a partir del *pellet* celular. En este sentido, los tratamientos en donde se utilizó el buffer 2 o 4 permitieron una mejor extracción de proteína considerando, sin embargo, esta extracción es aún muy escasa. Cabe resaltar que esta evaluación constituye sólo un ensayo inicial a los efectos de poner a punto una metodología de lisis celular para luego purificar la proteína recombinante.

Objetivo A.3: Expresión de la subunidad HA₁ de HA de la cepa pandémica A/VietNam/1203/2004 (H5N1) en cultivos de células de insecto en suspensión (rΔHA₅)

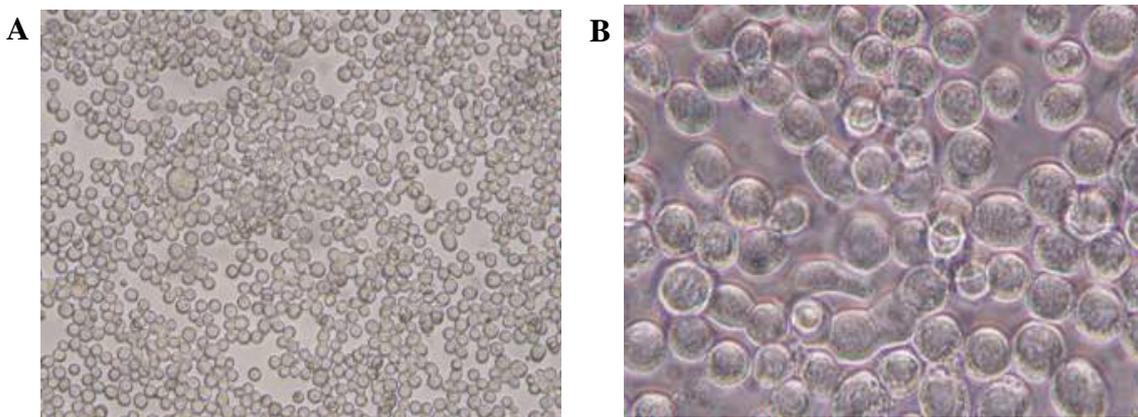
En este caso la hipótesis de trabajo es similar a la planteada para el objetivo anterior. En este caso el inmunógeno vacunal consiste en el dominio globular HA₁ con la secuencia señal propia del gen pero sin la región HA₂ ni la región transmembrana. Se eligió este dominio globular de la HA ya que en él se encuentran los sitios antigénicos inductores de anticuerpos neutralizantes y al retirar la porción distal con su dominio transmembrana se podrían evitar los problemas de extracción de la rHA de las membranas celulares de las células de insecto experimentados en las estrategias anteriores. Así también se evalúa la producción de proteína recombinante en cultivos de células de insecto en suspensión. En este caso se utilizó como modelo la cepa potencialmente pandémica del subtipo A/H5N1 [A/VietNam/1203/2004 (H5N1)].

4.6. Expresión de la subunidad HA₁ (rΔHA₅) de la cepa A/VietNam/1203/2004 (H5N1)

4.6.1. Transfección de células de insecto Sf9

En este caso también se utilizó el sistema *Baculogold* (BD Bioscience). El gen ΔHA₅ de la cepa A/VietNam/1203/2004 clonado en el vector de transferencia pVLSup1 (pVLSup1-ΔHA₅, M y M Item 3.6.3) fue co-transfectado con el ADN genómico de AcNPV, como se indicó en 4.1.1

Luego de la transfección se realizó un 1º pasaje ciego utilizando el SN de cada ensayo. En este caso, se detectó ecp a las 72 hs post-infección en el cultivo que recibió el SN de células transfectadas con el plásmido pVL1393-ΔHA₅ (Fig. 4.22 A y B). Al igual que lo descrito en ensayos anteriores, la monocapa se encontraba poco adherida, con gran proporción de células en suspensión y con células más redondeadas respecto de los controles (Fig. 4.22



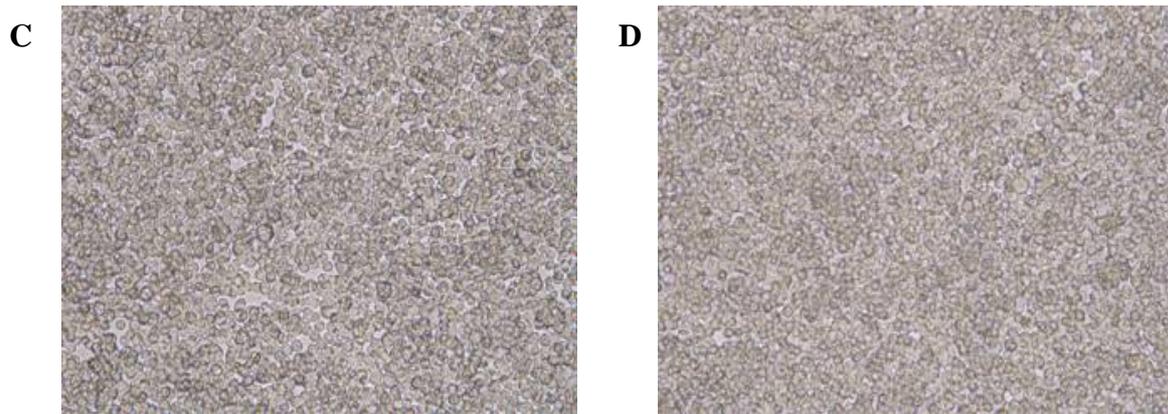


Figura 4.22. Transfección de células Sf9 con el vector pVL1393-ΔHA₅. Observación de la monocapa celular al microscopio óptico de campo claro a las 72 hs post-infección (1º pasaje ciego). **A:** Cultivo de células Sf9 infectadas con el SN de cultivo de la transfección con el vector pVL1393-ΔHA₅ (100X); **B:** *Idem* A (400X); **C:** Cultivo de células infectadas con el SN del cultivo sin transfectar (100X). **D:** Cultivo de células infectadas con el SN del cultivo sin transfectar + el reactivo de transfección Cellfectin® (100X).

4.6.2. Análisis de la expresión de rΔHA₅ en los cultivos de células transfectadas.

Para determinar si los rBv obtenidos en la etapa anterior expresaban la proteína rΔHA₅, se analizaron muestras de los cultivos obtenidos previamente en un ensayo de WB. Como se observa en la figura 4.23, se detectó una banda de PM aparente de 45.4 KDa a partir de las muestras derivadas del pasaje ciego de la transfección con pVL1393-ΔHA₅, que no estaba presente en los controles negativos (Fig. 4.23).

El PM de la banda observada se corresponde con el esperado para rHA1 (PM teórico: 38.7 KDa), por lo tanto estos resultados estarían indicando que, a partir de la transfección con pVL1393-ΔHA₅, se obtuvieron rBv que expresan la proteína recombinante.

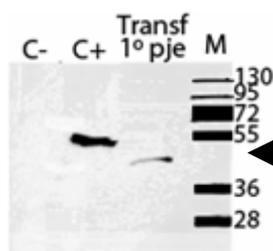


Figura 4.23. Análisis de la expresión de rΔHA₅. Se muestra un ensayo de *Western blot* utilizando un suero policlonal generado contra el virus homólogo inactivado (dilución 1/500). **C+:** **Control positivo:** virus homólogo purificado. **C-:** **Control negativo:** *pellet* celular del 1º pasaje de un cultivo no transfectado; **Transf 1º pje:** *pellet* celular del 1º pasaje de la transfección con pVL1393-ΔHA₅. Se sembraron $\approx 2 \times 10^4$ células totales. Relevado con SuperSignal® (Pierce). **M:** marcador de PM (Fermentas), se indica la posición en KDa. Gel de poliacrilamida 10%. La flecha indica la posición de la banda de PM esperado.

4.6.3. Clonado de los rBv que expresan r Δ HA₅ por la técnica de dilución y selección de los clones más productores de proteína recombinante.

A fin de obtener cultivos enriquecidos en rBvs que expresan altos niveles Δ HA₅, se utilizó la técnica de dilución en placa de 12 pocillos. Para ello, se realizó un primer pasaje de la transfección infectando una monocapa celular al 20% de confluencia con una dilución 1/1000 del SN de la transfección con el vector pVL1393- Δ HA₅ obtenido anteriormente. A los 5 días se realizó un segundo pasaje infectando una nueva monocapa celular (placa de 12 pocillos) utilizando el sobrenadante sin diluir de los cultivos infectados previamente. Finalmente, a los 4 días de esta última infección se observó ecp de similar magnitud en todos los pocillos infectados. Con el objetivo de comparar los niveles de producción de r Δ HA₅ en cada pocillo infectado, se realizaron ensayos de WB a partir de muestras de *pellet* celular de los cultivos a los 4 días de este 2º pasaje (Fig. 4.24).

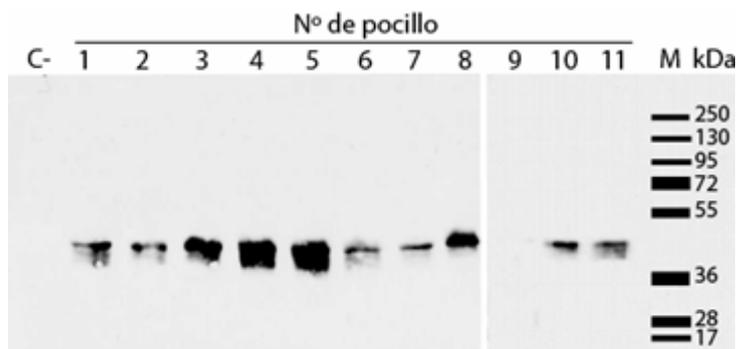


Figura 4.24. Análisis por Western blot de los niveles de expresión de r Δ HA₅. Se analizaron muestras de *pellet* celular ($\approx 1,5 \times 10^5$ células) obtenidas a partir de los 11 pocillos infectados con rBv. **C-: Control negativo:** *pellet* celular de cultivos no infectados ($\approx 1,5 \times 10^5$ células); **M:** marcador de PM (Fermentas), se indica la posición en KDa. Para la detección de la proteína recombinante se utilizó un antisuero policlonal generado contra el virus homólogo (dilución 1/500). Gel de poliacrilamida 10%

Como puede observarse en la figura 4.24, los pocillos infectados presentaron diferencias significativas en los niveles de expresión de r Δ HA₅. A partir de este ensayo, se eligió el cultivo nº 5 (en adelante denominado: clon 5) como el mejor productor de la proteína recombinante y fue el utilizado en los ensayos sub-siguientes.

4.6.4. Obtención de una semilla de trabajo a partir del clon de rBv seleccionado.

Para la obtención de la semilla de trabajo a partir del clon seleccionado se procedió de la misma manera que en 4.1.4.

Luego, se analizó la expresión de la proteína recombinante a partir de muestras de la semilla obtenida. En este caso se analizaron por *Western blot* tanto muestras de *pellet* como del SN de cultivo

(Fig. 4.25). Como se observa en la figura, se detectó expresión de rΔHA₅ tanto en *pellet* como en SN de cultivo. Cabe mencionar que, si se compara la intensidad de la banda a partir de la muestra de *pellet* (calle 5, ≈ 25μl de cultivo) con la banda correspondiente al SN (20 μl de cultivo), la expresión de rΔHA₅ parecería mayor en el SN de cultivo que en el *pellet*.

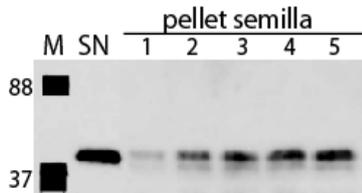


Figura 4.25. Semilla de trabajo del clon de rBv seleccionado. Análisis de la expresión de rΔHA₅. Se analizó por WB la expresión de la proteína recombinante a partir de muestras del SN y *pellet* celular de la semilla de trabajo. **SN:** sobrenadante (20μl); **calle 1:** ≈2,55x10³ cél; **calle 2:** ≈5,1x10³ cél; **calle 3:** ≈7,65x10³ cél; **calle 4:** ≈1x10⁴ cél; **calle 5:** ≈1,27x10⁴ cél **M:** marcadores PM (Recom[®]): se indica la posición en KDa. Para la detección de la proteína recombinante se utilizó un antisuero policlonal generado contra el virus homólogo inactivado (dilución 1/500). Gel de poliacrilamida 10%.

Finalmente, se tituló la semilla de trabajo y se determinó un título de 7.10⁷ UFP/ml (Fig. 4.26).

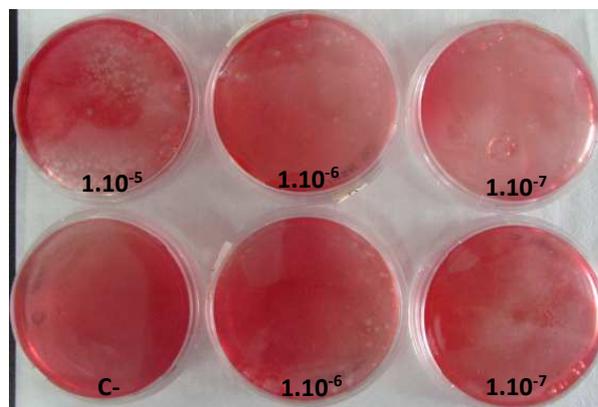


Figura 4.26. Titulación de la semilla de trabajo por placas de lisis. Se sembraron 9x10⁵ células por pocillo. Los números indican la dilución de la semilla de trabajo que se utilizó para infectar la monocapa celular. **C-: Control negativo:** células sin infectar.

4.6.6. Efecto de los factores de cultivo e infección en los niveles de producción de la proteína recombinante en cultivos en monocapa.

A fin de definir los factores de cultivo e infección que permiten alcanzar niveles óptimos de producción de rΔHA₅ en cultivos de células Sf9 en monocapa, se evaluó la variación de factores como el tiempo de cosecha de la muestra y la MOI siguiendo el trabajo de Nwe y col., 2006. De esta manera, utilizando la semilla de trabajo preparada, se infectó una monocapa de células a diferente MOI (0.5; 1; 3;

5 y 10) y se tomaron muestras tanto de *pellet* como de SN de cultivo a distintos tiempos post-infección (48; 72; 96 y 120 hs).

Como se observa en la figura 4.27, en la mayoría de las condiciones se detectó rΔHA₅ tanto en el *pellet* como en el SN. Si bien en la mayoría de las condiciones analizadas la señal detectada fue mayor en el *pellet* que en SN, cuando se infectó el cultivo con MOI = 5 los niveles de expresión de rΔHA₅ alcanzados en el *pellet* y en el SN fueron similares (tanto a las 72 h y 96 hpi).

En relación al tiempo óptimo de cosecha, considerando la proteína obtenida tanto en *pellet* como en SN, el tiempo óptimo de expresión de rΔHA₅ varía de acuerdo a la MOI utilizada para la infección.

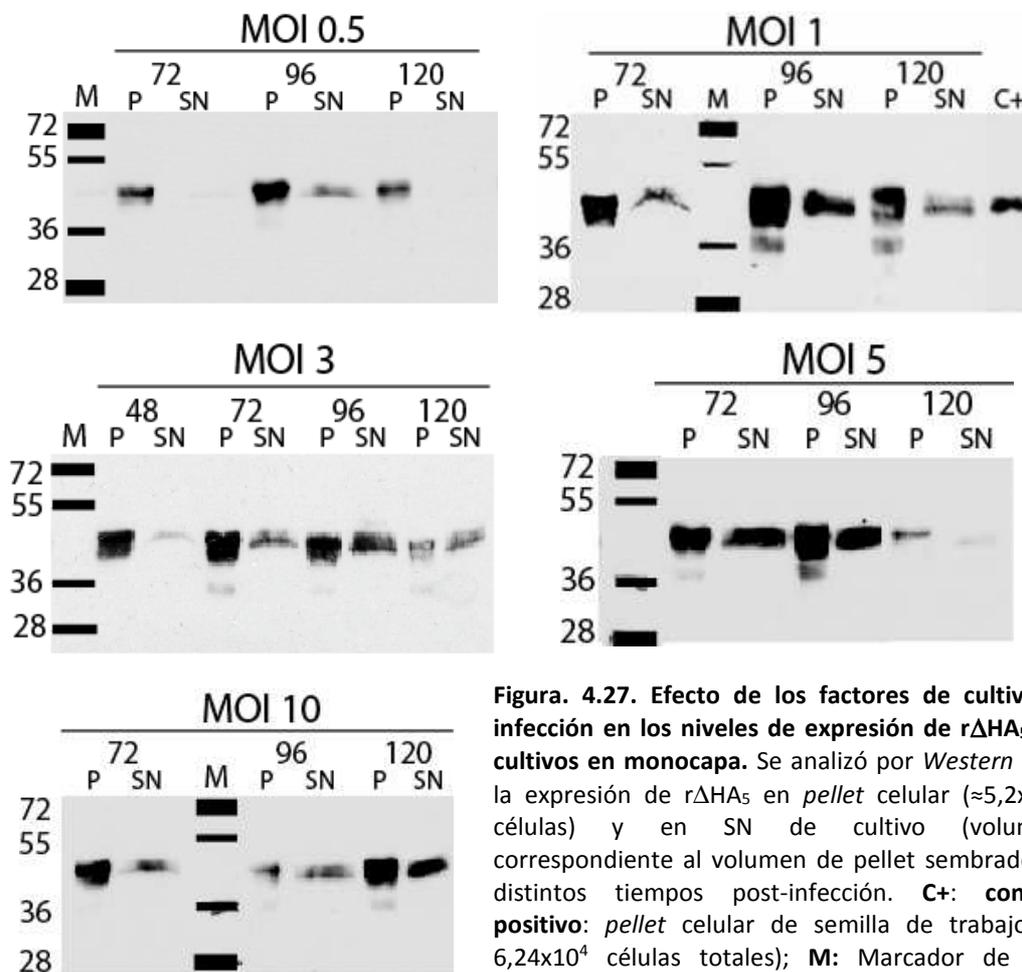


Figura. 4.27. Efecto de los factores de cultivo e infección en los niveles de expresión de rΔHA₅ en cultivos en monocapa. Se analizó por *Western blot* la expresión de rΔHA₅ en *pellet* celular ($\approx 5,2 \times 10^4$ células) y en SN de cultivo (volumen correspondiente al volumen de *pellet* sembrado) a distintos tiempos post-infección. **C+:** control positivo: *pellet* celular de semilla de trabajo ($\approx 6,24 \times 10^4$ células totales); **M:** Marcador de PM (Fermentas), se indica la posición en kDa. Para la detección se utilizó un suero policlonal generado contra el virus homólogo inactivado (dilución 1/500). Gels de poliácridamida 10%.

Nota: En todos los casos se muestran fotos representativas de los resultados que se repitieron en forma consistente luego de analizar las muestras en un mismo gel de poliácridamida y expuestos en la misma placa radiográfica para descartar posibles variables entre ensayos (por ej, transferencia, revelado, etc).

4.6.7. Efecto de los factores de cultivo e infección en los niveles de producción de r Δ HA₅ en cultivos en suspensión.

Dado que el objetivo del trabajo es obtener altos niveles de proteína recombinante a fin de poner a punto la producción de un inmunógeno vacunal, en esta etapa se decidió evaluar la producción de r Δ HA₅ en cultivos de células *Sf9* en suspensión. Para ello se procedió como se explicó en el *Item* anterior, es decir se evaluaron distintos factores de cultivo e infección, pero en este caso se infectó un cultivo en suspensión de células *Sf9* (volumen: 100 ml; densidad celular inicial: 1×10^6 células/ml). Se utilizaron las MOI (0.5; 1; 3 y 5) y se tomaron muestras tanto de *pellet* celular como de SN de cultivo a distintos tiempos post-infección (48; 72; 96 y 120 hs) (Fig. 4.28).

Como puede observarse en la figura, en este ensayo también se detectó r Δ HA₅ tanto en el *pellet* celular como en el SN de cultivo, en la mayoría de las condiciones analizadas. Sin embargo, en todas las condiciones ensayadas la señal detectada fue siempre mayor en el *pellet* que en el SN de cultivo, con niveles más similares entre ambas fracciones a MOI = 1 y 5. En relación a definir las condiciones de cultivo óptimas para la expresión de r Δ HA₅, en la condición MOI = 1, tanto para trabajar a partir de la fracción soluble (SN de cultivo) como de la fracción insoluble (*pellet* celular), el tiempo óptimo de cosecha fue de 72 hs post-infección (Fig. 4.28).

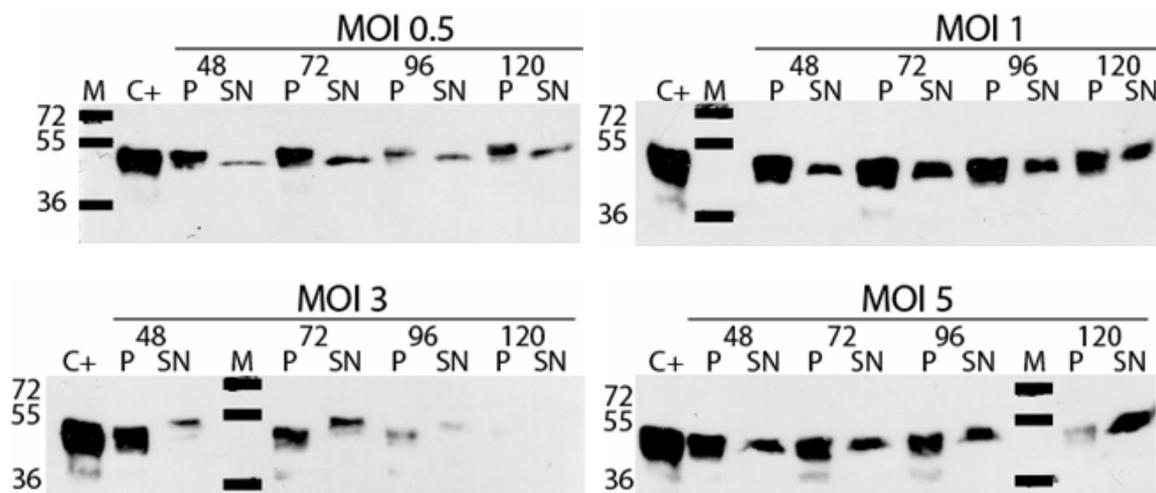


Figura. 4.28. Efecto de los factores de cultivo e infección en los niveles de expresión de r Δ HA₅ en cultivos en suspensión. Análisis por *Western blot* de la expresión de r Δ HA₅ en *pellet* celular ($\approx 5,2 \times 10^4$ células) y en SN de cultivo a distintos tiempos post-infección. **C+:** control positivo: *pellet* celular de semilla de trabajo ($\approx 6,24 \times 10^4$ células); **M:** marcador de PM (Fermentas), se indica la posición en kDa. Para la detección se utilizó un antisuero policlonal generado contra el virus homólogo inactivado (dilución 1/500). Gel de poliacrilamida 10%.

Como en el ensayo en monocapa, el tiempo óptimo de cosecha, considerando la proteína obtenida tanto en *pellet* como en SN, varía de acuerdo a la MOI. Sin embargo, en este caso, el tiempo óptimo observado fue, en general, más corto que el observado en los cultivos en monocapa: 72 hs para MOI 0,5 y 1 y 48 hs para MOI 3. Cabe aclarar que para MOI = 5 resulta difícil definir un tiempo óptimo de cosecha ya que los niveles de expresión de rΔHA₅ fueron similares tanto en *pellet* como en SN para los tiempos 48, 72 y 96 hs y recién se observa una disminución de la expresión de la proteína a las 120 hs post-infección.

4.6.8. Análisis comparativo de la expresión de rΔHA₅ en cultivos en monocapa o suspensión.

A fin de comparar en un mismo ensayo los niveles de expresión de rΔHA₅ en cultivos en monocapa y en suspensión, se analizaron muestras correspondientes a la infección con MOI = 1 de ambos tipos de cultivo por SDS-PAGE y *Western blot*. Para realizar un análisis comparativo, las muestras fueron sembradas en un mismo gel de poliacrilamida a fin de descartar posibles variables entre ensayos (Fig. 4.29). Se eligió esta MOI ya que fue la condición en la que se obtuvieron buenos niveles expresión de la proteína recombinante tanto en cultivos en monocapa como en suspensión (ver Fig. 4.27 y 4.28).

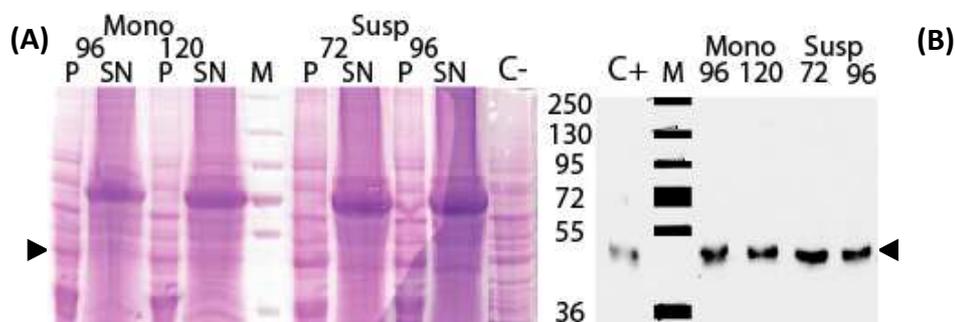


Fig. 4.29. Análisis de la expresión de rΔHA₅ en cultivos en monocapa o suspensión. Se analizó la expresión de rΔHA₅ a distintos tiempos post-infección, en cultivos en monocapa (**Mono**) o suspensión (**Susp**) infectados con MOI = 1. **A.** SDS-PAGE 8%: **P:** *pellet* celular ($\approx 8,32 \times 10^4$ células). **SN:** sobrenadante de cultivo (volumen equivalente al correspondiente volumen de *pellet* sembrado). **C-: Control negativo:** *pellet* de células infectadas con cultivo de rBv que expresa HA de la cepa NC, obtenido previamente en el laboratorio ($\approx 8,32 \times 10^4$ células totales). **B.** WB: **C+: control positivo:** *pellet* celular de cultivo en suspensión MOI = 3; 120 hs p.i. ($\approx 8,3 \cdot 10^4$ células). Se analizaron los *pellets* celulares ($\approx 5,2 \times 10^4$ células). **M:** Marcador de PM (Fermentas), se indica la posición en kDa. Para la detección se utilizó un suero policlonal generado contra el virus homólogo inactivado (dilución 1/500).

A partir del ensayo de *Western blot*, los niveles de expresión de rΔHA₅ parecerían similares tanto en los cultivos en monocapa como en suspensión (Fig. 4.29 B).

4.6.9. Prueba de lisis de células Sf9 infectadas con la semilla de trabajo

A partir de los ensayos realizados utilizando diferentes MOIs y tiempos de cosecha en cultivo de células Sf9 en monocapa (Item 4.6.6) o en suspensión (Item 4.6.7), se observó que la proteína recombinante producida no era secretada en su totalidad al medio de cultivo sino que una proporción muy importante quedaba retenida en el *pellet* celular. Por este motivo, con el objetivo de comenzar a poner a punto los ensayos de purificación de la proteína recombinante, se analizaron distintas condiciones de lisis y extracción proteica a partir del *pellet* celular. Como un primer paso se evaluó la lisis celular de un cultivo en monocapa infectado a MOI = 1 con la semilla de trabajo y cosechado a 96 hs post-infección. Para ello, se utilizó la metodología empleada en el trabajo de referencia (Nwe y col., 2006) como sigue. Se resuspendieron 20 mg de *pellet* celular en el *buffer* de lisis: 50 mM Fosfato pH: 8, 300 mM NaCl, 1% Igepal, suplementado con inhibidores de proteinasas (Protease Inhibitor Cocktail Set III, Calbiochem, 1 µl/ml + TLCK 2,5 µl/ml). La suspensión final (17,5 mg de *pellet*/ml) fue sonicada aplicando 3 pulsos de 10 segundos cada uno y la expresión de rΔHA₅ se evaluó mediante WB (Fig. 4.30).

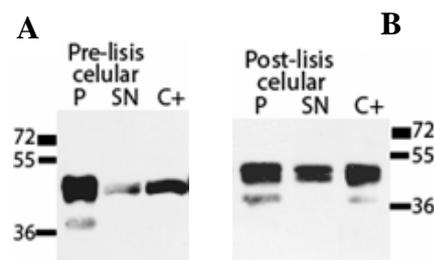


Figura 4.30. Lisis de células Sf9 infectadas con la semilla de trabajo. Se analizó por WB la extracción de rΔHA₅ a partir del *pellet* celular. **A. Muestras pre-lisis:** P: *pellet* celular ($\approx 1,25 \times 10^5$ células). SN: sobrenadante de cultivo (30 µl). C+: **control positivo:** SN de la semilla de trabajo (30 µl) (Item 4.5.4). **B. Muestras post-lisis:** P: *pellet* post-lisis ($\approx 2,7 \times 10^4$ células). SN: sobrenadante de lisis celular; C+: **control positivo:** *pellet* celular de la muestra figura A ($\approx 3 \times 10^4$ células). Los marcadores de PM se indican en kDa. Para la detección de la proteína recombinante se utilizó el antisuero policlonal utilizado previamente. Geles de poliacrilamida 8%.

Como puede observarse en la figura, si bien se extrajo proteína a partir del *pellet* celular, esta extracción no fue completa y aún queda una alta proporción de la proteína recombinante en el *pellet* celular. Este resultado señala la necesidad continuar la puesta a punto del método de extracción de proteínas a partir del *pellet* celular, a fin de contar con cantidad de proteína suficiente para los pasos de purificación subsiguientes.

Objetivo A.4: Expresión de la HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1) con secuencia de nucleótidos optimizada para expresión en Bv/células de insecto (rHA_{op}).

Como ya se mencionó, numerosos trabajos señalan la importancia de utilizar secuencias de nucleótidos diseñadas de acuerdo al uso preferencial de codones de la especie (*codon optimization sequences*) para mejorar los niveles de expresión de las proteínas recombinantes (Mossadegh N y col., 2004; Steitz J y col., 2010). Por esta razón, con el objetivo de evaluar una nueva estrategia que permita mejorar los niveles de expresión de la HA, en esta etapa se decidió trabajar a partir de genes sintéticos que codifican para las secuencias optimizadas para la expresión en células de insecto del gen HA. Se utilizó como modelo la HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1).

4.7. Expresión de HA₀ de la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1) con secuencia de nucleótidos optimizada (rHA_{op})

Se clonó el gen sintético que codifica para la HA₀ en el vector de transferencia a Bv pVL1393, obteniéndose el vector pVLHA_{op} (sistema *Baculogold*). A partir de la cotransfección de los cultivos de células Sf9 con el vector de transferencia pVLHA_{op}, y el ADN genómico de AcNPV se obtuvieron rBv que expresaron la rHA_{op}, como se muestra en las Figuras 4.31 y 4.32. Posteriormente, se procedió a la obtención de cultivos enriquecidos en rBv expresando rHA_{op}, por la técnica de dilución. Una vez seleccionado el cultivo más eficiente para la producción de la rHA_{op}, se procedió a realizar y titular la semilla de trabajo (título: 1,25 x 10⁹ UFP/ml).

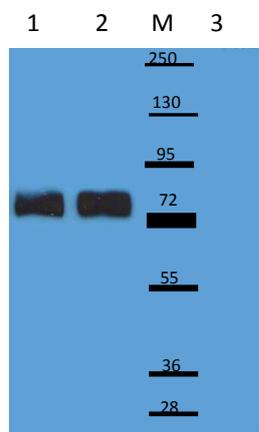


Figura. 4.31. Western Blot de pellets de células infectadas con rBV que expresan HA_{op}. **1.** Pellet de células infectado (1er pasaje a partir de la transfección) utilizado como control positivo. **2.** Pellet de células infectado proveniente de la semilla de trabajo. **M.** Marcador de PM (Fermentas). **3.** Pellet de células sin infectar (control negativo). El revelado fue realizado con suero específico de referencia contra la HA de la cepa A/New Caledonia/20/99.

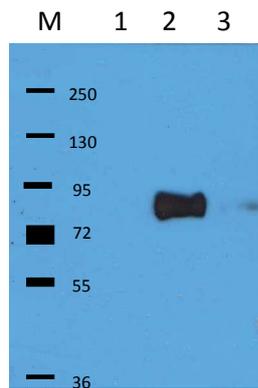


Figura 4.32. Western Blot de sobrenadante de cultivo de células infectadas con rBV que expresan HA_{op}. M. Marcador de PM (Fermentas). 1. SN de cultivo del primer pasaje a partir de la transfección. 2. Pellet de células infectadas (1er pasaje a partir de la transfección). 3. Dilución ¼ de la muestra sembrada en la calle 2. El revelado fue realizado con suero específico de referencia contra la HA de la cepa A/New Caledonia /20/99.

A pesar de haber utilizado una secuencia optimizada para la expresión en células de insecto no se observó un aumento cuantitativo en la expresión de la rHA_{NC}.

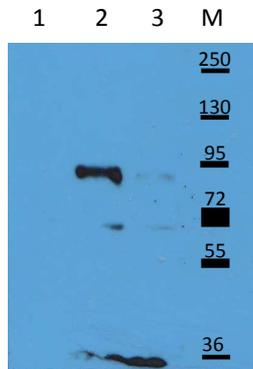
Objetivo A.5: Expresión de una molécula basada en la HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1) con secuencia optimizada, sin el dominio trans-membrana y adicionando un dominio de trimerización heterólogo (rHA_T).

En esta etapa del trabajo se decidió utilizar la estrategia anterior, es decir, utilizar genes con secuencias de codones optimizadas para la expresión en células de insecto, pero esta vez se clonó el gen de la proteína HA (cepa A/New Caledonia/20/99) sin su dominio transmembrana. Además se adicionó al extremo 3' un *tag* de 6 Histidinas y una secuencia codificante para el dominio de trimerización "GCN4" identificado en *Salmonella* entérica y utilizado en la bibliografía a fin de obtener proteínas recombinantes capaces de formar multímeros (Bosch BJ y col., 2010; Weldon W y col., 2010; Hernández Alvarez B y col., 2008). La hipótesis de trabajo se basó en mejorar el rendimiento en la expresión de la proteína recombinante (secuencia optimizada) así como también en aumentar la solubilidad de la proteína y su presentación al sistema inmune, favoreciendo la formación de trímeros estables gracias a la fusión del dominio "GCN4" mencionado.

4.8. Evaluación de la expresión de rHA_T

Se procedió como se detalló en el Item 4.7 obteniéndose una semilla de trabajo con un título de $2,45 \times 10^9$ UFP/ml. Se realizó un ensayo de Western Blot para analizar muestras tanto de *pellet* celular como de SN de cultivo de células infectadas con la semilla de trabajo; ésta se obtuvo por la infección de

una botella de cultivo de 175 cm² con una dilución 1/50 del cultivo seleccionado por la técnica de dilución del sobrenadante de transfección (Figura 4.33).



4.33. Análisis por Western blot de muestras de células infectadas con rBv que expresan HA_T. 1. Sobrenadante de cultivo 2. Pellet de células infectadas con rBv. 3. Dilución ¼ de la muestra de la calle 2.

Como puede observarse en la figura, al igual que lo observado para rΔHA_{gp} (ver Item 4.6), solo se detectó proteína recombinante en el pellet celular y no en el SN de cultivo. Este resultado estaría indicando que, contrariamente a lo esperado, la estrategia planeada no mostró mejoras ni en la solubilización. Por otro lado, al igual que en el caso anterior (rHA_{op}), no se observa una diferencia cuantitativa respecto de la producción de la rHA.

4.9. Expresión de distintas versiones de rHA de la cepa A/New Caledonia/20/99 en células High Five™

Para concluir, se realizó un estudio para evaluar los niveles de producción de las HAs recombinantes utilizando la línea celular *High Five*[™] (BTI-TN-5B1-4) (Invitrogen[™]) cultivadas en el medio de cultivo Express Five[®] SFM (Invitrogen[™]). Esta línea es un clon derivado de la línea parental *Trichoplusia ni*, y produciría mayores niveles de expresión que las líneas tradicionales (*Sf9*, *Sf21*).

Se infectaron en paralelo 3 botellas de cultivo de 25 cm² de células *High Five*[™] con las semillas correspondientes a rHA_{NC} y rΔHA_{gp} (cepa A/New Caledonia/20/99) utilizando el medio de cultivo Express Five[®] SFM con una MOI = 1. Se realizaron cosechas a las 72, 96 y 120 hpi. Se separaron células infectadas de SN de cultivo por centrifugación y se sembraron estas células en cantidades equivalentes en un gel de poliacrilamida al 8%. Las muestras fueron analizadas por WB revelado con el anticuerpo específico para la cepa en cuestión utilizado anteriormente (ver figura 4.34).

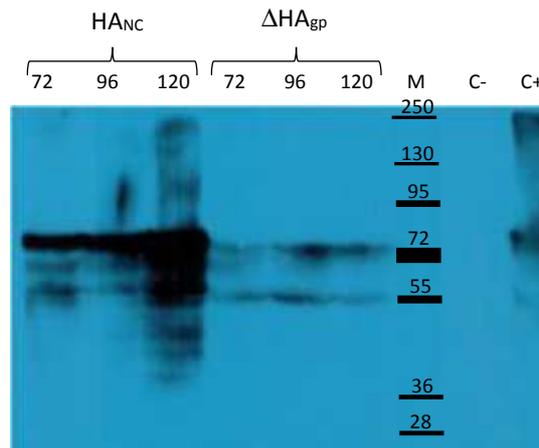


Figura 4.34. WB de pellet de células infectadas con rBvs productores de rHANc, rΔHAgp, (células High Five™ + Express Five® SFM). Se indican sobre la foto para cada calle, los tiempos de cosecha (72, 96 y 120 hs) y la versión de rHA a la cual corresponde ese *pellet* de células infectadas. **M:** marcador de PM (Fermentas). **C-:** *pellet* de células infectadas con Bv wild type. **C+:** *pellet* de células infectadas con rBv productor de rHANc con señal positiva por WB evaluado anteriormente.

Por otro lado, para poder comparar el rendimiento obtenido con las células *High Five* se realizó el mismo ensayo en las mismas condiciones con las células *Sf9* con el medio SF900II y se realizó WB con los pellets de células infectadas obtenidos (Fig. 4.35).

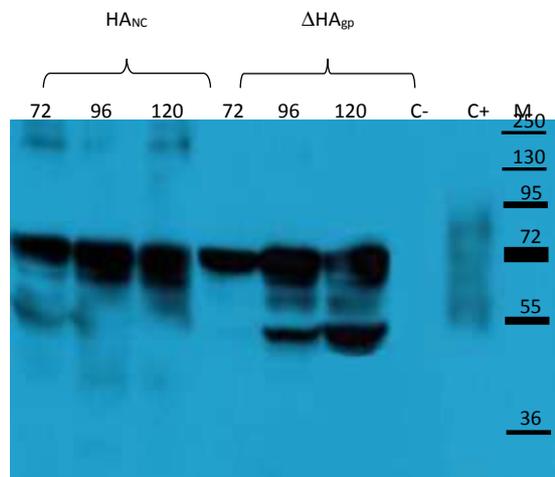


Figura 4.35. WB de células infectadas con rBvs productores de rHANc, rΔHAgp (células Sf9 + SF900II). A y B. Se indican sobre la foto para cada calle, los tiempos de cosecha (72, 96 y 120 hs) y la versión de rHA a la cual corresponde ese *pellet* de células infectadas. **M:** marcador de peso molecular (Fermentas). **C-:** *pellet* de células infectadas con Bv wild type. **C+:** *pellet* de células infectadas con rBv productor de rHANc con señal positiva por WB evaluado anteriormente.

Como puede observarse en las figuras 4.34 y 4.35, el rendimiento obtenido con las células *High Five*[™] no mejoró respecto de lo obtenido con las células *Sf9*. Si bien el proveedor (Life Technologies[™]) muestra curvas de producción de otras proteínas recombinantes significativamente aumentadas utilizando las células *High Five*[™] con el medio Express Five[®] SFM respecto de las células *Sf9* con SF900II en nuestro caso no se observaron diferencias; al contrario pareciera mejorar la señal en el segundo caso.

Dada la necesidad de preparar moléculas con fines industriales, en los ensayos anteriores se trabajó con la intención de obtener proteínas recombinantes con altos rendimientos de expresión, que puedan ser purificadas con costos accesibles y alto grado de pureza. Sin embargo, no se encontró una metodología que permitiera cumplir con los objetivos del trabajo. Los niveles de rHA continuaron siendo bajos aún en las condiciones, MOI y tiempo de cosecha post-infección, determinadas como óptimas para todas las estrategias de clonado y expresión evaluadas.

A partir de los resultados obtenidos hasta aquí, vemos que el principal inconveniente que dificulta la purificación de la proteína recombinante radica en que la proteína se asocia a la membrana celular de las células infectadas. Esto dificulta enormemente la purificación ya que extraer proteínas de las membranas celulares es una tarea difícil (ver Item 4.4). Por lo tanto, la combinación de estos 2 factores: por un lado, bajos niveles de expresión y por otro, la asociación de la proteína a las membranas celulares, limita considerablemente el rendimiento que puede lograrse en los ensayos de purificación. Si bien expresando solamente el dominio HA1 (ver Item 4.6), se logró mejorar la cantidad de proteína en solución, aún permanece una alta proporción de la proteína retenida en las membranas celulares.

B. GENERACIÓN DE UNA VACUNA DEL TIPO "UNIVERSAL" CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA. OBTENCIÓN DE INMUNÓGENOS DE AMPLIO ESPECTRO DE PROTECCIÓN CONTRA INFLUENZA TIPO A BASADOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS DERIVADOS DE LAS PROTEÍNAS CONSERVADAS NUCLEOPROTEÍNA (NP) Y MATRIZ 2 (M2).

En este caso la hipótesis de trabajo para lograr una vacuna de amplio rango de protección contra influenza A se basa en la combinación de diversas herramientas: **(i)** Se utilizan 2 antígenos altamente conservados del virus de influenza (NP y M2e). Estos antígenos, a diferencia de las proteínas HA y NA, presentan una baja tasa de mutación [Shu, L. y col., 1993] y se ha demostrado su capacidad protectora frente al desafío con dosis letales de cepas homólogas y heterólogas [Fiers, 2004; Liu W, 2004; De Filette MD, 2005; Ernst WA, 2006; Jimenez GS, 2007; Fan J, 2004]. **(ii)** Estos antígenos son presentados o vehiculizados en un sistema viral a fin de generar una respuesta inmune potenciada. **(iii)** Para vehicular los antígenos se utiliza el sistema Bv. Este sistema fue elegido ya que permite combinar evidencias experimentales interesantes en relación al desarrollo de una vacuna contra influenza. Por un lado, ha sido demostrado que Bv per se induce una respuesta inmune protectora específica contra influenza [Abe T y col., 2003]. Por lo tanto, su utilización como sistema vehiculizador permite aprovechar también su capacidad como adyuvante específico contra el virus. Por otro lado, este sistema de "delivery" para los antígenos M2e y NP permite presentar estas proteínas al sistema inmune de una manera muy similar a su presentación durante la infección natural [Ulmer y col., 1993; Wraith y col., 1987; Yap y col., 1987; Radosević K y col., 2008].

Objetivo B.1. Expresión de la NP de influenza fusionada a la proteína VP39 de Bv, utilizando Bv como carrier para la presentación de NP en la cápside del virus.

4.10. Expresión de la NP fusionada a VP39 de Bv

4.10.1. Transfección de células Sf9.

El báculo recombinante # 1 seleccionado a partir del ensayo realizado en 3.8.5, conteniendo la proteína NP (cepa A/New Caledonia/20/99) fusionada a la proteína vp39 se transfectó en células Sf9 (sistema *Bac-to-Bac*).

4.10.2. Análisis de la expresión de la proteína de fusión VP39-NP.

A partir del SN de la transfección anterior se realizaron tres pasajes seriados en cultivos en monocapa de células Sf9. Luego del tercer pasaje en donde se observó ecp, se cosecharon SN y *pellet* de las células infectadas.

Las muestras obtenidas se analizaron en geles de poliacrilamida al 8%. En una tinción con *Coomassie blue* se puede observar claramente una banda de aproximadamente 95 KDa (peso esperado de VP39-NP; PM VP39≈ 39 KDa; PM NP≈ 56KDa, PM VP39+NP≈95) diferencial y mayoritaria respecto del resto de las muestras que corresponden a *pellets* de células infectadas con otros rBv (Figura 4.36, calles 3 y 4).

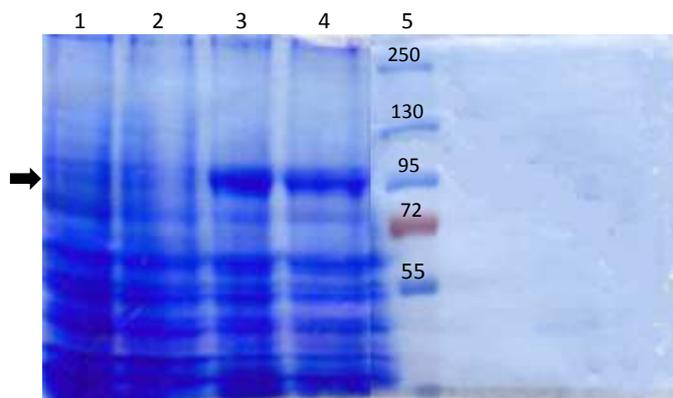


Figura 4.36. Análisis de la expresión de la proteína de fusión vp39-NP por SDS-PAGE. Gel de poliacrilamida al 8% teñido con *Coomassie brilliant blue*. **Calles 1 y 2,** *pellets* de células infectadas con rBv productor de rHA_p. **Calles 3 y 4,** *pellets* de células infectadas con rBv productor de rVP39-NP. **Calle 5,** Marcador de PM (Fermentas). La flecha indica la proteína VP39-NP

Por otro lado, a fin de corroborar la identidad de la banda diferencial observada, se realizó un ensayo de WB revelado con un suero de conejo hiperinmune anti virus A/New Caledonia/20/99. Como puede observarse en la figura 4.37, en la muestra de células infectadas con el rBv en cuestión se revela una banda de peso aproximado 95 KDa compatible con la proteína de fusión VP39-NP observada en el ensayo de *Coomassie blue*.

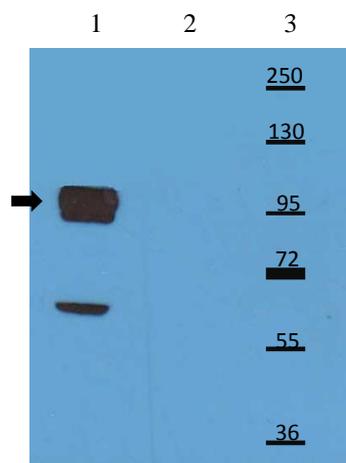


Figura 4.37. Análisis de la expresión de la proteína de fusión VP39-NP por Western blot. **Calle 1.** *Pellet* de células infectadas con rBv proveniente del 3er pasaje a partir del SN de transfección. **Calle 2.** *Pellet* de células infectadas con Bv-wt. **Calle 3.** Marcador de PM (Fermentas). El revelado se realizó con un suero de conejo hiperinmune anti virus de influenza (cepa A/New Caledonia/20/99).

4.10.3. Obtención de la semilla viral

A partir del sobrenadante obtenido se realizó un pasaje en un cultivo de células Sf9 en botella de cultivo de 175 cm² para obtener la semilla de trabajo. Se corroboró por *Western blot* que la semilla produjera la proteína de fusión VP39-NP y a continuación se tituló por unidades formadoras de placas obteniéndose como resultado un título de $3,3 \times 10^7$ UFP/ml.

4.10.4. Producción de los rBv portadores de la proteína de fusión.

Con la semilla obtenida en el punto anterior, se realizaron cuatro producciones virales que comprendieron entre tres y cuatro botellas de cultivo de 175 cm² ($2,3 \times 10^7$ UFP/ml; $1,6 \times 10^6$ UFP/ml; $3,4 \times 10^7$ UFP/ml). Las condiciones óptimas de cultivo como, multiplicidad y tiempo de cosecha, se estudiaron en un experimento previo. En estos experimentos se titularon producciones cosechadas a distintos tiempos (3, 4 y 5 días post- infección) cuyas MOI variaron entre 0,01 y 0,05 UFP/cél. La producción que mejor título arrojó fue la cosechada a los 5 días y realizada con una multiplicidad de 0,05 UFP/cél. Estos parámetros fueron tomados en cuenta a la hora de realizar nuevas producciones.

4.10.5. Purificación de las partículas virales

Las producciones virales obtenidas en el punto anterior se purificaron por ultracentrifugación en un colchón de sacarosa al 25%. Se tomaron muestras de virus antes y después del procesamiento. El *pellet* obtenido fue resuspendido en PBS pH 6.2 tal que el factor de concentración resultara en 100X.

4.10.6. Análisis por WB de los rBv purificados

Los virus purificados con anterioridad fueron analizados en ensayos de WB. Se utilizaron dos anticuerpos para el revelado, un anticuerpo monoclonal anti-gp64 (AcMo α -gp64) y el suero hiperinmune de conejo anti virus de influenza de la cepa A/New Caledonia/20/99 (AcPo α -vNC) utilizado en 4.10.2. El objetivo del uso de ambos anticuerpos fue, por un lado monitorear que la purificación viral resultara exitosa (los virus purificados tenían que reaccionar con el AcMo α -gp64), y por el otro examinar si la proteína de fusión rVP39-NP se incorporaba a las partículas virales (en este caso los virus purificados debían reaccionar además con el AcPo α -vNC). En la figura 4.38, que se muestra a continuación se puede observar que la muestra de virus purificado (calles 2 y 8) revela con el AcMo α -gp64 (panel B, calle 8) pero no con el AcPo α -vNC (panel A, calle 2). En cambio, las células infectadas provenientes de la producción de este virus (calles 3 y 9), revelan con ambos anticuerpos. Esto, estaría sugiriendo que, si bien las células infectadas con el virus rBv-VP39-NP producen la rVP39-NP, ésta no estaría siendo ensamblada en la cápside viral ya que no se observa expresión de la proteína recombinante VP39-NP en las muestras correspondientes al virus purificado, los cuales sólo estarían incorporando la proteína VP39 wild type.

Cabe señalar que la fusión de una proteína del PM de NP de influenza (56 kDa) a la VP39 de Bv no se había probado al momento de iniciar el trabajo. Por lo tanto, es altamente probable que la proteína de fusión resulte demasiado grande para formar parte de la nucleocápside del virus y por esta razón no pueda ser incorporada en la partícula viral.

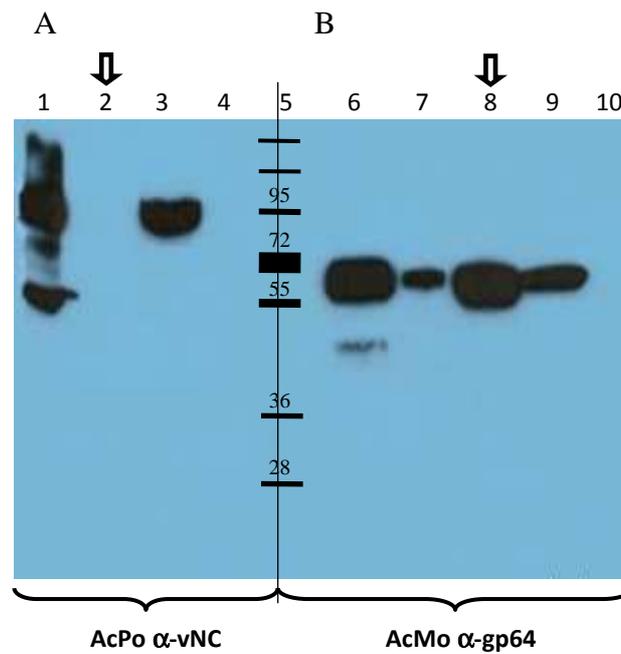


Figura 4.38. Ensayo de WB revelado con distintos anticuerpos. **A.** Revelado con suero de conejo anti virus A/ New Caledonia y conjugado anti-conejo. **B.** Revelado con anticuerpo monoclonal anti-gp64 y conjugado anti-ratón. Calles **1 y 7**, *pellet* de células infectadas con rBv-VP39-NP (control positivo). Calles **2 y 8**, rBv-VP39-NP n° 4 purificado. Calles **3 y 9**, *pellet* de células infectadas con rBv-VP39-NP n° 4. Calles **4 y 10**, rBv-VP39-NP n° 4 SN de cultivo. **Calle 5**, marcador de PM (Fermentas). **Calle 6**, *pellet* de células infectadas con rBv que expresa otra proteína (control positivo).

Objetivo B.2. Expresión de la porción extra-citoplasmática de la proteína Matriz 2 (M2e), fusionada a la proteína gp64 de Bv, utilizando Bv como carrier para la presentación de M2e en la membrana del virus.

4.11. Expresión de M2e fusionada a la proteína gp64 de Bv.

4.11.1. Transfección de células de insecto Sf9

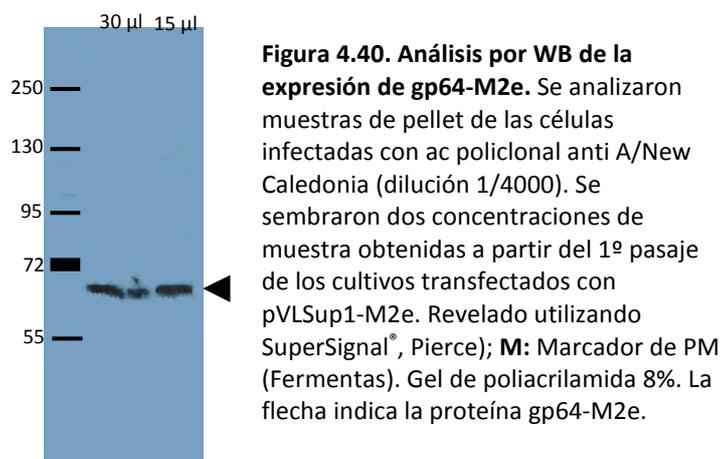
A fin de obtener los rBv que expresen la proteína de fusión gp64-M2e, se co-transfectaron células de insecto *Sf9* con el ADN genómico del virus AcNPV (*Baculogold*) y el vector de transferencia pVLSup1-M2e obtenido como se detalla en Materiales y Métodos. Al igual que para el resto de los rBv obtenidos con el sistema BaculoGold se realizaron los mismos controles de transfección (células sin transfectar y células incubadas con Cellfectin®)

A pesar de no observar ecp post-transfección, al 5º día se realizó un pasaje ciego utilizando el SN de cada transfección y se detectó ecp a las 48 hs post-infección en los cultivos que recibieron el SN de células transfectadas con el plásmido pVLSup1-M2e.

Se cosechó tanto el *pellet* celular como el SN de cultivo de este 1º pasaje ciego a las 48 hpi para analizar la producción de la proteína de fusión.

4.11.2. Análisis de la expresión de gp64-M2e en los cultivos transfectados.

Se analizaron las muestras del cultivo en ensayos de SDS-PAGE y WB. Como se observa en la figura 4.40, en el primer pasaje ciego de la transfección con el plásmido pVLSup1-M2e se detectó una banda específica y del PM esperado (67 KDa). Por lo tanto, estos ensayos permitieron confirmar la expresión de la proteína de fusión gp64-M2e en los cultivos procedentes de la transfección con pVLSup1-M2e



4.11.3. Clonado de los rBv que expresan gp64-M2e y selección de los clones más productores de proteína de fusión.

Con el objetivo de obtener preparaciones enriquecidas en los rBv que expresan altos niveles de gp64-M2e se utilizó la técnica de dilución límite en una placa de 12 pocillos. Para ello, se infectó la monocapa celular al 70% de confluencia con una dilución 1/1000 del SN de la transfección con el plásmido pVLSup1-M2e. A los 5 días se infectó una nueva monocapa celular (placa de 12 pocillos) utilizando el sobrenadante sin diluir de los cultivos infectados previamente y a los 4 días de esta última infección se observó ecp de similar magnitud en todos los pocillos infectados.

Para comparar los niveles de producción de gp64-M2e en cada pocillo infectado, se realizaron ensayos de *Western blot* a partir de muestras de *pellet* celular a los 4 días siguientes a la última infección. Como puede observarse en la figura 4.41, los cultivos infectados presentaron una elevada heterogeneidad en relación a los niveles de expresión de gp64M2e.

A partir de estos ensayos se eligió el cultivo # 10 (en adelante denominado clon 10) como el mejor productor de la proteína gp64-M2e y fue el utilizado en los ensayos subsiguientes.

4.11.4. Obtención de una semilla de trabajo a partir del clon de rBv seleccionado.

Con el objetivo de estandarizar la herramienta de trabajo, se generó una semilla a partir del cultivo de rBv seleccionado en el paso anterior (clon 10). Para ello, se infectaron células Sf9 en monocapa al 70% de confluencia en un frasco de 175 cm² con una dilución 1/50 del SN de cultivo obtenido. En este caso se detectó ecp a las 48 hpi y se cosecharon tanto las células como el sobrenadante de cultivo (35 ml).

Seguidamente, se analizó la expresión de la proteína de fusión a partir de muestras de cultivo de la semilla obtenida por *WB*. Como puede observarse en la Fig. 4.42 se detecta una banda del PM esperado para la proteína gp64-M2e; la detección se realizó en este caso también con un suero de conejo anti-M2e-OVA (preparado en el laboratorio).

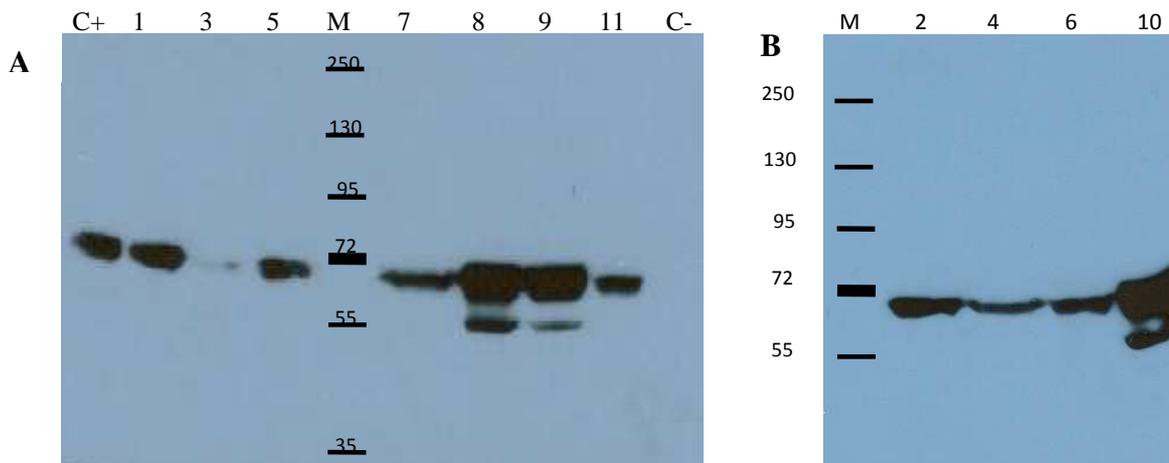


Figura 4.41. Análisis por WB de los niveles de expresión de gp64-M2e en los pocillos infectados. Se analizaron los niveles de expresión de la proteína de fusión por WB a partir de muestras de *pellet* celular ($\approx 2,5 \times 10^5$ células) obtenidas a partir de los 11 pocillos infectados con rBv como se explicó arriba. Se muestran 2 placas expuestas al sustrato quimioluminiscente: **A. y B.** Los números corresponden a la denominación de los cultivos testeados. **C-: Control negativo:** *Pellet* celular de cultivos no infectados ($\approx 2,5 \times 10^5$ células); **C+:** **Control positivo:** *pellet* celular testado con anterioridad para gp64-M2e. **M:** Marcador de PM (Fermentas), se indica la posición en kDa. Para la detección se utilizó un anticuerpo policlonal anti-M2e-ova (M2e conjugado a ovoalbúmina) de conejo producido en el laboratorio (dilución 1/500.000). Geles de poliacrilamida 8%. Revelado utilizando un sustrato quimioluminiscente de la enzima peroxidasa. (SuperSignal®, Pierce)

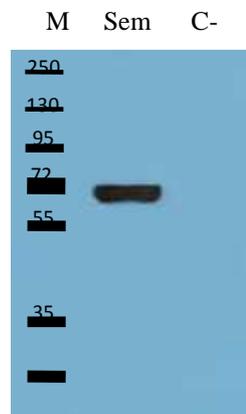


Figura 4.42. Semilla de trabajo obtenida a partir del clon 10 del rBv seleccionado. Análisis por Western blot de la expresión de proteína de fusión. Se analizó por WB el *pellet* celular proveniente de la semilla de trabajo. **C-: Control negativo:** *Pellet* celular a partir de cultivos no infectados; **M:** Marcador de PM (Fermentas). Para la detección se utilizó el suero policlonal anti-M2e-OVA (dilución 1/500.000). Gel de poliacrilamida 10%. Revelado utilizando un sustrato quimioluminiscente de la enzima peroxidasa. (SuperSignal®, Pierce)

La semilla de trabajo fue titulada por Unidades Formadoras de Placas de Lisis (UFP) determinándose un título de $4,5 \times 10^7$ UFP/ml (Fig 4.43).

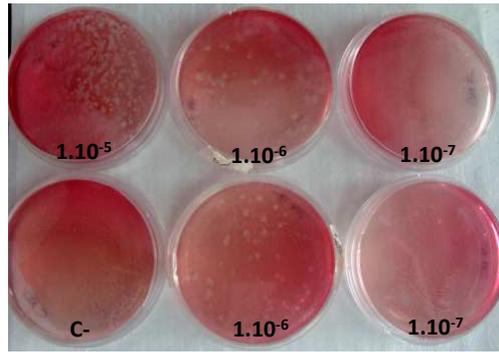


Figura 4.43. Titulación de la semilla de trabajo por unidades formadoras de placas de lisis. C-:Control negativo: células sin infectar. Se sembraron 9×10^5 células por placa. Los números indican la dilución de la semilla de trabajo que se utilizó para infectar la monocapa celular.

4.11.5. Obtención de baculovirus wild type

Para tener como control partículas virales que no expresen M2e para ser utilizadas en los ensayos de inmunización, se obtuvieron Bv salvajes (Bv wt).

Para ello se utilizó una preparación del vector de transferencia pVL1393 (vacío) en la transfección de células Sf9 junto al ADN genómico del virus AcNPV (*Baculogold*). Se procedió de la misma manera que en el resto de las transfecciones, se realizaron pasajes ciegos hasta observar ecp. Se preparó una semilla de trabajo, cuyo título fue $1,32 \times 10^8$ UFP/ml. En las producciones se realizaron lotes provenientes de la infección de 8 botellas de cultivo de 175 cm^2 infectadas a una multiplicidad de aproximadamente 0,05 UFP/célula. La cosecha se realizó a los 4 días post infección y se clarificó el sobrenadante por centrifugación a 3000 rpm. Luego se titularon las producciones por el método de unidades formadoras de placas de lisis.

4.11.6. Producción de rBv que expresan gp64-M2e en cultivos en monocapa.

Una vez obtenida y titulada la semilla de trabajo se procedió a la producción en cantidad de los baculovirus recombinantes. En cada producción se sembraron 8 botellas de cultivo de 175 cm^2 con una densidad de 1×10^5 células/ cm^2 (cantidad total de células por botella: $1,75 \times 10^7$). Se infectó cada botella con 19,6 ul de semilla (título: $4,5 \times 10^7$ UFP/ml), por lo que la multiplicidad resultó ser de 0,05 UFP/célula. La cosecha se realizó a los 4 días post infección. El sobrenadante cosechado se clarificó por centrifugación a 3000 rpm a 4°C . El *pellet* celular se cosechó para realizar WB de la producción.

4.11.7. Purificación de las partículas virales por ultracentrifugación

Para concentrar y purificar las partículas virales se procedió a ultracentrifugar los SN clarificados previamente. Se sembraron 27 ml de virus sobre un colchón de sacarosa de 3 ml al 25% en buffer de

fosfatos pH 6,5. La ultracentrifugación se realizó a 22.000 rpm durante 1 hora y 20 minutos. Luego se descartaron los SN y los *pellets* virales se resuspendieron en 270 μ l de buffer de fosfatos de pH 6,5 (factor de concentración 100X). Finalmente se valoraron los concentrados virales por titulación por placas de lisis para ser utilizados como inmunógenos en ensayos en animales.

Los concentrados de Bv fueron analizados por WB revelados con el anticuerpo monoclonal anti-gp64 (Figura 4.44).

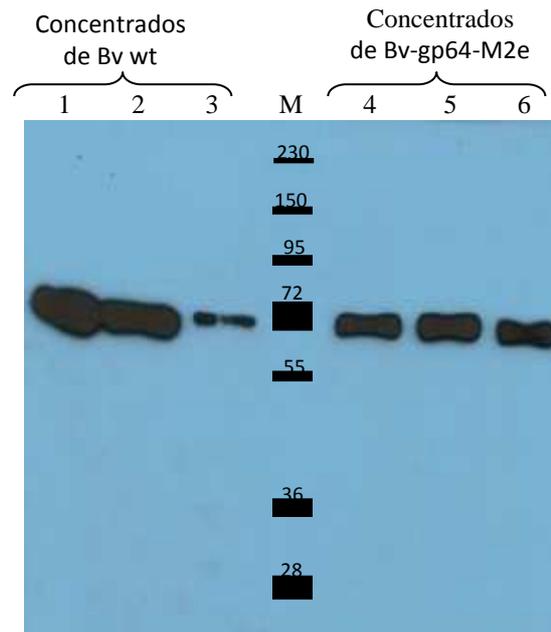


Figura 4.44. Western blot de los producciones de baculovirus concentradas por ultracentrifugación. Calles 1, 2 y 3: concentrados de tres producciones de Bv wt; **calles 4, 5 y 6:** concentrados de producciones de Bv gp64-M2e. **M:** Marcador de PM (Fermentas). Para la detección se utilizó un anticuerpo monoclonal anti gp64 (dilución 1/3000). Gel de poliacrilamida 10%. Revelado utilizando un sustrato quimioluminiscente de la enzima peroxidasa. (SuperSignal®, Pierce)

Objetivo B.3. Utilización de la proteína decamérica lumazina sintetasa de *Brucella abortus* (BLS) como carrier presentador del péptido M2e.

En esta etapa nos propusimos inicialmente expresar la porción extra-citoplasmática de la proteína Matriz 2 (M2) del virus de influenza como fusión a la lumazina sintetasa de *Brucella abortus* (BLS). El grupo del Dr Fernando Goldbaum (Instituto Leloir), con quien hemos establecido una colaboración, ha demostrado a través de numerosas publicaciones la capacidad de la proteína BLS como "carrier" de antígenos (Sciutto E, 2005) así como también sus propiedades inmunoestimuladoras y su capacidad de inducir una respuesta humoral y celular contra antígenos heterólogos (Rosas G, 2006).

Este proyecto constituye un desarrollo novedoso y prometedor en relación a vacunas universales contra influenza ya que involucra la utilización de un "carrier" e inmunoestimulador potente que podría elevar significativamente la respuesta contra el péptido M2e y por lo tanto ampliar la capacidad cross-protectora de la respuesta generada.

4.12. Expresión de las quimeras de BLS y BLS-M2e

4.12.1. Caracterización de las quimeras recombinantes de BLS y BLS-M2e

Como se detalló arriba, en esta etapa del trabajo se evaluó el posible uso de la proteína decamérica lumazina sintetasa de *Brucella abortus* (BLS) desarrollada en el Instituto Leloir, fusionada al péptido M2e, ya sea en una copia única o como un tandem de 4 copias (4M2e). Tanto la quimera BLS-M2e como la BLS-4M2e se expresaron eficientemente en *Escherichia coli* y fueron purificadas a homogeneidad (Fig 4.45 A). Así también, y en el mismo sistema, se expresó la proteína BLS para ser utilizada como control de los ensayos. La identificación se realizó por WB utilizando un anticuerpo monoclonal contra BLS o un anticuerpo policlonal contra el péptido M2e según se indica (Fig 4.45, B y C)

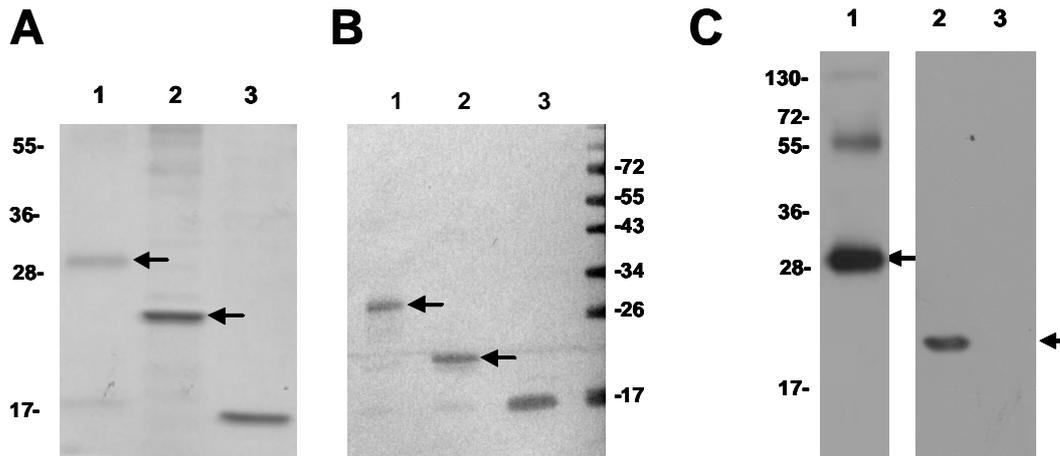


Figura 4.45. Expresión de las proteínas de fusión recombinantes basadas en la proteína BLS. (A) SDS-PAGE, teñido con *Coomassie Blue*. **Calle 1:** BLS-4M2e (0,3 μ g); **calle 2:** BLS-M2e (2 μ g) y **calle 3:** BLS (2,5 μ g). **(B)** *Western blot* de las quimeras utilizando un anticuerpo monoclonal anti-BLS. **Calle 1:** BLS-4M2e (0,5 μ g); **Calle 2:** BLS-M2e (0,5 μ g), y **calle 3:** BLS (0,7 μ g). **(C)** *Western blots* de BLS y sus quimeras utilizando un anticuerpo policlonal anti-M2e. **Calle 1:** BLS-4M2e (0,5 μ g); **Calle 2:** BLS-M2e (0,5 μ g), y **calle 3:** BLS (0,7 μ g). Las flechas indican la posición de las proteínas de fusión BLS-M2e recombinantes.

A fin de evaluar la estructura secundaria de las quimeras se realizó la determinación del espectro de dicroísmo circular (DC) de ambas quimeras. Como puede observarse en la Figura 4.46 A, los espectros fueron prácticamente idénticos al obtenido a partir de la proteína BLS, indicando que la estructura secundaria en general no sufrió cambios luego de la inserción de los péptidos. Por otro lado, la estabilidad térmica similar de BLS, BLS-M2e y BLS-4M2e por espectroscopia DC, indica que los dominios de BLS se plegaron en forma apropiada en las quimeras (Fig. 4.46 B); resultando el valor de los T_m aparentes en las transiciones térmicas de aproximadamente de 87°C para las tres proteínas. Así también, se determinaron por *Light Scattering System* (SLS) los pesos moleculares de las 3 proteínas recombinantes. Los resultados obtenidos se corresponden a los esperados para 10 moléculas de cada una de ellas confirmando que las distintas quimeras asociaron formando estructuras decaméricas (Fig 4.46 C). Los PM obtenidos fueron: BLS-4M2e, 278 kDa (peso teórico 275 kDa), BLS-M2e, 213 kDa (peso teórico 195 kDa) y BLS wt, 198 kDa (peso teórico 185 kDa).

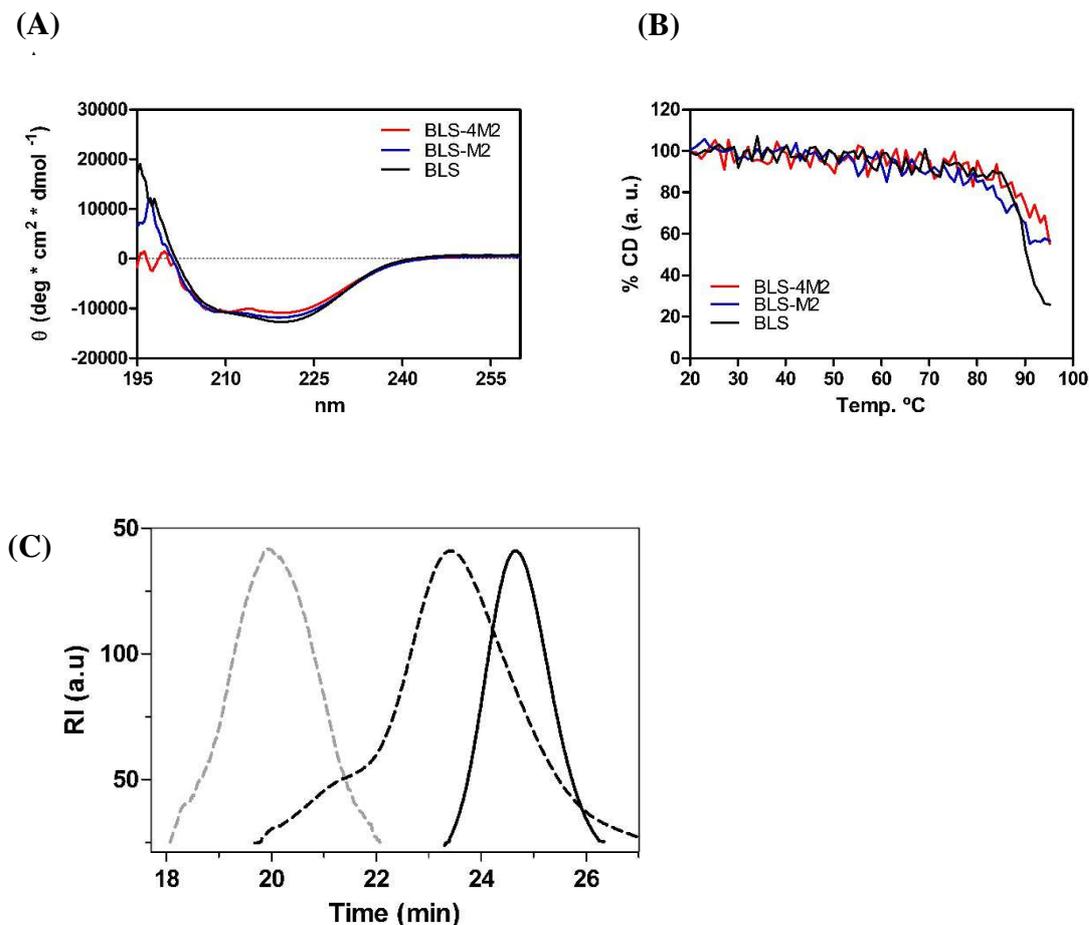


Figura 4.46. Estudios de estabilidad del carrier BLS y las BLS quiméricas con péptidos M2e. (A) El espectro de dicroísmo circular (UV lejano) expresado como elipicidad molar o θ de BLS (línea negra), BLS-M2e (línea azul) y BLS-4M2e (línea roja) pueden superponerse, mostrando que las quimeras tiene la misma estructura secundaria en general que BLS. (B) Desnaturalización termal de BLS (línea negra), BLS-M2e (azul) y BLS-4M2e (roja), monitoreada por UV-CD expresado como % de la señal a 222 nm a 20°C. (C) Cromatografía de exclusión por tamaño. Las proteínas fueron corridas en una columna Superdex 200. La elución fue monitoreada por medición de señales de la dispersión de la luz a 90 grados, a un flow rate de 0,5 ml/min (Light Scattering System). El PM experimental de las diferentes proteínas fue medida según descripto y el valor obtenido fue: para BLS-4M2e (línea de rayas gris) 278 kDa (peso teórico 275 kDa), BLS-M2e (línea de rayas negra) 213 kDa (teórico 195 kDa) y BLS wt (línea negra continua) 198 kDa (teórico 185 kDa).

4.12.2. Experimentos dosis/respuesta

A fin de evaluar inicialmente la respuesta inmune al inocular las quimeras en ratones, se determinaron los niveles de anticuerpos obtenidos en grupos de animales SPF (specific pathogen free) de 60 días de edad inoculados con 5, 10 o 25 μg de BLS o BLS-M2e formuladas en hidróxido de aluminio. Se administraron 3 dosis cada 21 días y se tomaron muestras de suero a los 15 días siguientes a cada dosis. Como puede observarse en la figura 4.47 A, a los quince días después de la segunda y tercer dosis se obtuvieron títulos altos de anticuerpos específicos anti-M2e en todos los grupos, excepto en los grupos

vacunados con el carrier BLS, observándose una respuesta dosis-dependiente. A partir de estos resultados se eligió la dosis de 10 µg para las inmunizaciones sub-siguientes.

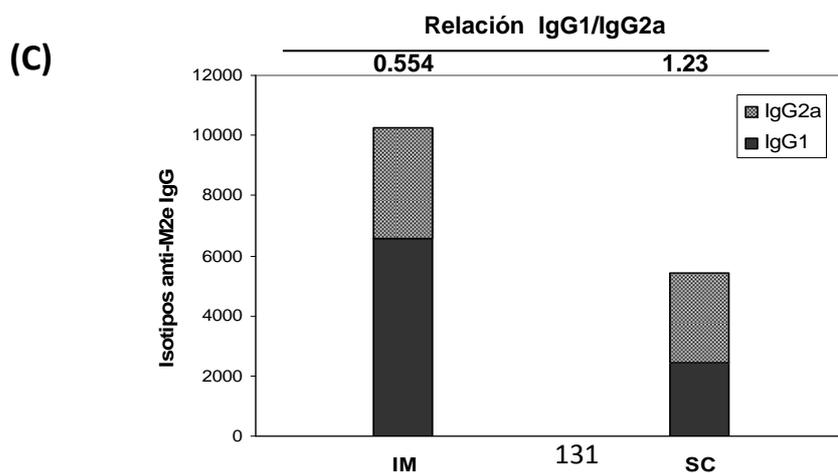
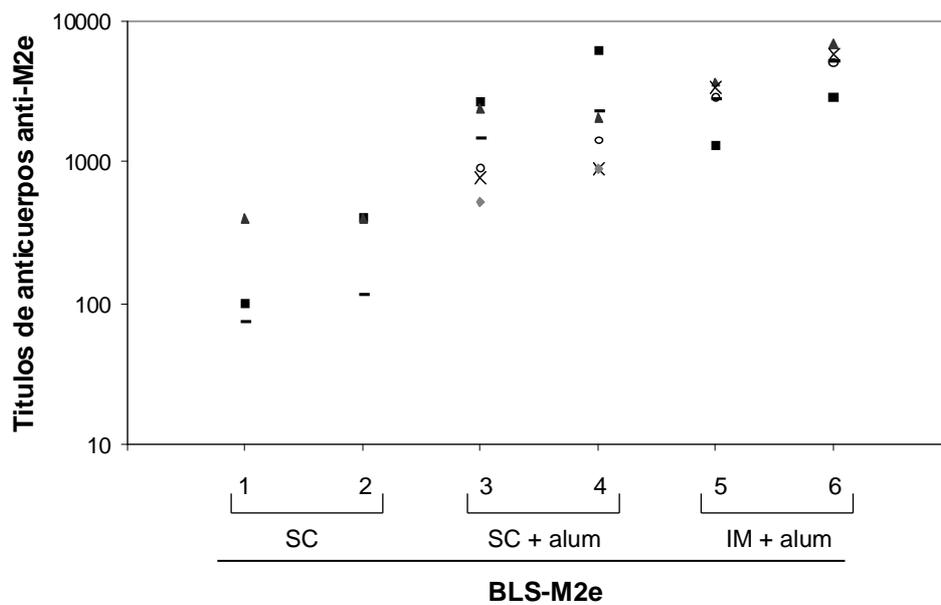
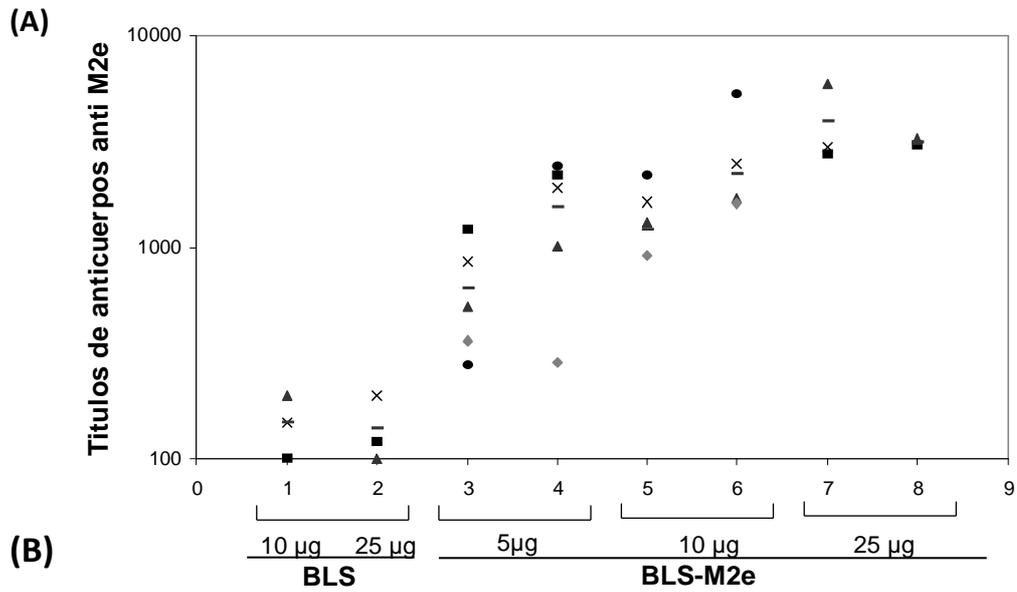


Figura 4.47. Detección de anticuerpos específicos contra M2e en ratones inmunizados con BLS-M2e recombinante. (A) Curva dosis-respuesta. Se inmunizaron ratones BALB/c por vía subcutánea (SC) con 5, 10 o 25 µg de BLS-M2e o BLS formuladas en hidróxido de aluminio. Los animales fueron inoculados 3 veces con intervalos de 3 semanas entre cada dosis. Se analizaron por ELISA diluciones seriadas de los sueros. Las calles 3, 5, y 7 corresponden a la segunda dosis mientras que las calles 4, 6 y 8 corresponden a la tercera dosis. Las calles 1 y 2 corresponden a la tercera dosis con 10 o 25 µg del carrier BLS solo respectivamente. **(B)** Análisis de la utilización de distintas vías de inmunización. Se inmunizaron grupos de ratones por vía SC o intramuscular (IM) con 10 µg de BLS-M2e formulada con o sin hidróxido de aluminio como adyuvante, como se indica. Se administraron 3 dosis con intervalos de 3 semanas. Los datos graficados en los paneles A y B corresponden a animales individuales. Calles 1, 3 y 5, corresponden a la segunda inoculación. Calles 2, 4, y 6 corresponden a la tercera inoculación. En cada caso se indica la media con una raya (-). **(C)** Se determinaron por ELISA los isotipos IgG1 e IgG2a de los anticuerpos desarrollados luego de inoculación con BLS-M2e por vía IM o SC. Gris oscuro: IgG1; gris claro: IgG2a.

4.12.3. Caracterización de la respuesta inmune desarrollada en ratones BALB/c e inoculados por diferentes vías y/o con diferentes adyuvantes

A fin de determinar las condiciones óptimas para la obtención de una respuesta por anticuerpos elevada, un grupo de ratones recibió 10 µg de la proteína BLS-M2e por vía SC, mientras que el segundo y tercer grupo recibieron la misma dosis de BLS-M2e pero formulada en hidróxido de aluminio por vía SC o IM, respectivamente. Como puede observarse en la figura 4.47 B, los animales inoculados por vía IM generaron títulos altos de anticuerpos específicos anti-M2e a partir de la segunda dosis y las respuestas fueron más homogéneas entre los distintos individuos (calles 5 y 6). También puede observarse en la figura (calles 1 a 4) que la co-administración de hidróxido de aluminio conlleva a la generación de títulos de anticuerpos significativamente más elevados.

En relación al tipo de respuesta obtenido, la inmunización por vía IM produjo un aumento de títulos de IgG1, con un cociente IgG2a/IgG1 de 0,554, sugiriendo una respuesta inmune de tipo Th2 (Fig. 4.47 C) mientras que, la inoculación por vía SC indujo una respuesta con un cociente IgG2a/IgG1 de 1,23, indicativo de una respuesta de tipo Th1. Si bien los ratones infectados con virus influenza generalmente no desarrollan niveles detectables de anticuerpos contra M2, recientemente ha sido reportado en animales vacunados con proteínas quiméricas de M2e, que anticuerpos de ambos isotipos se encuentran involucrados en la protección contra influenza (El Bakkouri y col., 2011). Por esta razón, la vía de inoculación SC, que en nuestro caso produjo una respuesta IgG2a/IgG1 más balanceada, fue seleccionada para ser usada en los experimentos sub-siguientes.

A continuación se analizó el efecto de otros adyuvantes descriptos recientemente y evaluados para uso en humanos, tal como ISCOM MATRIX (IMX[®]) y alfa-galactosil ceramida (αGC). En este sentido, IMX[®] es un adyuvante capaz de inducir una respuesta inmune, humoral y celular, importante tanto en animales como en humanos (Pearse y col., 2005) y ha sido últimamente experimentado en vacunas de influenza (McKenzie A y col., 2010). Por otro lado, αGC es un glicolípido con fuerte actividad inmunomoduladora y fue probado exitosamente en otras vacunas contra influenza también basadas en

M2e (Li K y col., 2011). En el caso de la quimera BLS-M2e, la inclusión de IMX® en la formulación tuvo un efecto notable en el nivel de respuesta, mientras que la formulación con α GC no produjo un nivel de anticuerpos diferente al obtenido con la quimera sin adyuvante (Fig. 4.48). Cabe mencionar que los animales del grupo control inmunizados con el carrier BLS no generaron títulos de anticuerpos contra M2e (dato no mostrado).

Finalmente, se recolectaron suero y saliva a las dos semanas después de la tercera inmunización a partir de los grupos de ratones BALB/c inoculados por vía intranasal (IN) con 10 μ g de la proteína BLS-M2e, sola o formulada con monophosphoril lipid A (MPL), IMX® o α GC (adyuvantes descriptos como activadores del sistema inmune de mucosas). A partir de estos ensayos, todos los grupos mostraron títulos muy bajos por ELISA en todas las condiciones testeadas (datos no mostrados).

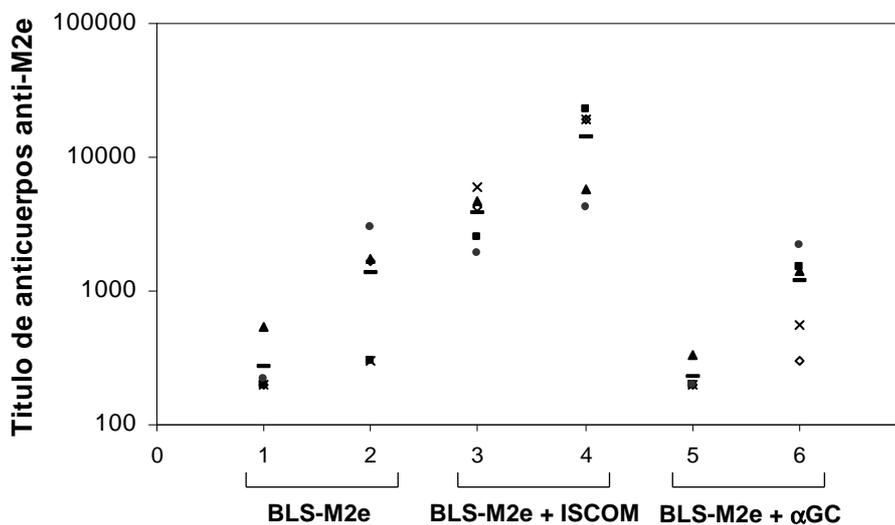


Figura 4.48. Efecto del uso de diferentes adyuvantes en la respuesta inmune obtenida contra la proteína BLS-M2e. Se inmunizaron ratones BALB/c por vía SC con 10 μ g de la proteína BLS-M2e. Los animales recibieron 3 dosis del inmunógeno con intervalos de 3 semanas entre cada una y formulado como se indica en cada caso. Los niveles de anticuerpos específicos anti-M2e (IgG) fueron analizados por ELISA en sueros recolectados dos semanas después de la segunda y tercera inmunización. Los datos mostrados corresponden a cada animal individual. Calles 1, 3 y 5, corresponden a la segunda inoculación. Calles 2, 4, y 6 corresponden a la tercera inoculación. Los valores medios están indicados con una raya (-).

Posteriormente quisimos evaluar la influencia en la respuesta inmune obtenida al inocular los animales con quimeras conteniendo distinto número de copias del péptido M2e. De esta manera se inmunizaron ratones con 10 μ g de la quimera BLS-4M2e o de la quimera BLS-M2e purificadas, sin adición de adyuvante. En este caso puede observarse que se indujo seroconversión en ambos grupos de ratones, pero los títulos de anticuerpos específicos anti-M2e fueron significativamente más altos en los

grupos inoculados con la quimera BLS-4M2e que los inmunizados con la quimera BLS-M2e (Fig. 4.49). Los títulos de anticuerpos contra el carrier BLS en los animales inoculados con BLS-M2e o BLS-4M2e fueron de 1/600,000 y 1/100,000, respectivamente.

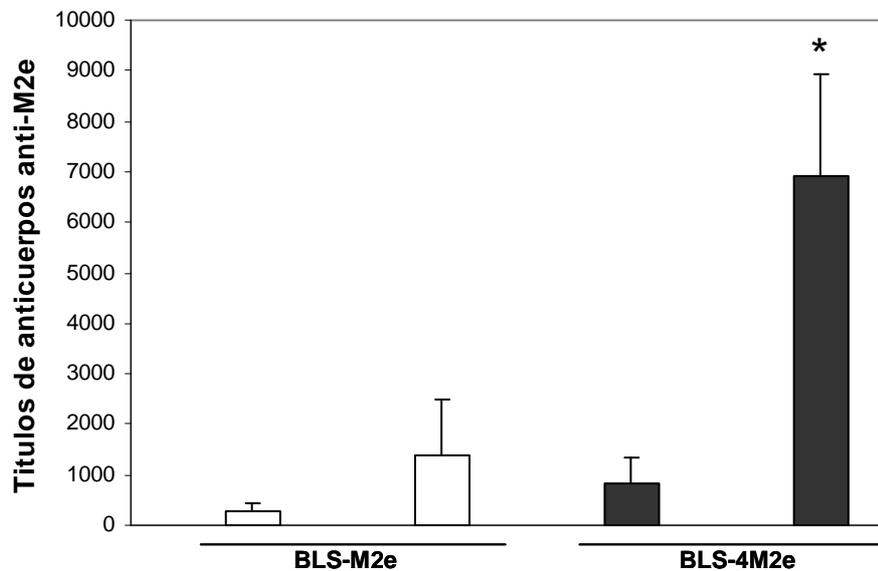
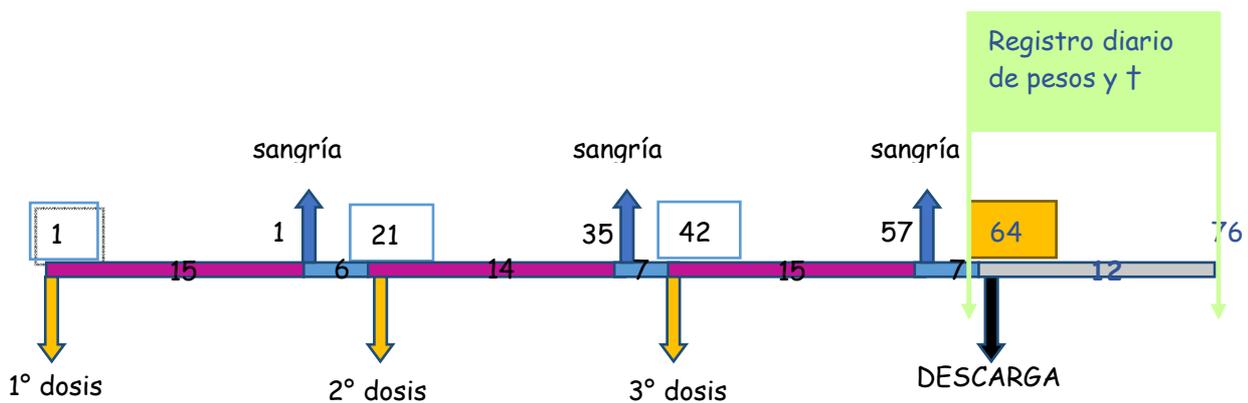


Figura 4.49. Respuesta de anticuerpos desarrollada por ratones inmunizados con BLS-M2e o BLS-4M2e en ausencia de adyuvantes. Se inmunizaron grupos de 5 ratones BALB/c con 10 µg de BLS-M2e o BLS-4M2e en PBS y re-inoculados dos veces con intervalos de 3 semanas. Se analizaron por ELISA los niveles de anticuerpos específicos anti-M2e luego de la segunda o tercera inoculación. Los datos están expresados como la media ± DS. El asterisco señala diferencias significativas ($p < 0.05$) en la respuesta inmune.

Objetivo B.4. Evaluación de la inmunogenicidad y protección de las vacunas basadas en M2e en el modelo ratón.

4.13. Pruebas de inmunogenicidad y protección de las vacunas basadas en el péptido M2e

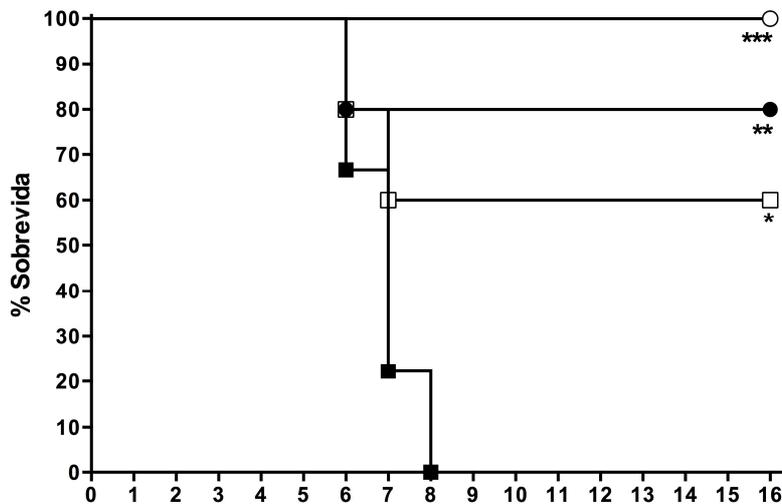
El esquema de inmunización consistió en la aplicación de tres dosis por vía subcutánea a intervalos de 21 días; al término de la tercera dosis se realizó la descarga con 5 DL₅₀ de virus adaptado a ratón de la cepa A/PR/8/34. A continuación se muestra un esquema temporal del plan de inmunización y descarga.



4.13.1. Protección en ratones inoculados con la quimera BLS-4M2e

Las pruebas de protección fueron realizadas en grupos de 5 ratones BALB/c vacunados con 10 µg de la quimera BLS-4M2e formulada con hidróxido de Aluminio, IMX® o sin agregado de adyuvante. Se incluyó como control negativo un grupo de animales vacunados con PBS, el cual no fue desafiado pero aportó el control de la curva de peso de ratones normales durante el curso del experimento. Los animales fueron desafiados dos semanas después de la tercera inoculación por vía IN con 5 DL₅₀ de virus adaptado a ratón de la cepa A/PR/8/34 como ya se mencionó.

(A)



(B)

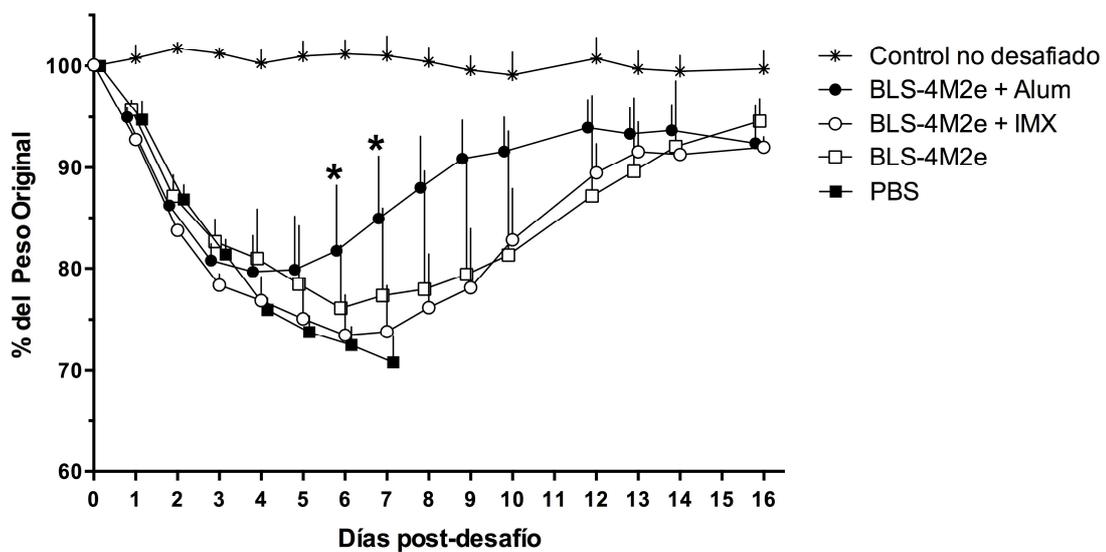


Figura 4.50. Ensayo de protección al desafío con virus de influenza de ratones inmunizados con la quimera BLS-4M2e. Se vacunaron grupos de 5 ratones BALB/c con la quimera BLS-4M2e, no adyuvada o formulada con IMX[®] o formulada con hidróxido de aluminio, así como un grupo de ratones inoculados solamente con PBS. Los animales fueron desafiados 2 semanas después del segundo *boost* por vía intranasal con 5 LD₅₀ del virus de influenza A/PR/8/34 adaptado a ratón. **(A)** Supervivencia luego de desafío. Los ratones vacunados con BLS-4M2e fueron protegidos significativamente en comparación con los placebos vacunados. Una protección del 100% se logro con BLS-4M2e + IMX[®] (log-rank test, $P < 0.001$); 80% de protección con BLS-4M2e + alum (log-rank test, $P < 0.01$) y 60% con BLS-4M2e sin adyuvante (log-rank test, $P < 0.05$). **(B)** Pérdida de peso de los animales luego del desafío. Se encontraron diferencias significativas en la morbilidad entre los ratones vacunados con PBS o con BLS-4M2e + alum en los días 6 y 7 post-desafío (t -test, $P < 0.05$, indicado por el

asterisco). La recuperación de peso en el grupo vacunado con BLS-4M2e + alum fue significativamente más rápida en los días 7, 8, 9 y 10 pd ($P < 0.05$). El grupo de ratones no desafiado fue incluido a fin de proveer una curva de control de peso. Los DSs están indicados por día y por grupo.

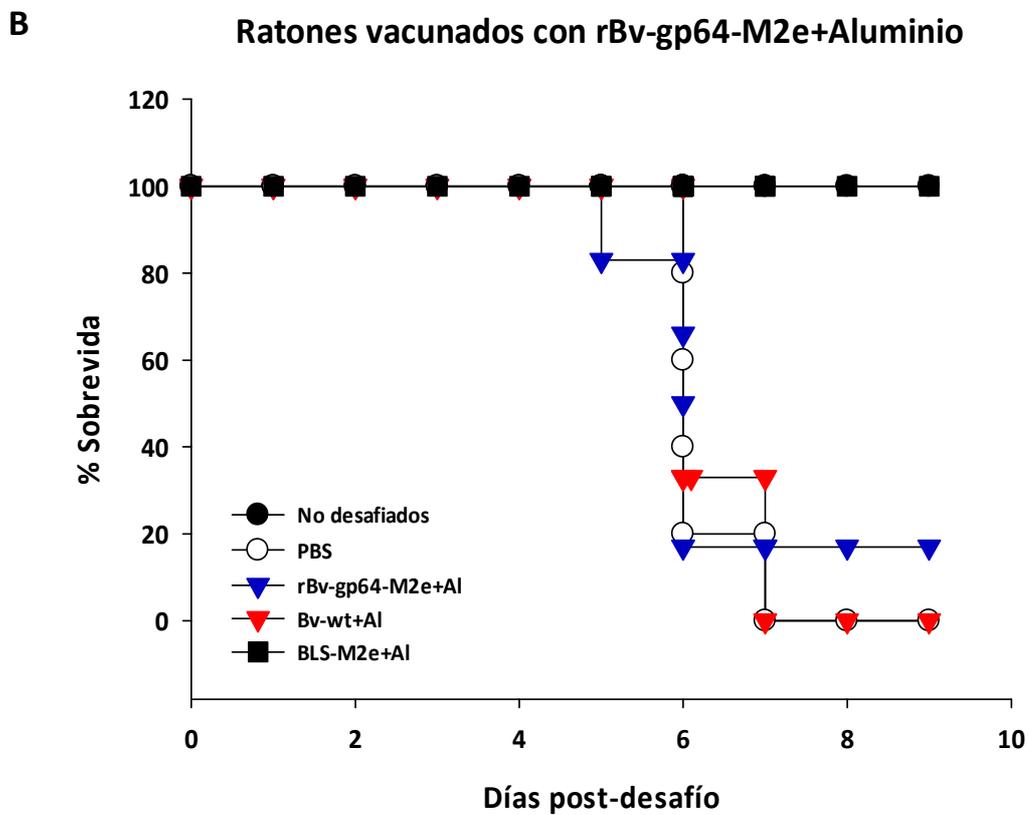
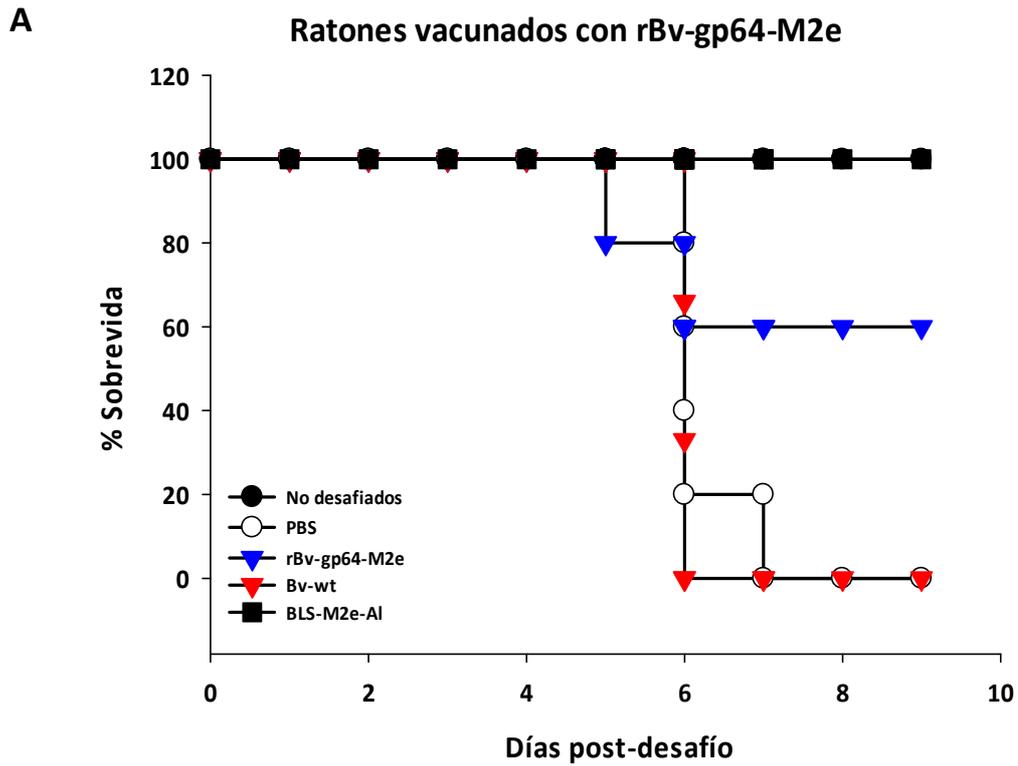
Como se observa en la Fig. 4.50 A, la vacunación con la quimera BLS-4M2e sin agregado de adyuvante produjo un 60% de protección. El porcentaje de protección aumenta cuando la quimera fue formulada con hidróxido de Al (80% de protección), alcanzando el 100% de protección en el caso de la formulación con IMX[®]. Los títulos promedio de anticuerpos antes del desafío fueron 1/4,260; 1/10,900 y 1/24,931 para los grupos inoculados con BLS-4M2e, BLS-4M2e+alum y BLS-4M2e + IMX[®], respectivamente. El porcentaje de pérdida de peso promedio en cada grupo de ratones después del desafío se muestra en la Fig. 4.50 B. Siete días después del desafío, los animales que sobrevivieron en los 3 grupos vacunados con las quimeras recuperaron el peso gradualmente, aproximándose al peso inicial a los 16 días post desafío.

4.13.2. Protección en ratones inoculados con rBv gp64-M2e

Se realizaron ensayos de protección en grupos de 3 a 5 ratones BALB/c inmunizados con las siguientes preparaciones:

- *rBv- gp64-M2e
- *rBv-gp64 -M2e + Aluminio
- *rBv-gp64 -M2e+ adyuvante de Freund
- *BLS-M2e + Aluminio
- *Bv-wt
- *Bv-wt + Aluminio
- *Bv-wt + adyuvante de Freund
- *PBS

Una vez desafiados, los animales fueron examinados diariamente para registrar su peso, signos clínicos de la infección por influenza y supervivencia. Con los datos recogidos, se confeccionaron los gráficos que se muestran a continuación:



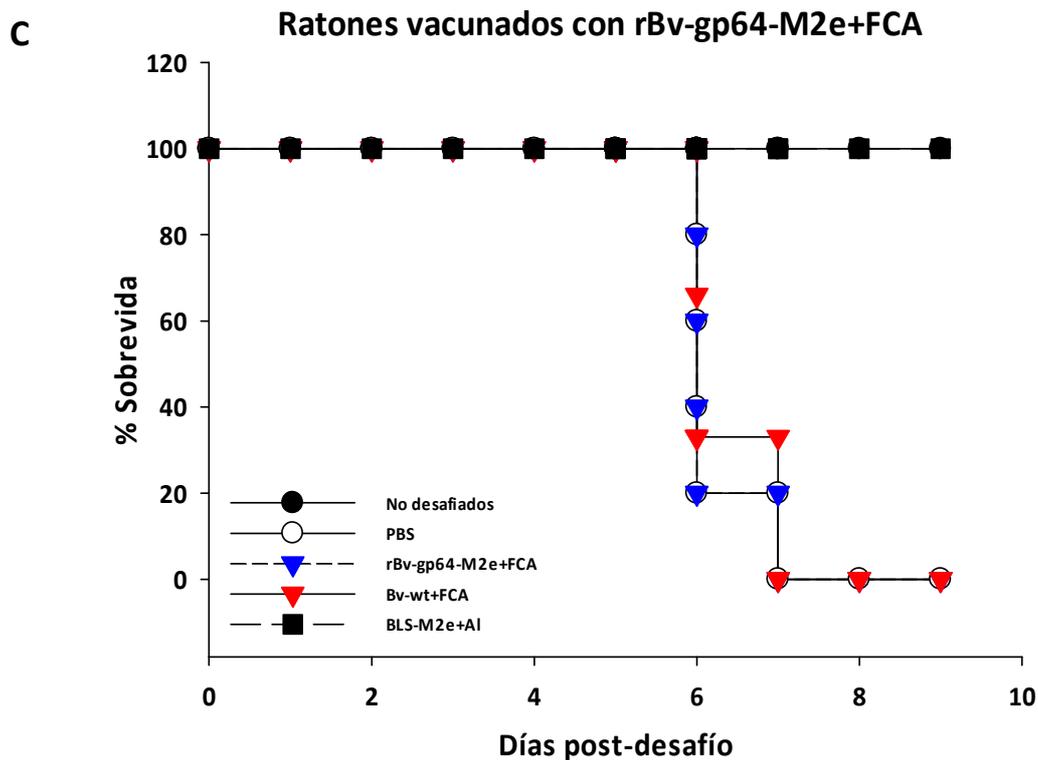
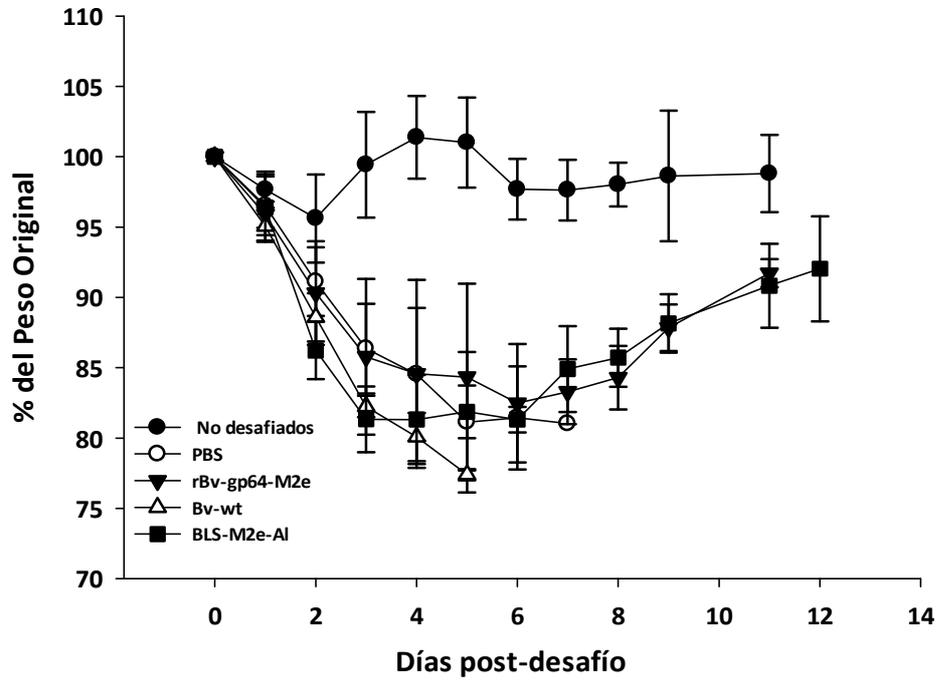


Figura 4.51. Porcentaje de supervivencia de ratones inmunizados con formulaciones que contienen M2e con sus controles. A. Grupo de ratones inmunizados con rBv-gp64-M2e sin adyuvante. B. Grupo de ratones inmunizados con rBv-gp64-M2e + aluminio. C. Grupo de ratones inmunizados con rBv-gp64-M2e + adyuvante de Freund (FCA). En cada gráfico se marca en color azul la respuesta del grupo de ratones inmunizados con el rBv-gp64-M2 (con o sin adyuvante según corresponda) y en rojo su control con Bv-wt.

Como puede observarse en los gráficos, el grupo inmunizado con rBV-gp64-M2e fue el que mejor respuesta presentó (porcentaje de supervivencia luego de la descarga: 60%) respecto de su control, ratones inmunizados con Bv-wt en el cual todos los animales murieron. En los casos en los que se administró el virus recombinante citado asociado a un adyuvante, tanto aluminio como adyuvante de Freund, el porcentaje de protección disminuyó a aproximadamente un 20%; en estos casos también los controles con Bv-wt + el adyuvante respectivo presentó la muerte de todos los animales. Como controles se utilizaron: animales vacunados con BLS-M2e + aluminio que presentaron 100% de protección ante la descarga con el virus de desafío, animales inoculados con PBS desafiados (0% de supervivencia) y animales no desafiados.

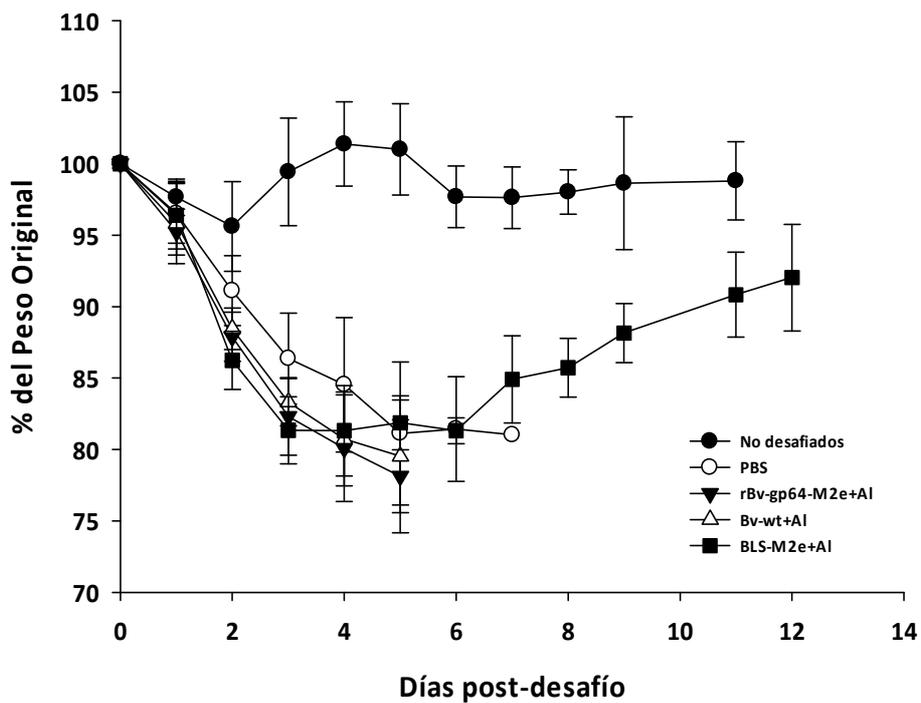
A

Ratones vacunados con rBv-gp64-M2e



B

Ratones vacunados con rBv-gp64-M2e+Aluminio



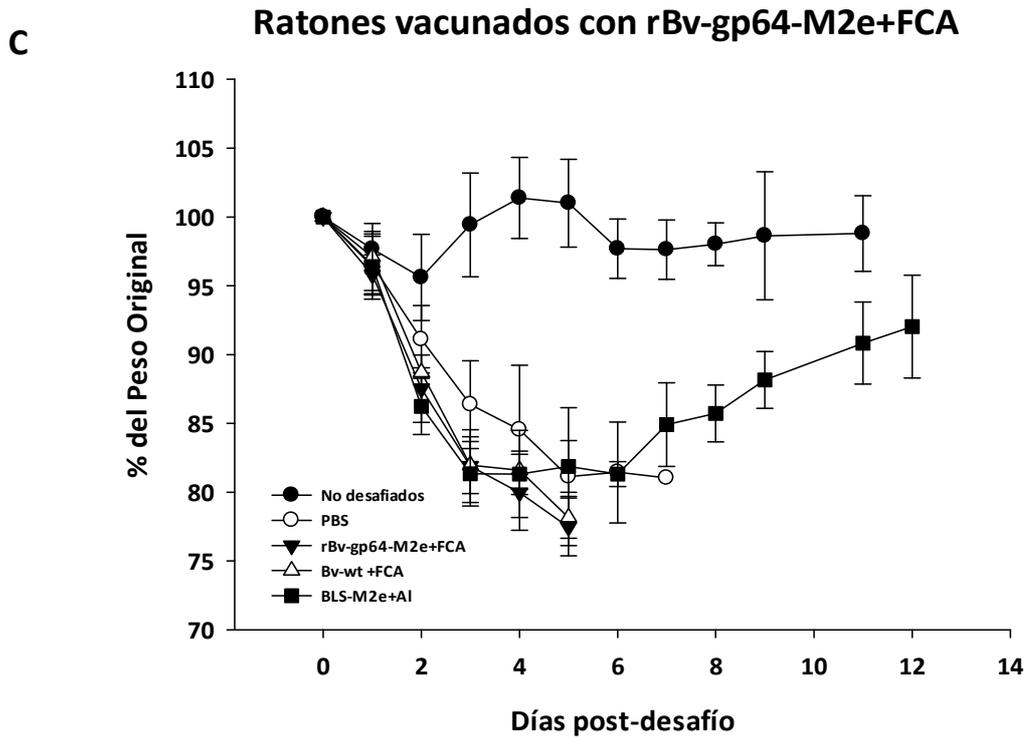


Figura 4.52. Curva de pesos de los distintos grupos vacunados con sus controles. A. Grupo de ratones inmunizados con rBv-gp64-M2e sin adyuvante. **B.** Grupo de ratones inmunizados con rBv-gp64-M2e + aluminio. **C.** Grupo de ratones inmunizados con rBv-gp64-M2e + adyuvante de Freund (FCA).

Respecto de las curvas de peso, los animales inmunizados con BLS-M2e+aluminio presentaron los primeros 5 días mayor disminución de peso que el control inoculado con PBS y que los ratones inmunizados con rBV-gp64-M2e pero luego fueron mostrando una tendencia a la recuperación del peso inicial. En este caso, también se observa mejor respuesta de los animales inmunizados con rBv-gp64-M2e que su control (Bv-wt) y que las formulaciones con adyuvante como era de esperar luego de las curvas de supervivencia.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El objetivo general de este trabajo de tesis doctoral fue el diseño y expresión de antígenos recombinantes derivados de proteínas inmunodominantes y/o conservadas de cepas del virus de influenza, con aplicación potencial en vacunas antigripales para epidemias estacionales o pandemias.

Las vacunas tradicionales basadas en la producción en huevos han sido usadas exitosamente por más de 50 años. Son confiables y efectivas (si hay una buena coincidencia con la cepa circulante) y accesibles. Sin embargo este tipo de producción es lenta y estrictamente dependiente de la disponibilidad de huevos embrionados y no permiten la generación de lotes vacunales en forma rápida en caso de ocurrir una pandemia. Dos nuevas posibilidades se muestran promisorias para reemplazar esta tecnología: una está basada en la producción de antígenos tradicionales en cultivos celulares y la otra en antígenos recombinantes. La primera está disponible en el mercado en este momento en pequeñas cantidades. Una de las limitaciones es que el proceso de producción en cultivos celulares, al igual que el proceso en huevos, requiere la generación de virus "reassortantes" para las nuevas semillas, y otra es el bajo rendimiento.

La idea central del presente trabajo fue aportar a la segunda opción, es decir aplicar tecnologías modernas al desarrollo de vacunas que deben proveer de inmunógenos aptos de ser producidos rápidamente en grandes cantidades, para prevenir un patógeno altamente variable, que puede sufrir sorpresivos cambios antigénicos. La protección debería comprender, de acuerdo a la situación epidemiológica que se trate, desde una respuesta protectora a las esperables variaciones puntuales que se acumulan progresivamente en las proteínas de superficie del virus, hasta los sorpresivos saltos antigénicos por introducción de genes de otras especies, que generan cepas quiméricas, que se presentan a una población casi virgen para este tipo de variaciones.

La hipótesis de trabajo fue, por un lado, generar inmunógenos vacunales **recombinantes para cepas estacionales**, los cuales se basarían en la hemaglutinina viral, que es donde se producen la mayor cantidad de cambios antigénicos de este tipo. La propuesta concreta fue la obtención de una vacuna trivalente basada en la HA viral. Se trabajó para ello con las cepas de la OMS disponibles al momento del inicio del trabajo [2004: A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Panamá/2007/99 (H3N2) y B/Yamanashi/166/98] y se eligió el sistema de expresión baculovirus/células de insecto, inspirado en un proyecto viable ("Flublock®") que desde hace algunos años desarrolla la empresa Protein Sciences [Cox M.M.J., Hashimoto Y. A fast track influenza virus vaccine produced in insect cells. *Minireview. Journal of Invertebrate Pathology* 107 (2011) S31–S41].

Por otro lado, la segunda hipótesis fue desarrollar inmunógenos **de amplio espectro de protección** capaces de generar inmunidad heterosubtípica contra distintas cepas del virus de influenza, basada en la

expresión de antígenos que están conservados en muchas cepas humanas y en cepas potencialmente pandémicas que infectan a distintas especies de animales. La propuesta fue la obtención de inmunógenos conservados que se expondrían al sistema inmune de forma particulada, y se eligieron la nucleoproteína (NP) y el ectodominio de la proteína Matriz 2 (M2e).

5.1. Expresión de hemaglutininas virales en cultivos de células de insecto

El diseño de inmunógenos basados en la HA tuvo como objetivo específico contribuir a la sustitución de las vacunas estacionales importadas producidas en huevos embrionados, por otra tecnología de generación más avanzada.

Para producir las HA se utilizaron dos sistemas comerciales de clonado en Bv: *Baculogold* y *Bac-to-bac* y el vector *pVL-Sup1*, apto para fusionar secuencias heterólogas a la señal de la proteína gp64 de Bv.

Para la expresión, de las HAs se trabajó en cultivos celulares en monocapa y suspensión, obteniéndose títulos de semillas de trabajo de Bv recombinantes del orden de 10^7 a 10^8 UFP/ml. La purificación de las proteínas supuso una dificultad grande debido a que a pesar de que se testearon distintas condiciones, y sistemas (columnas de intercambio iónico, de níquel o de afinidad) hubo poca o casi nula liberación de la HA de las membranas de las células infectadas.

Pero el inconveniente central de fondo fue la **baja producción** de HA y su **insolubilidad**.

Para aumentar la producción de HA y/o su expresión en forma soluble en el sobrenadante de los cultivos, se comenzó por realizar la delección del dominio trans-membrana y el cambio de la secuencia señal. La hipótesis de trabajo fue que se podrían mejorar los rendimientos de proteína recombinante, en especial en el sobrenadante de cultivo, utilizando la señal de secreción de la glicoproteína de superficie gp64 de Bv y que la eliminación de la región trans-membrana facilitaría la solubilidad ($r\Delta HA_{gp}$). Se utilizó como modelo la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1) y se trabajó en la optimización de la producción de la $r\Delta HA_{gp}$ en cultivos de células *Sf9* en monocapa, evaluando los niveles de expresión variando distintos factores de cultivo e infección como el tiempo de cosecha y la multiplicidad de infección. Pero, aunque se lograron títulos un poco más altos de las semillas de trabajo (5×10^7 UFP/ml), la $r\Delta HA_{gp}$ se expresó solo en *pellets* celulares y los tratamientos evaluados sólo permitieron extraer una mínima proporción de la proteína recombinante a partir del *pellet* celular.

La siguiente hipótesis de trabajo fue que la optimización de la secuencia del gen de HA para la expresión en el sistema Bv/células de insecto aumentaría los niveles de expresión, ya que esta estrategia resultó en otros casos en un aumento del rendimiento de proteína recombinante. Los resultados indicaron que los niveles de expresión de la proteína recombinante (rHA_{op}) siguieron siendo

bajos, ya que al igual que en los casos anteriores, rHA_{op} sólo pudo ser detectada en ensayos de *Western Blot*. De todos modos, los títulos de las semillas de Bv recombinantes fueron más altos, indicando una cierta mejora del sistema ($1,25 \times 10^9$ UFP/ml).

El último diseño que se experimentó fue la combinación de una molécula HA con secuencia optimizada y el reemplazo del dominio transmembrana propio por un dominio de trimerización heterólogo (rHA_T). La hipótesis de trabajo fue que se favorecería el rendimiento (por secuencia optimizada) y la solubilidad de la proteína por la formación de trímeros estables, a la vez que mejoraría la presentación al sistema inmune.

Como conclusión, se puede decir que la expresión de la HA tuvo un aspecto exitoso en cuanto a su antigenicidad, ya que fue reconocida por sueros de referencia específicos, pero los niveles de producción fueron bajos y fue muy difícil detectar la proteína en geles teñidos con *Coomassie blue*. Por lo que no se cuenta aún con un proceso en condiciones de producir en escala, y se requiere mayor trabajo de optimización. Todas las modificaciones mencionadas se ensayaron con la HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1), pero al comienzo del trabajo se expresaron también las rHA de otras dos cepas, A/H3N2 y B, que compondrían esta vacuna.

Como última posibilidad dentro de los términos temporales de esta tesis, se clonó y expresó la subunidad HA₁. La hipótesis de trabajo fue similar al objetivo 2, pero generando un inmunógeno vacunal en cultivos de células de insecto en suspensión que consista solo en el dominio globular HA₁ (con secuencia señal propia, sin región HA₂, y sin dominio trans-membrana), y se utilizó como modelo la secuencia de la HA una cepa potencialmente pandémica del subtipo A/H5N1 [A/VietNam/1203/2004 (H5N1)] que había sido enviada a nuestro laboratorio por el CDC (Atlanta, USA).

En este caso se detectó rΔHA₅ tanto en la fracción de células como en el sobrenadante de cultivo, en proporciones dependientes de la multiplicidad de infección. Por lo tanto, a pesar que no se alcanzó a poner a punto en este trabajo la etapa de purificación de esta proteína, se podría elegir la MOI en dependencia de la fracción con que se desee trabajar para los pasos sub-siguientes (Fig. 4.27 y 4.28).

Es importante señalar, que la porción de la subunidad HA₁, ha resultado ser muy inmunogénica y contiene todos los dominios inmunodominantes necesarios en una vacuna de tipo estacional, aunque no se han realizado con este prototipo la batería de pruebas clínicas completadas para el registro de la HA completa como en el caso de Flublok®.

5.2. Obtención de inmunógenos de amplio espectro de protección contra influenza

En esta segunda parte del trabajo se eligieron dos proteínas y tres prototipos: (i) la exposición de la NP en la cápside de la partícula de baculovirus, (ii) la exposición del péptido M2e en la membrana de la partícula de Bv y (iii) la exposición del péptido M2e en proteína decamérica lumazina sintasa de *Brucella abortus*.

Sin precisar acá las particularidades de cada diseño que ya fueron desarrollados en las secciones de Materiales y Métodos y Resultados, podría sintetizarse que las dos variantes de exposición de M2e al sistema inmune resultaron protectivas y validaron la hipótesis de trabajo, mientras que la NP fue expresada abundantemente pero no se incorporó a la cápside del virión, probablemente debido al gran tamaño de la proteína de fusión NP-VP39. Esta misma molécula fue expresada y purificada en grandes cantidades tanto en el sistema Bv/células de insecto como en bacterias en un trabajo en colaboración realizado con IMBECU, CONICET (Cargnelutti y col., *Bioengineered* 2013, 4(6), 1-5; Cargnelutti y col., *J. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 22(3), 416–421).

La utilización de la plataforma BLS, desarrollada en el Instituto Leloir, como carrier presentador del péptido M2e al sistema inmune fue el diseño más exitoso. Se desarrollaron quimeras con la proteína decamérica BLS decorada con 10 a 40 copias de M2e, que ha sido considerado un candidato muy promisorio para una vacuna de amplia protección contra influenza debido a que los anticuerpos contra M2e son protectivos en modelos animales y capaces de hacer el *clearing* de células infectadas.

Es importante señalar que si bien existen numerosos desarrollos de expresión del péptidos M2e en la literatura usando sistemas diversos, no existe aún en la Farmacopea internacional un correlato de protección para las vacunas de tipos universal, es decir aquellas no basadas en la HA, cuya potencia como se sabe, está validada a través del título de inhibición de la hemaglutinación (IHA).

Para la evaluación de protección de las vacunas basadas en M2e hubo que poner a punto un modelo de desafío en ratón, y se desarrolló también un test de ELISA utilizando el péptido M2e sintético. El esquema de inmunización consistió en la aplicación de tres dosis por vía subcutánea a intervalos de 21 días; al término de la tercera dosis se realizó la descarga intranasal de 5 DL_{50%} de virus adaptado a ratón de la cepa A/PR/8, en un área de Bioseguridad NBS2 y en jaulas de bioseguridad dotadas de filtración de aire HEPA.

La inoculación de ratones BALB/c con BLS-M2e mostró una clara correlación dosis/respuesta. A partir de estos resultados se seleccionó la dosis de 10 µg, que es altamente posible de producir a partir de una sencilla fermentación bacteriana (Fig 4.47 A).

La respuesta fue además dependiente de la adición de adyuvante y del número de copias de M2e (Fig. 4.47 B y 4.48). Como se esperaba, en cantidades similares, la quimera que tenía 40 copias generó

una mayor inmunidad humoral en ausencia de adyuvante que la quimera con solo 10 copias (Fig. 4.49). Sin embargo, cuando la quimera de 10 copias se formuló con adyuvantes, la inmunidad aumentó significativamente llegando a niveles similares a la de 40 copias sin adyuvante (1/8000 con hidróxido de aluminio) y aun a valores más altos (1/30000 con IMX®). La inclusión del adyuvante IMX® tuvo un notable efecto en el nivel de respuesta a la inmunización con ambas quimeras (Fig. 4.48).

Los animales inoculados por vía IM generaron altos títulos de anticuerpos específicos anti-M2e y las respuestas fueron más homogéneas entre los distintos individuos (Fig. 4.47 B). La inmunización por vía IM produjo un aumento de títulos de anticuerpos de isotipo IgG1, con un cociente IgG2a/IgG1 de 0,554, sugiriendo una respuesta inmune de tipo Th2 (Fig. 4.47 C). En contraste, la inoculación por vía SC indujo una respuesta con un cociente IgG2a/IgG1 de 1,23, indicativo de una respuesta de tipo Th1.

La vacunación con la quimera BLS-4M2e/IMX® protegió el 100% de los ratones desafiados; BLS-4M2e formulado con hidróxido de Al protegió el 80%; y BLS-4M2e sin adyuvante protegió el 60% de los animales desafiados (Fig. 4.50 A). El porcentaje de sobrevivencia fue correlativo con el título de anticuerpos desarrollados. Los títulos promedio de anticuerpos previos al ensayo de desafío fueron 1/4260, 1/10900 y 1/24931 para los grupos inoculados con BLS-4M2e, BLS-4M2e/Al y BLS-4M2e + IMX®, respectivamente. Los títulos de anticuerpos contra el carrier BLS fueron siempre altos (1/100,000 - 1/600,000), como fue reportado con anterioridad.

El porcentaje de pérdida de peso promedio en cada grupo de ratones después del desafío se muestra en la Fig. 4.50 B. Siete días después del desafío, los animales que sobrevivieron en los 3 grupos vacunados con las quimeras recuperaron el peso gradualmente, aproximándose al peso inicial a los 16 días post desafío. En relación a la morbilidad hubo una diferencia significativa en términos de pérdida de peso entre los animales inoculados con PBS y los animales vacunados con BLS-4M2e/Al para los días 6 y 7 post desafío ($P < 0.05$). Es interesante remarcar que en el experimento que se muestra en este trabajo, la recuperación del peso fue significativamente más rápida en el grupo adyuvado con Al que en el grupo adyuvado con IMX®, en los días 7 a 10 pd ($P < 0.05$).

Es importante resaltar que en el caso de los grupos de ratones vacunados con partículas de Bv que expresan en la membrana el péptido M2e (rBv-gp64-M2e) el mayor índice de protección se obtuvo en el grupo de animales vacunados con las partículas no adyuvadas (protección de un 60%, Fig. 4.51) mientras que el agregado de adyuvante fue en detrimento del grado de protección. Como se muestra en la figura 4.51, cuando se formularon las partículas virales recombinantes, tanto con hidróxido de Al como con adyuvante de Freund's la protección bajó al 20 % de los animales desafiados. El control positivo de este experimento fue la quimera BLS-M2e adyuvada con hidróxido de Al, que protegió el 100% de los animales contra desafío de virus vivo. La inoculación con Bv-wt no presentó protección para

ningún grupo ya que en todos los casos fue del 0% (Fig 4.51). En cuanto a morbilidad, en ese experimento la cinética de pérdida y recuperación de peso de los animales fue similar a la observada para la vacunación con BLS-M2e, (Fig 4.52).

A futuro, y para confirmar estos datos, se realizarán experimentos comparativos de los tres prototipos (BLS-M2e, BLS-4M2e y Bac-M2e) con mayor número de animales a fin de confirmar la protección comparativa, ya que los experimentos in vivo poseen una cierta variabilidad.

A pesar de que los ratones infectados con virus influenza no generan normalmente anticuerpos detectables contra M2 (que está presente en el virión en pequeñas cantidades), ha sido recientemente reportado que en animales vacunados con proteínas quiméricas de M2e, anticuerpos de ambos isotipos han estado involucrados en la protección contra el desafío con el virus de influenza.

En cuanto al mecanismo de protección, en estudios previos se mostró que la protección conferida por el péptido M2e fue exclusivamente mediada por anticuerpos. En este sentido, Jegerlehner y col. reportó que la vacunación con M2e acoplada a partículas formadas por el core de hepatitis B indujo anticuerpos protectivos mientras que la contribución de las células T en la protección fue despreciable. Los autores muestran que los anticuerpos específicos anti-M2 no neutralizan al virus in vitro y sugieren un mecanismo indirecto de protección, como ADCC. Un reporte más reciente muestra que usando el mismo antígeno los anticuerpos de tipo IgG1 e IgG2 están involucrados en protección de los ratones contra influenza. Los resultados de ese trabajo sugieren la posibilidad de que altos títulos de IgG1 podrían mediar protección por medio de macrófagos alveolares. Otro grupo de investigación reportó que la protección conferida por vacunas basadas en M2e podría estar mediada por células NK vía ADCC (citotoxicidad dependiente de anticuerpos) o citotoxicidad mediada por complemento.

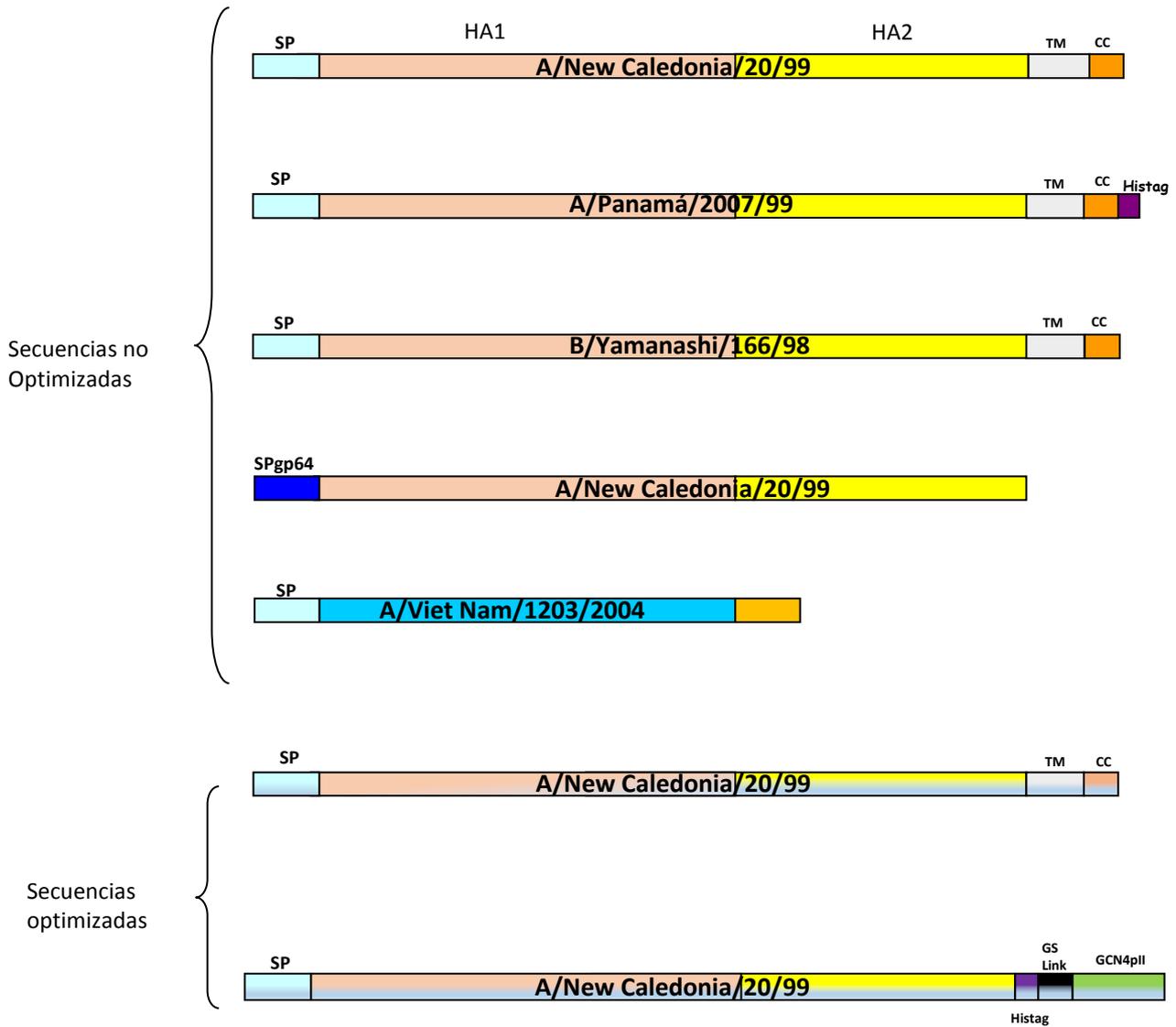
Los resultados en este trabajo utilizando como carrier del péptido M2e la proteína BLS, son atractivos ya que este es un antígeno generado a través de procedimientos simples de producción y purificación, expuesto por un carrier que permitiría ser usado con adyuvantes seguros como aluminio o IMX®, o eventualmente solo. La plasticidad de BLS sugiere además que podrían producirse vacunas polivalentes combinando distintas quimeras, e introduciendo de esta forma péptidos M2e que presenten pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos para generar anticuerpos de más amplia reactividad, e incluso incluir péptidos conservados de otras proteínas virales.

ANEXOS

6. ANEXOS

ANEXO Nº1

Construcciones de hemaglutininas



ANEXO Nº 2

Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la HA_{NC} del clon seleccionado de la cepa A/New Caledonia/20/99 con la secuencia de referencia (Nº de acceso GenBank: AY289929). Método utilizado: ClustalW2.

Clon 4	MKAKLLVLLCFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCL	60
Referencia	MKAKLLVLLCFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCL	60

Clon 4	LKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETPNPENGTCYPGYFADYEELRE	120
Referencia	LKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETPNPENGTCYPGYFADYEELRE	120

Clon 4	QLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHVTGVSASCSHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLCPNLSKS	180
Referencia	QLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHVTGVSASCSHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKS	180

Clon 4	YVNNKEKEVLVLWGVHHPNIGNQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPGIAKRPKVRDQE	240
Referencia	YVNNKEKEVLVLWGVHHPNIGNQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQE	240

Clon 4	GRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSGGFGPGIITSNAPMDECDAKCQTPQG	300
Referencia	GRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRRGFGSGIITSNAPMDECDAKCQTPQG	300

Clon 4	AINSSLPFQNVHPVTIGCEPKYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGM	360
Referencia	AINSSLPFQNVHPVTIGCEPKYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGM	360

Clon 4	VDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRM	420
Referencia	VDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRM	420

Clon 4	ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGC	480
Referencia	ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGC	480

Clon 4	FEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSL	540
Referencia	FEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSL	540

Clon 4	VLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI	565
Referencia	VLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI	565

Los sitios antigénicos descritos según Sriwilajaroen y col. (2012) y Caton y col. (1983) se marcan en colores:

Sa;
 Sb;
 Ca1;
 Ca2;
 Cb

Los cambios aminoacídicos del clon seleccionado respecto de la secuencia de referencia, se marcan en rojo.

ANEXO Nº 3

**Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la HA_P del clon seleccionado de la cepa A/Panamá/2007/99 con la secuencia de referencia (Nº de acceso GenBank: DQ487340.1).
Método utilizado: ClustalW2**

Clon 7	MKTIIALSYILCLVFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVSNGLVKTITNDQIEVTNATELVQ	60
Referencia	MKTIIALSYILCLVFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVSNGLVKTITNDQIEVTNATELVQ	60

Clon 7	SSSTGRICD ^G PHQILDGENCTLIDALLGDPHCDGFQNKEDLFFVERSKAYSNCYPYDVPD	120
Referencia	SSSTGRICD ^S PHQILDGENCTLIDALLGDPHCDGFQNKEDLFFVERSKAYSNCYPYDVPD	120

Clon 7	YASLRSLVASSG ^T LEFNNE ^S FNWTGVAQNGTSS ^A CKRRSN ^K SFFSRLNWLHQL ^E YKYPAL	180
Referencia	YASLRSLVASSG ^T LEFNNE ^S FNWTGVAQNGTSS ^A CKRRSN ^N SFFSRLNWLHQL ^K YKYPAL	180

Clon 7	NVTMPN ^N EKFDKLYI ^W GVHHPSTDSQ ^I SIYAQASGRVTV ^S TKRSQQTVIPNIGS ^R PWVR	240
Referencia	NVTMPN ^N EKFDKLYI ^W GVHHPSTDSQ ^I SIYAQASGRVTV ^S TKRSQQTVIPNIGS ^I PWVR	240

Clon 7	GVSSRIS ^I YWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFK ^I R ^S GKSSIMRSDA ^I PIGKCNSECITP	300
Referencia	GVSSRIS ^I YWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFK ^I R ^S GKSSIMRSDA ^I PIGKCNSECITP	300

Clon 7	NGSIPNDKPFQNVN ^R ITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWE	360
Referencia	NGSIPNDKPFQNVN ^R ITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWE	360

Clon 7	GMVDGWYGF ^R HQNSEGTGQAADLKSTQAAINQINGKLNRLIEKTNEKFH ^Q IEKEFSEVEG	420
Referencia	GMVDGWYGF ^R HQNSEGTGQAADLKSTQAAINQINGKLNRLIEKTNEKFH ^Q IEKEFSEVEG	420

Clon 7	RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEM ^N KLFERTKKQLRENAEDMGN	480
Referencia	RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEM ^N KLFERTKKQLRENAEDMGN	480

Clon 7	GCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISC	540
Referencia	GCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISC	540

Clon 7	FLLCVLLGFIMWACQKGNIRCNICI	566
Referencia	FLLCVLLGFIMWACQKGNIRCNICI	566

Los sitios antigénicos descritos según Wilson y col. (1990) se marcan en colores:

A; B; C; D; E

Los cambios aminoacídicos del clon seleccionado respecto de la secuencia de referencia, se marcan en rojo.

ANEXO Nº 4

**Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la HA_B/Y del clon seleccionado de la cepa B/Yamanashi/166/98 con la secuencia de referencia (Nº de acceso GenBank: CY019531.1).
Método utilizado: ClustalW2.**

Clon 2	MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVGIPLTTTTPTKSHFANLK	60
Referencia	MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVGIPLTTTTPTKSHFANLK	60

Clon 2	GTKTRGKLCPTCLNCTDL DVALGRPMC VGVTPSAKASILHEVRPVTSGCFPIMHDR TKIR	120
Referencia	GTKTRGKLCPTCLNCTDL DVALGRPMC VGVTPSAKASILHEVRPVTSGCFPIMHDR TKIR	120

Clon 2	QLPNLLRGYEKIRLSTQNVINA EKAPGGPYRLGTS GSCPNATSRSGFFATMAWAVPKDNN	180
Referencia	QLPNLLRGYEKIRLSTQNVINA EKAPGGPYRLGTS GSCPNATSRSGFFATMAWAVPKDNN	180

Clon 2	KTATNPLTVEVPR ICTKEEDQITVWGFHSDDKTQMKNLYGDSNPQKFTSSANGVTTHYVS	240
Referencia	KTATNPLTVEVPR ICTKEEDQITVWGFHSDDKTQMKNLYGDSNPQKFTSSANGVTTHYVS	240

Clon 2	QIGGFDPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKPGKTGTIVYQRGILLPQK VWCASGRSKVIKGS	300
Referencia	QIGGFDPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKPGKTGTIVYQRGILLPQK VWCASGRSKVIKGS	300

Clon 2	LPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVK TPLKLANGTKYRPPAKLLKE	360
Referencia	LPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVK TPLKLANGTKYRPPAKLLKE	360

Clon 2	RGFFGAIAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELE	420
Referencia	RGFFGAIAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELE	420

Clon 2	VKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDLDRADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALE	480
Referencia	VKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDLDRADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALE	480

Clon 2	RKLLKMLGPSAVDIGNGCFETKHKCNQTCLDR IAAGTFNAGEFSLPTFDSL NITAASLND	540
Referencia	RKLLKMLGPSAVDIGNGCFETKHKCNQTCLDR IAAGTFNAGEFSLPTFDSL NITAASLND	540

Clon 2	DGLDNHTILLYSTAASSLAVTLMIAIFIVYMISRDNVSCSICL	584
Referencia	DGLDNHTILLYSTAASSLAVTLMIAIFIVYMISRDNVSCSICL	584

Los sitios antigénicos descritos según Pechirra y col. (2005) se marca en color

Los cambios aminoacídicos del clon seleccionado respecto de la secuencia de referencia, se marcan en rojo.

ANEXO Nº 5

Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la ΔHAgp del clon seleccionado de la cepa A/New Caledonia/20/99 con la secuencia de referencia (Nº de acceso GenBank: AY289929). Método utilizado: ClustalW2

Clon 1	TICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLC LLKGIAPLQLGNCSVAGWI	60
Referencia	TICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLC LLKGIAPLQLGNCSVAGWI	78

Clon 1	LGNPECELLISKESWSYIVETPNPENGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKES	120
Referencia	LGNPECELLISKESWSYIVETPNPENGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKES	138

Clon 1	SWPNHTVTIGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLC PNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHHP	180
Referencia	SWPNHTVTIGVSASC SHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHHP	198

Clon 1	PNIGNQRALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPGI AKRPKVRDQEGRINYYWTLLPEPDTIIF	240
Referencia	PNIGNQRALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEI AKRPKVRDQEGRINYYWTLLPEPDTIIF	258

Clon 1	EANGNLIAPWYAFALS GGFPGIITSNAPMDECDACQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGE	300
Referencia	EANGNLIAPWYAFALS RGFSGIITSNAPMDECDACQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGE	318

Clon 1	CPKYVRS AKLRMTGLRNIPSIQSRGLFGAIA GFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYA	360
Referencia	CPKYVRS AKLRMTGLRNIPSIQSRGLFGAIA GFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYA	378

Clon 1	ADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYN	420
Referencia	ADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYN	438

Clon 1	AELLVLENER TLDFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNG	480
Referencia	AELLVLENER TLDFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNG	498

Clon 1	TYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ	510
Referencia	TYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQ	528

Los sitios antigénicos descritos según Sriwilaijaroen y col. (2012) y Caton y col. (1983) se marcan en colores:

Sa;
 Sb;
 Ca1;
 Ca2;
 Cb

Los cambios aminoacídicos del clon seleccionado respecto de la secuencia de referencia, se marcan en rojo.

ANEXO Nº 6

Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la HA1 del clon seleccionado de la cepa A/Viet Nam/1203/2004 (Δ HA5) con la secuencia de referencia (Nº de acceso GenBank: ABP51977.1). Método utilizado: ClustalW2

```

Clon 9      MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKKHNGKLCDL 60
Referencia  MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKKHNGKLCDL 60
*****

Clon 9      DGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIIVEKANPVNDLCYPGDFNDYEELKHL 120
Referencia  DGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIIVEKANPVNDLCYPGDFNDYEELKHL 120
*****

Clon 9      LSRINHFEDIQIIPKSSWSSEASLGVSLACFPYQKSSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKRSY 180
Referencia  LSRINHFEDIQIIPKSSWSSEASLGVSSACFPYQKSSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKRSY 180
*****

Clon 9      NNTSQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPRIATRISKVNGQSG 240
Referencia  NNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPRIATRISKVNGQSG 240
***.*****

Clon 9      RMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKG DSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGA 300
Referencia  RMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKG DSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGA 300
*****

Clon 9      INSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNRLVLATGLRNSPQRERR 340
Referencia  INSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNRLVLATGLRNSPQRETR 340
*****
    
```

- Sitio A
- Residuo del Sitio C
- Región conservada VINI (incluida en sitio E)
- Sitio B
- Epitope conservado QNPTTYI
- Otras regiones antigénicas

ANEXO Nº 7

Secuencia optimizada de gen sintético HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 optimizado para su expresión en células de insecto.

ggatccATGAAGGCTAAGCTGCTCGTCTTGCTCTGCACTTTCACCGCCACCTACGCTGACACAATCTGTATCGGCTACCACGCCAA
CAACTCTACCGACTGTGGATACCGTCTTGAGAGAAGAACGTTACAGTGACCCACTCAGTGAACCTGCTCGAAGACTCGCACA
ACGGCAAGCTCTGCTTGCTGAAGGGAATCGCTCCACTCCAGTTGGGTAAGTCTCCGTGGCCGGTTGGATCTTGGGCAACCCG
GAGTGTGAACCTTGATCTCTAAGGAGTCGTGGTCTACATCGTCGAGACACCAAACCCGGAAAACGGAACCTGCTACCCCGG
TACTTCGCTGACTACGAGGAATTGAGGGAGCAACTGTCTCTGTGAGCTCATTGAGAGATTCGAAATCTTCCCAAGGAAT
CGTCCTGGCCTAACCACACTGTTACAGGCGTGTCTGCCAGCTGTTACACAACGGAAAGTCTAGCTTCTACAGGAACCTGCTCT
GGCTGACCGGCAAGAACGGCCTCTACCCTAAGTCTCGAAGTCTACGTCAACAACAAGGAGAAGGAAGTGTGGTTCTCTG
GGGTGTTACACACCCCTAACATCGGCAACCAGAGAGCTCTGTACCACACCGAGAACGCCTACGTTTCCGTGGTCTCATCGCA
CTACTCTCGTCGTTCACTCCAGAGATCGCTAAGCGTCCGAAGTCCGCGACCAAGAAGGCCGTATCAACTACTACTGGACTTT
GCTGGAGCCCGTGACACAATCATCTTGAAGCTAACGGCAACTTGATCGCCCTTGGTACGCTTTCGCCCTGTCCCGCGGATT
CGGTTCTGGCATCATACAAGCAACGCTCCAATGGACGAGTGCGATGCCAAGTGTGAGACCCCGCAAGGTGCTATCAACTCCT
CTCTCCCTTCCAGAACGTCCACCCTGTTACAATCGGAGAGTGCCCTAAGTACGTTAGGAGCGCCAAGCTGAGAATGGTGACT
GGTCTCCGTAACATCCCATCTATCCAAAGCCGCGGACTGTTCCGTGCTATCGCCGATTTCATCGAGGGTGGCTGGACCGGTAT
GGTGGACGGCTGGTACGGATAACCACCAGAACGAACAAGGAAGCGGTTACGCTGCCGATCAGAAGTCAACCCAAAACGCT
ATCAACGGCATCACTAACAAGGTGAACTCCGTCATCGAGAAGATGAACACCCAGTTCCTGCGGTCGAAAGGAATTCAACAA
GCTCGAGAGGAGAATGAAAACTTGAACAAGAAGGTGGACGATGGTTTCTGGACATCTGGACTTACAACGCTGAGCTCTTG
GTCCTGCTCGAGAACGAACGCACACTCGACTTCCACGATTGAAACGTCGAAGAACCTGTACGAGAAGGTTAAGTACAGCTCAA
GAACAACGCCAAGGAGATCGGCAACGGATGCTTGAATTCTACCACAAGTGAACAACGAGTGTATGGAATCTGTGAAGAAC
GGCACCTACGACTACCCCAAGTACTCAGAGGAATCGAAGCTGAACCGTGAGAAGATCGATGGCGTGAAGCTCGAATCCATGG
GAGTCTACCAGATCTTGGCTATCTACTACTGTGCGCCAGCTATTGGTTTTGCTGGTGAGCCTGGGTGCTATCTCTCTTGAT
GTGTTCAAACGGTTCGCTGCAATGTCGTATCTGTATCTAAgcggccgc.

ANEXO Nº 8

Secuencia optimizada del gen sintético HA de la cepa A/New Caledonia/20/99 optimizado para su expresión en células de insecto sin la región transmembrana, con una cola de histidinas y el complejo de trimerización GCN4pII.

GCGGCCGCATGAAGGCTAAGCTCCTCGTCTTGCTCTGTACTTTCCTGACACATACGCTGACACTATCTGCATCGGTTACCACG
CCAACAACCTCCACCGACACTGTGGATACCGTCCTCGAGAAGAACGTTACAGTGACCCACTCGGTGAACCTGCTCGAAGACTCA
CACAACGGCAAGTTGTGCTTGCTGAAGGGAATCGTCCATTGACGCTGGGTAAGTCTCCGTGGCTGGTTGGATCCTGGGAA
ACCCAGAGTGTGAACTCTGATCTCTAAGGAGTCGTGGTCTACATCGTCGAGACACCAACCCGAAAACGGAACCTGCTAC
CCCGTTACTTCGCTGACTACGAGGAACTGAGGGAGCAACTCTCCTCTGTCAGCTCATTGAGAGATTGAAATCTTCCCAAG
GAATCGTCCTGGCCTAACCACACTGTTACAGGCGTGTCTGCCAGCTGTTACACAACGGAAGTCTAGCTTCTACCGCAACCTG
CTCTGGCTGACTGGCAAGAACGGCTTGTACCCTAACCTGTGCAAGTCTACGTTAACAACAAGGAGAAGGAAGTCTCTGTTTT
GTGGGGTGTGCACCACCCCTAACATCGGCAACCAGAGGGCTCTGTACCACCCGAGAACGCCTACGTGTCCGTGGTCTCAT
CGCACTACTCTCGTCGCTTCACTCCAGAGATCGCTAAGCGTCCGAAGGTCCGCGACCAAGAAGGCCGTATCAACTACTACTGG
ACTTTGCTGGAGCCCGGTGACACAATCATCTTCGAAGCTAACGGCAACCTCATCGCCCCTTGGTACGCTTTCGCTTGTCTCGC
GGATTCCGGTAGCGGCATCATCACATCAAACGCTCCAATGGACGAGTGCATGCAAGTGTGACACCCGCAAGGTGCTATCA
ACTCCTCTCTCCCCTCCAGAACGTCCACCCTGTTACAATCGGAGAGTGCCTAAGTACGTGAGGTCCGCCAAGCTCAGAATGG
TCACTGGTTTGCCTAACATCCAAGCATCCAATCACGCGGACTGTTCCGGTGCTATCGCCGGATTTCATCGAGGGTGGCTGGACC
GGTATGGTGGACGGCTGGTACGGATAACCACCACGAAACGAACAAGGAAGCGGTTACGCTGCCGATCAGAAGTCAACCCAA
AACGCTATCAACGGCATCACTAACAAGGTGAACCTCCGTCATCGAGAAGATGAACACCCAGTTCACTGCCGTCGGAAAGGAATT
CAACAAGCTGGAGAGGAGAATGGAAAACCTCAACAAGAAGGTGACGATGGTTTCTTGACATCTGGACTTACAACGCTGAG
CTTTGGTTCTGCTCGAGAACGAACGTACTGACTGACTTCCACGATTCTAACGTTAAGAATTGTACGAGAAGGTGAAGAGCCA
GCTGAAGAACAACGCCAAGGAGATCGGCAACGGATGCTTCAATTCTACCACAAGTGAACAACGAGTGTATGGAAAAGCGTG
AAGAACGGCACCTACGACTACCCCAAGTACTCGGAGGAATCCAAGTGAACAGGGAGAAGATCGATGGCGTCAAGCTCGAAT
CTATGGGAGTTTACCAGCACACCACCACCACCTCTGGTAGCGGCTCAGGATCGGGTCCGGCTCTGGAAGCTCAAGAATG
AAGCAAATCGAGGACAAGATCGAGGAAATCCTGTCCAAGATCTACCACATCGAAAACGAAATCGCCCGCATCAAGAAGTTGG
TCGGAGAGAGGTAAGATCT

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFIA

- Abe, T., Hemmi, H., Miyamoto, H., Moriishi, K., Tamura, S., Takaku, H., Akira, S., Matsuura, Y. (2005): Involvement of the Toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J Virol* ; 79(5): 2847-58. doi: 10.1128/JVI.79.5.2847-2858.2005.
- Abe, T., Takahashi, H., Hamazaki, H., Miyano-Kurosaki, N., Matsuura, Y., Takaku, H. (2003): Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *J Immunol*; 171(3): 1133-9. doi: 10.4049/jimmunol.171.3.1133.
- Adler-Moore, J., Munoz, M., Kim, H., Romero, J., Tumpey, T., Zeng, H., Petro, C., Ernst, W., Kosina, S., Jimenez, G., Fujii, G. (2011): Characterization of the murine Th2 response to immunization with liposomal M2e influenza vaccine. *Vaccine*; 29(27): 4460-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.040.
- Alvarez, P., Zylberman, V., Ghersi, G., Boado, L., Goldbaum, F., Mattion, N. (2013): Tandem repeats of the extracellular domain of Matrix 2 influenza protein exposed in Brucella lumazine synthase decameric carrier molecule induce protection in mice. *Vaccine*; 31(5): 806-12. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.11.072.
- Avalos, R.T., Yu, Z., Nayak, D.P. (1997): Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *J Virol*; 71(4): 2947-58.
- Barrett, P.N., Mundt, W., Kistner, O., Howard, M.K. (2009): Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev Vaccines*; 8(5): 607-18. doi: 10.1586/erv.09.19.
- Baxter, R., Patriarca, P.A., Ensor, K., Izikson, R., Goldenthal, K.L., Cox, M.M. (2011): Evaluation of the safety, reactogenicity and immunogenicity of FluBlok® trivalent recombinant baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine administered intramuscularly to healthy adults 50-64 years of age. *Vaccine*; 29(12): 2272-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.01.039.
- BD Biosciences (2003). BD BaculoGold™ Baculovirus Expression System Innovative Solutions for Proteomics.

- Becker, R. (2004): Partnership: expanding R&D capabilities to address changing market needs. Phacilitate Vaccine Forum, Boston, MA.
- Bosch, B.J., Bodewes, R., de Vries, R.P., Kreijtz, J.H., Bartelink, W., van Amerongen, G., Rimmelzwaan, G.F., de Haan, C.A., Osterhaus, A.D., Rottier, P.J. (2010): Recombinant soluble, multimeric HA and NA exhibit distinctive types of protection against pandemic swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus infection in ferrets. *J Virol*; 84(19): 10366-74. doi: 10.1128/JVI.01035-10.
- Bouvier, N.M., Palese, P. (2008): The Biology of influenza viruses. *Vaccine*; 26 (Suppl 4): D49–53.
- Brands, R., Visser, J., Medema, J., Palache, A.M., van Scharrenburg, G.J. (1999): Influvac: a safe Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cell culture-based influenza vaccine. *Dev Biol Stand*; 98: 93-100; discussion 111.
- Bui, M., Wills, E.G., Helenius, A., Whittaker, G.R. (2000): Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleo proteins. *J Virol*; 74(4): 1781-6.
- Cargnelutti, D.E., Sánchez, M.V., Mattion, N.M., Scodeller, E.A. (2013): Development of a universal CTL-based vaccine for influenza. *Bioengineered*; 4(6): 374-8. doi: 10.4161/bioe.23573.
- Cargnelutti, D.E., Sanchez, M.V., Alvarez, P., Boado, L., Glikmann, G., Mattion, N., Scodeller, E.A. (2012): Improved immune response to recombinant influenza nucleoprotein formulated with ISCOMATRIX. *J Microbiol Biotechnol*; 22(3): 416-21.
- Carragher, D.M., Kaminski, D.A., Moquin, A., Hartson, L., Randall, T.D. (2008): A novel role for non-neutralizing antibodies against nucleoprotein in facilitating resistance to influenza virus. *J Immunol*; 181(6): 4168-76.
- Caton, A.J., Raymond, F.L., Brownlee, G.G., Yewdell, J.W., Gerhard, W. (1983): Antigenic variation in influenza virus. *Biochem Soc Trans*; 11(4): 435-41.
- CDC (2006): High levels of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses and interim guidelines for use of antiviral agents- United States, 2005-2006 influenza season. *Morb Mortal Wkly Rep (MMWR)*; 55(2): 44-46.
- CDC (2008): Morbidity and Mortality Weekly Report (www.cdc.gov/mmwr/).

- CDC (2014): "Types of Influenza Viruses. Seasonal Influenza (Flu)." from <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>.
- Cox, M.M. (2005): Pandemic influenza: overview of vaccines and antiviral drugs. *Yale J Biol Med*; 78(5): 321-8.
- Cox, M.M., Hollister, J.R. (2009): FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals*; 37: 182-189. doi: 10.1016/j.biologicals.2009.02.014.
- Cox, M.M., Karl Anderson, D. (2007): Production of a novel influenza vaccine using insect cells: protection against drifted strains. *Influenza Other Respir Viruses*; 1(1): 35-40. doi: 10.1111/j.1750-2659.2006.00007.x.
- Cox, M.M., Hashimoto, Y. (2011): A fast track influenza virus vaccine produced in insect cells. *J Invertebr Pathol*; 107 Suppl:S31-41. doi: 10.1016/j.jip.2011.05.003..
- Chen, J., Deng, Y.M. (2009): Influenza virus antigenic variation, host antibody production and new approach to control epidemics. *Virology*; 6: 30. doi: 10.1186/1743-422X-6-30.
- Chimeno Zoth, S., Carballeda, J.M., Gómez, E., Gravisaco, M.J., Carrillo, E., Berinstein, A. (2012): Modulation of innate immunity in chickens induced by in vivo administration of baculovirus. *Vet Immunol Immunopathol*; 145(1-2): 241-7. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.11.008.
- Davies, W.L., Grunert, R.R., Haff, R.F., McGahen, J.W., Neumayer, E.M., Paulshock, M., Watts, J.C., Wood, T.R., Hermann, E.C., Hoffmann, C.E. (1964): Antiviral activity of 1-adamantanamine (Amantadine). *Science*; 144(3620): 862–863.
- De Filette, M., Min Jou, W., Birkett, A., Lyons, K., Schultz, B., Tonkyro, A., Resch, S., Fiers, W. (2005): Universal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs. *Virology*; 337(1): 149–61. doi:10.1016/j.virol.2005.04.004.
- De Jong, M.D., Hien, T.T. (2006): Avian influenza A (H5N1). *J Clin Virol*; 35(1): 2-13.
- El Bakkouri, K., Descamps, F., De Filette, M., Smet, A., Festjens, E., Birkett, A., Van Rooijen, N., Verbeek, S., Fiers, W., Saelens, X. (2011): Universal vaccine based on ectodomain of matrix

- protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. *J Immunol*; 186(2): 1022-31. doi: 10.4049/jimmunol.0902147.
- Ernst, W.A., Kim, H.J., Tumpey, T.M., Jansen, A.D., Tai, W., Cramer, D.V., Adler-Moore, J.P., Fujii, G. (2006): Protection against H1, H5, H6 and H9 influenza A infection with liposomal matrix 2 epitope vaccines. *Vaccine*; 24(24): 5158-68. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.04.008.
- Fan, J., Liang, X., Horton, M.S., Perry, H.C., Citron, M.P., Heidecker, G.J., Fu, T.M., Joyce, J., Przysiecki, C.T., Keller, P.M., Garsky, V.M., Ionescu, R., Rippeon, Y., Shi, L., Chastain, M.A., Condra, J.H., Davies, M.E., Liao, J., Emini, E.A., Shiver, J.W. (2004): Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine*; 22(23-24): 2993-3003. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.02.021
- FDA (2009): Flublok® (Influenza Vaccine, Recombinant Hemagglutinin), Briefing Document, *Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting*, Protein Sciences Corporation 1000 Research Parkway Meriden, CT 06450, 1-25.
- Fiers, W., De Filette, M., Birkett, A., Neiryneck, S., Min Jou, W. (2004): A "universal" human influenza A vaccine. *Virus Res*; 103(1-2): 173-6. doi: 10.1016/j.virusres.2004.02.030.
- Fiore, A.E., Bridges, C.B., Cox, N.J. (2009): Seasonal influenza vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol*; 333: 43-82. doi: 10.1007/978-3-540-92165-3_3.
- Flinsenberg, T.W., Compeer, E.B., Boelens, J.J., Boes, M. (2011): Antigen cross-presentation: extending recent laboratory findings to therapeutic intervention. *Clin. Exp. Immunol*; 165(1): 8-18. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04411.x.
- Forthofer, R. N., Lee E. S. (1995): Introduction to biostatistics: a guide to design, analysis, and discovery. *Academica*. San Diego, CA.
- Francis, T. Jr. (1940): A New Type of Virus from Epidemic Influenza. *Science*; 92(2392): 405-8.
- Francis, T. Jr., Quilligan, J.J. Jr., Minuse, E. (1950): Identification of another epidemic respiratory disease. *Science*; 112(2913): 495-7.

- Gamblin, S.J., Skehel, J.J. (2010): Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem*; 285(37): 28403-9. doi: 10.1074/jbc.R110.129809.
- Grabherr, R., Ernst, W. (2010): Baculovirus for eukaryotic protein display. *Curr Gene Ther*; 10(3): 195-200. doi: 10.2174/156652310791321297.
- Gronowski, A. M., Hilbert, D. M., Sheehan, K. C., Garotta, G., Schreiber, R. D. (1999): Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. *J Virol*; 73(12): 9944- 51.
- Harlow, E., Lane, D. (1988): *Antibodies-A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Hay, A.J., Wolstenholme, A.J., Skehel, J.J., Smith, M.H. (1985): The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J*; 4(11): 3021-4.
- Heldt, F.S., Frensing, T., Reichl, U. (2012): Modeling the intracellular dynamics of influenza virus replication to understand the control of viral RNA synthesis. *J Virol*; 86(15): 7806-17. doi: 10.1128/JVI.00080-12.
- Hernandez Alvarez, B., Hartmann, M.D., Albrecht, R., Lupas, A.N., Zeth, K., Linke, D. (2008): A new expression system for protein crystallization using trimeric coiled-coil adaptors. *Protein Eng Des Sel*; 21(1): 11-8. doi: 10.1093/protein/gzm071.
- Hilleman, M.R. (2002): Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine*; 20(25-26): 3068-87. doi: 10.1016/S0264-410X(02)00254-2.
- Holsinger, L.J., Nichani, D., Pinto, L.H., Lamb, R.A. (1994): Influenza A virus M2 ion channel protein: a structure-function analysis. *J.Virol*; 68(3): 1551-63.
- Holsinger, L.J., Shaughnessy, M.A., Micko, A., Pinto, L.H., Lamb, R.A. (1995): Analysis of the posttranslational modifications of the influenza virus M2 protein. *J Virol*; 69(2): 1219-25.
- Horimoto, T., Kawaoka, Y. (2005): Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol*; 3(8): 591-600. doi:10.1038/nrmicro1208.
- Horvath, C.M., Williams, M.A., Lamb, R.A. (1990): Eukaryotic coupled translation of tandem cistrons: Identification of the influenza B virus BM2 polypeptide. *EMBO J*; 9(8): 2639-2647.

- Hu, Y.C. (2005): Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta Pharmacol Sin*; 26(4): 405-16. doi:10.1111/j.1745-7254.2005.00078.x.
- Imaz, M.S., Eimann, M., Poyard, E., Savy, V. (2002): Influenza associated excess mortality in Argentina: 1992-2002. *Rev Chilena Infectol*; 23(4): 297-306.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*; 96(1): 23-8. doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-P.
- Invitrogen (2004). Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins Version D. 6 April 2004. 10359, www.invitrogen.com: 1-70.
- Jarvis, D.L. (2003): Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. *Virology*; 310(1): 1-7. doi: 10.1016/S0042-6822(03)00120-X.
- Jegerlehner, A., Schmitz, N., Storni, T., Bachmann, M.F. (2004): Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J Immunol*; 172(9): 5598-605. doi: 10.4049/jimmunol.172.9.5598.
- Jimenez, G.S., Planchon, R., Wei, Q., Rusalov, D., Geall, A., Enas, J., Lalor, P., Leamy, V., Vahle, R., Luke, C.J., Rolland, A., Kaslow, D.C., Smith, L.R. (2007): Vaxfectin-formulated influenza DNA vaccines encoding NP and M2 viral proteins protect mice against lethal viral challenge. *Hum Vaccin*; 3(5): 157-64. doi: 10.4161/hv.3.5.4175.
- Kaverin, N.V., Rudneva, I.A., Govorkova, E.A., Timofeeva, T.A., Shilov, A.A., Kochergin-Nikitsky, K.S., Krylov, P.S., Webster, R.G. (2007): Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of a highly pathogenic H5N1 influenza virus by using monoclonal antibodies. *J Virol*; 81(23): 12911-7. doi: 10.1128/JVI.01522-07.
- Kaverin, N.V., Rudneva, I.A., Ilyushina, N.A., Varich, N.L., Lipatov, A.S., Smirnov, Y.A., Govorkova, E.A., Gitelman, A.K., Lvov, D.K., Webster, R.G. (2002): Structure of antigenic sites on the haemagglutinin molecule of H5 avian influenza virus and phenotypic variation of escape mutants. *J Gen Virol*; 83(Pt 10): 2497-505.

- Keitel, W.A., Treanor, J.J., El Sahly, H.M., Gilbert, A., Meyer, A.L., Patriarca, P.A., Cox, M.M. (2009): Comparative immunogenicity of recombinant influenza hemagglutinin (rHA) and trivalent inactivated vaccine (TIV) among persons >or =65 years old. *Vaccine*; 28(2): 379-85. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.10.037.
- King, J.C. Jr., Cox, M.M., Reisinger, K., Hedrick, J., Graham, I., Patriarca, P. (2009): Evaluation of the safety, reactogenicity and immunogenicity of FluBlok trivalent recombinant baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine administered intramuscularly to healthy children aged 6-59 months. *Vaccine*; 27(47): 6589-94. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.08.032.
- Knipe David & Howley Peter. (2007): *Fields Virology*. Fifth Edition. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Klumer Business.
- Kost, T.A., Condreay, J.P., Jarvis, D.L. (2005): Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol*; 23(5): 567-75. doi:10.1038/nbt1095.
- Kovacs, F.A., Denny, J.K., Song, Z., Quine, J.R., Cross, T.A. (2000): Helix tilt of the M2 transmembrane peptide from influenza A virus: An intrinsic property. *J Mol Biol*; 295(1): 117-25. doi: 10.1006/jmbi.1999.3322.
- Lamb, R.A., Zebedee, S.L., Richardson, C.D. (1985): Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell*; 40(3): 627-33. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90211-9](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(85)90211-9).
- Lamere, M.W., Moquin, A., Lee, F.E., Misra, R.S., Blair, P.J, Haynes, L., Randall, T.D., Lund, F.E., Kaminski, D.A. (2011): Regulation of antinucleoprotein IgG by systemic vaccination and its effect on influenza virus clearance. *J.Virol*; 85(10): 5027-35. doi: 10.1128/JVI.00150-11.
- Laplagne, D.A., Zylberman, V., Ainciart, N., Steward, M.W., Sciutto, E., Fossati, C.A., Goldbaum, F.A. (2004): Engineering of a polymeric bacterial protein as a scaffold for the multiple display of peptides. *Proteins*; 57(4): 820-8. doi: 10.1002/prot.20248.
- Legge, K.L., Braciale, T.J. (2003): Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. *Immunity*; 18(2): 265-77. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00023-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00023-2).

- Li, K., Luo, J., Wang, C., He, H. (2011): Alpha-Galactosylceramide potently augments M2e induced protective immunity against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus infection in mice. *Vaccine*; 29(44): 7711–7. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.07.136.
- Liang, S., Mozdzanowska, K., Palladino, G., Gerhard, W. (1994): Heterosubtypic immunity to influenza type A virus in mice. Effector mechanisms and their longevity. *J. Immunol*; 152(4): 1653-61.
- Lin, Y.J., Deng, M.C., Wu, S.H., Chen, Y.L., Cheng, H.C., Chang, C.Y., Lee, M.S., Chien, M.S., Huang, C.C. (2008): Baculovirus-derived hemagglutinin vaccine protects chickens from lethal homologous virus H5N1 challenge. *J Vet Med Sci*; 70(11): 1147-52. <http://dx.doi.org/10.1292/jyms.70.1147>.
- Liu, W., Zou, P., Chen, Y.H. (2004): Monoclonal antibodies recognizing EVETPIRN epitope of influenza A virus M2 protein could protect mice from lethal influenza A virus challenge. *Immunol Lett*; 93(2-3): 131-6. doi: 10.1016/j.imlet.2004.03.003.
- Luckow, V.A., Lee, S.C., Barry, G.F., Olins, P.O. (1993): Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol*; 67(8): 4566-79.
- McCaughey, C. (2010): Influenza: A virus of our times. *Ulster Med J*; 79(2): 46-51.
- McKenzie, A., Watt, M., Gittleson, C. (2010): ISCOMATRIX® vaccines: safety in human clinical studies. *Hum Vaccin*; 6(3): 237-46. doi:10.4161/hv.6.3.10754.
- Medcalf, L., Poole, E., Elton, D., Digard, P. (1999): Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein. *J. Virol*; 73(9): 7349-56.
- Medina, R.A., García-Sastre, A. (2011): Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol*; 9(8): 590-603. doi: 10.1038/nrmicro2613.
- Ministerio de la Salud. Presidencia de la Nación. INFLUENZA: CIRCULACIÓN VIRAL 2012. ALERTA. Semana Epidemiológica:28. Notificador: Programa Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles. Fecha de Alerta.10/07/2012.

- Mossadegh, N., Gissmann, L., Müller, M., Zentgraf, H., Alonso, A., Tomakidi, P. (2004): Codon optimization of the human papillomavirus 11 (HPV 11) L1 gene leads to increased gene expression and formation of virus-like particles in mammalian epithelial cells. *Virology*; 326(1): 57-66. doi: 10.1016/j.virol.2004.04.050.
- Nayak, D.P., Davis, A.R., McQueen, N.L., Bos, T.J., Jabbar, M.A., Sivasubramanian, N., Lionelli, G. (1985): Biological and immunological properties of haemagglutinin and neuraminidase expressed from cloned cDNAs in prokaryotic and eukaryotic cells. *Vaccine*; 3(3): 165-71. doi: 10.1016/0264-410X(85)90097-0.
- Neiryneck, S., Deroo, T., Saelens, X., Vanlandschoot, P., Jou, W.M., Fiers, W. (1999): A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med*; 5(10): 1158–63. doi:10.1038/13484.
- Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R.H., Kawaoka, Y. (2006): Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature*; 439(7075): 490-2. doi:10.1038/nature04378.
- Nwe, N., He, Q., Damrongwatanapokin, S., Du, Q., Manopo, I., Limlamthong, Y., Fenner, B.J., Spencer, L., Kwang, J. (2006): Expression of hemagglutinin protein from the avian influenza virus H5N1 in a baculovirus/insect cell system significantly enhanced by suspension culture. *BMC Microbiol*; 6:16. doi:10.1186/1471-2180-6-16.
- Ortega, J., Martin-Benito, J., Zurcher, T., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L., Ortin, J. (2000): Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J. Virol*; 74(1): 156-63. doi:10.1128/JVI.74.1.156-163.2000
- Oxford, J.S., Galbraith, A. (1980): Antiviral activity of amantadine: A review of laboratory and clinical data. *Pharmacol Ther*; 11(1): 181–262. doi: 10.1016/0163-7258(80)90072-8.
- Pearse, M.J., Drane, D. (2005): ISCOMATRIX® adjuvant for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev*; 57(3): 465–74. doi: 10.1016/j.addr.2004.09.006.

- Pechirra, P., Nunes, B., Coelho, A., Ribeiro, C., Gonçalves, P., Pedro, S., Castro, L.C., Rebelo-de-Andrade, H. (2005): Molecular characterization of the HA gene of influenza type B viruses. *J Med Virol*; 77(4): 541-9. doi: 10.1002/jmv.20490.
- Percheson, P.B., Trépanier, P., Hassell, T., Nestruck, A.C., Dugré, R., Mabrouk, T. (1999): A phase I, randomized controlled clinical trial to study the reactogenicity and immunogenicity of a new split influenza vaccine derived from a non-tumorigenic cell line. *Dev. Biol. Stand*; 98: 127-32; discussion 133-4.
- PharMingen (1999). Baculovirus Expression Vector System Manual. Instruction Manual. General Methods 6xHis and GST Purification Direct Cloning. bdbiosciences.com. San Diego, CA 92121. USA.
- Philpott, M., Hioe, C., Sheerar, M., Hinshaw, V.S. (1990): Hemagglutinin mutations related to attenuation and altered cell tropism of a virulent avian influenza A virus. *J Virol*; 64(6): 2941-7.
- Pidre, M., Ferrelli, M.L., Haase, S., Romanowski, V. (2013): Baculovirus Display: A Novel Tool for Vaccination. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. "Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications"*, ed por V. Romanowski, ISBN 978-953-51-1207-5. Chapter 6. doi: 10.5772/55572.
- Pinto, L.H., Dieckmann, G.R., Gandhi, C.S., Papworth, C.G., Braman, J., Shaughnessy, M.A., Lear, J.D., Lamb, R.A., DeGrado, W.F. (1997): A functionally defined model for the M2 proton channel of influenza A virus suggests a mechanism for its ion selectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94(21): 11301-06.
- Poland, G.A., Jacobson, R.M., Targonski, P.V. (2007): Avian and pandemic influenza: An overview. *Vaccine*; 25(16): 3057-61. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.01.050.
- Pons, M.W., Schulze, I.T., Hirst, G.K., Hauser, R. (1969): Isolation and characterization of the ribonucleoprotein of influenza virus. *Virology*; 39(2): 250-9.
- Portela, A., Digard, P. (2002): The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol*; 83(Pt 4): 723-34.

- Quilligan, J.J. Jr., Francis, T. Jr., Rowe, R.J., Traggis, D.G., Adcock, J.D., Kurtz, H. (1950): The action of terramycin on the growth of strains of influenza, herpes simplex, and rabies viruses in chicken embryos and mice. *Ann N Y Acad Sci*; 53(2): 407-11. doi: 10.1111/j.1749-6632.1950.tb42175.x.
- Radosević, K., Rodriguez, A., Mintardjo, R., Tax, D., Bengtsson, K.L., Thompson, C., Zambon, M., Weverling, G.J., Uytdehaag, F., Goudsmit, J. (2008): Antibody and T-cell responses to a virosomal adjuvanted H9N2 avian influenza vaccine: impact of distinct additional adjuvants. *Vaccine*; 26(29-30): 3640-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.04.071.
- Roberts, P.C., Lamb, R.A., Compans, R.W. (1998): The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation. *Virology*; 240(1): 127-37. doi:10.1006/viro.1997.8916.
- Rosas, G., Fragoso, G., Ainciart, N., Esquivel-Guadarrama, F., Santana, A., Bobes, R.J., Ramírez-Pliego, O., Toledo, A., Cruz-Revilla, C., Meneses, G., Berguer, P., Goldbaum, F.A., Sciutto, E. (2006): Brucella spp. lumazine synthase: a novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity. *Microbes Infect*; 8(5): 1277-86. doi:10.1016/j.micinf.2005.12.006.
- Salahuddin, P., Khan, A.U. (2010): Structural and functional analysis of NS1 and NS2 proteins of H1N1 subtype. *Genomics Proteomics Bioinformatics*; 8(3):190-9. doi: 10.1016/S1672-0229(10)60021-6.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-309-6.
- Sciutto, E., Toledo, A., Cruz, C., Rosas, G., Meneses, G., Laplagne, D., Ainciart, N., Cervantes, J., Fragoso, G., Goldbaum, F.A. (2005): Brucella spp. lumazine synthase: a novel antigen delivery system. *Vaccine*; 23(21): 2784-90. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.11.043.
- Shors, T., Mc Fadden, S.H. (2009): 1918 influenza: a Winnebago County, Wisconsin perspective. *Clin Med Res*; 7(4): 147-56. doi: 10.3121/cmr.2009.863.
- Shu, L.L., Bean, W.J., Webster, R.G. (1993): Analysis of the evolution and variation of the human influenza A virus nucleoprotein gene from 1933 to 1990. *J Virol*; 67(5): 2723-9.
- Skehel, J., Wiley, D. (2000): Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*; 69:531-69. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.531.

- Smith, G.E. (Middlefield, CT), Volvovitz, F. (New Haven, CT), Wilkinson, B.E. (Middletown, CT), Voznesensky, A. I. (West Hartford, CT), Hackett, C. S. (Wallingford, CT) (2001): Method for producing influenza hemagglutinin multivalent vaccines. United States. Protein Sciences Corporation (Meriden, CT), Patent USA N°6245532.
<http://www.freepatentsonline.com/6245532.html>
- Smith, W., Manch, M.D., Andrewes, C.H., Lond, M.D., Laidlaw, P.P., Chir, B., Camb, F.R.S. (1933): A Virus Obtained From Influenza Patients. *The Lancet*; 222(5732): 66-68. doi: 10.1016/S0140-6736(00)78541-2.
- Song, J.M., Wang, B.Z., Park, K.M., Van Rooijen, N., Quan, F.S., Kim, M.C., Jin, H.T., Pekosz, A., Compans, R.W., Kang, S.M. (2011): Influenza virus-like particles containing M2 induce broadly cross protective immunity. *PLoS One*; 6(1): e14538. doi: 10.1371/journal.pone.0014538.
- Sriwilaijaroen, N., Suzuki, Y. (2012): Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*; 88(6): 226-49.
<http://dx.doi.org/10.2183/pjab.88.226>.
- Steitz, J., Barlow, P.G., Hossain, J., Kim, E., Okada, K., Kenniston, T., Rea, S., Donis, R.O., Gambotto, A. (2010): A candidate H1N1 pandemic influenza vaccine elicits protective immunity in mice. *PLoS One*; 5(5): e10492. doi: 10.1371/journal.pone.0010492.
- Subbarao, K., Joseph, T. (2007): Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. *Nat Rev Immunol*; 7(4): 267-78. doi:10.1038/nri2054.
- Sugrue, R.J., Bahadur, G., Zambon, M.C., Hall-Smith, M., Douglas, A.R., Hay, A.J. (1990): Specific structural alteration of the influenza haemagglutinin by amantadine. *EMBO J*; 9(11): 3469-76.
- Sugrue, R.J., Hay, A.J. (1991): Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology*; 180(2):617-24.
- Tami, C., Farber, M., Palma, E.L., Taboga, O. (2000): Presentation of antigenic sites from foot-and-mouth disease virus on the surface of baculovirus and in the membrane of infected cells. *Arch Virol*; 145(9): 1815-28.

- Tamura, S., Kurata, T. (2004): Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. *Jpn J Infect Dis*; 57(6): 236-47.
- Tamura, S., Miyata, K., Matsuo, K., Asanuma, H., Takahashi, H., Nakajima, K., Suzuki, Y., Aizawa, C., Kurata, T. (1996): Acceleration of influenza virus clearance by Th1 cells in the nasal site of mice immunized intranasally with adjuvant-combined recombinant nucleoprotein. *J Immunol*; 156(10): 3892-900.
- Thueng-in K, Maneewatch S, Srimanote P, Songserm T, Tapchaisri P, Sookrung N, Tongtawe P, Channarong S, Chaicumpa W. (2010): Heterosubtypic immunity to influenza mediated by liposome adjuvanted H5N1 recombinant protein vaccines. *Vaccine*; 28(41): 6765-77. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.07.065.
- Tong, S., Li, Y., Rivaller, P., Conrardy, C., Alvarez Castillo, D., Chen, L., Recuenco, S., Ellison, J.A., Davis, C.T., York, I.A., Turmelle, A.S., Moran, D., Rogers, S., Shi, M., Tao, Y., Weil, M.R., Tang, K., Rowe, L.A., Sammons, S., Xu, X., Frace, M., Lindblade, F.M., Cox, N.J., Anderson, L.J., Rupprecht, C.E., Donis, R.O. (2012): A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci USA*; 109(11): 4269–4274. doi: 10.1073/pnas.1116200109.
- Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., Yang, H., Chen, X., Recuenco, S., Gomez, J., Chen, L.M., Johnson, A., Tao, Y., Dreyfus, C., Yu, W., McBride, R., Carney, P.J., Gilbert, A.T., Chang, J., Guo, Z., Davis, C.T., Paulson, J.C., Stevens, J., Rupprecht, C.E., Holmes, E.C., Wilson, I.A., Donis, R.O. (2013): New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathogens*; 9(10): e1003657. doi: 10.1371/journal.ppat.1003657.
- Tosh, P.K., Poland, G.A. (2008): Emerging vaccines for influenza. *Expert Opin Emerg Drugs*; 13(1): 21-40. doi: 10.1517/14728214.13.1.21
- Treanor, J.J., Campbell, J.D., Brady, R.C.I. (2005): Rapid licensure of a new, inactivated influenza vaccine in the United States. *Hum Vaccin*; 1(6): 239-44. doi: 10.4161/hv.1.6.2376.
- Treanor, J.J., Tierney, E.L., Zebedee, S.L., Lamb, R.A., Murphy, B.R. (1990): Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice. *J Virol*; 64(3):1375–7.

- Treanor, J.J., Schiff, G.M., Couch, R.B., Cate, T.R., Brady, R.C., Hay, C.M., Wolff, M., She, D., Cox, M.M. (2006): Dose-related safety and immunogenicity of a trivalent baculovirus-expressed influenza-virus hemagglutinin vaccine in elderly adults. *J Infect Dis*; 193(9): 1223-8. doi: 10.1086/503050.
- Treanor, J.J., Schiff, G.M., Hayden, F.G., Brady, R.C., Hay, C.M., Meyer, A.L., Holden-Wiltse, J., Liang, H., Gilbert, A., Cox, M. (2007): Safety and immunogenicity of a baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine: a randomized controlled trial. *JAMA*; 297(14): 1577-82. doi:10.1001/jama.297.14.1577.
- Turley, C.B., Rupp, R.E., Johnson, C., Taylor, D.N., Wolfson, J., Tussey, L., Kavita, U., Stanberry, L., Shaw, A. (2011): Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. *Vaccine*; 29(32): 5145-52. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.041.
- Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A. (1993): Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*; 259(5102): 1745-9. doi:10.1126/science.8456302
- Velikovsky, C.A., Cassataro, J., Giambartolomei, G.H., Goldbaum, F.A., Estein, S., Bowden, R.A. (2002): A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun*; 70(5):2507–11.
- Velikovsky, C.A., Goldbaum, F.A., Cassataro, J., Estein, S., Bowden, R.A., Bruno, L., Fossati, C.A., Giambartolomei, G.H. (2003): *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1–Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella abortus* 544 independently of the adjuvant formulation used. *Infect Immun*; 71(10): 5750–5.
- Veljkovic, V., Veljkovic, N., Muller, C., Müller, S., Glisic, S., Perovic, V., Köhler, H. (2009): Characterization of conserved properties of hemagglutinin of H5N1 and human influenza viruses: possible consequences for therapy and infection control. *BMC Struct Biol*; 9:21. doi:10.1186/1472-6807-9-21.
- Wang, K., Holtz, K., Anderson, K., Chubet, R., Mahmoud, W., Cox, M. (2006): Expression and purification of an influenza hemagglutinin—one step closer to a recombinant protein-based influenza vaccine. *Vaccine*; 24(12): 2176–85. doi:10.1016/j.vaccine.2005.11.005.

- Wang, S.F., Chen, K.H., Thitithanyanont, A., Yao, L., Lee, Y.M., Chan, Y.J., Liu, S.J., Chong, P., Liu, W.T., Huang, J.C., Chen, Y.M. (2009): Generating and characterizing monoclonal and polyclonal antibodies against avian H5N1 hemagglutinin protein. *Biochem Biophys Res Commun*; 382(4): 691-6. doi:10.1016/j.bbrc.2009.03.119.
- Weldon, W.C., Wang, B.Z., Martin, M.P., Koutsonanos, D.G., Skountzou, I., Compans, R.W. (2010): Enhanced immunogenicity of stabilized trimeric soluble influenza hemagglutinin. *PLoS One*; 5(9). pii: e12466. doi: 10.1371/journal.pone.0012466.
- Wharton, S.A., Belshe, R.B., Skehel, J.J., Hay, A.J. (1994): Role of virion M2 protein in influenza virus uncoating: Specific reduction in the rate of membrane fusion between virus and liposomes by amantadine. *J Gen Virol*; 75(Pt 4): 945-8. doi: 10.1099/0022-1317-75-4-945.
- WHO (2005): WHO global influenza preparedness plan. The role of WHO and recommendations for national measures before and during pandemics. EPIDEMIC ALERT & RESPONSE from http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_5.pdf.
- Wilson, I.A., Cox, N.J. (1990): Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu Rev Immunol*; 8: 737-71. doi: 10.1146/annurev.iy.08.040190.003513.
- Wraith, D.C., Vessey, A.E., Askonas, B.A. (1987): Purified influenza virus nucleoprotein protects mice from lethal infection. *J Gen Virol*; 68(Pt 2): 433-40. doi: 10.1099/0022-1317-68-2-433.
- Yap, K.L., Ada, G.L., McKenzie, I.F. (1978): Transfer of specific cytotoxic T lymphocytes protects mice inoculated with influenza virus. *Nature*; 273(5659): 238-9.
- Ye, Z., Liu, T., Offringa, D.P., McInnis, J., Levandowski, R.A. (1999): Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins. *J Virol*; 73(9): 7467-73.
- Zebedee, S.L., Lamb, R.A. (1988): Influenza A virus M2 protein: Monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol*; 62(8): 2762-2772.
- Zebedee, S.L., Richardson, C.D., Lamb, R.A. (1985): Characterization of the influenza virus M2 integral membrane protein and expression at the infected-cell surface from cloned cDNA. *J Virol*; 56: 502-511.

Zylberman, V., Craig, P.O., Klinke, S., Braden, B.C., Cauerhff, A., Goldbaum, F.A. (2004): High order quaternary arrangement confers increased structural stability to Brucella sp. lumazine synthase. *J Biol Chem*; 279(9): 8093–101. doi: 10.1074/jbc.M312035200.